



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I623552 B

(45) 公告日：中華民國 107 (2018) 年 05 月 11 日

(21) 申請案號：105140707

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 08 日

(51) Int. Cl. :	<i>C07K7/06</i> (2006.01)	<i>C07K14/005</i> (2006.01)
	<i>G01N33/574</i> (2006.01)	<i>G01N33/68</i> (2006.01)
	<i>A61K47/66</i> (2017.01)	<i>A61K49/14</i> (2006.01)
	<i>A61K51/08</i> (2006.01)	<i>C40B30/04</i> (2006.01)
	<i>C40B30/06</i> (2006.01)	

(30) 優先權：2015/12/08 中華民國 104141210

(71) 申請人：財團法人農業科技研究院 (中華民國) AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

新竹市香山區大湖路 51 巷 1 號

(72) 發明人：莊景凱 CHUANG, CHIN-KAI (TW)；蘇郁琇 SU, YU HSYU (TW)；林岱昀 LIN, TAI-YUN (TW)

(74) 代理人：鄭志玲

(56) 參考文獻：

CN 104592352A

Christiansen A et al., Sci Rep. 2015 Aug 6;5:12913.

Fu, Yang. "Identification and Characterization of Novel Ribosomal Protein-binding RNA motifs in Bacteria", MS, Boston College, 2014.

Che YJ et al., Biomicrofluidics. 2015 Oct 15;9(5):054121.

Beck S et al., Biomaterials. 2011 Nov;32(33):8518-28.

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：4 共 31 頁

(54) 名稱

靶向癌幹細胞的胜肽及其用途

CANCER STEM CELL TARGETING PEPTIDE AND USE THEREOF

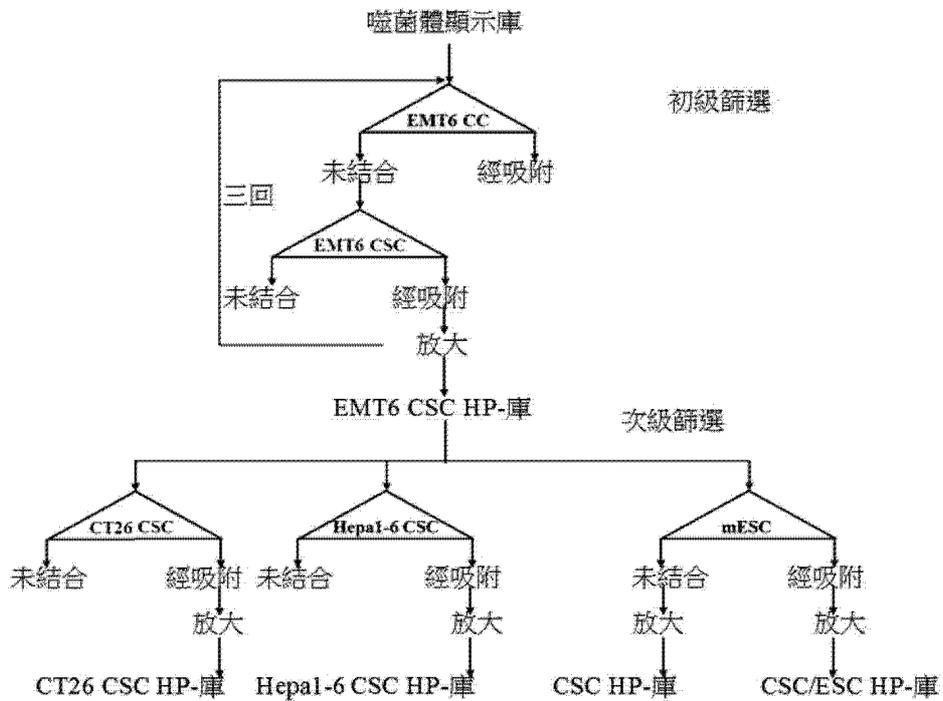
(57) 摘要

本發明係提供一種靶向癌幹細胞的合成胜肽。該胜肽係由 SEQ ID NO：1 至 SEQ ID NO：15 中任一者之胺基酸序列組成。本發明亦提供一種組合物，包含所述合成胜肽，其具有接合至其上之治療劑，以及一醫藥上可接受之載體或稀釋劑。本發明更提供一種篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽的方法。該方法之步驟包含利用噬菌體表現系統建立寡胜肽庫、以癌細胞株之腫瘤實質細胞培養物接觸該庫、以該癌細胞株之癌幹細胞培養物接觸未結合至該腫瘤實質細胞之噬菌體、及由結合至癌幹細胞之噬菌體篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽。

A synthetic peptide that targets cancer stem cells is provided. The peptide consists of the amino acid sequence of anyone of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 15. Also provided is a composition comprising said synthetic peptide with a therapeutic agent fused thereto, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. Further provided is a method of screening a peptide specifically targeting to a cancer stem cell. The method comprises the steps of establishing an oligopeptide library by using a phage expression system, contacting

the library with a culture of bulk tumor cells of a cancer cell line, contacting the phages which do not bind to the bulk tumor cells with a culture of cancer stem cells of said cancer cell line, and screening a peptide specifically targeting to a cancer stem cell from the phages which bind to the cancer stem cells.

指定代表圖：



【圖4A】

【發明說明書】

【中文發明名稱】 靶向癌幹細胞的胜肽及其用途

【英文發明名稱】 CANCER STEM CELL TARGETING PEPTIDE AND USE
THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種靶向癌幹細胞的合成胜肽。本發明亦有關一種醫藥組合物，其包含具有一治療劑的此種合成胜肽。另一方面，本發明係有關於一種篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽的方法。

【先前技術】

【0002】 自從1994年首次發現急性骨髓性白血病(AML)的癌幹細胞(CSC)以來，陸續在乳癌、腦癌、肝癌、結腸癌、肺癌、及胰臟癌中進一步鑑定出CSC的存在。除了正常幹細胞的自我更新活性以外，CSCs尚可抵抗化療、放療、缺氧、及免疫監視療法。此外，CSCs被認為是癌症復發的主要原因。

【0003】 目前仍需特異性靶向癌幹細胞的試劑，以用於治療、造影、及其他目的。

【發明內容】

【0004】 在一方面，本發明提供一種靶向癌幹細胞之合成胜肽，其係由SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 15中任一者之胺基酸序列組成。

【0005】 在本發明之一具體實施例中，所述合成胜肽係用於診斷癌症。根據本發明之一些其他具體實施例，所述胜肽係用於將治療劑靶向癌幹細胞。

【0006】 根據本發明，合成胜肽可接合至可檢測部分。在本發明之部分具體實施例中，可檢測部分為放射線標記、螢光團、或磁造影對比劑。

【0007】 根據本發明，合成胜肽可接合至一治療劑。在本發明之部分較佳具體實施例中，治療劑為抗腫瘤劑。抗腫瘤劑包括但不侷限於，化學治療劑、放射線治療劑或免疫治療劑。

【0008】 另一方面，本發明提供一種組合物，其包含根據本發明之合成胜肽及醫藥上可接受之載體或稀釋劑。較佳地，該合成胜肽接合至一治療劑。

【0009】 又一方面，本發明提供一種篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽的方法，包含利用噬菌體表現系統建立寡胜肽庫、以癌細胞株之腫瘤實質細胞培養物接觸該庫、以該癌細胞株之癌幹細胞或癌幹細胞樣細胞培養物接觸未結合至該腫瘤實質細胞之噬菌體、及由結合至癌幹細胞或癌幹細胞樣細胞之噬菌體篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽。

【0010】 應了解到，上述一般描述及下列詳盡描述係僅在於示例及說明，而非限制本發明。

【圖式簡單說明】

【0011】 前述發明內容與下述發明詳述可結合附圖閱讀，而有更詳盡地理解。為了說明本發明目的，附圖中顯示出目前較佳的具體實施例。

【0012】 在圖式中：

【0013】 圖1A顯示癌幹細胞(CSC)歸巢胜肽(HPs)選擇性結合至CSCs。玫瑰紅B (Rhodamine B)標記之CSC HP1 (Rd-CSC HP-1)與CSC HP2 (Rd-CSC HP-2)，以及FITC標記之CSC HP11 (FITC-CSC HP-11)，係直接用於染色EMT6 CSCs與CCs。細胞以DAPI對比染色。於相同曝光條件下取得螢光影像。

【0014】 圖1B顯示CSC HPs選擇性結合至CSCs。EMT-6、CT26、Hepa1-6、及PANC-1之CSCs係分別以Rd-CSC HP-1、Rd-CSC HP-2、FITC-CSC HP-3、FITC-CSC HP-8、FITC-CSC HP-9、FITC-CSC HP-10、或FITC-CSC HP-11染色。於相同曝光條件下取得螢光影像。

【0015】 圖2顯示CSC HP-hP1-DsRed結合至PANC-1 CCs與CSCs。CSC HP-hP1-DsRed重組型蛋白，最終濃度為25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，係用於染色PANC-1 CCs與CSCs。箭頭代表在PANC-1 CC案例中觀察到的弱信號。

【0016】 圖3A-3F顯示聚醣微陣列與免疫螢光(IF)所分析之CSC HPs標靶。圖3A顯示以生物素標記之CSC HP-hP1的聚醣微陣列分析結果。圖3B顯示生物素標記之CSC HP-9的聚醣微陣列分析結果。圖3C顯示Globo系列聚醣(聚醣26)與乳/新乳(Lacto/Neolacto)系列聚醣(聚醣19)信號之相對強度，其係以15個CSC HPs收集之同一微陣列陽性對照組信號3進行標準化。圖3D顯示自15個CSC HPs之聚醣63與聚醣69信號之相對強度。圖3E顯示自CSC HP-10、CSC HP-11、及CSC HP-hP2 晶片收集之聚醣 66 (Gal- β -1,3-GalNAc- β -)、聚醣 67 (Gal- β -1,3-(Neu5Ac- α -2,6)-GalNAc- β -)、聚醣 68 (Neu5Ac- α -2,6-Gal- β -1,3-GalNAc- β -)、聚醣 69 (Neu5Ac- α -2,6-Gal- β -1,3-(Neu5Ac- α -2,6)-GalNAc- β -)、及聚醣 70 (Neu5Ac- α -2,3-Gal- β -1,3-(Neu5Ac- α -2,6)-GalNAc- β -)信號之相對強度。圖3F為

PANC-1 CSCs上之幹細胞特異性聚醣標記物的IF影像，其係以抗Globo系列(SSEA-4與GbH)、乳/新乳(Lc/nLc)系列(SSEA-1與SSEA-5)、及路易斯Y (Lewis Y)之單株抗體進行。

【0017】 圖4A為流程圖，其顯示自原始M13 PhD7庫之初級篩選，以製備EMT6 CSC HP-庫，以及二級篩選，以產生CT26 CSC HP-庫、Hep1-6 CSC HP-庫、CSC/ESC HP-庫、及CSC HP-庫。

【0018】 圖4B為說明建立PANC-1 CSC HP-庫的流程圖。

【實施方式】

【0019】 除非另有指明，本文使用的所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域技術人員普遍理解的相同含義。

【0020】 在一方面，本發明提供一種靶向癌幹細胞的合成胜肽，其係由SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 15中任一者之胺基酸序列組成。本發明之合成胜肽選擇性或特異性歸巢至癌幹細胞，因此適合以共軛物形式選擇性地將系統性投予之治療劑靶向癌幹細胞。此治療劑之選擇性靶向方式增加藥劑傳送至癌幹細胞之有效量，同時降低藥劑對身體其他細胞或其他部分不良效應的可能性。

【0021】 本文中使用的「癌幹細胞(CSCs)」乙詞係指哺乳類動物(如人類或小鼠)的癌幹細胞。

【0022】 本發明之合成胜肽歸巢至、靶向或特異性結合至CSCs，但並未或極弱地結合至(正常)癌細胞(CCs)。癌幹細胞係指源自包括但不限於，乳癌、肝癌、胰臟癌、及結腸癌等癌症。

【0023】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 SQPTW MF (SEQ ID NO: 1) (亦稱作CSC HP-1)組成。在一具體實施例中，CSC HP-1歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。在另一具體實施例中，CSC HP-1歸巢至、靶向、或特異性結合至結腸癌之CSCs。

【0024】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 GMMSSPP (SEQ ID NO: 2)(亦稱作CSC HP-2)組成。在一具體實施例中，CSC HP-2歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。在另一具體實施例中，CSC HP-2歸巢至、靶向、或特異性結合至結腸癌之CSCs。

【0025】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 FSGGGNH (SEQ ID NO: 3)(亦稱作CSC HP-3)組成。在一具體實施例中，CSC HP-3歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。在另一具體實施例中，CSC HP-3歸巢至、靶向、或特異性結合至結腸癌之CSCs。在另一具體實施例中，CSC HP-3歸巢至、靶向、或特異性結合至肝癌之CSCs。

【0026】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 FPFTKNL (SEQ ID NO: 4)(亦稱作CSC HP-4)組成。在一具體實施例中，CSC HP-4歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。

【0027】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 ATYGNLW (SEQ ID NO: 5)(亦稱作CSC HP-5)組成。在一具體實施例中，CSC HP-5歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。在另一具體實施例中，CSC HP-5歸巢至、靶向、或特異性結合至結腸癌之CSCs。

【0028】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 YHMPALM (SEQ ID NO: 6)(亦稱作CSC HP-6)組成。在一具體實施例中，CSC

HP-6歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。在另一具體實施例中，CSC HP-6歸巢至、靶向、或特異性結合至結腸癌之CSCs。

【0029】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 HGGVRLY (SEQ ID NO: 7)(亦稱作CSC HP-7)組成。在一具體實施例中，CSC HP-7歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。在另一具體實施例中，CSC HP-7歸巢至、靶向、或特異性結合至結腸癌之CSCs。

【0030】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 ELTPLTL (SEQ ID NO: 8)(亦稱作CSC HP-8)組成。在一具體實施例中，CSC HP-8歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。在另一具體實施例中，CSC HP-8歸巢至、靶向、或特異性結合至結腸癌之CSCs。

【0031】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 GPSASRN (SEQ ID NO: 9)(亦稱作CSC HP-10)組成。在一具體實施例中，CSC HP-10歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。

【0032】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 GLAPFNA (SEQ ID NO: 10)(亦稱作CSC HP-11)組成。在一具體實施例中，CSC HP-11歸巢至、靶向、或特異性結合至乳癌之CSCs。

【0033】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 KIYTTLD (SEQ ID NO: 11)(亦稱作CSC HP-9)組成。

【0034】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 NLQPPAY (SEQ ID NO: 12)(亦稱作CSC HP-12)組成。

【0035】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 GPKVTIW (SEQ ID NO: 13)(亦稱作CSC HP-Hp1)組成。在一具體實施例中，CSC HP-Hp1歸巢至、靶向、或特異性結合至胰臟癌之CSCs。

【0036】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 GSPVMSW (SEQ ID NO: 14)(亦稱作CSC HP-Hp2)組成。在一具體實施例中，CSC HP-Hp2歸巢至、靶向、或特異性結合至胰臟癌之CSCs。

【0037】 根據本發明之一具體實施例，合成胜肽係由胺基酸序列 YHQVKPH (SEQ ID NO: 15)(亦稱作CSC HP-Hp3)組成。在一具體實施例中，CSC HP-Hp3歸巢至、靶向、或特異性結合至胰臟癌之CSCs。

【0038】 本發明之合成胜肽可使用常規方法製備或合成，例如，化學合成法。

【0039】 根據本發明之特定具體實施例，合成胜肽係用於診斷癌症。根據本發明之一些其他具體實施例，合成胜肽係用於將治療劑靶向癌幹細胞。

【0040】 根據本發明，合成胜肽可接合至可檢測部分。根據本發明之特定具體實施例，可檢測部分為放射線標記、螢光團、或磁造影對比劑。

【0041】 根據本發明，合成胜肽可接合至治療劑。在本發明之特定較佳具體實施例中，治療劑為抗腫瘤劑。抗腫瘤劑包括但不限於，化學治療劑、放射線治療劑、或免疫治療劑。本文中使用的「免疫治療劑」乙詞係指在治療上可增強或抑制以該藥劑治療之個體之免疫系統的藥劑。

【0042】 上述可檢測部分或治療劑可直接或間接結合或接合至本發明之合成胜肽，例如，經由共價鍵或通過離子鍵結合。

【0043】 另一方面，本發明提供一種組合物，其包含本發明之合成胜肽及醫藥上可接受之載體或稀釋劑。較佳地，合成胜肽係接合至一治療劑。所述組合物可用作醫藥組合物。所述組合物之製備可藉由混合合成胜肽與醫藥上可接受之載體或稀釋劑，或者化學共軛連接胜肽與醫藥上可接受之載體或稀釋劑。

【0044】 本發明之合成胜肽或組合物可靜脈注射投予有需求之個體。

【0045】 又一方面，本發明提供一種篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽的方法，其包含利用噬菌體表現系統建立寡胜肽庫、以癌細胞株之大量(正常)腫瘤細胞培養物接觸該庫之噬菌體、以該癌細胞株之癌幹細胞或癌幹細胞樣細胞之培養物接觸未結合至腫瘤實質細胞之噬菌體、以及由結合至癌幹細胞之噬菌體篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽。

【0046】 根據本發明之較佳具體實施例，癌幹細胞或癌幹細胞樣細胞係源自於瘤球(tumorsphere)(Weiswald *et al.*, *Neoplasia*, 17(1): 1-15 (2015))，其製自正常腫瘤細胞。瘤球可由無血清培養法製備。舉例而言，揭示於Eramo *et al.*, *Cell Death Differentiation*, 15: 504-514 (2008)；Cioce *et al.*, *Cell Cycle*, 9: 2878-2887 (2010)；Cao *et al.*, *BMC Gastroenterol.*, 11: 71 (2011)；或者Chen *et al.*, *Clin. Exp. Metastasis*, 28(8): 751-763 (2011))之方法。

【0047】 在先前技術中，靶向(正常)癌細胞之胜肽或其他實體已得到大多數關注，部分係因少量癌幹細胞可藉由細胞培養取得。此外，根據發明人的知識，目前尚未有人提出篩選未結合至正常癌細胞，而結合至癌幹細胞或癌幹細胞樣細胞之胜肽的策略。然而，發明人意外地發現，經由上述方法並使用源自於瘤球的癌幹細胞或癌幹細胞樣細胞，可有效篩選出特異性結合至癌幹細胞的胜肽。

【0048】 本發明經由以下實例進一步說明，提供實例之目的僅用於說明而非侷限。

【0049】 實例

【0050】 材料及方法

【0051】 1. 癌細胞及癌幹細胞(CSC)培養

【0052】 儘管CSCs可利用表面標記如CD44與CD133富集化，但能選擇性增殖CSCs的實際與簡易方法乃是研究關鍵。一開創性無血清培養法係於2008年建立，其可於懸浮狀態下選擇性增殖人類肺臟CSCs(Eramo *et al.*, *Cell Death Differentiation*, 15: 504-514 (2008))。自此以後，乳房(Cioce *et al.*, *Cell Cycle*, 9: 2878-2887 (2010))、肝臟(Cao *et al.*, *BMC Gastroenterol.*, 11: 71 (2011))、及結腸(Chen *et al.*, *Clin. Exp. Metastasis*, 28(8): 751-763 (2011))之CSCs被報告。CSCs生長成球狀聚集形狀，從而被建議命名為瘤球(Weiswald *et al.*, *Neoplasia*, 17(1): 1-15 (2015))。

【0053】 重組型生長因子係購自PeproTech。小鼠乳癌EMT6、肝癌Hep1-6、及人類胰臟管腺瘤PANC-1細胞株係維持於補充有10% FCS 的DMEM。小鼠結腸癌CT26細胞株係培養於補充有10% FCS 的RPMI1640。CSCs之基礎培養基為DMEM/F12伴隨2 mM麩醯胺酸，且EMT6 CSCs之補充物為25 ng/mL rmEGF、25 ng/mL rmFGF2、5 µg/mL胰島素、4 µg/mL肝素、0.5 µg/mL氫皮質酮、及1% BSA；在CT26 CSCs則為20 ng/mL rmEGF、5 µg/mL胰島素、2% B27、及0.4% BSA；在Hep1-6 CSCs則為20 ng/mL rmEGF、10 ng/mL rmFGF2、2% B27、及1% N2；以及在PANC-1 CSCs則為2% B27與20 ng/mL rhFGF2。欲製備瘤球，癌細胞以低密度(如 $<10^4$ 個細胞/mL)培養於無血清培養基。於培養7天

後，以40 μm 之細胞過濾器收取瘤球，並於室溫下以900 $\times\text{g}$ 離心5分鐘。以胰蛋白酶將瘤球團粒分離成單一細胞，之後再經7天將所得細胞擴增成瘤球。每隔一天補充生長因子，並以第三至第五回擴展之經分離瘤球進行實驗。

【0054】 2. M13噬菌體顯示法

【0055】 M13 PhD-7庫(NEB, E8100)係購自New England Biolabs Inc.，其含有 10^9 個獨立殖株。溶於10 mL DMEM之 10^{13} 個溶菌斑形成單位(pfus)之M13 PhD-7噬菌體係於T75培養瓶中預先以癌細胞吸附二次，每次1小時。接著，將上清液移至T25培養瓶，內含 5×10^6 個CSCs，並培養1小時。利用離心移除未結合及結合能力差的噬菌體，並於DMEM/0/2% BSA中懸浮三次。細胞團粒懸浮於1 mL PBS，內含 10^9 個大腸桿菌ER2738，並於振盪器中培養1小時。之後，加入10 mL LB/5 mM MgCl_2 。於37°C下培養整夜後，離心移除細胞，將上清液中之噬菌體滴定。前述選擇程序係以EMT6與PANC-1進行三回，以分別取得初級EMT6 CSC歸巢胜肽(HP)-及PANC-1 CSC HP-庫。隨後，挑選M13溶菌斑，以製備定序用DNA。EMT6 CSC HP-庫係進一步再以CT26 CSCs、Hepa1-6 CSCs、及小鼠胚胎幹細胞(mESC)擇取，以製備次級CT26 CSC HP-、Hepa1-6 CSC HP-、及CSC/ES HP-庫。收集mESC吸附後之未結合部分，並定為CSC PH-庫。參見圖4A與4B。

【0056】 3. CSC HPs結合至CSCs

【0057】 以20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之玫瑰紅B標記之CSC HP1 (Rd-CSC HP-1)與CSC HP2 (Rd-CSC HP-2)及FITC標記之CSC HP11 (FITC-CSC HP-11)直接染色EMT6 CSCs與CCs。細胞以DAPI進行對比染色。

【0058】 4. 聚醣微陣列分析

【0059】 N端生物素共軛連接之CSC HPs，其序列如下表A所示，係由GeneDirex合成，其純度高於95%。生物素-CSC HPs係溶於DMSO並製成10 mg/mL儲液。

【0060】 表A. 生物素標記之CSC HPs

名稱	序列
生物素標記之 CSC HP-1	生物素-GGSQPTWMF (生物素-GG-SEQ ID NO: 1)
生物素標記之 CSC HP-2	生物素-GGMMSSPP (生物素-G-SEQ ID NO: 2)
生物素標記之 CSC HP-3	生物素-GGFSGGGNH (生物素-GG-SEQ ID NO: 3)
生物素標記之 CSC HP-4	生物素-GGFPFTKNL (生物素-GG-SEQ ID NO: 4)
生物素標記之 CSC HP-5	生物素-GGATYGNLW (生物素-GG-SEQ ID NO: 5)
生物素標記之 CSC HP-6	生物素-GGYHMPALM (生物素-GG-SEQ ID NO: 6)
生物素標記之 CSC HP-7	生物素-GGHGGVRLY (生物素-GG-SEQ ID NO: 7)
生物素標記之 CSC HP-8	生物素-GGELTPLTL (生物素-GG-SEQ ID NO: 8)
生物素標記之 CSC HP-9	生物素-GGKIYTTLD (生物素-GG-SEQ ID NO: 11)
生物素標記之 CSC HP-10	生物素-GGPSASRN (生物素-G-SEQ ID NO: 9)
生物素標記之 CSC HP-11	生物素-GGLAPFNA (生物素-G-SEQ ID NO: 10)
生物素標記之 CSC HP-12	生物素-GGNLQPPAY (生物素-GG-SEQ ID NO: 12)
生物素標記之 CSC HP-hP1	生物素-GGPKVTIW (生物素-G-SEQ ID NO: 13)
生物素標記之 CSC HP-hP2	生物素-GGSPVMSW (生物素-G-SEQ ID NO: 14)
生物素標記之 CSC HP-hP3	生物素-GGYHQVKPH (生物素-GG-SEQ ID NO: 15)

【0061】 聚醣陣列100微晶片 (Cat. # GA-Glycan-100)係購自RayBiotech，並按照製造商說明進行些許修改。簡言之，在以400 μ L樣本稀釋劑(項目E)於室溫下阻斷30分鐘後，以樣本稀釋劑將生物素共軛連接之CSC HPs稀釋至1 μ g/400 μ L，並於室溫下進行雜交反應2小時。於清洗後，將400 μ L之1 \times Cy3-共軛連接之鏈黴親和素(streptavidin)加入各孔中。以塑料膠帶覆蓋培養室，並以鋁箔覆蓋載玻片，避免於暗房培養時曝光。載玻片與Cy3-共軛連接之鏈黴親和素於室溫下培養1小時，伴隨輕柔搖動或搖晃。徹底清洗後，使載玻片徹底排洩，並以雷射掃描儀Axon GenePix讀取其上之螢光信號。聚醣X之相對強度係定義為(X之平均值 - 陰性對照組)/(陽性對照組 - 陰性對照組) \times 100%。

【0062】 5. 免疫螢光(IF)試驗

【0063】 初級抗體兔多株抗CD44 (GTX102111)、抗E-鈣黏蛋白(E-cadherin)(GTX61823)與抗CDSN (GTX110093)及小鼠單株抗SSEA-1 (IgM, GTX48038)、抗SSEA-5 (IgG, GTX70019)、及抗路易斯Y (IgM, GTX75903)係

購自GeneTex；小鼠單株抗SSEA-4 (IgG, 90230)、抗TRA-1-60與TRA-1-81 (IgM, 90232)係購自Millipore；小鼠單株抗GbH (IgM, ALX-804-550)係購自Enzo。次級抗體DyLight594-共軛連接之山羊抗兔IgG (111-515-144)與DyLight488-共軛連接之驢抗小鼠IgG (715-485-151)係購自Jackson Lab.；DyLight594-共軛連接之山羊抗小鼠IgM (GTX76754)係購自GeneTex。癌細胞與瘤球係以4%聚甲醛/PBS固定，並以0.5% NP-40/1% BSA/PBS (PBSNB)透化(permeabilized)。隨後，以初級抗體培養細胞二小時，其係以PBSNB稀釋50至100倍。細胞以0.05% NP-40/PBS (PBSN)清洗4次後，接著以次級抗體(1/200稀釋於PBSNB)培養2小時。在以PBSN清洗4次及以水簡易清洗一次後，細胞以DAPI封固。

【0064】 實例1：小鼠EMT6、CT26、及Hepa1-6 CSCs之鑑定

【0065】 以M13噬菌體顯示之特異於癌幹細胞之胜肽的選擇標準取決於CSCs與癌細胞(CCs)間之表面特徵差異。以瘤球形式製備之小鼠EMT6、CT26、及Hepa1-6 CSCs (數據未顯示)係藉由檢查特異性幹細胞表面標記進行鑑定。幹細胞表面標記TRA-1-60係高度表現於所有三CSCs之上，但其在相對應之CCs上表現量低或未檢出，而以組成性表現之表面蛋白角化粒(corneodesmosin；CDSN)在CSCs與CCs兩者皆可檢出(數據未顯示)。除了SSEA-4之外，其在EMT6 CSCs上顯示弱表現，所有的人類CSC一般標記，CD44與E-鈣黏蛋白，以及多能幹細胞標記，SSEA-1、SSEA-5、TRA-1-60、及TRA-1-81，經證實在所有三小鼠CSCs上為強表現(數據未顯示)。

【0066】 實例2：初級EMT6 CSC HP-庫

【0067】 欲探究CSC特異性HPs，M13 PhD7七胜肽庫係以EMT6 CCs預先吸附，以移除一般癌症HPs，隨後將游離噬菌體轉移至EMT6 CSCs以進行正向選

擇(positive selection)。結合於EMT6 CSCs之噬菌體係經捕捉，並利用大腸桿菌 ER2738放大。前述選擇程序係進行三回，以製備富集之初級EMT6 CSC HP庫。隨機挑選獨立之溶菌斑，且讀取31個有效序列並摘錄於下表1。

【0068】 表1：初級與次級CSC HP-庫檢測之CSC HP序列次數

CSC HPs		初級	次級			
名稱	序列	EMT6 (n=31)	CT26 (n=20)	Hepa1-6 (n=10)	CSC/ESC (n=20)	CSC (n=20)
CSC HP-1	SQPTWMF	10	6		11	8
CSC HP-2	GMMSSPP	6	3		1	1
CSC HP-3	FSGGGNH	5	1	10	1	1
CSC HP-4	FPFTKNL	3			2	2
CSC HP-5	ATYGNLW	2	1		1	2
CSC HP-6	YHMPALM	1	1		1	2
CSC HP-7	HGGVRLY	1	1		1	2
CSC HP-8	ELTPLTL	1	7		2	
CSC HP-9	KIYTTLD					1
CSC HP-10	GPSASRN	1				
CSC HP-11	GLAPFNA	1				
CSC HP-12	NLQPPAY					1

【0069】 胜肽SQPTWMF (稱作CSC HP-1) (SEQ ID NO: 1)、GMMSSPP (稱作CSC HP-2) (SEQ ID NO: 2)、FSGGGNH (稱作CSC HP-3) (SEQ ID NO: 3)、FPFTKNL (稱作CSC HP-4) (SEQ ID NO: 4)、及ATYGNLW (稱作CSC HP-5) (SEQ ID NO: 5)分別發生10、6、5、3、及2次。胜肽YHMPALM (稱作CSC HP-6) (SEQ ID NO: 6)、HGGVRLY (稱作CSC HP-7) (SEQ ID NO: 7)、ELTPLTL (稱作CSC HP-8) (SEQ ID NO: 8)、GPSASRN (稱作CSC HP-10) (SEQ ID NO: 9)、及GLAPFNA (稱作CSC HP-11) (SEQ ID NO: 10)發生一次。由於M13 PhD7庫估計含有 10^9 個獨立殖株，可得出結論，選擇程序非常有效。

【0070】 實例3：次級CT26 CSC HP-、Hepa1-6 CSC HP-、CSC/ESC HP-、及CSC HP-庫

【0071】 初級CSC HP-庫以CT26或Hepa1-6 CSCs直接篩選一次，以測試CSC HP對不同類型癌症親合性之偏性。如表1所示，CSC HP-8與CSC HP-3分別對CT26與Hepa1-6 CSCs更具特異性。CSCs與胚胎幹細胞(ESCs)間之CSC HP親合性偏性係另一有趣議題。CSC HP-1係進一步於ESC結合部分中富集(CSC/ESC-HP-庫)。於ESC未結合部分(CSC HP-庫)讀取到二新穎胜肽序列，KIYTTLD (CSC HP-9) (SEQ ID NO: 11)與NLQPPAY (CSC HP-12) (SEQ ID NO: 12)(表1)。

【0072】 實例4：CSC HPs與CSCs間之交互作用

【0073】 依據上述結果，選取CSC HP-1、CSC HP-2、CSC HP-3、CSC HP-8、CSC HP-9、CSC HP-10、及CSC HP-11，並以化學合成方式於N端共軛連接玫瑰紅B或螢光素(fluorescein)。所有該等胜肽特異性結合至EMT6、CT26、及Hepa1-6 CSCs。其於平行CC實驗中未被檢測出(圖1A與圖1B)。感興趣之處為，測定該等源自小鼠癌症之CSC HPs是否能辨識人類CSCs。由人類胰腺癌細胞株PANC-1製成之瘤球發現明確地與七個胜肽結合(圖1B)。

【0074】 實例5：初級PANC-1 CSC HP庫

【0075】 若由小鼠CSCs選擇之CSC HPs可與人類CSCs交叉反應，則由人類CSCs選擇之CSC HPs能否與小鼠CSCs結合? 遵照類似程序進行EMT6 CSC HP篩選，在以人類胰腺PANC-1 CCs進行負向選擇及以PANC-1 CSCs進行正向選擇三回之後，建立初級PANC-1 CSC HP-庫。隨機揀取獨立溶菌斑，並讀取20個有效序列。胜肽GPKVTIW (定為CSC HP-hP1)、GSPVMSW (CSC HP-hP2)、及YHQVKPH (CSC HP-hP3)分別發生17、2、及1次。參見下表2。

【0076】 表2. 初級PANC-1CSC HP-庫檢測之CSC HP序列次數

CSC HP		初級
名稱	序列	PANC-1 (n=20)
CSCHP-hP1	GPKVTIW (SEQ ID NO: 13)	17
CSCHP-hP2	GSPVMSW (SEQ ID NO: 14)	2
CSCHP-hP3	YHQVKPH (SEQ ID NO: 15)	1

【0077】 CSC HP-hP系列之胺基酸序列未相符於彼等小鼠CSC HPs。除了化學合成之FITC-CSC HP-hP1以外，其可選擇性地結合人類與小鼠CSCs兩者(數據未顯示)，製備CSC HP-hP1-DsRed重組型蛋白，以測試CSC HP-hP1與PANC-1 CSCs間之交互作用是否受大分子攜帶接合至CSC HP-hP1胜肽C端之影響。經顯示，CSC HP-hP1-DsRed重組型蛋白選擇性地結合至PANC-1 CSCs，而CCs內一些細胞亦可以重組型蛋白染色，如圖2之箭頭所指。

【0078】 實例6：CSC HPs之標靶

【0079】 經開發之CSC HPs可區別CSCs與CCs，且發現其於人類與小鼠之間呈現跨物種(cross-species)現象。極有趣之處在於釐清該等CSC HPs之標靶。於硝酸纖維素膜上未有可檢測出之殘留的FITC-CSC HPs螢光信號，其係以SDS PAGE分離並以CSC膜蛋白墨染(數據未顯示)。於聚醣微陣列(聚醣陣列100微晶片)，其上以100種寡醣染點4次，用以分析寡醣與CSC HPs間之交互作用的可能性。表2所列之生物素-CSC HPs係於晶片上與聚醣雜交。利用Cy3-共軛連接之鏈黴親和素探查晶片上捕捉之生物素-CSC HPs，並以雷射掃描儀讀取其上之螢光信號。兩個主要型態係繪製於圖3A-3F。第一者包括聚醣16 (Gal-β-1,4-Glc-β-)、18 (Gal-α-1,4-Gal-β-1,4-Glc-β-)、及26 (GalNAc-β-1,3-Gal-α-1,4-Gal-β-1,4-Glc-β-) Globo系列(圖3A)。典型案例為CSC HP-1與CHC HP-hP1 (圖3C)。除了Globo系列信號以外，第二個主要型態涉及聚醣19 (GlcNAc-β-1,3-Gal-β-1,4-Glc-β-)，其為乳

/異乳三醣骨架)，其程度類似聚醣26 (圖3B)。典型案例為CSC HP5、CSC HP6、CSC HP7、及CSC HP9 (圖3C)。亦可檢測兩個惡性與轉移聚醣標記，聚醣63 (Fuc- α -1,2-Gal- β -1,4-(Fuc- α -1,3)-GlcNAc- β -，亦稱作路易斯Y表位)與聚醣69 (Neu5Ac- α -2,6-Gal- β -1,3-(Neu5Ac- α -2,6)-GalNAc- β -)。CSC HP-1與CSC HP-hP1表現較高之聚醣63信號，CSC HP-9、CSC HP-10、CSC HP-11、CSC HP-hP2、及CSC HP-hP3表現較高之聚醣69信號(圖3D)。兩個Neu5Ac- α -2,6-殘基皆係CSC HPs結合所需(圖3E)。依據前述結果，製備人類胰腺癌細胞PANC-1之CSCs，且Globo系列之CSC聚醣標記，SSEA-4與GbH、乳/異乳系列之CSC聚醣標記，SSEA-1與SSEA-5、及路易斯Y皆可藉由IF試驗於PANC-1 CSCs上證實，如圖3F所示。

【0080】 依據聚醣微陣列數據，CSC HP-1與CSC HP-hP1強力及特異性結合至聚醣26，其係四醣之Globo根結構(root structure)。另一方面，CSC HP5、CSC HP6、CSC HP7、及CSC HP9強力結合至聚醣19，其係乳與新乳根結構四醣類之核心三醣。CSC HP-3與CSC HP-8被認為分別特異於肝臟與結腸之CSCs，發現弱結合至聚醣26。CSC HP-1與CSC HP-hP1係更強力結合至聚醣63，路易斯Y表位，的兩個CSC HP成員。

【符號說明】

【0081】 無

【生物材料寄存】

【0082】 無

序列表

<110> 財團法人農業科技研究院

<120> 靶向癌幹細胞的胜肽及其用途

<130> 0637/ATI0021TW-1

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 1

Ser Gln Pro Thr Trp Met Phe
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 2

Gly Met Met Ser Ser Pro Pro
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 3

Phe Ser Gly Gly Gly Asn His
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 4

Phe Pro Phe Thr Lys Asn Leu
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 5

Ala Thr Tyr Gly Asn Leu Trp
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 6

Tyr His Met Pro Ala Leu Met
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 7

His Gly Gly Val Arg Leu Tyr
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 8

Glu Leu Thr Pro Leu Thr Leu
1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 9

Gly Pro Ser Ala Ser Arg Asn
1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 10

Gly Leu Ala Pro Phe Asn Ala
1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 11

Lys Ile Tyr Thr Thr Leu Asp
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 12

Asn Leu Gln Pro Pro Ala Tyr

1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 13

Gly Pro Lys Val Thr Ile Trp
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 14

Gly Ser Pro Val Met Ser Trp
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向癌幹細胞的胜肽

<400> 15

Tyr His Gln Val Lys Pro His
1 5

**公告本**

申請日: 105/12/08

IPC分類: *C07K 7/06* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 47/66 (2017.01)
A61K 49/14 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01)
C40B 30/06 (2006.01)**【發明摘要】****【中文發明名稱】** 靶向癌幹細胞的胜肽及其用途**【英文發明名稱】** CANCER STEM CELL TARGETING PEPTIDE AND USE

THEREOF

【中文】

本發明係提供一種靶向癌幹細胞的合成胜肽。該胜肽係由SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 15中任一者之胺基酸序列組成。本發明亦提供一種組合物，包含所述合成胜肽，其具有接合至其上之治療劑，以及一醫藥上可接受之載體或稀釋劑。本發明更提供一種篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽的方法。該方法之步驟包含利用噬菌體表現系統建立寡胜肽庫、以癌細胞株之腫瘤實質細胞培養物接觸該庫、以該癌細胞株之癌幹細胞培養物接觸未結合至該腫瘤實質細胞之噬菌體、及由結合至癌幹細胞之噬菌體篩選特異性靶向癌幹細胞之胜肽。

【英文】

A synthetic peptide that targets cancer stem cells is provided. The peptide consists of the amino acid sequence of anyone of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 15. Also provided is a composition comprising said synthetic peptide with a therapeutic agent fused thereto, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. Further provided is a method of screening a peptide specifically targeting to a cancer stem cell. The method comprises the steps of establishing an oligopeptide library by using a phage expression system, contacting the library with a culture of bulk tumor cells of a cancer cell line, contacting the phages which do not bind to the bulk tumor cells with a culture

of cancer stem cells of said cancer cell line, and screening a peptide specifically targeting to a cancer stem cell from the phages which bind to the cancer stem cells.

【指定代表圖】 圖4A

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

of cancer stem cells of said cancer cell line, and screening a peptide specifically targeting to a cancer stem cell from the phages which bind to the cancer stem cells.

【指定代表圖】 圖4A

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明申請專利範圍】

- 【第1項】 一種靶向癌幹細胞之合成胜肽，其係選自於由SEQ ID NOS: 4-6、8-9及11-15之胺基酸序列組成之群組。
- 【第2項】 如請求項1之合成胜肽，其係用於診斷癌症。
- 【第3項】 如請求項1之合成胜肽，其係用於將治療劑靶向癌幹細胞。
- 【第4項】 如請求項1之合成胜肽，其係接合至一可檢測部分。
- 【第5項】 如請求項1之合成胜肽，其係接合至一治療劑。
- 【第6項】 如請求項4之合成胜肽，其中該可檢測部分係放射線標記、螢光團、或磁造影對比劑。
- 【第7項】 如請求項5之合成胜肽，其中該治療劑係抗腫瘤劑。
- 【第8項】 如請求項7之合成胜肽，其中該抗腫瘤劑係化學治療劑、放射線治療劑、或免疫治療劑。
- 【第9項】 一種組合物，其包含如請求項5之合成胜肽及醫藥上可接受之載體或稀釋劑。