

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2025-511684  
(P2025-511684A)

(43)公表日 令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	4 C 0 7 6
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	4 C 2 0 6
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65	4 H 0 4 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全51頁) 最終頁に続く		
(21)出願番号	特願2024-559077(P2024-559077)	(71)出願人	522189872	
(86)(22)出願日	令和5年4月6日(2023.4.6)		ツインピッグ バイオラブ インコーポレ	
(85)翻訳文提出日	令和6年12月3日(2024.12.3)		イテッド	
(86)国際出願番号	PCT/KR2023/004674		Twinpig Biolab, Inc.	
(87)国際公開番号	WO2023/195802		大韓民国 0 2 4 4 7 ソウル トンデム	
(87)国際公開日	令和5年10月12日(2023.10.12)		ン - グ キョンヒデ - ロ 2 3 6 フロア	
(31)優先権主張番号	10-2022-0043200		6 0 7 ホ	
(32)優先日	令和4年4月7日(2022.4.7)	(74)代理人	100091683	
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 吉 川 俊雄	
	韓国(KR)	(74)代理人	100179316	
(31)優先権主張番号	10-2022-0043573		弁理士 市川 寛奈	
(32)優先日	令和4年4月7日(2022.4.7)	(72)発明者	ベ, ヒヨンス	
(33)優先権主張国・地域又は機関			大韓民国 0 5 2 2 9 , ソウル, ガンド	
	韓国(KR)		ン - グ, アリス - ロ 5 0 - ギル, 5 0	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		, # 1 1 0 - 9 0 1	
		最終頁に続く	最終頁に続く	

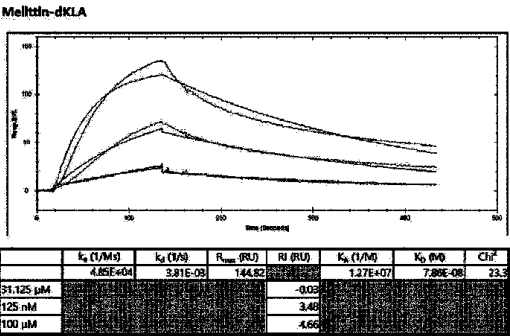
(54)【発明の名称】 新規ペプチドベースの免疫抗癌剤

(57)【要約】

本発明は、新規ペプチドベースの免疫抗癌剤に関するものであって、メリチン、その変異体またはこれらの類似体、またはこれらと薬物が連結された複合体の免疫抗癌剤用途に関するものであって、本発明におけるメリチン、その変異体またはこれらの類似体は、M 2 腫瘍関連マクロファージの細胞膜に発現される I T G B 2 に特異的に結合し、M 2 腫瘍関連マクロファージを死滅させ、メリチン、その変異体またはこれらの類似体に薬物としてプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された複合体が前記のM 2 腫瘍関連マクロファージのアポトーシス効果を著しく増加させるため、これを腫瘍の生長と転移を抑制用抗癌組成物として活用することができる。

。

【選択図】 図 1 7



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体を有効成分として含む、腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophages、TAM) を除去するための薬学的組成物。

## 【請求項 2】

腫瘍関連マクロファージは、IGBT2 (Integrin beta 2) を発現する M2 腫瘍関連マクロファージである、請求項 1 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

10

## 【請求項 3】

メリチン、その変異体またはこれらの類似体が CD18 が拡張された (extended) 活性型構造 (Active conformation) に特異的に結合する、請求項 1 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

## 【請求項 4】

メリチン、その変異体またはこれらの類似体が ITGB2 の 449466 ~ 565 のアミノ酸に結合する、請求項 1 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

## 【請求項 5】

20

メリチンは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

## 【請求項 6】

メリチンの変異体は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

## 【請求項 7】

リンカーにより結合された、請求項 1 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

## 【請求項 8】

リンカーは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

30

## 【請求項 9】

配列番号 5 または 6 のアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 1 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

## 【請求項 10】

プロアポトーシス性ペプチドは、KLA、アルファ - ディフェンシン - 1 (alpha - defensin - 1)、BMAP - 28、Brevenin - 2R、ブフォリン IIb (Buforin IIb)、セクロピン A - マガイニン 2 (cecropin A - Magainin 2、CA - MA - 2)、セクロピン A (Cecropin A)、セクロピン B (Cecropin B)、クリソフィシン - 1 (chrysopsin - 1)、D - K6L9、ゴメシン (Gomesin)、ラクトフェリシン B (Lactoferricin B)、LLL27、LTX - 315、マガイニン 2 (Magainin 2)、マガイニン II - ボンベシン結合体 (Magainin II - bombesin conjugate、MG2B)、パルダキシシン (Pardaxin) およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

40

## 【請求項 11】

抗癌剤は、SN - 38 (7 - エチル - 10 - ヒドロキシ - カンプトテシン、7 - Ethyl - 10 - hydroxy - camptothecin)、ダウノルビシン (daunorubicin)、ドキソルビシン (doxorubicin)、エピルビシン (ep

50

irubicin)、イダルビシン(idarubicin)、ピクサントロン(pixantrone)、サバルビシン(sabarubicin)、バルルビシン(valrubicin)、パクリタキセル(paclitaxel)、ドセタキセル(docetaxel)、メクロレタミン(mechloethamine)、クロラムブシル(chlorambucil)、フェニルアラニン(phenylalanine)、マスタード(mustard)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、イホスファミド(ifosfamide)、カルムスチン(carmustine: BCNU)、ロムスチン(lomustine: CCNU)、ストレプトゾトシン(streptozotocin)、ブスルファン(busulfan)、チオテパ(thiotepa)、シスプラチン(cisplatin)、カルボプラチン(carboplatin) 10  
 、ダクチノマイシン(dactinomycin: actinomycin D)、プリカマイシン(pli camycin)、マイトマイシンC(mitomycin C)、ビンクリスチン(vincristine)、ビンブラスチン(vinblastine)、テニポシド(teniposide)、トポテカン(topotecan)、イリノテカン(iridotecan)、ウラムスチン(uramustine)、メルファラン(melphalan)、ベンダムスチン(bendamustine)、ダカルバジン(dacarbazine)、テモゾロミド(temozolomide)、アルトレタミン(al tretamine)、デュオカルマイシン(duo carmycin)、ネダプラチン(nedaplatin)、オキサリプラチン(oxaliplatin) 20  
 、サトラプラチン(satraplatin)、トリプラチンテトラナイトレート(triplatin tetranitrate)、5 - フルオロウラシル(5 - fluorouracil)、6 - メルカプトプリン(6 - mercaptopurine)、カペシタビン(capecitabine)、クラドリビン(cladribine)、クロファラビン(clofarabine)、シスタルビン(cystarbine)、フロクスウリジン(floxuridine)、フルダラビン(fludarabine)、ゲムシタビン(gemcitabine)、ヒドロキシウレア(hydroxyurea)、メトトレキサート(methotrexate)、ペメトレキセド(pemetrexed)、ペントスタチン(pentostatin)、チオグアニン(thioguanine)、エトポシド(etoposide)、ミトキサントロン(mitoxantrone)、イキサベピロン(izabepilone)、ビンデシン(vindesine) 30  
 、ビノレルビン(vinorelbine)、エストラムスチン(estramustine)、メイタンシン(maytansine)、DM1(mertansine、メルタンシン)、DM4、ドラスタチン(dolastatin)、アウリスタチンE(auristatin E)、アウリスタチンF(auristatin F)、モノメチルアウリスタチンE(monomethyl auristatin E、MMAE)、モノメチルアウリスタチンF(monomethyl auristatin F) およびこれらの誘導体からなる群から選択される、請求項1に記載の腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物。

【請求項12】

メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌 40  
 剤が結合された結合体を有効成分として含む、癌の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項13】

癌は、脳腫瘍、黒色腫、骨髄腫、非小細胞性肺癌、口腔癌、肝臓癌、胃癌、結腸癌、乳癌、三重陰性乳癌(Triple Negative Breast Cancer、TNBC)、肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部または頸部癌、子宮頸部癌、卵巣癌、大腸癌、小腸癌、直腸癌、卵管癌、肛門付近癌、子宮内膜癌、陰癌、外陰癌、ホジキン病(Hodgkin's disease)、食道癌、リンパ腺癌、膀胱癌、胆嚢癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性または急性白血病、リンパ球リンパ腫、腎臓または尿管癌、腎細胞癌、腎臓骨盤癌、中枢神経系腫瘍、一次中枢神経系リンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫および下垂体腺腫からなる群か 50

ら選択されるいずれか一つ以上である、請求項 1 2 に記載の癌の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項 1 4】

癌は、抗癌剤耐性癌である、請求項 1 2 に記載の癌の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項 1 5】

M 0 マクロファージおよび M 1 マクロファージに比べて、M 2 マクロファージにて I T G B 2 の発現が上方制御された患者を対象として投与するものである、請求項 1 2 に記載の癌の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項 1 6】

メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体を薬学的に有効な量で癌に罹患したオブジェクトに投与する段階を含む、癌の治療方法。 10

【請求項 1 7】

癌の予防および治療用薬学的組成物の製造に用いるための、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体の用途。 。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規ペプチドベースの免疫抗癌剤に関するものであって、メリチン、その変異体またはこれらの類似体、またはこれらと薬物が結合された複合体の免疫抗癌剤の用途に関するものである。 20

【背景技術】

【0 0 0 2】

既存の抗癌治療は、癌細胞を直接攻撃したり、癌細胞を攻撃する体内の免疫細胞の活性を強化させる方向で研究されてきた。しかし、このような抗癌剤は、癌細胞以外の他の正常な細胞もまた攻撃をし、脱毛、吐き気、嘔吐などの多くの副作用を引き起こし、免疫細胞の過度な増加による付加的な反応をもたらす。既存の化学的療法や放射線療法に比べて副作用を最小化することができる抗癌免疫療法は、体内の免疫システムを用いて癌を治療する方法であり、このような抗癌免疫療法の内には、治療用免疫細胞である T 細胞 ( C A R - T 含む )、樹状細胞 ( D e n d r i t i c C e l l s )、ナチュラルキラー細胞 ( N a t u r a l K i l l e r C e l l s ) などを体外で活性化させた後に、体内に直接注入する細胞療法と癌抗原と免疫活性化物質を体内に注入することによって、体内に存在する免疫細胞を直接活性化することで抗癌効能を高める抗癌ワクチンに対する方法などが活発に進められている。しかし、このような細胞療法や癌ワクチンは、主に血液癌関連の疾患に主に用いられており、固形癌ではほとんどがその治療効能が極めて低いという短所がある。このような理由のうちの一つは、固形癌の周囲で免疫機能を抑制する微小環境要因に起因する。実際、腫瘍微小環境において、免疫細胞の機能を低下させる細胞 ( M D S C : m y e o l o i d - d e r i v e d s t r o m a l c e l l s、T r e g : r e g u l a t o r y T c e l l、T A M : t u m o r - a s s o c i a t e d m a c r o p h a g e s ) や免疫抑制誘発サイトカイン、代謝物などが活発に作用することによって、免疫活性化物質と治療用免疫細胞の活性を急激に低下させるものである。したがって、腫瘍細胞および免疫細胞に直接的な影響なしに腫瘍細胞の周囲の微小環境のみを調節し、腫瘍細胞への影響分供給、腫瘍細胞周囲の血管新生などを遮断し、抗癌効果を有する治療剤の開発が重要となっている。腫瘍微小環境は、悪性細胞の増殖および生存、血管新生、転移、異常な適応免疫およびホルモンおよび化学療法剤に対する反応減少に寄与し、治療目標として大いに考慮されている。 30 40

【0 0 0 3】

腫瘍周囲の微小環境 ( m i c r o e n v i r o n m e n t ) は、内皮細胞、炎症性細胞および線維芽細胞から構成されており、1 9 7 0 年代に腫瘍関連マクロファージ ( t u m o 50

r - a s s o c i a t e d m a c r o p h a g e、T A M ) が腫瘍の成長において重要な役割を果たすことが明らかになった。腫瘍関連マクロファージは、癌の成長、転移などの全般的な腫瘍微小環境と関連し、重要な役割を担っており、腫瘍抑制 M 1 型マクロファージまたは腫瘍支持 M 2 型マクロファージの二つの表現型に分類される。M 1 型マクロファージは、抗原を提示する強力な能力を有し、一般にインターフェロン - 、リポ多糖 ( L P S )、腫瘍壊死因子 ( T N F ) - によって活性化され、炎症誘発性作用および殺菌作用をする。M 2 型マクロファージは、多様な細胞外マトリックス成分、血管新生および走化性因子を放出することによって、免疫抑制、腫瘍形成および血管形成を促進することが知られている。一般に、I L - 4 と I L - 1 3 によって誘導され、アルギナーゼ - 1、mannose ( M M R、C D 2 0 6 )、スカベンジャー受容体 ( S R - A、C D 2 0 4、C D 1 6 3、I L - 1 0 などのようなマーカーを発現することにより、M 1 型腫瘍関連マクロファージと区別される。腫瘍周囲に存在する腫瘍関連マクロファージは、腫瘍細胞の成長、転移と密接に関連しており、癌患者において、多数の M 2 型腫瘍関連マクロファージが腫瘍周囲に存在すると、患者の予後および生存率が良くないことが報告されている。2 型マクロファージは、癌の成長を促進する I L - 1 0、T G F および C C L 1 8 のようなサイトカインを生成し、M 2 型腫瘍関連マクロファージの表面に存在する P D L 1 および B 7 - 1 / 2 のような受容体は、T 細胞、N K 細胞の抗腫瘍活性を抑制することが報告されている。M 2 型腫瘍関連マクロファージが多量存在する微小環境では、腫瘍の成長、分化および転移が活発になされるので、M 2 型腫瘍関連マクロファージを標的とする標的治療剤の開発が必要である。

10

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0004】

本発明の目的は、腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物を提供することである。

#### 【0005】

また、本発明の目的は、癌の予防または治療用薬学的組成物を提供することである。

#### 【0006】

また、本発明の目的は、癌の治療方法を提供することである。

#### 【0007】

併せて、本発明の目的は、本発明における結合体の癌の予防および治療用薬学的組成物の製造に用いるための用途を提供することである。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

前記目的を達成するために、本発明は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体を有効成分として含む、腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージを除去するための薬学的組成物を提供する。

#### 【0009】

また、本発明は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体を有効成分として含む、癌の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

40

#### 【0010】

また、本発明は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体を薬学的に有効な量で癌に罹患したオブジェクトに投与する段階を含む、癌の治療方法を提供する。

#### 【0011】

併せて、本発明は、癌の予防および治療用薬学的組成物の製造に用いるための、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体の用途を提供する。

#### 【発明の効果】

50

## 【 0 0 1 2 】

本発明におけるメリチン、その変異体またはこれらの類似体は、M2腫瘍関連マクロファージの細胞膜に発現されるITGB2に特異的に結合し、M2腫瘍関連マクロファージを死滅させ、メリチン、その変異体またはこれらの類似体に薬物としてプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された複合体が、前記のM2腫瘍関連マクロファージのアポトーシス効果を著しく増加させるので、これを腫瘍の生長と転移の抑制用抗癌組成物として活用することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 1 3 】

【図1a】TAMpepのM2マクロファージに対する親和度をフローサイトメトリーにより確認した図である。 10

【図1b】TAMpepのM2マクロファージに対する親和度を定量化したグラフである（\* $P < 0.05$  versus the M0.）。

【図2a】M2/M0およびM1/M0の比率のベンダイアグラム解析により、M2マクロファージにてTAMpepと結合するタンパク質を識別した図である。

【図2b】M2/M0の比率のスクATTERプロット（scatter plots）分析により、M2マクロファージにてTAMpepと結合するタンパク質を識別した図である。

【図2c】M1/M0の比率のスクATTERプロット分析により、M2マクロファージにてTAMpepと結合するタンパク質を識別した図である。 20

【図2d】M2/M1の比率のスクATTERプロット分析により、M2マクロファージにてTAMpepと結合するタンパク質を識別した図である。

【図3】M0、M1およびM2マクロファージにおいて、それぞれ抽出した細胞膜タンパク質とTAMpep 826 - ビオチンを反応させて得たLC-MSクロマトグラムデータを示す図である。

【図4】LC-MS/MSプロテオミックスを用いてTAMpep 826のターゲットタンパク質を同定した図である。

【図5】Quantitative RT-PCR条件を示す図である。

【図6】M2マクロファージにおけるITGB2 mRNA発現を確認した図である。

【図7】M2マクロファージにおけるITGB2タンパク質発現を確認した図である。 30

【図8】免疫蛍光分析によりM2マクロファージにおけるITGB2タンパク質の発現を確認した図である。

【図9】M2マクロファージの細胞膜におけるITGB2の発現を確認した図である。

【図10】M2マクロファージにおいて、TAMpep 826およびITGB2の相互作用をプルダウンアッセイ（Pull-down assay）で確認した図である。

【図11】免疫蛍光分析によりM2マクロファージにおけるTAMpep 826およびITGB2の相互作用を確認した図である。

【図12】TB511とITGB2の結合部位をドッキングシミュレーションで確認した図である。

【図13】TB511とITGB2の結合部位をドッキングシミュレーションで確認した図である。 40

【図14】本発明のITGB2結合ADC作製に用いられた抗-CD18抗体がCD18のM2 TAMにおける活性型構造（Extended-open form）に特異的に結合することを示す模式図である。

【図15】センサーチップ表面にITGB2を固定化して確認した図である。

【図16】抗-ITGB2抗体とITGB2タンパク質の結合力をSPRで確認した図である。

【図17】Melittin-dKLAとITGB2タンパク質の結合力をSPRで確認した図である。

【図18】M2マクロファージにおいて、Crispr/cas9により確立したITG 50

B 2 発現抑制細胞モデルにおける I T G B 2 の m R N A 発現を確認した図である。

【図 1 9】M 2 マクロファージにおいて、I T G B 2 発現抑制による M e l i t t i n - d K L A の細胞死滅の減少効果を確認した図である。

【図 2 0】M 2 マクロファージにおいて、I T G B 2 発現抑制による T B 5 1 1 ( T A M p e p 8 2 6 - d K L A ) の細胞死滅誘導減少効果を確認した図である。

【図 2 1】M 2 マクロファージにおいて、I T G B 2 抗体による T B 5 1 1 の細胞死滅誘導減少効果を確認した図である。

【図 2 2】乳癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果を確認した図である。

【図 2 3】乳癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果を確認した図である。

【図 2 4】肺癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果を確認した図である。

【図 2 5】肺癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果を確認した図である。

【図 2 6】肺癌 3 D オルガノイドにおける M - D M 1 の効果を確認した図である。

【図 2 7】抗癌剤耐性肺癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果を確認した図である。

【図 2 8】抗癌剤耐性肺癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果を確認した図である。

【図 2 9】抗癌剤耐性前立腺癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果を確認した図である。

【図 3 0】抗癌剤耐性前立腺癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果を確認した図である。

【図 3 1】乳癌 3 D オルガノイドにおける C D 1 8 - D M 1 の効果を確認した図である。

【図 3 2】乳癌 3 D オルガノイドにおける C D 1 8 - M M A E の効果を確認した図である。

【図 3 3】肺癌 3 D オルガノイドにおける A D C ( C D 1 8 - D M 1 および C D 1 8 - M M A E ) の効果を確認した図である。

【図 3 4】肺癌 3 D オルガノイドにおける A D C ( C D 1 8 - D M 1 および C D 1 8 - M M A E ) の効果を確認した図である。

【図 3 5】抗癌剤耐性肺癌 3 D オルガノイドにおける A D C ( C D 1 8 - D M 1 および C D 1 8 - M M A E ) の効果を確認した図である。

【図 3 6】抗癌剤耐性肺癌 3 D オルガノイドにおける A D C ( C D 1 8 - D M 1 および C D 1 8 - M M A E ) の効果を確認した図である。

【図 3 7】抗癌剤耐性前立腺癌 3 D オルガノイドにおける A D C ( C D 1 8 - D M 1 および C D 1 8 - M M A E ) の効果を確認した図である。

【図 3 8】抗癌剤耐性前立腺癌 3 D オルガノイドにおける A D C ( C D 1 8 - D M 1 および C D 1 8 - M M A E ) の効果を確認した図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 4】

以下、添付された図面を参照して本発明の具現例でもって本発明を詳細に説明する。但し、下記の具現例は、本発明に対する例示として提示されるものであり、当業者に周知著名な技術または構成に対する具体的な説明が本発明の要旨を不要に曖昧にするおそれがあると判断された場合には、その詳細な説明を省略することができ、これによって本発明が制限されるものではない。本発明は後述する特許請求の範囲の記載およびそれより解釈される均等範疇内で多様な変形及び応用が可能である。

【0 0 1 5】

また、本明細書にて使用される用語 ( t e r m i n o l o g y ) は、本発明の好ましい実施例を適切に表現するために使用された用語であって、これは使用者、運用者の意図または本発明が属する分野の慣例などによって異なり得る。したがって、本用語に対する定義は、本明細書の全般にわたった内容に基づいて下されるべきである。明細書全体において、ある部分がある構成要素を「含む」とした時、これは特に相反する記載がない限り、他の構成要素を除外するものではなく、他の構成要素をさらに含むことができることを意味

10

20

30

40

50

する。

【 0 0 1 6 】

本発明にて使用される全ての技術用語は、特に断りがない限り、本発明の関連分野における通常の当業者が一般に理解されることと同様の意味で使用される。また、本明細書には好適な方法または試料が記載されるが、これと類似または同等のものも本発明の範疇に含まれる。本明細書に参考文献として記載される全ての刊行物の内容は、本発明に組み込まれる。

【 0 0 1 7 】

本明細書の全体を通して、天然に存在するアミノ酸に対する通常の 1 文字および 3 文字のコードが用いられるだけでなく、A i b ( - アミノイソ酪酸 )、S a r ( N - m e t h y l g l y c i n e ) などのような他のアミノ酸に対して一般的に許容される 3 文字のコードが使用される。また、本発明において、略語として言及されたアミノ酸は、次のように I U P A C - I U B 命名法に基づいて記載された：

アラニン：A、アルギニン：R、アスパラギン：N、アスパラギン酸：D、システイン：C、グルタミン酸：E、グルタミン：Q、グリシン：G、ヒスチジン：H、イソロイシン：I、ロイシン：L、リジン：K、メチオニン：M、フェニルアラニン：F、プロリン：P、セリン：S、トレオニン：T、トリプトファン：W、チロシン：Y および バリン：V

【 0 0 1 8 】

一側面において、本発明は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体を有効成分として含む、腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージ ( t u m o r a s s o c i a t e d m a c r o p h a g e s 、 T A M ) を除去するための薬学的組成物に関するものである。

【 0 0 1 9 】

一具現例において、前記腫瘍関連マクロファージは、I G B T 2 ( I n t e g r i n b e t a 2 ) を発現する M 2 腫瘍関連マクロファージであってもよい。

【 0 0 2 0 】

一具現例において、前記組成物は、M 1 マクロファージは、除去することなく、M 2 マクロファージのみを除去することができる。

【 0 0 2 1 】

一具現例において、メリチンは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むことができる。

【 0 0 2 2 】

一具現例において、メリチンの変異体は、配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 ~ 7 位のアミノ酸が欠失したペプチドであってもよく、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むことができる。

【 0 0 2 3 】

一具現例において、I T G B 2 は、配列番号 7 または 8 のアミノ酸配列を含むことができる。

【 0 0 2 4 】

一具現例において、前記メリチン、その変異体またはこれらの類似体は、I T G B 2 ( C D 1 8 ) が拡張された ( e x t e n d e d ) 活性型構造 ( A c t i v e c o n f o r m a t i o n ) に特異的に結合することができる。

【 0 0 2 5 】

一具現例において、メリチン、その変異体またはこれらの類似体が I T G B 2 の 4 6 6 ~ 5 6 5 のアミノ酸と結合することができる。

【 0 0 2 6 】

一具現例において、前記組成物は、配列番号 5 または 6 のアミノ酸配列を含むペプチドを含むことができる。

【 0 0 2 7 】

一具現例において、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペ

10

20

30

40

50



プチドまたは抗癌剤が結合された結合体は、ペプチド - 薬物複合体 (peptide - drug conjugate、PDC) であってもよく、PDCは、配列番号5のアミノ酸配列を含むMelittin - dKLAであってもよく、配列番号6のアミノ酸配列を含むTB511であってもよく、マレイミド - 修飾されたメリチンに薬物DM1がコンジュゲートされたM - DM1であってもよい。

【0028】

一具現例において、TB511のLEU(6)は、ITGB2のLEU(528)、THR(538)、LEU(556)、CYS(557)、およびPHE(558)部位と結合(binding)することができ、TB511のTRP(12)は、ITGB2のGLU(466)、ILE(469)、CYS(470)、およびARG(471)と結合することができる。

10

【0029】

一具現例において、メリチン、その変異体またはこれらの類似体とプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤は、リンカーを媒介に共有結合するか、リンカーの媒介なしに非共有結合することができる。

【0030】

一具現例において、前記リンカーは、配列番号3のアミノ酸配列を含むことができる。

【0031】

一具現例において、メリチン、その変異体またはこれらの類似体に半減期または安定性を増加させるための特定の目的のために設計された標的配列、タグ、標識残基またはアミノ酸配列をさらに含むことができる。

20

【0032】

一具現例において、前記プロアポトーシス性ペプチドは、KLA、アルファ - ディフェンシン - 1(alpha - defensin - 1)、BMAP - 28、Brevenin - 2R、ブフォリンIIb(Bufoforin IIb)、セクロピンA - マガイニン2(cecropin A - Magainin 2、CA - MA - 2)、セクロピンA(Cecropin A)、セクロピンB(Cecropin B)、クリソフィシン - 1(chrysophsin - 1)、D - K6L9、ゴメシン(Gomesin)、ラクtoferricin B(Lactoferricin B)、LLL27、LTX - 315、マガイニン2(Magainin 2)、マガイニンII - ボンベシン結合体(Magainin II - bombesin conjugate、MG2B)、パルダキシシン(Pardaxin)およびこれらの組み合わせからなる群から選択されることができ、D型異性体KLAであることがより好ましく、配列番号4のアミノ酸配列を含むことができる。

30

【0033】

一具現例において、前記抗癌剤は、SN - 38(7 - エチル - 10 - ヒドロキシ - カンプトテシン、7 - Ethyl - 10 - hydroxy - camptothecin)、ダウノルビシン(daunorubicin)、ドキソルビシン(doxorubicin)、エピルビシン(epirubicin)、イダルビシン(idarubicin)、ピクサントロン(pixantrone)、サバルビシン(sabarubicin)、バルルビシン(valrubicin)、パクリタキセル(paclitaxel)、ドセタキセル(docetaxel)、メクロレタミン(mechloethamine)、クロラムブシル(chlorambucil)、フェニルアラニン(phenylalanine)、マスタード(mustard)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、イホスファミド(ifosfamide)、カルムスチン(carmustine: BCNU)、ロムスチン(lomustine: CCNU)、ストレプトゾトシン(streptozotocin)、ブスルファン(busulfan)、チオテパ(thiotepa)、シスプラチン(cisplatin)、カルボプラチン(carboplatin)、ダクチノマイシン(dactinomycin: actinomycin D)、プリカマイシン(pli camycin)、マイトマイシンC(mitomycin C)、ビンクリスチン(vincristine)、ビンブラスチン(

40

50

vinblastine)、テニボシド(teniposide)、トポテカン(topotecan)、イリノテカン(irinotecan)、ウラムスチン(uramustine)、メルファラン(melphalan)、ベンダムスチン(bendamustine)、ダカルバジン(dacarbazine)、テモゾロミド(temozolomide)、アルトレタミン(altretamine)、デュオカルマイシン(duocarmycin)、ネダプラチン(nedaplatin)、オキサリプラチン(oxaliplatin)、サトラプラチン(satraplatin)、トリプラチンテトラナイトレート(triplatin tetranitrate)、5-フルオロウラシル(5-fluorouracil)、6-メルカプトプリン(6-mercaptopurine)、カペシタビン(capecitabine)、クラドリピン(cladribine)、クロファラビン(clofarabine)、シスタルビン(cystarbine)、フロクスウリジン(floxuridine)、フルダラビン(fludarabine)、ゲムシタビン(gemcitabine)、ヒドロキシウレア(hydroxyurea)、メトトレキサート(methotrexate)、ペメトレキセド(pemetrexed)、ペントスタチン(pentostatin)、チオグアニン(thioguanine)、エトポシド(etoposide)、ミトキサントロン(mitoxantrone)、イキサベピロン(izabepilone)、ビンデシン(vindesine)、ビノレルビン(vinorelbine)、エストラムスチン(estramustine)、メイタンシン(maytansine)、DM1(mertansine、メルタンシン)、DM4、ドラスタチン(dolastatin)、アウリスタチンE(auristatin E)、アウリスタチンF(auristatin F)、モノメチルアウリスタチンE(monomethyl auristatin E、MMAE)、モノメチルアウリスタチンF(monomethyl auristatin F)およびこれらの誘導体からなる群から選択されることができ、DM1またはMMAEであってもよい。

#### 【0034】

一具現例において、前記メリチン、その変異体またはこれらの類似体とプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤は、化学的リンカーまたは直接結合により連結されることができ、化学的リンカーは、メリチン、その変異体またはこれらの類似体とプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤上のアミン基(amine)、カルボキシ基(carboxyl)またはスルフィドリル基(sulphydryl)を介して連結されることができ。

#### 【0035】

一具現例において、前記化学的リンカーは、両末端にカルボジイミド基(carbodiimide)、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(N-hydroxysuccinimide ester; NHS ester)、イミドエステル(imidoester)、ペンタフルオロフェニルエステル(pentafluorophenyl ester)、ヒドロキシメチルホスフィン(hydroxymethyl phosphine)、マレイミド(maleimide)、ハロアセチル(haloacetyl)、ピリジルジスルフィド(pyridyldisulfide)、チオスルホナート(thiosulfonate)、ビニルスルホン(vinyl sulfone)およびこれらの組み合わせから選択される作用基を含むことができ、EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)、DCC(N,N'-dicyclohexylcarbodiimide)、SATA(succinimidyl acetylthioacetate)、スルホ-SMCC(sulfosuccinimidyl-4-(NDmaleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)、DMA(dimethyladipimide 2HCl)、DMP(dimethylpimelidate 2HCl)、DMS(dimethyl Suberimidate 2HCl)、DTBP(dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate 2HCl)、スルホ-SIAB(sulfosuccinimidyl(4-iodoace

tyl)aminobenzoate)、SIAB(succinimidylyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate)、SBAP(succinimidylyl 3-(bromoacetamido)propionate)、SIA(succinimidylyl iodoacetate)、SM(PEG)n(succinimidylyl - ([N-maleimidopropionamido] - #ethylene glycol ester、n=2、4、6、8、12または24)、SMCC(succinimidylyl - 4-(N-Dmaleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)、LCSMCC(succinimidylyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxy - (6-amidocaproate))、スルホ - EMCS(N - ester) 10、EMCS(N - スルホ - GMBS(N - ester)、GMBS(N - ester)、スルホ - KMUS(N - ester)、スルホ - MBS(m-maleimido benzoyl - Nhydroxysulfosuccinimide ester)、MBS(m-maleimido benzoyl - N - hydroxysuccinimide ester)、スルホ - SMPB(sulfosuccinimidylyl 4 - (p-maleimidophenyl)butyrate)、SMPB(succinimidylyl 4 - (pmaleimidophenyl)butyrate)、AMAS(N - -maleimidoacet - oxysuccinimide ester)、BMP(S(N - -maleimidopropylloxysuccinimide ester)、SMPH(succinimidylyl 6 - [( - maleimid 20opropionamido)hexanoate])、PEG12 - SPDP(2 - pyridyldithiol - tetraoxaocatactriacontane - N - hydroxysuccinimide)、PEG4 - SPDP、スルホ - LCSPDP(sulfosuccinimidylyl 6 - [3' - (2 - pyridyldithio)propionamido]hexanoate)、SPDP(succinimidylyl 3 - (2 - pyridyldithio)propionate)、LC - SPDP(succinimidylyl 6 - [3' - (2 - pyridyldithio)propionamido]hexanoate)、SMP(4 - succinimidyloxy carbonyl - alpha - methyl - alpha(2 - pyridyldithio)toluene)、DSS(disuccinimidylylsuberate) 30、BS(PEG)5(bis(succinimidylyl)penta(ethylene glycol))、BS(PEG)9(bis(succinimidylyl)nona(ethylene glycol))、BS3(bis[sulfosuccinimidylyl]suberate)、BSOCOES(bis[2 - (succinimido oxycarbonyloxy)ethyl]sulfone)、PDPH(3 - (2 - pyridyldithio)propionyl hydrazide)、DSG(disuccinimidylyl glutarate)、DSP(dithiobis[succinimidylyl propionate])、BM(PEG)n(1, 8 - bismaleimido - ethylene glycol、n=2または3) 40、BMB(1, 4 - bismaleimidobutane)、BMDB(1, 4 - bismaleimidylyl - 2, 3 - dihydroxybutane)、BMH(bismaleimido hexane)、BMOE(bismaleimido ethane)、DTME(dithiobismaleimido ethane)、TMEA(tris(2 - maleimidoethyl)amine)、DSS(disuccinimidylyl suberate)、DST(disuccinimidylyl tartarate)、DTSSP(3, 3' - dithiobis[sulfosuccinimidylyl propionate])、EGS(ethylene glycol bis[succinimidylylsuccinate])、スルホ - EGS(ethylene glycol bis[sulfosuccinimidylylsuccinate]) 50)およびTSAT(tris - succinimidylylaminotriacetat

e)、DFDNB(1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene)およびこれらの組み合わせから選択されることができる。

【0036】

本発明において、前記ペプチドは、前記アミノ酸配列を有することが好ましいが、これらに限定されるものではない。本発明の好ましい具現例によれば、前記ペプチドは、前記アミノ酸の割合が50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは100%と高いことが好ましい。

【0037】

本発明において、前記ペプチドは、標的化配列、タグ(tag)、標識された残基、半減期またはペプチドの安定性を増加させるための特定の目的で考案された追加のアミノ酸配列も含むことができる。また、本発明のペプチドは、エフェクター(effectors)、薬物、プロドラッグ、毒素、ペプチド、伝達分子などのカップリングパートナーと連結されることができる。

【0038】

本発明において、前記ペプチドは、薬学的に許容可能な塩の形態で製造されることができる。具体的には、酸を添加することで塩を形成することができ、例えば、無機酸(例：塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸など)、有機カルボン酸(例：酢酸、トリフルオロ酢酸のようなハロ酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、サリチル酸)、および酸性糖(グルクロン酸、ガラクトン酸、グルコン酸、アスコルビン酸)、酸性多糖類(例：ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、アルギニン酸)、コンドロイチン硫酸などのスルホン酸糖エステルを含む有機スルホン酸(例：メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸)などを添加して塩を形成することができる。

【0039】

本発明の用語、「結合体」は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体ペプチドとプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された複合体であって、M2型腫瘍関連マクロファージを標的とすることができる。前記結合体は、ターゲティングするM2型マクロファージに結合し、マクロファージのミトコンドリアを損傷させることで腫瘍の生長と転移を抑制し、周囲の血管新生を選択的に抑制することによって癌を抑制することができる。

【0040】

すなわち、本発明の複合体は、抗癌剤に比べて抗癌活性が向上したものであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0041】

本発明において、前記結合体は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体をGGGSリンカー(配列番号3)を介してプロアポトーシス性ペプチドと連結することができ、またはSPDPリンカーを介してDoxorubicin、Methotrexate、Entinostat、Cladribine、PralatrexateおよびLorlatinibのような抗癌剤と連結するものであってもよい。また、抗癌剤中、Maytansine DM1、Maytansine DM3およびMaytansine DM4は、リンカーなしに直接連結して結合されることができるが、これらに制限されるものではない。

【0042】

すなわち、本発明の結合体は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体が化学的リンカーを介したり、または、直接抗癌剤と連結された形態であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0043】

本発明の用語、「メリチン(Melittin; MEL)」は、ハチ毒の主要成分を構成するペプチドである。前記本明細書にて使用される用語「ハチ毒(bee venom; BV)」は、ミツバチ(Apis mellifera)の腹部で生成される酸性および塩

10

20

30

40

50

基性分泌物の混合物であって、苦い無色の液体形態を帯び、その主な成分は、ペプチドであるメリチン (melittin)、アパミン (apamin)、マスト細胞脱顆粒 (mast cell degranulating; MCD) ペプチド、および酵素であるホスホリパーゼ A2 (phospholipase A2; PLA2) などであり、その他に多様な微量の成分を含む。したがって、本発明のメリチンは、ミツバチ (Apis mellifera) のハチ毒から分離されるものであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0044】

本発明にて用いられた用語「ペプチド」は、アミノ酸重合体であって、天然アミノ酸だけでなく、非タンパク質性アミノ酸も構成要素として含むことができる。

10

【0045】

本発明にて使用された、用語「変異体」は、基準物質と比較したとき、最低1個のアミノ酸の差 (置換、挿入または欠損) を含む対応するアミノ酸配列を指す。特定の具体例において、「変異体」は、基準配列と比較したとき、高いアミノ酸配列相同性 (homology) および/または保存的アミノ酸置換、欠損および/または挿入を有する。

【0046】

本発明にて使用された、用語「ペプチド類似体」は、アミノ酸の側鎖またはアルファ - アミノ酸バックボーンに対して、一つ以上の他の機能基で置換された類似体を含むことができる。側鎖若しくはバックボーンが改質化されたペプチド類似体の例としては、ピロリジン環がヒドロキシ基で置換されたヒドロキシプロリンや、N - メチルグリシン「ペプトイド」が挙げられるが、これに制限されるものではない。ペプチド類似体の種類については、当業界に公知されている。

20

【0047】

本発明によるタンパク質変異体は、特定のアミノ酸残基位置でアミノ酸残基が保存的に置換された変異体も含む意味として解釈される。

【0048】

本発明にて「保存的置換」とは、1個以上のアミノ酸を当該メリチンタンパク質変異体の生物学的または生化学的機能の損失を惹起しない類似する生化学的特性を有するアミノ酸で置換することを含む変異体の変形を意味する。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基を類似する側鎖を有するアミノ酸残基に代替させる置換である。類似する側鎖を有するアミノ酸残基部類は、当該技術分野に規定されており、広く知られている。これらの部類は、塩基性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、帯電しない極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非 - 極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベタ - 分枝の側鎖を有するアミノ酸 (例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン) および芳香族側鎖を有するアミノ酸 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を含む。

30

【0049】

本発明によるペプチドは、標準合成方法、再組み合わせ発現システム、または任意の他の当該分野の方法により製造されることができる。したがって、本発明によるペプチドは、例えば、次を含む方法を含む多数の方法により合成されることができる：

40

(a) ペプチドを固相法または液相法の手段で段階的にまたは断片組立により合成し、最終ペプチド生成物を分離し精製する方法；または

(b) ペプチドをインコーディングする核酸作製物を宿主細胞内で発現させ、発現生成物を宿主細胞培養物から回収する方法；または

(c) ペプチドをインコーディングする核酸作製物の無細胞 *in vitro* 発現を行い、発現生成物を回収する方法；または

(a)、(b) および (c) の任意の組み合わせによりペプチドの断片を得て、次いで断

50

片を連結させてペプチドを得て、当該ペプチドを回収する方法。

一側面において、本発明は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体を有効成分として含む、癌の予防または治療用薬学的組成物に関するものである。

【0050】

一具現例において、前記癌は、脳腫瘍、黒色腫、骨髄腫、非小細胞性肺癌、口腔癌、肝臓癌、胃癌、結腸癌、乳癌、三重陰性乳癌 (Triple Negative Breast Cancer、TNBC)、肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部または頸部癌、子宮頸部癌、卵巣癌、大腸癌、小腸癌、直腸癌、卵管癌、肛門癌、子宮内膜癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病 (Hodgkin's disease)、食道癌、リンパ腺癌、膀胱癌、胆嚢癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性または急性白血病、リンパ球リンパ腫、腎臓または尿管癌、腎細胞癌、腎臓骨盤癌、中枢神経系腫瘍、一次中枢神経系リンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫および下垂体腺腫からなる群から選択されるいずれか一つ以上であることができ、抗癌剤耐性癌であってもよい。

10

【0051】

一具現例において、前記組成物は、M0マクロファージおよびM1マクロファージに比べて、M2マクロファージにてITGB2の発現が上方制御された患者を対象に投与することができる。

【0052】

一具現例において、前記組成物は、標的抗癌剤であってもよい。

20

【0053】

本発明における薬学的組成物は、単独の療法で用いられることができるが、他の通常の生物学的療法、化学療法または放射療法と共に用いられることもでき、このような並行療法を実施する場合には、より効果的に癌を治療することができる。本発明を癌の予防および治療に用いる場合、前記組成物と共に用いられることができる化学療法剤は、シスプラチン (cisplatin)、カルボプラチン (carboplatin)、プロカルバジン (procarbazine)、メクロレタミン (mechlorethamine)、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、イホスファミド (ifosfamide)、メルファラン (melphalan)、クロラムブシル (chlorambucil)、ブスルファン (busulfan)、ニトロソウレア (nitrosourea)、ダクチノマイシン (daunomycin)、ダウノルビシン (daunorubicin)、ドキシソルビシン (doxorubicin)、ブレオマイシン (bleomycin)、プリカマイシン (plicomycin)、マイトマイシン (mitomycin)、エトポシド (etoposide)、タモキシフェン (tamoxifen)、タキソール (taxol)、トランスプラチナ (transplatinum)、5-フルオロウラシル (5-fluorouracil)、ビンクリスチン (vincristin)、ビンブラスチン (vinblastin) およびメトトレキサート (methotrexate) などを含む。本発明の組成物と共に用いられることができる放射療法は、X-線照射および $\gamma$ -線照射などである。

30

40

【0054】

本発明において、用語「予防」とは、本発明による組成物の投与により癌の発生、拡散および再発を抑制または遅延させるあらゆる行為を意味する。

【0055】

本発明の組成物の治療的に有効な量は、多様な要素、例えば、投与方法、目的部位、患者の状態などによって異なり得る。したがって、人体に使用時の投与量は、安全性および効率性を共に考慮し、適正量で決定されるべきである。動物実験を通じて決定した有効量からヒトに使用される量を推定することも可能である。有効な量を決定する際に、考慮すべきこのような事項は、例えば、Hardman and Limbird、eds.、Goodman and Gilman's The Pharmacological B

50

asis of Therapeutics, 10th ed. (2001), Pergamon Press; および E. W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1990), Mack Publishing Co. に記述されている。

【0056】

本発明における薬学的組成物は、薬学的に有効な量で投与する。本発明にて使される用語、「薬学的に有効な量」は、医学的治療に適用可能な合理的な恩恵／リスク比で疾患を治療するのに十分であり、副作用を引き起こさない程度の量を意味し、有効用量レベルは患者の健康状態、疾患の種類、重症度、薬物の活性、薬物に対する感度、投与方法、投与時間、投与経路および排出率、治療期間、配合または同時に使用される薬物を含む要素およびその他の医学分野で公知の要素によって決定されることができる。本発明の組成物は、個別の治療剤として投与することができるか、または他の治療剤と併用して投与することができ、従来の治療剤と順次または同時に投与することができ、単回または複数回投与することができる。前記した要素を全て考慮して、副作用なく最小限の量で最大の効果が得られる量を投与することが重要であり、これは当業者によって容易に決定され得る。

10

【0057】

本発明における薬学的組成物は、生物学的製剤に通常使用される担体、希釈剤、賦形剤または二つ以上のこれらの組み合わせを含むことができる。本発明にて使用される用語、「薬学的に許容可能な」とは、前記組成物に露出される正常な細胞やヒトに毒性のない特性を示すことを意味する。前記担体は、組成物を生体内送達に適したものであれば、特に制限されず、例えば、Merck Index、13th ed., Merck & Co., Inc. に記載された化合物、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール、およびこれらの成分中、1成分以上を混合して用いることができ、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液、静菌剤などの他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤および潤滑剤を付加的に添加し、水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤に製剤化することができる。さらに、当分野の適正な方法によりまたは Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990) に開示されている方法を用いて各疾患に応じてまたは成分に応じて好ましく製剤化することができる。

20

30

【0058】

一具現例において、前記薬学組成物は、経口型剤形、外用剤、坐剤、滅菌注射溶液および噴霧剤を含む群から選択される一つ以上の剤形であってもよい。

本発明における組成物はまた、生物学的製剤に通常使用される担体、希釈剤、賦形剤または二つ以上のこれらの組み合わせを含むことができる。薬学的に許容可能な担体は、組成物を生体内送達に適したものであれば、特に制限されず、例えば、Merck Index、13th ed., Merck & Co., Inc. に記載された化合物、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノールおよびこれらの成分中、1成分以上を混合して用いることができ、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液、静菌剤などの他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤および潤滑剤を付加的に添加し、水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注射用製剤、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤に製剤化することができる。さらに当分野の適正な方法によりまたは Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990) に開示されている方法を用いて各疾患に応じてまたは成分に応じて好ましく製剤化することができる。

40

【0059】

本発明における組成物にさらに同一または類似する機能を示す有効成分を1種以上含有することができる。本発明における組成物は、組成物の総重量に対して前記タンパク質を0

50

． 0 0 0 1 ～ 1 0 重量 %、好ましくは 0 ． 0 0 1 ～ 1 重量 % を含む。

【 0 0 6 0 】

本発明における薬学的組成物は、薬剤学的に許容可能な添加剤をさらに含むことができ、このとき、薬剤学的に許容可能な添加剤としては、デンプン、ゼラチン化デンプン、微結晶セルロース、乳糖、ポビドン、コロイド状二酸化ケイ素、リン酸水素カルシウム、ラクトース、マンニトール、飴、アラビアゴム、アルファ化デンプン、トウモロコシデンプン、粉末セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、オパドライ、デンプングリコール酸ナトリウム、カルナウバロウ、合成ケイ酸アルミニウム、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸アルミニウム、ステアリン酸カルシウム、白糖、デキストロース、ソルビトールおよびタルクなどが用いられることができる。本発明による薬剤学的に許容可能な添加剤は、前記組成物に対して 0 ． 1 重量部 ～ 9 0 重量部含まれることが好ましいが、これらに限定されるものではない。

10

【 0 0 6 1 】

本発明における組成物は、目的とする方法に従って、非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に適用）するか、経口投与することができ、投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、排泄率および疾患の重症度などによってその範囲が多様である。本発明による組成物の一日の投与量は、0 ． 0 0 0 1 ～ 1 0 m g / m l であり、好ましくは 0 ． 0 0 0 1 ～ 5 m g / m l であり、一日に 1 回 ～ 数回に分けて投与することがより好ましい。

【 0 0 6 2 】

本発明における組成物の経口投与のための液状製剤としては、懸濁剤、内服液剤、乳剤、シロップ剤などが該当するが、通常使用される単純な希釈剤である水、液体パラフィン以外に多様な賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが共に含まれることができる。非経口投与のための製剤には、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤などが含まれる。

20

【 0 0 6 3 】

一側面において、本発明は、本発明における組成物を試験管の M 2 腫瘍関連マクロファージに処理する段階を含む、M 2 型腫瘍関連マクロファージ除去方法に関するものである。

【 0 0 6 4 】

一側面において、本発明は、本発明における組成物を含む癌診断用組成物に関するものである。

30

【 0 0 6 5 】

一側面において、本発明は、本発明における癌診断用組成物を含む、癌診断キットに関するものである。

【 0 0 6 6 】

本発明において、用語「癌診断キット」とは、本発明の癌診断用組成物が含まれたキットを意味する。したがって、前記表現「癌診断キット」とは、「癌診断用組成物」と互いに交差または混用して使用が可能である。本明細書にて用語「診断」とは、特定の疾病または疾患に対する一つのオブジェクトの感受性 ( s u s c e p t i b i l i t y ) を判定すること、一つのオブジェクトが特定の疾病または疾患を現在有しているか否かを判定すること、特定の疾病または疾患に罹患したオブジェクトの予後 ( p r o g n o s i s ) （例えば、前 - 転移性または転移性癌状態の同定、癌のステージ決定または治療に対する癌の反応性決定）を判定すること、またはセラメトリクス ( t h e r a m e t r i c s ) （例えば、治療効能に対する情報を提供するために、オブジェクトの状態をモニタリングすること）を含む。

40

【 0 0 6 7 】

本発明におけるメリチン、その変異体またはこれらの類似体は、M 2 腫瘍関連マクロファージの細胞膜に発現される I T G B 2 に特異的に結合することによって、これら自体またはこれらと連結された薬物（プロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤）が M 2 腫瘍関連マクロファージを死滅させることによって、腫瘍の生長と転移を抑制し、周囲の血管新生

50



を選択的に抑制することによって抗癌活性を有し、M2腫瘍関連マクロファージを特異的に結合するため、癌の診断にも使われるテラノスティック製剤として使用されることができる。また、抗癌剤と共に同時に、別途にまたは順次投与される抗癌補助剤としても使用されることができる。併せて、メリチン、その変異体またはこれらの類似体がM2腫瘍関連マクロファージと特異的に結合するため、これを標的化する薬物伝達体としても用いられることができる。

【0068】

一側面において、本発明は、対象から分離された生物学的試料と本発明の組成物を接触させる段階；および正常対照群試料と比較する段階を含む、癌診断のための情報提供方法に関するものである。

10

【0069】

一具現例において、対象から分離された生物学的試料でのM2腫瘍関連マクロファージレベルが正常対照群試料に比べて高い場合、前記検査対象が癌であると判断する段階をさらに含むことができる。

【0070】

本発明にて用いられた用語、「試料（サンプル）」とは、対象または患者から得た生物学的試料を意味する。生物学的試料の供給源は、新鮮な、凍結されたおよび／または保存された臓器または組織サンプルまたは生検または吸引物からの固形組織；血液または任意の血液成分；対象の妊娠または発生の任意の時点の細胞であってもよい。

【0071】

20

一側面において、本発明は、本発明におけるメリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体を薬学的に有効な量で癌に罹患したオブジェクトに投与する段階を含む、癌の治療方法に関するものである。

【0072】

一具現例において、前記オブジェクトは、M0マクロファージおよびM1マクロファージに比べて、M2マクロファージにてITGB2の発現が上方制御された患者であってもよい。

【0073】

一側面において、本発明は、メリチン、その変異体またはこれらの類似体にプロアポトーシス性ペプチドまたは抗癌剤が結合された結合体の癌の予防および治療用薬学的組成物の製造に用いるための用途に関するものである。

30

【0074】

下記の実施例を通じて本発明をより詳しく説明する。しかし、下記実施例は、本発明の内容を具体化するためのものに過ぎず、これにより本発明が限定されるものではない。

【0075】

実施例1．M2腫瘍関連マクロファージ（M2TAM）標的化ペプチドの合成  
下記表1のメリチン（Melittin）およびTAMpep826をGenScript（Piscataway, NJ, USA）に合成依頼して供給を受け、その後、実験にてD-PBSに5mg/mlで溶かし、用いられた。

【0076】

40

【表1】

名称	配列	配列番号	説明
メリチン	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQ Q	1	メリチンペプチド
TAMpep 826	VLTTGLPALISWIKRKRQQ	2	メリチンの最初の7個のアミノ酸が除去されたペプチ ド

【0077】

実施例2．M2 T A M 標的化の分析

50

## 2 - 1 . メリチンの M 2 T A M に対する親和度 ( A f f i n i t y ) の確認

前記実施例 1 にて作製したメリチンが、M 2 腫瘍関連マクロファージ ( M 2 T A M ) に特異的に結合するか否かを確認するため、ヒト単球細胞株 T H P - 1 を M 0 、 M 1 、および M 2 マクロファージに分化させ、 F I T C コンジュゲートされたメリチンを処理し、フローサイトメトリーにより確認した。具体的に、T H P - 1 細胞は、1 0 0 n M の P M A ( p h o r b o l 1 2 - m y r i s t a t e 1 3 - a c e t a t e ) を 3 7 ° で 2 4 時間処理し ( M 0 マクロファージ ) 、分化された M 0 マクロファージを 1 0 0 n M の L P S および 2 0 n g / m l の I F N -  $\gamma$  と 3 7 ° で 7 2 時間培養し、M 1 マクロファージ ( M 1 ) に分化させ、2 0 n g / m l の I L - 4 および I L - 1 3 と 3 7 ° で 7 2 時間培養し、M 2 マクロファージ ( M 2 ) に分化させた。分化された細胞に F I T C コンジュゲートされたメリチン 5 0 n M を 1 時間処理し、B D F A C S C a n t o I I i n s t r u m e n t s ( B D b i o s c i e n c e s 、 S a n J o s e 、 C A 、 U S A ) で細胞を検出し、F l o w J o s o f t w a r e ( B D b i o s c i e n c e s ) により分析した。

### 【 0 0 7 8 】

その結果、F I T C 陽性細胞は、M 0 および M 2 マクロファージに比べて、M 2 マクロファージにおいて、著しく増加した ( 図 1 a および b ) 。これを通じて、メリチンが M 2 マクロファージに優先的に結合することが確認された。

### 【 0 0 7 9 】

## 2 - 2 . メリチンの M 2 T A M 結合標的タンパク質の識別

M 2 マクロファージのあるタンパク質がメリチンと M 2 マクロファージの特異的結合に関連しているか否かを確認するため、ビオチン - コンジュゲートされたメリチン ( メリチン - b i o t i n ) を合成した。T H P - 1 細胞 (  $5 \times 10^6$  c e l l s ) を M 0 、 M 1 、および M 2 マクロファージに分化させた後、スクレーパーを用いて細胞を集めて、遠心分離 ( 3 0 0 g 、 5 分 ) を通じて細胞を洗浄し、細胞膜タンパク質抽出キット ( m e m b r a n e p r o t e i n e x t r a c t i o n k i t ) ( T h e r m o F i s h e r s c i e n t i f i c ) を用いてマクロファージの細胞膜タンパク質を得た。メリチンにビオチン ( b i o t i n ) が結合されたメリチン - ビオチン ( 2 0 0  $\mu$  g ) と常温 ( 2 0 ~ 2 4 ° ) で 1 時間反応させた後、ストレプトアビジン・レジン ( s t r e p t a v i d i n r e s i n ) ( T h e r m o F i s h e r s c i e n t i f i c ) を用いてメリチンと結合したタンパク質を得た。塩を除去するため、1 0 0 % のメタノール、0 . 1 % のギ酸および 8 0 % の C A N をそれぞれ 1 0 0  $\mu$  l ずつ 1 8 M i c r o S p i n - C o l u m n に添加して用意し、用意したカラムに試料をロードし、5 0  $\mu$  l の 0 . 1 % のギ酸を添加し、不要な物質を除去した。その後、8 0 % の C A N 1 0 0  $\mu$  l を添加し、ペプチドを溶離させた。脱塩が終わると、S p e e d - v a c で乾燥させ、溶液を全部除去し、下記表 2 の条件で U P L C - E x a c t i v e e q u i p m e n t ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) を用いて、L C - M S / M S により分析した。M a x Q u a n t および M P P ( M a s s P r o f i l e r P r o f e s s i o n a l ) を用いて、M 0 マクロファージに比べて、M 1 および M 2 マクロファージにおいて、上方制御されたタンパク質に対してデータを分析した。データを分析するために、各指標別に L C - M S / M S データを、P r o t e o m e D i s c o v e r e r を用いて分析し、データベースは、U n i p r o t の h u m a n d a t a b a s e を用いて、L F Q ( L a b e l - F r e e Q u a n t i f i c a t i o n ) により進めた。M o d i f i c a t i o n は、O x i d a t i o n ( M ) 、C a r b a m y l ( N - t e r m ) 、C a r b a m i d o m e t h y l ( C ) を追加し、B a s e l i n e o p t i o n は、n o n e とした。

### 【 0 0 8 0 】

10

20

30

40

50

【表 2】

パラメータ		条件							
トラッピングカラム		C <sub>18</sub> , 3 μm, 100 Å, 75 μm x 2 cm							
分析カラム		PepMap™ RSLC C <sub>18</sub> 2 μm, 100 Å, 75 μm x 50 cm							
移動相		A: 0.1%ギ酸を含む水 B: 0.1%ギ酸を含む80%ACN							
グラジエント	時間 (分)	0	14	120	120.1	130	130.1	180	
	溶媒 B(%)	4	4	40	96	96	4	4	
カラム流量		300 nL/分							
質量範囲		400 ~ 2000 m/z							

10

20

【0081】

その結果、M2/M0にて53個のタンパク質が、M1/M0にて123個のタンパク質が上方制御された(図2a)。M2マクロファージよりもより多くの上方制御されたタンパク質がM1マクロファージと相互作用したが、細胞膜に存在するタンパク質はその限りでない。膜タンパク質中、ITGB2がM2マクロファージにおいて、上方制御されることが示された(図2b)。また、M1マクロファージのマーカーとして知られたIL-10およびCXCL10のようなサイトカインがM1マクロファージにおいて、上方制御された(図2v)。また、タンパク質がM1に比べてM2にて上方制御されたタンパク質が確認されたが、膜タンパク質中、ITGB2のみがM2マクロファージにおいて、上方制御されることが確認された(図2d)。これを通じて、メリチンがM2マクロファージの膜タンパク質ITGB2と相互作用し、結合することが確認された。

30

【0082】

2-3. TAMpep826のM2-TAM結合標的タンパク質の識別  
前記実施例2-2からみられるように、M0、M1およびM2マクロファージからそれぞれ抽出した細胞膜タンパク質とTAMpep826-ビオチンを反応させて、LC-MS/MSproteomicsを通じてターゲットタンパク質を確認した。

【0083】

その結果、細胞膜タンパク質中、ITGB2がM0およびM1マクロファージに比べて、M2マクロファージにおいて、より高いレベルで発現されることが示され(図4)、TAMpep826のM2マクロファージ結合標的タンパク質として選別された。

40

【0084】

実施例3. M2マクロファージのITGB2発現の確認

3-1. ITGB2 mRNA発現の確認

M0、M1、M2マクロファージおよびTAMsにおいて、ITGB2のmRNA発現レベルを評価するために、リアルタイム重合酵素連鎖反応を行った。具体的には、M0、M1またはM2マクロファージに分化された細胞において、easy-BLUE total RNA Extraction Kit (iNtRON)を用いてRNAを抽出し、CycleScript-Reverse Transcriptase (Bioneer)を用いてcDNAで合成した。ActinまたはITGB2遺伝子のプライマー(表

50

3)を用い、図5の条件でreal-time PCR(CFX96、Bio-rad)を進め、Actinに比べて各遺伝子の発現量を相対定量(Relative quantification)により比較および分析した。

【0085】

【表3】

標的cDNA	Forward/Reverse	配列(5' to 3')
β-アクチン	F	GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG
	R	ATGCCACAGGATTCCATACC
ITGB2	F	GAGGTCAGGAGGATTTGGGG
	R	TACAAGTGTTGGGGAGCCAG

10

【0086】

その結果、ITGB2のmRNA発現は、M0およびM1に比べてM2マクロファージおよびTAMにおいて、有意に増加したことが示された(図6)。

【0087】

3-2. ITGB2タンパク質発現の確認

M0、M1、M2マクロファージおよびTAMsにおいて、ITGB2のタンパク質発現レベルを評価するために、ウェスタンブロット解析を行った。具体的には、M0、M1およびM2マクロファージに分化されたそれぞれの細胞からProprep solution(intRON)を用いてタンパク質を抽出し、電気泳動法によりメンブレンにタンパク質を転写した。メンブレンを5%のBSAに浸してブロックした後、1次抗体(ITGB2)を24時間4℃で処理し、2次抗体を1時間常温で処理した後、D-Plus(商標出願)ECL Pico System(Donning LS)を処理し、Davinch-Chemi(商標出願)imaging system(Intoxia)でタンパク質バンド写真を撮影した。

20

【0088】

その結果、ITGB2のタンパク質発現は、M0およびM1に比べて、M2マクロファージおよびTAMにおいて、有意に増加したことが示された(図7)。

30

【0089】

3-3. 免疫蛍光法によるITGB2タンパク質発現の確認

M0、M1、M2マクロファージおよびTAMsにおいて、ITGB2のタンパク質発現レベルを評価するために、免疫蛍光解析を行った。具体的には、M0、M1およびM2マクロファージに分化されたそれぞれの細胞を4%のホルマリンで固定させた後、PBSで洗浄し、5%のBSAに浸してブロックした後、1次抗体(ITGB2)を24時間4℃で処理し、2次抗体を2時間常温で処理し、染色を行った。染色した細胞は、DAPI mounting後、LSM800(Zeiss)で蛍光写真を撮影した。

40

【0090】

その結果、ITGB2のタンパク質は、M0およびM1に比べて、M2マクロファージおよびTAMにて高い発現レベルを示した(図8)。

【0091】

実施例4. M2 TAM標的化ペプチドとITGB2の相互作用の確認

4-1. M2マクロファージ細胞膜におけるITGB2の発現の確認

ITGB2がM2マクロファージの細胞膜にて発現されるか否かを確認するため、M2マクロファージから細胞膜タンパク質およびサイトゾル(cytosol)タンパク質をそれぞれ分離抽出し、ビオチン化されたTAM pep 826と反応させ、ITGB2の発現をウェスタンブロット解析により評価した。その結果、ITGB2タンパク質は、M2マ

50

クロファージの細胞膜にて発現されることが示された（図 9）。

【0092】

4 - 2 . T A M p e p 8 2 6 および I T G B 2 の相互作用の確認

M2マクロファージにおいて、T A M p e p 8 2 6 が I T G B 2 と相互作用するか否かを確認するために、T A M p e p 8 2 6 およびビオチン化された T A M p e p 8 2 6 の競争的な反応を通じて I T G B 2 の発現を評価した。具体的には、M2マクロファージに分化された細胞をスクレーパーで集めて、遠心分離（300 g、5分）により細胞を洗浄し、細胞膜タンパク質抽出キット（Thermo Fisher scientific）を用いてマクロファージの細胞膜タンパク質を得た。T A M p e p 8 2 6 または s c r a m b l e ペプチドを濃度別（0.001、0.01、0.1、1および10 μg）に1時間前処理した後、タンパク質にビオチンが結合された T A M p e p 8 2 6（200 μg）と常温（20～24℃）で1時間反応させた後、Dynabeads（商標出願）M-280 Streptavidin（Thermo Fisher scientific）を用いて、T A M p e p 8 2 6 と結合したタンパク質を得た。タンパク質をウェスタンブロット解析して、I T G B 2 の発現を確認した。

10

20

【0093】

その結果、s c r a m b l e d ペプチドを前処理したとき、ビオチン化された T A M p e p 8 2 6 と結合された I T G B 2 の発現は、影響がないことが示されたのに対し、T A M p e p 8 2 6 で前処理したときは、濃度によって I T G B 2 発現が抑制されることが示された（図 10）。このことから、T A M p e p 8 2 6 が M2マクロファージの細胞膜において、I T G B 2 と相互作用することを確認することができた。

【0094】

4 - 3 . 免疫蛍光法を用いた T A M p e p 8 2 6 および I T G B 2 の相互作用の確認

M2マクロファージの細胞膜において、I T G B 2 および T A M p e p 8 2 6 が c o - l o c a l i z a t i o n するか否かを確認するために、F I T C が結合された T A M p e p 8 2 6 を用いて免疫蛍光分析を行った。その結果、T A M p e p 8 2 6 と I T G B 2 は、M2マクロファージの細胞膜に集中的に分布されていることが示された（図 11）。

【0095】

4 - 4 . T B 5 1 1 と I T G B 2 の結合部位の確認

C D 1 8（I T G B 2）のシステイン（cysteine）rich 部分の配列を基に（u n i p o r t \_ p 0 5 1 0 7、C y s t e i n - r i c h t a n d e m r e p e a t s r e g i o n : 4 4 9 - 6 1 7）、t r R o s e t t a アルゴリズム（algorithm）を用いて、3次構造（tertiary structure）を構成した（<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>）。その後、T B 5 1 1 と C D 1 8 のドッキングシミュレーション（Docking simulation）は、t r R o s e t t a で作った C D 1 8 P D B ファイルと T B 5 1 1 のアミノ酸配列を有し、C A B S - d o c k s e r v e r を通じて行われた（<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSDock/>）。ドッキングシミュレーションの結果、作られた10個のモデルのうち、T B 5 1 1 配列のアラニン置換の結果を基に代表モデルを選定した（図 12）。

30

40

【0096】

その結果、T B 5 1 1 の L E U（6）は、C D 1 8 の L E U（528）、T H R（538）、L E U（556）、C Y S（557）および P H E（558）部位と結合（bind）することが予測され、T B 5 1 1 の T R P（12）は、C D 1 8 の G L U（466）、I L E（469）、C Y S（470）および A R G（471）と結合することが予測された。また、T B 5 1 1 の L E U（6）および T R P（12）をそれぞれアラニンで置換し、C D 1 8 との結合をシミュレーションすると、二つの部位全部 C D 1 8 のどの配列とも結合しないことが示された。したがって、T B 5 1 1 の L E U（6）および T R P（12）は、T B 5 1 1 と C D 1 8 間のドッキングにおいて核心的な部分であり、T B 5 1 1 は、C D 1 8 の 4 6 6 ~ 5 6 5 に結合することが予測され得る（図 13）。

50

## 【 0 0 9 7 】

## 実施例 5 . I T G B 2 結合部分の合成

5 - 1 . I T G B 2 結合 P D C ( p e p t i d e - d r u g c o n j u g a t e ) の合成  
 下記表 4 の M e l i t t i n - d K L A および T B 5 1 1 ペプチドを G e n S c r i p t ( P i s c a t a w a y , N J , U S A ) に合成依頼して供給を受け、その後、実験にて D - P B S に 5 m g / m l で溶かし、用いられた。d K L A は、ペプチド間アミド結合を通じて連結しており、メリチンまたは T A M p e p 8 2 6 と d K L A 間の相互作用および折り畳みを最小化するため、真ん中に 4 個のグリシンおよび 1 個のセリンで構成されたリンカーを配置し、両端を区分し、K L A は、体内の分解を最小化するために、L 型でない D 型異性体を用いた。また、M - D M 1 を作製するために、2 5 m M のホウ酸ナトリウム緩衝液 ( 2 5 m M N a C l , 1 m M E D T A , p H 8 . 0 ) に溶かしたマレイミド ( M a l e i m i d e ) - 修飾されたメリチン ( G e n S c r i p t , B e i j i n g , C h i n a ) ( 1 0 0 μ M , 1 m L , 0 . 1 m m o l ) に D M 1 ( M e r t a n s i n e ) ( M e d C h e m E x p r e s s , P r i n c e t o n ) ( 1 . 1 当量、DMF 中 1 0 m M ) および DMF ( D i m e t h y l f o r m a m i d e ) を添加し、3 7 °C で 1 時間反応させた後、生成物を D u l b e c c o のリン酸緩衝食塩水 ( D P B S ; W e l g e n e ) で限外濾過により 3 回濾過することによって、マレイミド ( M a l e i m i d e ) - 修飾されたメリチン M の N - 末端に D M 1 を結合させて P D C を作製し、M - D M 1 として命名した。作製した M - D M 1 は、P o r o s h e l l 1 2 0 C 1 8 c o l u m n ( 2 . 7 μ m , 3 × 5 0 m m , A g i l e n t , S a n t a C l a r a , C A , U S A ) にて逆相高性能液体クロマトグラフィー ( H P L C ) を 5 μ L , 0 . 5 m L / 分 の速度で注入し、特性を分析した。

## 【 0 0 9 8 】

## 【表 4】

名称	配列	配列番号	説明
メリチン	G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q	1	メリチンペプチド
T A M p e p 8 2 6	V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q	2	メリチンの最初の 7 個のアミノ酸が除去されたペプチド
リンカー	G G G G S	3	
d K L A	d [ K L A K L A K K L A K L A K ]	4	プロアポトーシスペプチド
M e l i t t i n - d K L A	G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q - G G G G S - d [ K L A K L A K K L A K L A K ]	5	メリチンにリンカーおよび薬物 d K L A が付着したペプチド
T B 5 1 1	V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q - G G G G S - d [ K L A K L A K K L A K L A K ]	6	T A M p e p 8 2 6 にリンカーおよび薬物 d K L A が付着したペプチド
M - D M 1			マレイミド修飾されたメリチンに薬物 DM 1 がコンジュゲートされた P D C

## 【 0 0 9 9 】

## 5 - 2 . I T G B 2 結合 A D C ( A n t i b o d y - d r u g c o n j u g a t e ) の合成

## 5 - 2 - 1 . 抗 - C D 1 8 抗体および D M 1 の A D C の作製

マクロファージ - 1 抗原 ( M a c r o p h a g e - 1 a n t i g e n , M a c - 1 ) のうちの一つである、C D 1 8 の M 2 T A M における活性型構造 ( A c t i v e c o n f o r m a t i o n ) に特異的に結合する抗体 ( 図 1 4 ) を作製するために、抗 - C D 1 8 抗体を分泌するハイブリドーマ ( M M 1 8 / 2 . a . 8 ) 細胞の培養液を集めて、2 , 5 0 0 r p m , 4 °C で 1 0 分間遠心分離し、上澄み液を得た後、タンパク質 G - セファロースカラムクロマトグラフィー方法により精製した。P B S で予め平衡化させたタンパク

質 G - セファロースカラム (Pharmacia、スウェーデン) に抗体溶液をゆっくりと通過させ、カラムをペリスタティックポンプ (peristaltic pump) に連結し、PBS で十分に洗浄した。洗浄完了後、0.2 M のグリシン (glycine) - HCl (pH 2.7) で抗体を溶出した。このとき、予め用意した 1 M の Tris (pH 9.0) を含むチューブに前記溶出液を緩衝させた。この抗体を PBS に透析 (dialysis) した後、用いた。BCA タンパク質分析キット (BCA (商標出願) Protein Assay Kit、Pierce) を用いて精製された抗体量を測定し、Flow cytometry 分析を通じて、抗体の結合能を確認した。精製した抗 - CD 18 抗体を PBS (pH 7.4) にバッファー交換し、抗 - CD 18 抗体 (1 mg/ml、6.67  $\mu$ M) に DMSO に溶かした SMCC - DM1 (mertansine、120  $\mu$ M) (MedChemExpress) を 1 : 18 の比率で混ぜ、常温で 4 ~ 20 時間反応させた。未反応の DM1 を除去するため、10 KDa cutoff centrifugal filter を用いて、CD 18 - DM1 を PBS (pH 7.4) にバッファー交換し、0.2  $\mu$ m シリンジフィルターでろ過した。UV - Vis spectroscopy を用いて、抗 - CD 18 抗体 (280 nm) に結合された DM1 (252 nm) の量を測定し、DM1 と抗 - CD 18 抗体の比率 (drug antibody ratio、DAR) を計算し、DAR 値は 5.8 として示された。このように作製された抗 - CD 18 抗体と DM1 が結合された ADC を CD 18 - DM1 と命名した。

#### 【0100】

5 - 2 - 2. 抗 - CD 18 抗体および MMAE (Monomethyl auristatin E) の ADC の作製 20

前記実施例にて精製した抗 - CD 18 抗体を PBS (pH 7.4) にバッファー交換し、CD 18 抗体のジスルフィド結合 (disulfide bond) を部分的に還元するために、抗 - CD 18 抗体 (1 mg/ml、6.67  $\mu$ M) に 1 mM DTT (66.7  $\mu$ M) を 1 : 10 の比率で混ぜ、37 °C で 1 ~ 2 時間反応させ、PBS (pH 7.4) にバッファー交換した。部分的に還元された抗 - CD 18 抗体 (1 mg/ml、6.67  $\mu$ M) に 10 mM Suo - Val - Cit - PAB - MMAE (MedChemExpress) を 1 : 20 ~ 1 : 40 の比率で混ぜ、4 °C で 12 時間反応させ、PBS (pH 7.4) にバッファー交換した。UV - Vis spectroscopy を用いて、抗 - CD 18 抗体 (280 nm) に結合された vc - MMAE (248 nm) の量を測定し、vc - MMAE と抗 - CD 18 抗体の比率 (drug antibody ratio、DAR) を計算し、DAR 値は、2.8 ~ 5.4 として示された。このように作製された抗 - CD 18 抗体と MMAE が結合された ADC を CD 18 - MMAE と命名した。

#### 【0101】

実施例 6. ITGB2 結合 PDC の M2 TAM 結合の確認

ITGB2 および Melittin - dKLA の結合力を確認するために、ITGB2 タンパク質を金薄膜センサーチップ上にコーティングした後、陽性対照群として ITGB2 抗体および Melittin - dKLA をそれぞれ流し、反射光を測定し、表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance、SPR) 分析を行った。具体的に、センサーチップ表面に ITGB2 を固定させた後、アミンカップリング (amine coupling) を用いて、下記表 5 の条件で固定化 (immobilization) を行った (図 15)。その後、ITGB2 がコーティングされたセンサチップに多様な濃度の ITGB2 抗体および Melittin - dKLA を流し、結合 (association) および解離 (dissociation) 区間を観察し、センサグラムを通じて下記表 6 の分子間結合速度定数分析 (kinetic evaluation) 条件で分子間結合速度定数 (kinetic parameter) を計算した。

#### 【0102】

【表 5】

結合方法	アミン結合	
センサーチップ	HC1000M	
流動バッファー	PBS pH 7.4	
フローセル 1	活性化	200mM EDC, 100mM NHS
	ブロッキングタンパク質	BSA
	ブロッキング	1 M エタノールアミン <sup>+</sup> HCl
フローセル 2	活性化	200mM EDC, 100mM NHS
	リガンド濃度	50 µg/ml in 5 mM 酢酸バッファー (pH 4.0)
	標的RU	5000 RU
	ブロッキング溶媒	1 M エタノールアミン <sup>+</sup> HCl

10

【 0 1 0 3 】

【表 6】

2) 動態評価

流動バッファー	1 X PBS			
分析対象	名前	抗-ITGB2抗体, TAMpep		
	濃度	抗-ITGB2抗体	1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM	
		TAMpep	15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 nM	
結合設定	接触時間(分)	2 分	流量 (ul/分)	30 µl/分
	解離時間(分)	5 分	安定化時間 (分)	0
再生	再生溶液	グリシン pH 1.5	流量 (ul/分)	30 µl/分
	接触時間(秒)	45 sec	安定化時間 (分)	2 分

20

【 0 1 0 4 】

30

その結果、陽性対照群であるITGB2抗体の二つの分子間の結合力を評価する解離速度定数 (kd; dissociation rate constant) を結合速度定数 (ka; association rate constant) に分けて得る平衡解離定数 (KD; equilibrium dissociation constant) が  $1.14 \cdot 10^{-8}$  で、Melittin-dKLAの平衡解離定数は、 $7.86 \cdot 10^{-8}$  で示された (図16および17)。したがって、Melittin-dKLAがITGB2と結合力を有していることが確認された。

【 0 1 0 5 】

実施例 7 . PDCのITGB2によるM2 TAM細胞死滅効果の確認

7 - 1 . ITGB2の発現抑制細胞モデルの作製

40

M2マクロファージにおいて、ITGB2を通じて細胞死滅を誘導するか否かを確認するために使用するための細胞モデルとして、Crispr/cas9を用い、M2マクロファージにてITGB2の発現が抑制された細胞モデルを作製した。具体的には、M2マクロファージに分化された細胞をOpti-MEM培地で培養した。Crispr/cas9は、CRISPRMAX (商標出願) Reagent kit (Thermo Fisher scientific) のCas9 protein V2 (Thermo Fisher scientific) とgRNA (Genscript; ITGB2; 表7) をCas9 Plus (商標出願) Reagent (Thermo Fisher scientific) と共に混ぜ、CRISPRMAX (商標出願) ReagentをOpti-MEM培地に希釈した後、全部混ぜて5 - 10分間反応させた後、M2マクロ

50



ファージに分化された細胞に添加し、37℃で2～3日間培養した。その後、ITGB2のmRNA発現レベルを確認した。

【0106】

【表7】

s gRNA	配列 (5' to 3')
ITGB2	mG*mU*mU*rCrArArCrGrUrGrArCrCrUrUrCrCrGrGr rCrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGr CrArArGrUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrC rCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUr GrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCrU*mU*mU*mU

10

【0107】

その結果、ITGB2 s gRNAを注入したM2マクロファージは、ITGB2の発現が対照群に比べて有意に減少することが示された(図18)。

【0108】

7-2. Melittin-dKLAのITGB2によるM2 TAM細胞死滅の確認  
Melittin-dKLAがM2マクロファージにおいて、ITGB2に結合し、細胞アポトーシス(apoptosis)を誘導するか否かを確認するために、前記実施例7-1にて作製したCrispr/cas9によりITGB2発現が抑制されたM2マクロファージにMelittin-dKLA(1μM)を24時間処理し、CCK-8分析方法を用いて細胞生存率を分析した。具体的には、前記実施例7-1にて作製したITGB2ロックダウンマクロファージにMelittin-dKLA(1μM)を1時間反応させた。反応後、培地を交換し、37℃で24時間培養した。細胞生存能を確認するために、CCK-8 reagent (Enzo Life Sciences)を培地の1/10入れ、37℃で3時間反応させた。吸光度は、microplate reader (Molecular Devices)で450nmにて測定した。

20

【0109】

その結果、対照群M2マクロファージにおいて、Melittin-dKLAにより細胞生存率が著しく減少したが、ITGB2がロックダウンされたM2マクロファージでは、Melittin-dKLAによる細胞生存率の減少が抑制されることが示された(図19)。したがって、これを通じて、Melittin-dKLAがM2マクロファージのITGB2と特異的に結合することによってM2マクロファージの細胞アポトーシスを誘導することを確認することができた。

30

【0110】

7-3. TB511のITGB2によるM2 TAM細胞死滅の確認  
TB511(TAMpep826-dKLA)がM2マクロファージにおいて、ITGB2により細胞死滅を誘導するか否かを確認するために、前記実施例7-1にて作製したCrispr/cas9によりITGB2発現が抑制されたM2マクロファージにTB511を反応させた。その結果、M2マクロファージは、TB511により50%程度の細胞生存能を示したが、ITGB2発現が抑制された細胞からは細胞生存能が有意に増加することが示された(図20)。

40

【0111】

7-4. ITGB2抗体によるTB511の細胞死滅誘導減少の確認  
TB511がM2マクロファージにおいて、ITGB2により細胞死滅を誘導するか否かを確認するために、前記実施例7-1にて作製したITGB2発現が抑制されたM2マクロファージに抗-ITGB2抗体(Polyclonal Rabbit anti-Human ITGB2/CD18抗体)(LS-C312785; LS Bio)(1μg)を1時間前処理した後、TB511(1μM)を1時間反応させた後、細胞死滅誘導するか否かをCCK-8分析を用いた細胞生存能分析により、細胞死滅マーカーであるc

50

cas p a s e - 3 のタンパク質発現をウェスタンブロット解析により、cas p a s e - 3、cas p a s e - 8、cas p a s e - 9 の遺伝子発現を Real - t i m e P C R により、および cas p a s e - 3 のタンパク質発現誘導を免疫蛍光法により確認した。

#### 【 0 1 1 2 】

その結果、M 2 マクロファージは、I T G B 2 抗体によっては細胞生存能には影響がなく、T B 5 1 1 によっては細胞生存能が有意に減少した。その反面、I T G B 2 抗体を前処理した M 2 マクロファージでは、T B 5 1 1 による細胞生存能が有意に増加したことが示された ( 図 2 1 )。また、M 2 マクロファージは、T B 5 1 1 により cas p a s e - 3 発現が有意に増加するのに対し、I T G B 2 抗体を前処理した M 2 マクロファージでは、T B 5 1 1 による cas p a s e - 3 発現が有意に減少した ( 図 2 1 )。また、M 2 マクロファージは、T B 5 1 1 により cas p a s e - 3、cas p a s e - 8 および cas p a s e - 9 の発現が有意に増加するのに対し、I T G B 2 抗体を前処理した M 2 マクロファージでは、T B 5 1 1 による cas p a s e - 3、cas p a s e - 8 および cas p a s e - 9 の発現が有意に減少した ( 図 2 1 )。M 2 マクロファージは、T B 5 1 1 により cas p a s e - 3 発現が増加するのに対し、I T G B 2 抗体を前処理した M 2 マクロファージでは、T B 5 1 1 による cas p a s e - 3 発現が減少した ( 図 2 1 )。さらに、T B 5 1 1 のミトコンドリア標的化を確認した結果、I T G B 2 抗体を前処理した M 2 マクロファージは、I T G B 2 前処理していない細胞に比べて、ミトコンドリアと T B 5 1 1 の co - l o c a l i z a t i o n が減少した ( 図 2 1 )。

#### 【 0 1 1 3 】

実施例 8 . 3 D 癌オルガノイドにおける P D C の効能の確認

8 - 1 . 乳癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果の確認

in v i t r o での限界点を補完し、in v i v o を代替すべく乳癌の癌微小環境 ( T u m o r m i c r o e n v i r o n m e n t ; T M E ) を模擬した 3 D オルガノイドを作製し、これに対する T B 5 1 1 の効果を確認した。具体的には、R P M I - 1 6 4 0 培養液にマトリゲル ( m a t r i g e l ) が 3 % となるように混合し、M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳癌細胞、C A F ( C a n c e r - a s s o c i a t e d F i b r o b l a s t ) および I n c u c y t e ( 登録商標 ) N u c l i g h t L e n t i v i r u s R e a g e n t s ( S a r t o r i u s ) を用いて、G F P が発現されるように作製した T H P - 1 細胞を計数し、5 : 1 : 1 の比率で 2 0 0  $\mu$  l となるように 9 6 u - b o t t o m 3 - D c u l t u e p l a t e ( S b i o ) に分注した。培養後、1 2 0 0 r p m で 3 分間遠心分離し、細胞を集めた後、3 7 のインキュベーターで 4 8 時間培養し、スフェロイド ( s p h e r o i d ) を形成した。スフェロイド形成 2 日目から T B 5 1 1 を 1  $\mu$  M、2  $\mu$  M、4  $\mu$  M および 8  $\mu$  M の濃度で 3 日毎にそれぞれ処理し、蛍光顕微鏡で画像を撮影し、B r i g h t - f i e l d 画像を撮影した後、ペレットの直径を測定方法により、スフェロイド領域 ( s p h e r o i d a r e a ) を測定した。また、平均腫瘍回転楕円体直径は、オープンソースを用いて、スフェロイド当たり平均 3 個の直径を測定し、I m a g e J ( s o f t w a r e v e r s i o n 1 . 4 7 m ) によりサイズを分析し、スフェロイドの大きさは、B r i g h t - f i e l d 画像を撮影した後、( 2 0 X )、平均腫瘍回転楕円体直径をスフェロイド当たり平均 3 個ずつ測定し、I m a g e J ( s o f t w a r e v e r s i o n 1 . 4 7 m ) により分析した。併せて、薬物処理 1 0 日目にスフェロイドを固定し、腫瘍増殖因子である k i - 6 7 に対する抗体 ( a b c a m ) を反応させて免疫蛍光染色を行った ( 対照染色 : D A P I )。T H P - 1 の場合、別途の染色を進めず、細胞内に発現する G F P 蛍光を共焦点顕微鏡で画像を撮影し、蛍光を発現する細胞の数を測定した。

#### 【 0 1 1 4 】

その結果、薬物を処理していない群は、時間が経つにつれてスフェロイドの大きさがだんだん大きくなり、単球 ( m o n o c y t e ) である T H P - 1 細胞が癌細胞および C A F と共培養時、癌細胞および T M E によって T A M に分化され、腫瘍成長を促進することが

示された。その反面、T B 5 1 1 を処理した群では、10 日目に 1  $\mu$  M の濃度で濃度依存的にスフェロイドの大きさが減少することが確認され (図 2 2)、G F P 蛍光を発現する T H P - 1 細胞の数が薬物無処理群に比べて濃度依存的に著しく減少することが示された (\*\*\*  $p < 0.001$ ) (図 2 3)。したがって、I T G B 2 結合 P D C である T B 5 1 1 が T H P - 1 細胞に選択的に結合し、M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳癌の細胞死滅を誘導することが確認された。

#### 【0115】

##### 8 - 2 . 肺癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果の確認

前記実施例 8 - 1 の方法により A 5 4 9 ヒト肺癌細胞、C A F および T H P - 1 細胞を混合し、肺癌 3 D スフェロイドを作製した後、T B 5 1 1 を 1  $\mu$  M、2  $\mu$  M および 4  $\mu$  M の濃度でそれぞれ処理し、その効果を前記実施例 8 - 1 と同様に分析した。スフェロイド作製時、癌細胞単独または癌細胞 + C A F 細胞のみを混合して、3 D スフェロイドも作製し、スフェロイドの大きさを比較した。

#### 【0116】

その結果、A 5 4 9 細胞単独または A 5 4 9 + C A F 細胞のみでスフェロイドを形成したときよりも A 5 4 9 + C A F + T H P - 1 細胞でスフェロイドを形成したときのスフェロイドの大きさが著しく増加することが示された。また、T B 5 1 1 を処理していない群に比べて、T B 5 1 1 を処理した群において、スフェロイドの大きさが T B 5 1 1 の濃度依存的に著しく減少することが示された (\*\*\*  $p < 0.001$ ) (図 2 4)。また、薬物を処理してから 10 日目にスフェロイドを蛍光染色し、関連マーカーを確認した結果、T B 5 1 1 を処理していない群に比べて、T H P - 1 細胞の数が濃度依存的に著しく減少しており、腫瘍増殖因子 k i - 6 7 も濃度依存的に減少することが示された (\*\*\*  $p < 0.001$ ) (図 2 5)。

#### 【0117】

##### 8 - 3 . 肺癌 3 D オルガノイドにおける M - D M 1 の効果の確認

肺癌に対する M - D M 1 (M e l - D M 1) の効能を確認するため、前記実施例 8 - 1 の方法により A 5 4 9 ヒト肺癌細胞、C A F および T H P - 1 細胞を混合して、肺癌 3 D スフェロイドを作製した後、M - D M 1 を 1  $\mu$  M、2  $\mu$  M および 4  $\mu$  M の濃度でそれぞれ処理し、その効果を前記実施例 8 - 1 と同様に分析した。

#### 【0118】

その結果、M - D M 1 を処理していない群に比べて、M - D M 1 を処理した群において、濃度依存的にスフェロイドの大きさが減少することが示された (\*\*\*  $p < 0.001$ ) (図 2 6)。

#### 【0119】

##### 実施例 9 . 抗癌剤耐性 3 D 癌オルガノイドにおける P D C の効能の確認

##### 9 - 1 . 抗癌剤耐性肺癌 3 D オルガノイドにおける T B 5 1 1 の効果の確認

カルボプラチン (C a r b o p l a t i n) 耐性肺癌に対する T B 5 1 1 の効能を確認するため、前記実施例 8 - 1 の方法によりカルボプラチン耐性 A 5 4 9 細胞、C A F および T H P - 1 細胞を混合し、3 D - スフェロイドを形成し、T B 5 1 1 を 1  $\mu$  M、2  $\mu$  M および 4  $\mu$  M の濃度でそれぞれ処理した後、その効果を前記実施例 8 - 1 と同様に分析した。

#### 【0120】

その結果、A 5 4 9 耐性細胞単独または A 5 4 9 + C A F 細胞のみでスフェロイドを形成したときよりも、A 5 4 9 + C A F + T H P - 1 細胞でスフェロイドを形成したときのスフェロイドの大きさが著しく増加することが示され、T B 5 1 1 を処理していない群に比べて、T B 5 1 1 を処理した群において、スフェロイドの大きさが T B 5 1 1 濃度依存的に著しく減少することが示された (\*\*\*  $p < 0.001$ ) (図 2 7)。また、薬物を処理してから 10 日目にスフェロイドを免疫蛍光染色し、関連マーカーを確認した結果、T B 5 1 1 無処理群に比べて、T B 5 1 1 を処理した群において、T H P - 1 細胞の数が濃度依存的に著しく減少しており、腫瘍増殖因子 k i - 6 7 も 2  $\mu$  M から有意的に減少した

ことが示された ( $*** p < 0.001$ ) (図 28)。

【0121】

9-2. 抗癌剤耐性前立腺癌 3Dオルガノイドにおける TB511 の効果の確認

ドセタキセル (Docetaxel) 耐性前立腺癌に対する TB511 の効果を確認するため、前記実施例 8-1 の方法によりドセタキセル耐性 PC3 前立腺癌細胞、CAF および THP-1 細胞を混合し、3D-スフェロイドを形成し、TB511 を  $1 \mu\text{M}$ 、 $2 \mu\text{M}$  または  $4 \mu\text{M}$  の濃度でそれぞれ処理した後、その効果を前記実施例 8-1 と同様に分析した。

【0122】

その結果、PC3 耐性細胞単独または PC3 + CAF 細胞のみでスフェロイドを形成したときよりも、PC3 + CAF + THP-1 細胞でスフェロイドを形成したとき、その大きさが著しく増加しており、TB511 を処理していない群に比べて、TB511 を処理した群において、スフェロイドの大きさが TB511 濃度依存的に著しく減少することが示された ( $*** p < 0.001$ ) (図 29)。また、薬物を処理してから 10 日目にスフェロイドを免疫蛍光染色し、関連マーカーを確認した結果、TB511 無処理群に比べて、TB511 を処理した群において、THP-1 細胞の数が濃度依存的に著しく減少しており、腫瘍増殖因子  $ki-67$  も減少する傾向を示した ( $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ ) (図 30)。

【0123】

実施例 10. 3D 癌オルガノイドにおける ADC の効果の確認

10-1. 乳癌 3Dオルガノイドにおける ADC の効果の確認

乳癌に対する ITGB2 結合 ADC (Antibody-drug conjugate) の効果を確認するため、前記実施例 8-1 の方法により MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞、CAF および THP-1 細胞を混合し、3D-スフェロイドを形成し、本発明の ADC である CD18-DM1 または CD18-MMAE を  $10 \mu\text{g}$  および  $20 \mu\text{g}$  の濃度でそれぞれ処理した後、その効果を前記実施例 8-1 と同様に分析した。

【0124】

その結果、ADC を処理していない群は、時間が経つにつれて乳癌スフェロイドの大きさがだんだん大きくなったが、ADC を処理した群では、8 日目にスフェロイドの大きさが減少することが示された (図 31 および 32)。また、ADC を処理していない群において、GFP 陽性 THP-1 細胞が強く増加したが、CD18-DM1 または CD18-MMAE 処理群では、濃度依存的に減少することが示された ( $*** p < 0.001$ ) (図 31 および 32)。

【0125】

10-2. 肺癌 3Dオルガノイドにおける ADC の効果の確認

肺癌に対する ADC の効果を確認するため、前記実施例 8-1 の方法により A549 ヒト肺癌細胞、CAF および THP-1 細胞を混合し、3D-スフェロイドを形成し、本発明の ADC である CD18-DM1 または CD18-MMAE を  $10 \mu\text{g}$  の濃度でそれぞれ処理した後、その効果を前記実施例 8-1 と同様に分析した。

【0126】

その結果、ADC を処理していない群は、時間が経つにつれてスフェロイドの大きさがだんだん大きくなるのに対し、CD18-DM1 または CD18-MMAE を処理した群では、8 日目にスフェロイドの大きさが減少することが示された (図 33)。また、薬物を処理してから 8 日目にスフェロイドを免疫蛍光染色し、関連マーカーを確認した結果、ADC を処理していない群において、THP-1 細胞が強く増加するのに対し、ADC 処理群では、著しく減少することが示された ( $*** p < 0.001$ ) (図 34)。

【0127】

実施例 11. 抗癌剤耐性 3D 癌オルガノイドにおける ADC の効果の確認

11-1. 抗癌剤耐性肺癌 3Dオルガノイドにおける ADC の効果の確認

カルボプラチン耐性肺癌に対する ADC の効果を確認するため、前記実施例 8-1 の方法

10

20

30

40

50

によりカルボプラチン耐性 A 5 4 9 細胞、C A F および T H P - 1 細胞を混合し、3 D - スフェロイドを形成し、C D 1 8 - D M 1 または C D 1 8 - M M A E をそれぞれ 1 0  $\mu$  g の濃度で処理した後、その効果を前記実施例 8 - 1 と同様に分析した。

#### 【 0 1 2 8 】

その結果、A D C を処理していない群は、時間が経つにつれてスフェロイドの大きさがだんだん大きくなるのに対し、C D 1 8 - D M 1 または C D 1 8 - M M A E を処理した群では、8 日目にスフェロイドの大きさが減少することが示された ( 図 3 5 )。また、薬物を処理してから 8 日目にスフェロイドを免疫蛍光染色し、関連マーカーを確認した結果、A D C を処理していない群に比べて、C D 1 8 - D M 1 または C D 1 8 - M M A E を処理した群において、T H P - 1 細胞の数が有意に減少し、腫瘍増殖因子 k i - 6 7 も減少することが示された ( \* \* \*  $p < 0 . 0 0 1$  ) ( 図 3 6 )。

10

#### 【 0 1 2 9 】

1 1 - 2 . 抗癌剤耐性前立腺癌 3 D オルガノイドにおける A D C の効果の確認  
ドセタキセル耐性前立腺癌に対する A D C の効能を確認するため、前記実施例 8 - 1 の方法によりドセタキセル耐性 P C 3 前立腺癌細胞、C A F および T H P - 1 細胞を混合し、3 D - スフェロイドを形成し、C D 1 8 - D M 1 または C D 1 8 - M M A E をそれぞれ 1 0  $\mu$  g の濃度で処理した後、その効果を前記実施例 8 - 1 と同様に分析した。

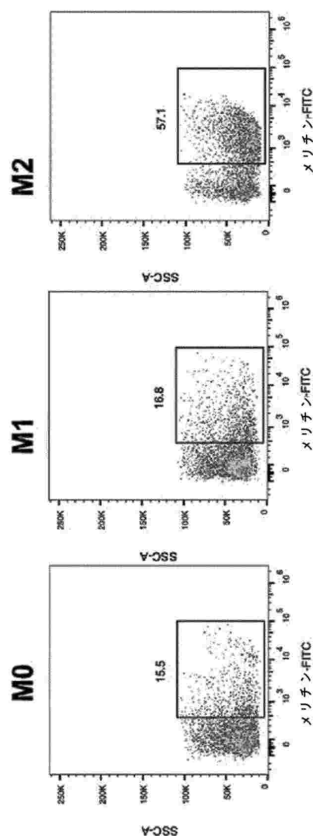
#### 【 0 1 3 0 】

その結果、A D C を処理していない群は、時間が経つにつれてスフェロイドの大きさがだんだん大きくなるのに対し、C D 1 8 - D M 1 または C D 1 8 - M M A E を処理した群では、8 日目にスフェロイドの大きさが減少することが示された ( 図 3 7 )。また、薬物を処理してから 8 日目にスフェロイドを免疫蛍光染色し、関連マーカーを確認した結果、A D C を処理していない群では、蛍光が強く増加するのに対し、C D 1 8 - D M 1 または C D 1 8 - M M A E を処理した群では、T H P - 1 細胞の数が著しく減少しており、腫瘍増殖因子 k i - 6 7 も減少することが示された ( \* \* \*  $p < 0 . 0 0 1$  ) ( 図 3 8 )。

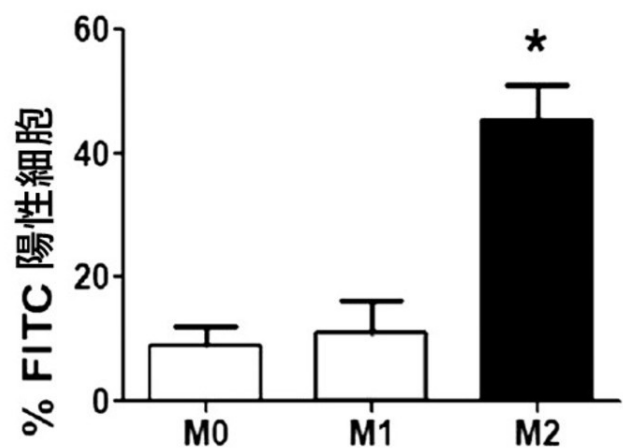
20

#### 【 図面 】

##### 【 図 1 a 】



##### 【 図 1 b 】

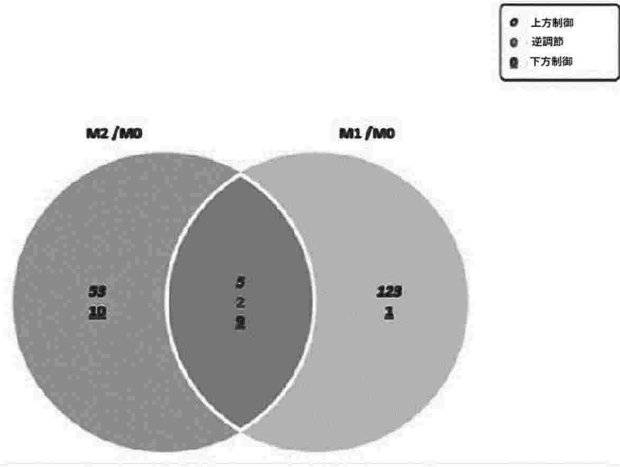


30

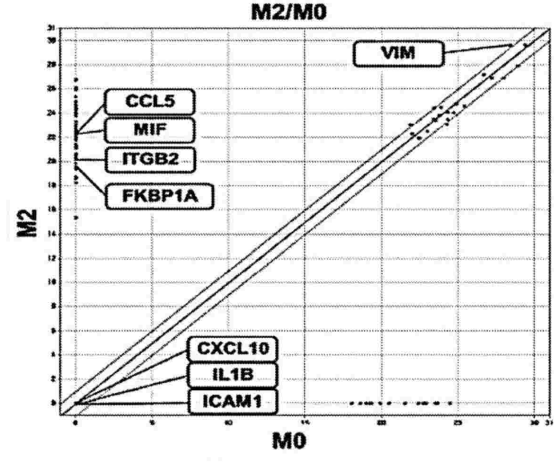
40

50

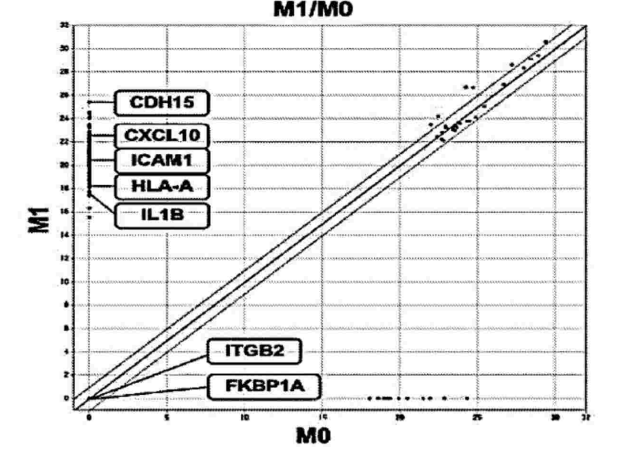
【 図 2 a 】



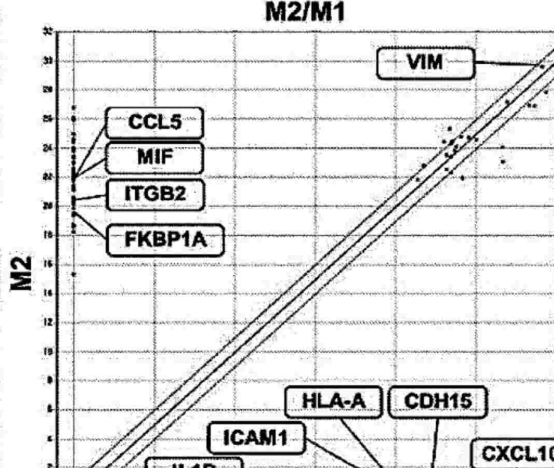
【 図 2 b 】



【 図 2 c 】



【 図 2 d 】



10

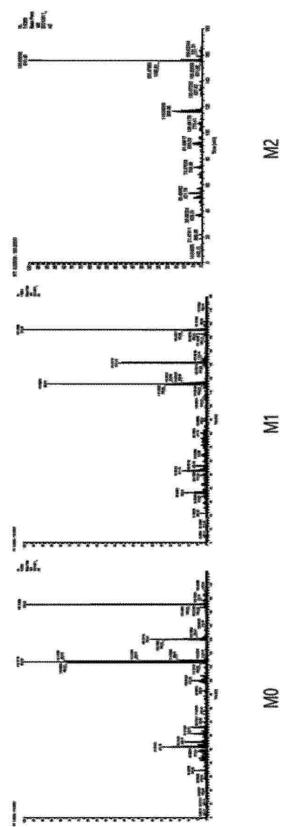
20

30

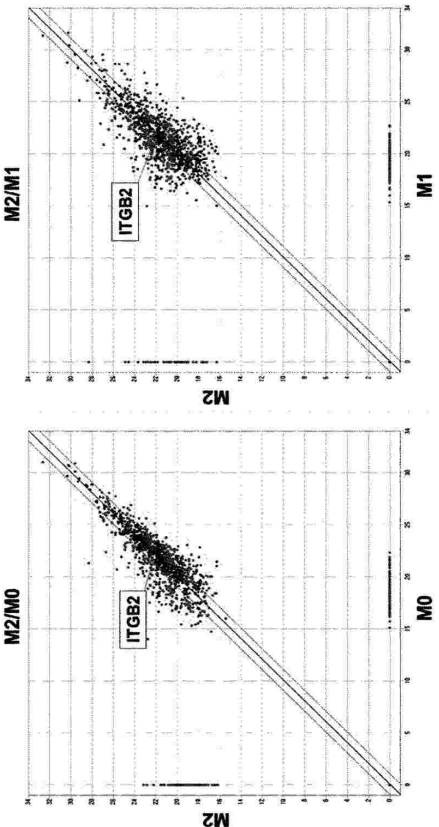
40

50

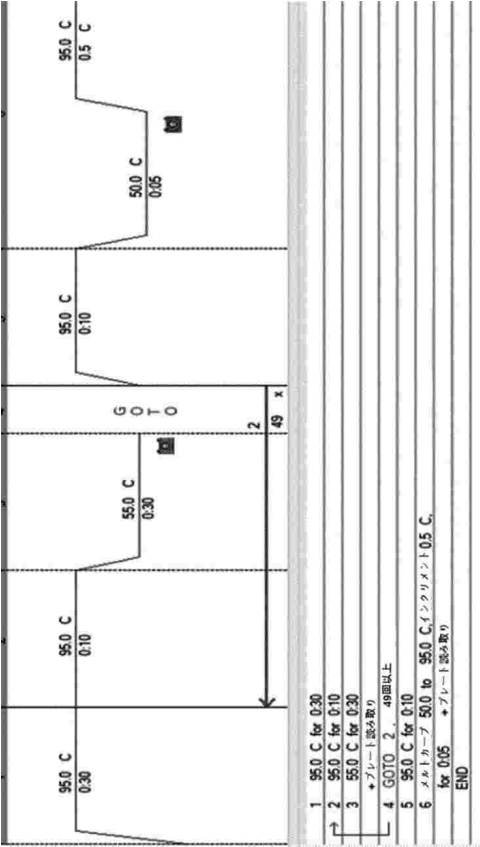
【 図 3 】



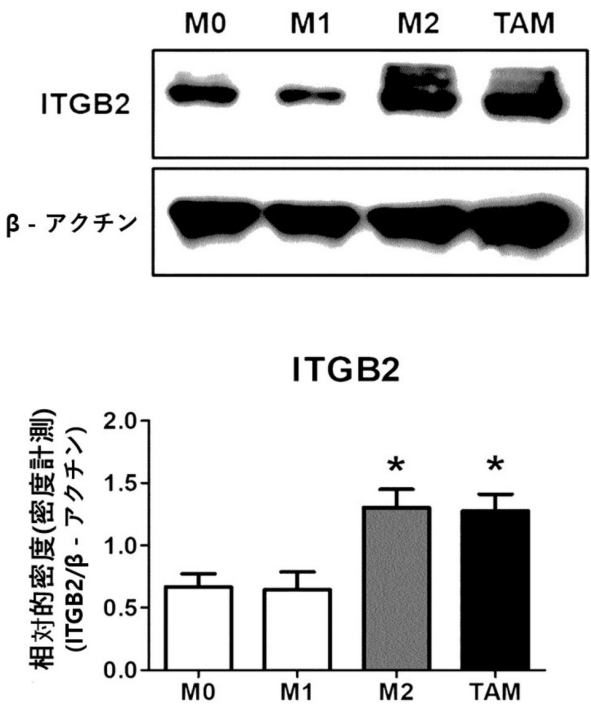
【 図 4 】



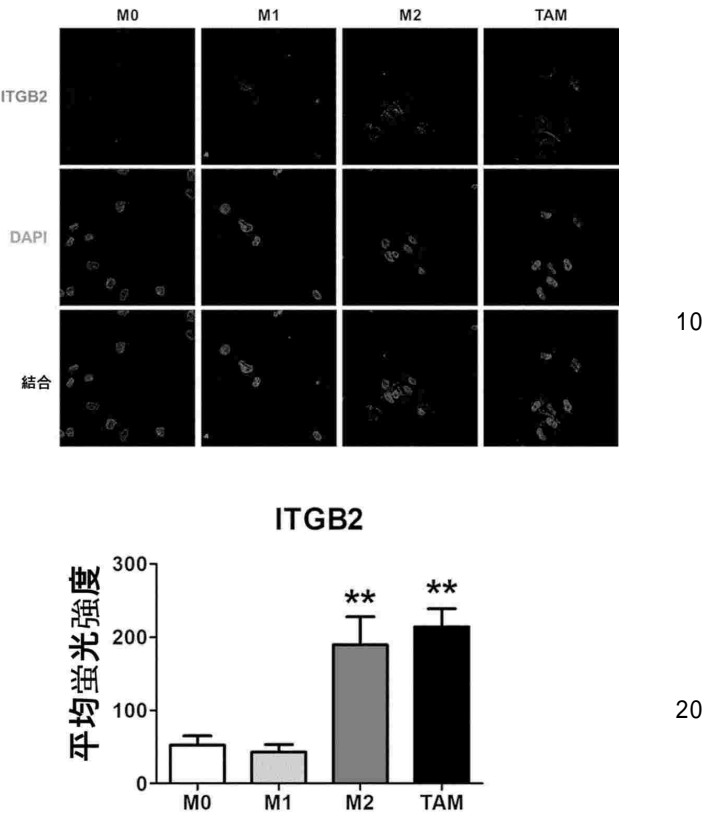
【 図 5 】



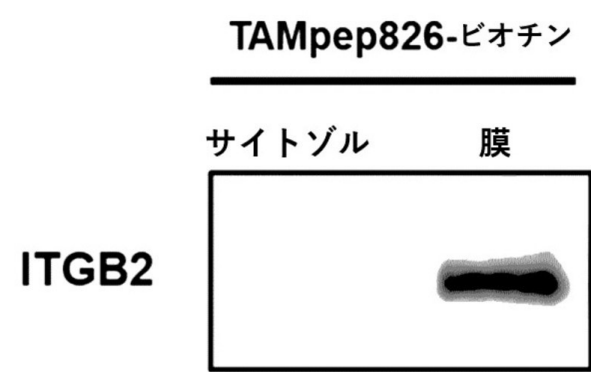
【 図 7 】



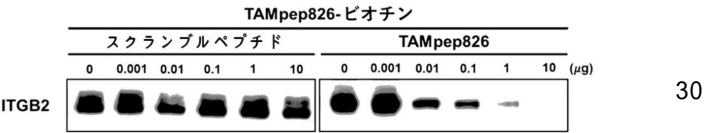
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



10

20

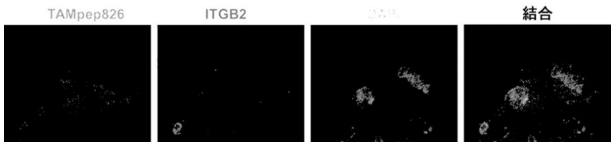
30

40

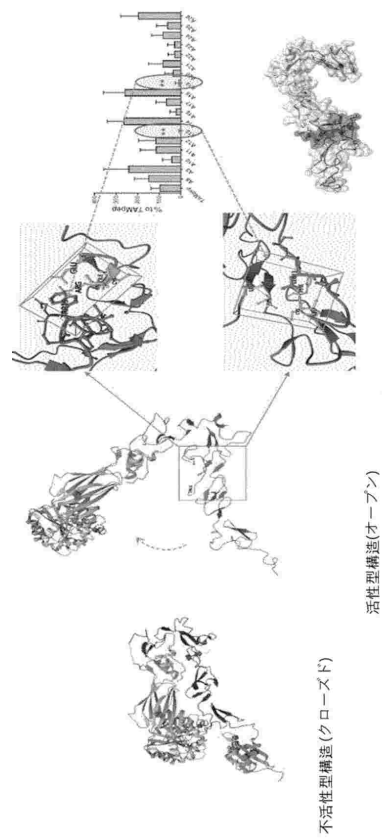
50



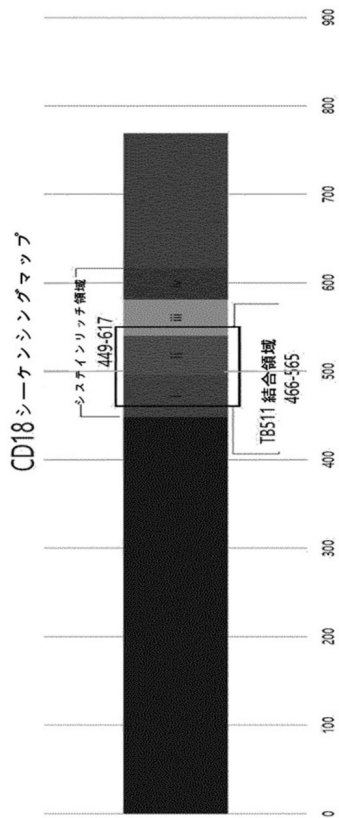
【図 1 1】



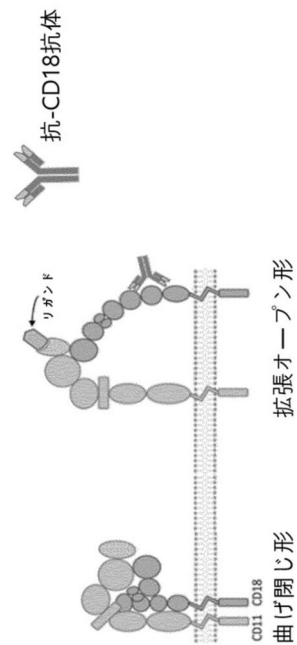
【図 1 2】



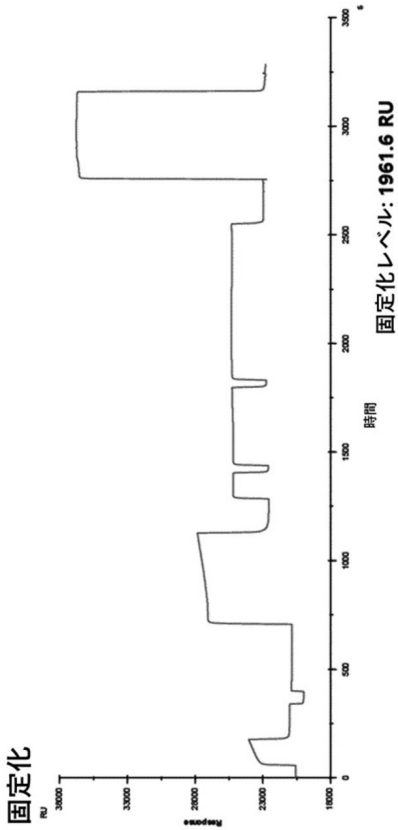
【図 1 3】



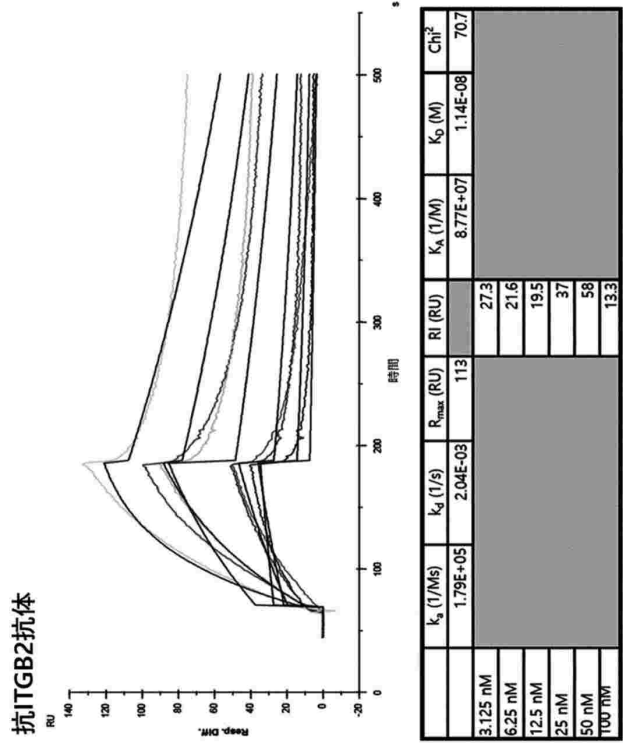
【図 1 4】



【 図 1 5 】



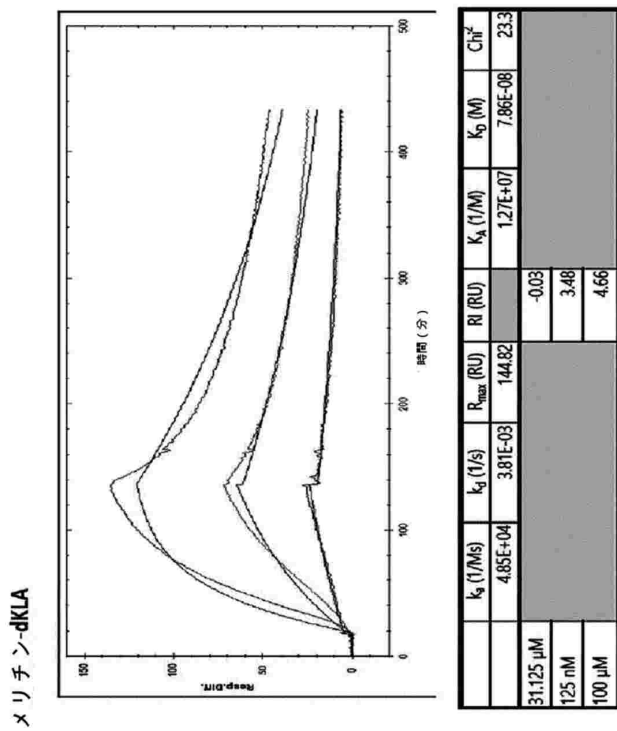
【 図 1 6 】



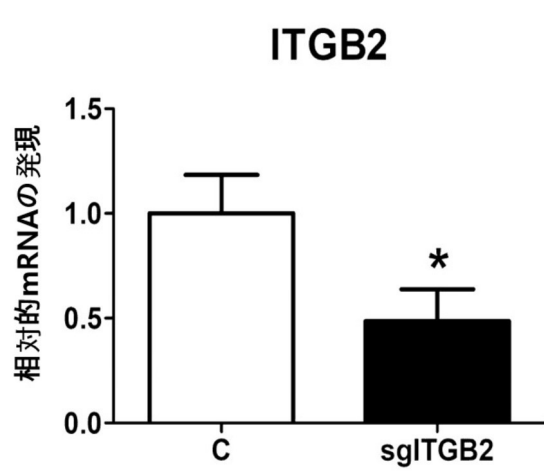
10

20

【 図 1 7 】



【 図 1 8 】

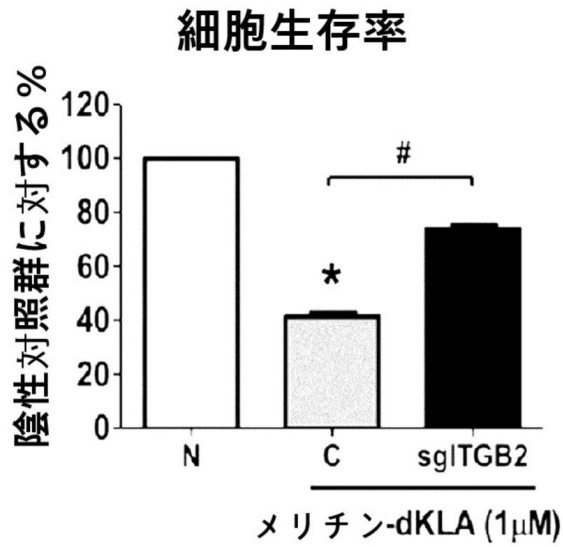


30

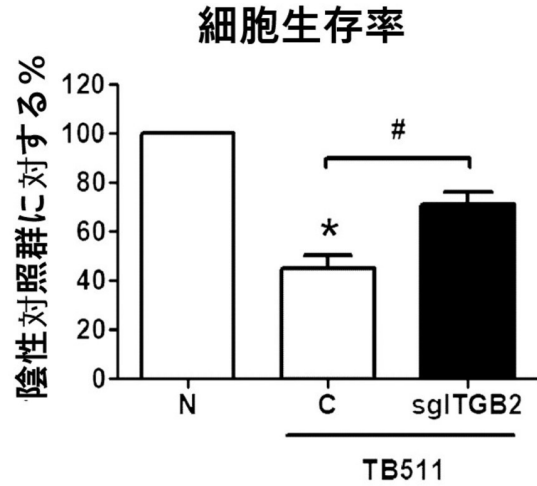
40

50

【図 19】

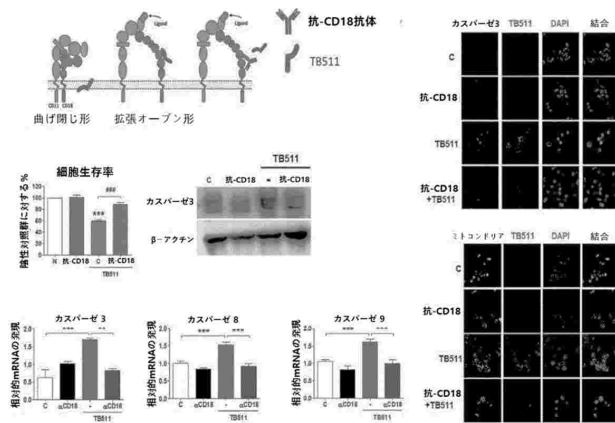


【図 20】

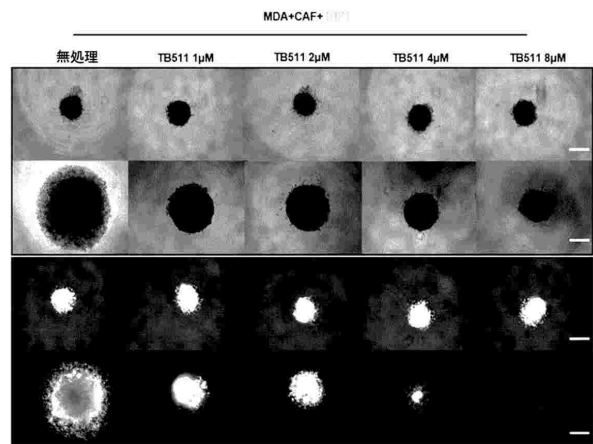


10

【図 21】



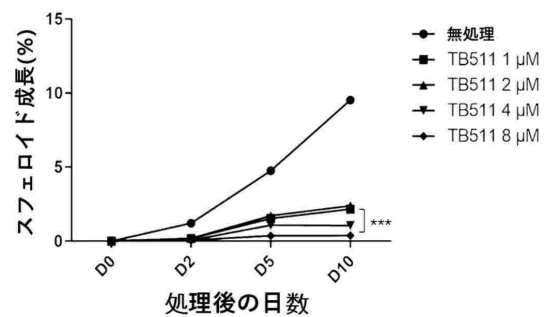
【図 22】



20

30

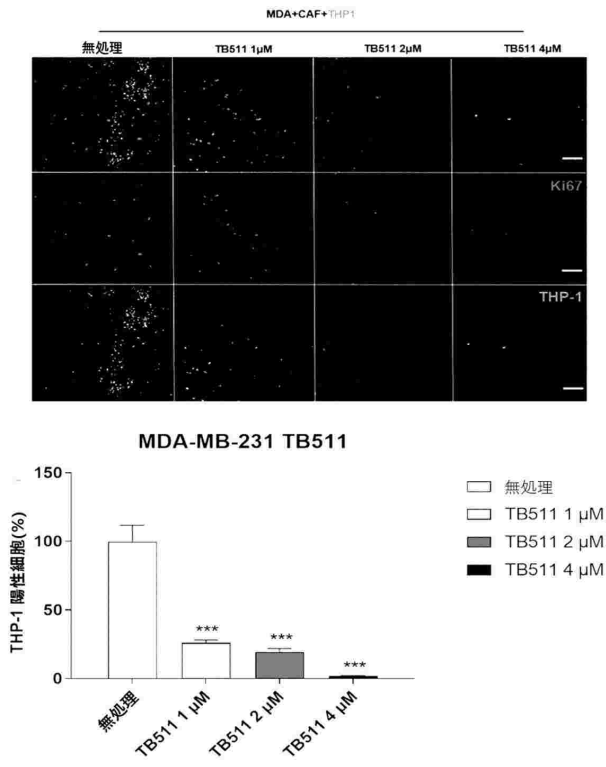
MDA-MB-231 TB511



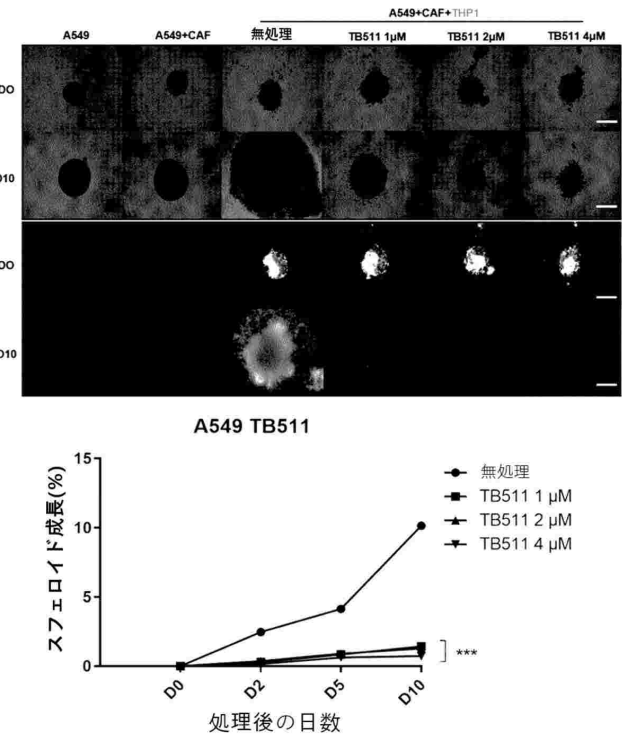
40

50

【図 2 3】



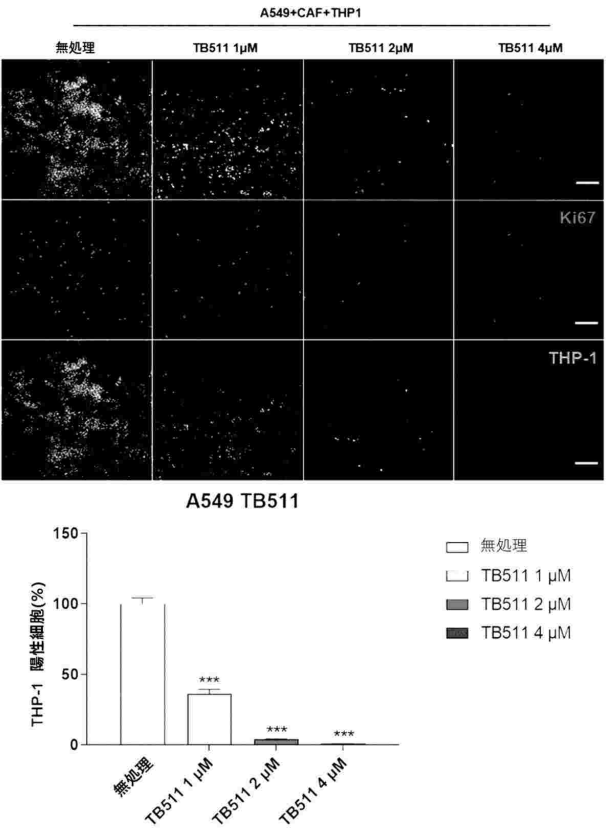
【図 2 4】



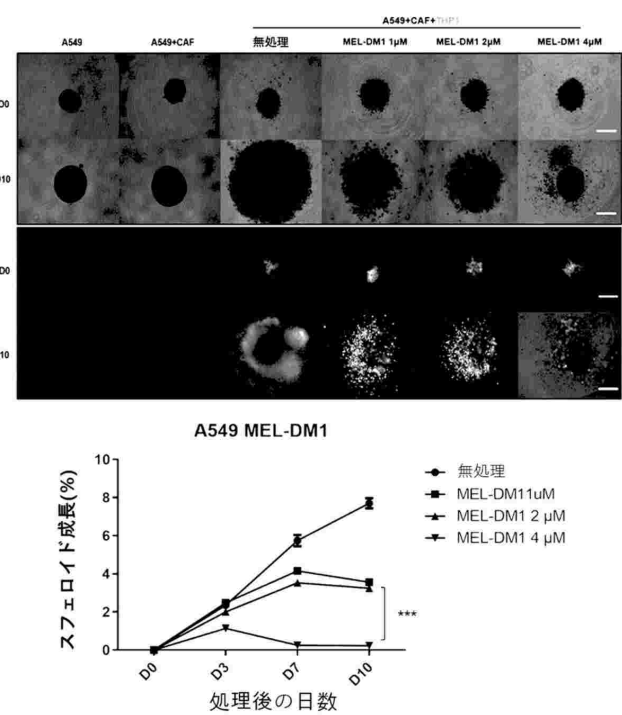
10

20

【図 2 5】



【図 2 6】

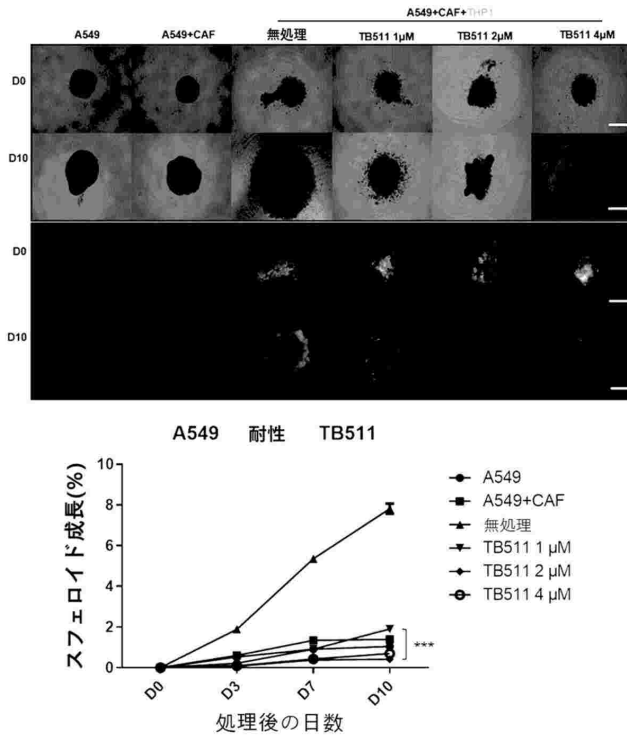


30

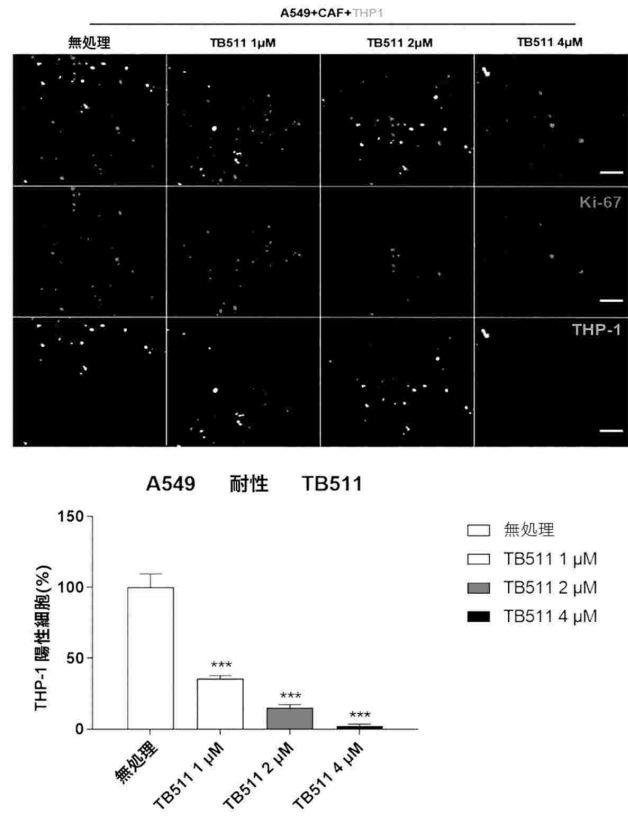
40

50

【図 27】



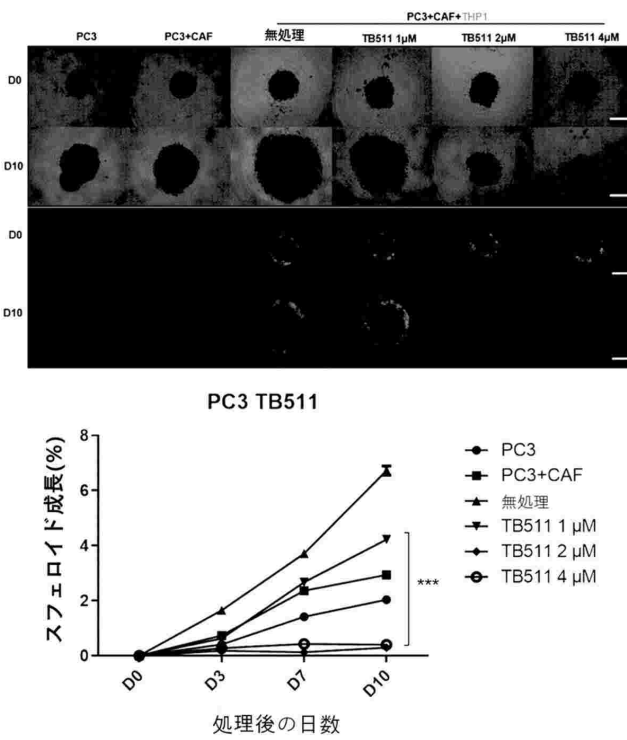
【図 28】



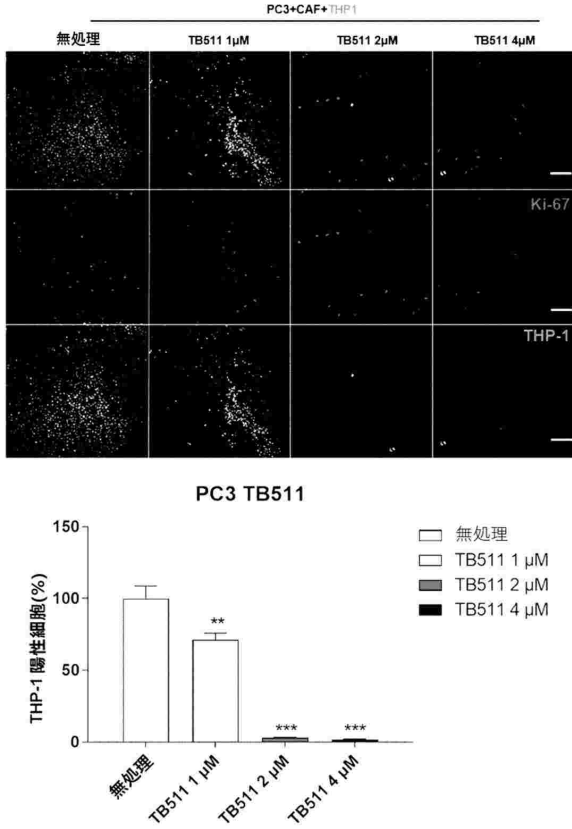
10

20

【図 29】



【図 30】

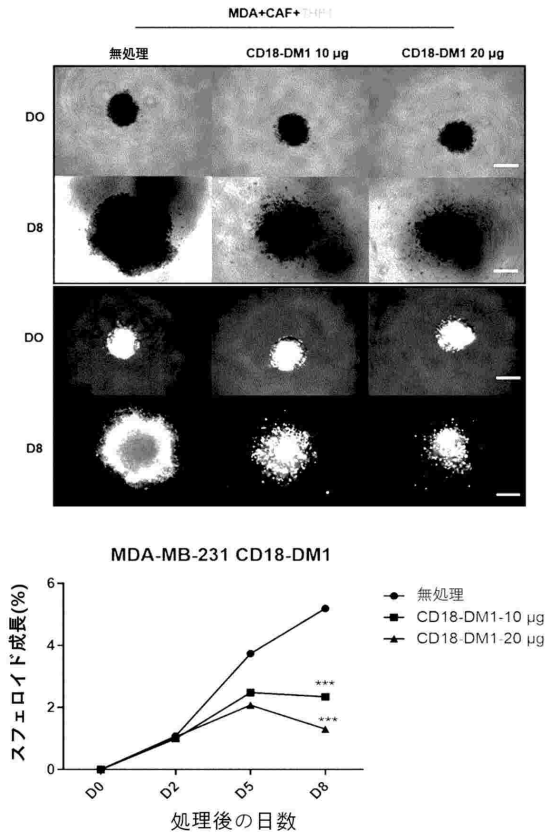


30

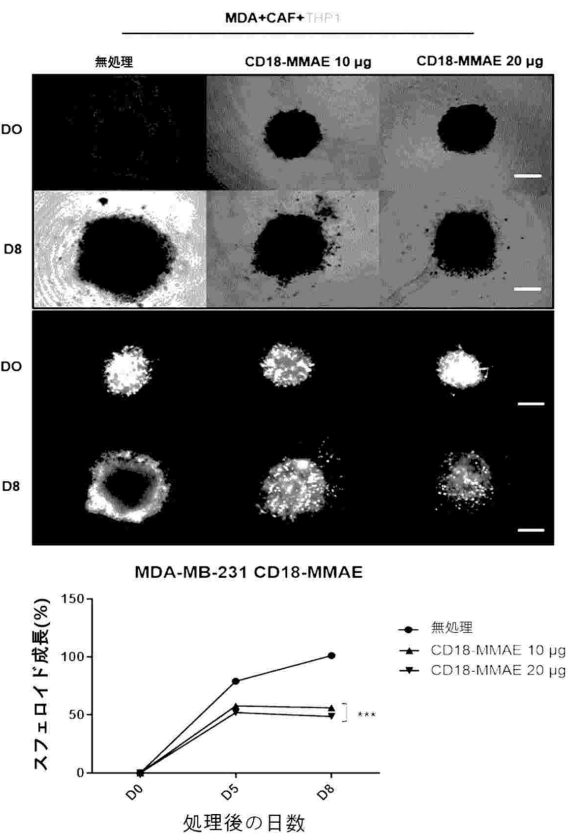
40

50

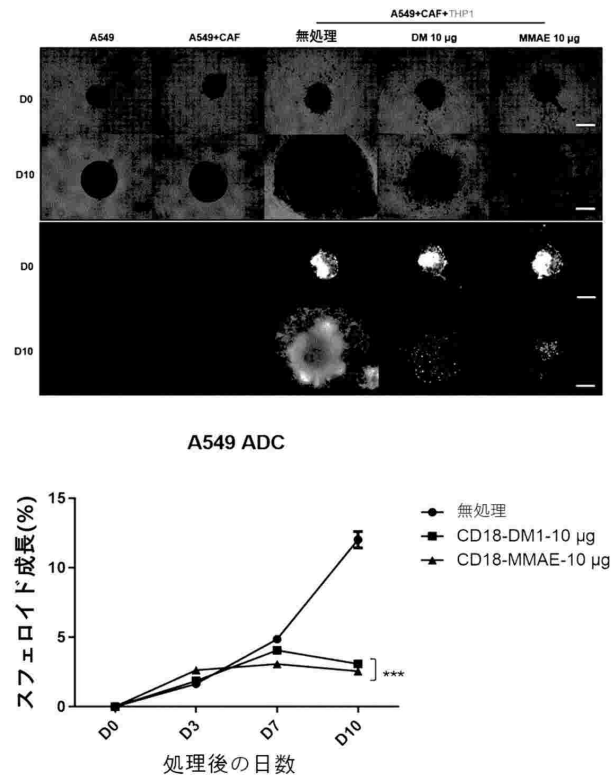
【 図 3 1 】



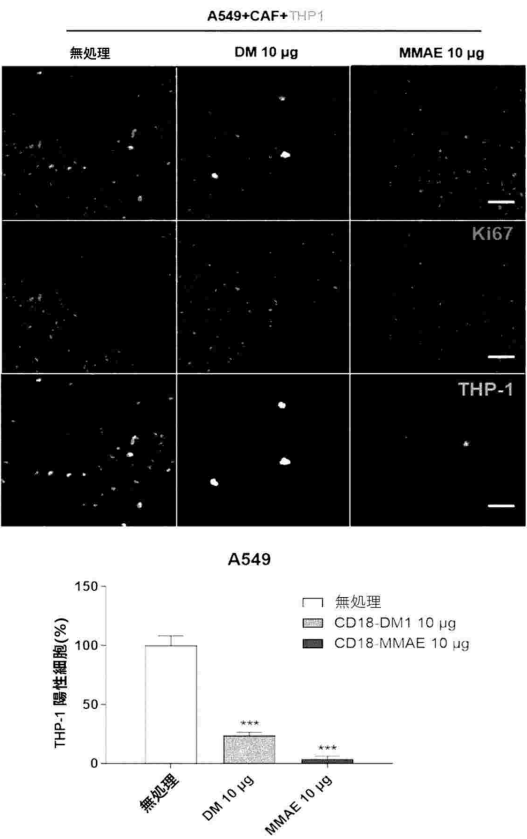
【 図 3 2 】



【 図 3 3 】



【 図 3 4 】



10

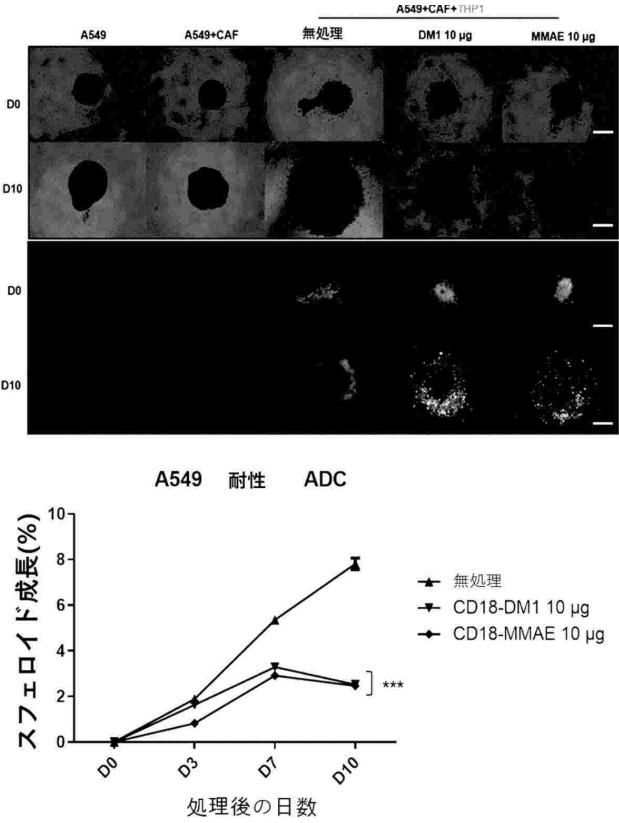
20

30

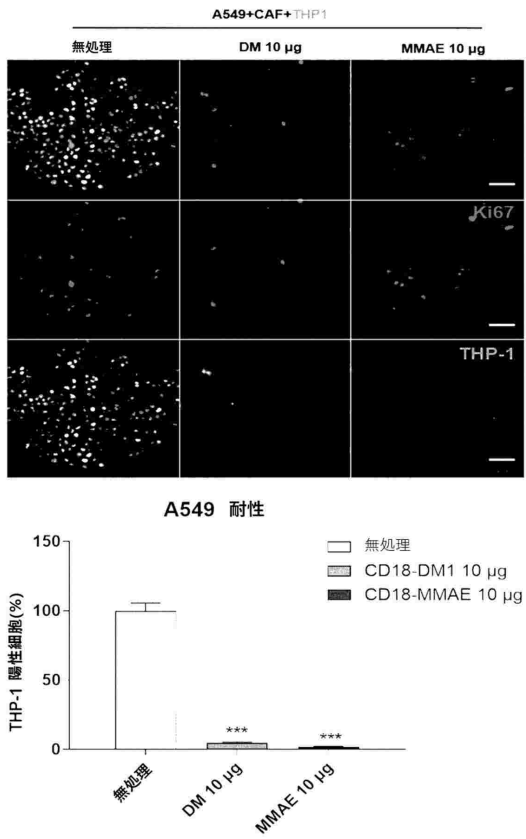
40

50

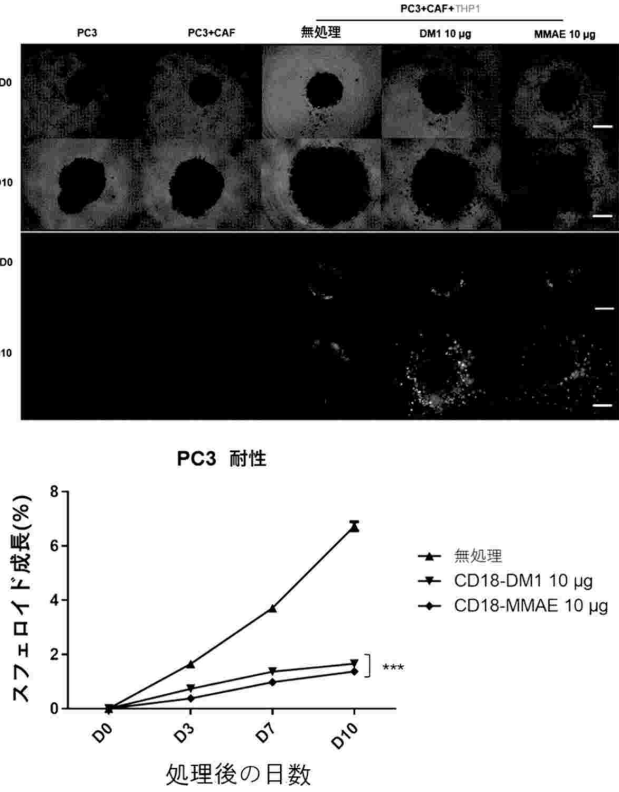
【 図 3 5 】



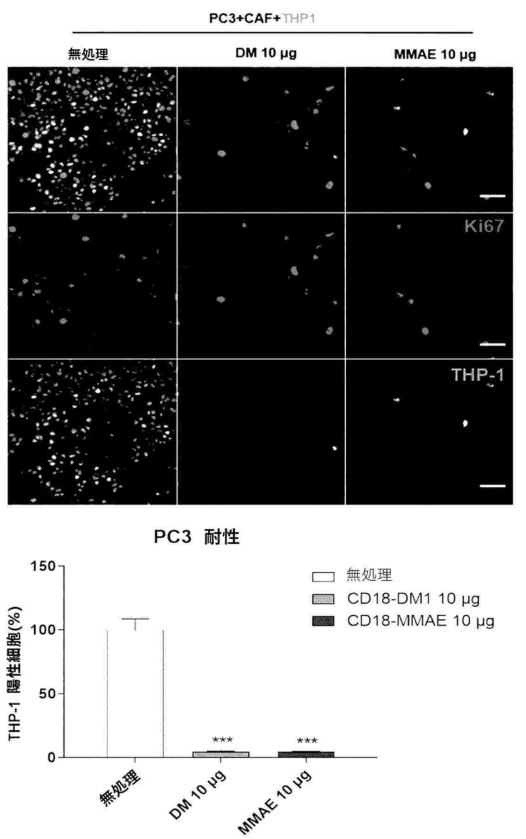
【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



【 図 3 8 】



10

20

30

40

50

【配列表】  
2025511684000001.xml

10

20

30

40

50



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/004674

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 38/17(2006.01); A61K 47/64(2017.01); A61K 47/65(2017.01); A61K 47/55(2017.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 14/435(2006.01); A61K 47/68(2017.01); C12Q 1/6886(2018.01); G01N 33/574(2006.01); G01N 33/68(2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/17(2006.01); A61K 31/704(2006.01); A61K 47/06(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 멜리틴(melittin), 항암제(anti-tumor agent), 전세포사멸성 펩타이드(pro-apoptotic peptide), 결합체(conjugate), ITGB2(integrin beta 2), M2 종양관련 대식세포(M2 tumor associated macrophage)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019-212324 A1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 07 November 2019 (2019-11-07) See paragraphs [0001], [0033], [0037], [0065] and [0128]; and claims 1-6, 11-12 and 14.	1,5-14,17
Y		2-4,15
Y	WU, Jindao et al. M2 macrophage-derived exosomes facilitate HCC metastasis by transferring αMβ2 integrin to tumor cells. Hepatology. 2021, vol. 73, no. 4, pp. 1365-1380. See abstract; and page 1378.	2-4,15
X	LEE, Chanju et al. Targeting of M2-like tumor-associated macrophages with a melittin-based pro-apoptotic peptide. Journal for Immunotherapy of Cancer. 2019, vol. 7, article no. 147, pp. 1-14. See abstract; and pages 2, 4 and 12.	1,5-14,17
X	HAN, Ik-Hwan et al. Therapeutic effect of melittin-dKLA targeting tumor-associated macrophages in melanoma. International Journal of Molecular Sciences. 13 March 2022, vol. 23, article no. 3094, pp. 1-16. See abstract; and pages 2 and 9-11.	1,5-14,17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"D" document cited by the applicant in the international application</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>19 July 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>19 July 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/KR <b>Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208</b> Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer  Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2023/004674****C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, Chanju et al. Combination of anti-PD-L1 antibody with peptide MEL-dKLA targeting M2 tumor-associated macrophages suppresses breast cancer metastasis. Cancer Communications. 16 February 2022 (online publication date), vol. 42, no. 4, pp. 345-349. See pages 345 and 348.	1,5-14,17
X	LEE, Chanju et al. Development of melittin-based anti-cancer drug for targeting tumor-associated macrophages. The Journal of Immunology. 2018, vol. 200 (1 Supplement), 56.22. See abstract.	1,5-14,17
PX	KIM, Soyoung et al. Enhanced therapeutic effect of optimized melittin-dKLA, a peptide agent targeting M2-like tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer. International Journal of Molecular Sciences. 12 December 2022, vol. 23, article no. 15751, pp. 1-18. See abstract; pages 5-12; and figure 2.	1,5-14,17

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/KR2023/004674</b>
<b>Box No. I</b>	<b>Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)</b>	
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), <input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.</p> <p>3. Additional comments:</p>		10
		20
		30
		40
		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/KR2023/004674**

<b>Box No. II</b>	<b>Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <div><div><div>1.</div><div><input checked="" type="checkbox"/></div><div>Claims Nos.: <b>16</b> because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).</div></div><div><div>2.</div><div><input type="checkbox"/></div><div>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:</div></div><div><div>3.</div><div><input type="checkbox"/></div><div>Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</div></div></div>	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> <b>Information on patent family members</b>				<b>International application No.</b> <b>PCT/KR2023/004674</b>			
<b>Patent document cited in search report</b>			<b>Publication date (day/month/year)</b>	<b>Patent family member(s)</b>			<b>Publication date (day/month/year)</b>
WO	2019-212324	A1	07 November 2019	CN	112533640	A	19 March 2021
				EP	3789041	A1	10 March 2021
				JP	2021-526548	A	07 October 2021
				JP	7234349	B2	07 March 2023
				KR	10-2019-0127609	A	13 November 2019
				KR	10-2250412	B1	17 May 2021
				US	11484601	B2	01 November 2022
				US	2021-0244823	A1	12 August 2021
<hr/>							

10

20

30

40

50

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2023/004674

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>A61K 38/17(2006.01); A61K 47/64(2017.01); A61K 47/65(2017.01); A61K 47/55(2017.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 14/435(2006.01); A61K 47/68(2017.01); C12Q 1/6886(2018.01); G01N 33/574(2006.01); G01N 33/68(2006.01)</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류들 기재) A61K 38/17(2006.01); A61K 31/704(2006.01); A61K 47/06(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 멜리틴(melittin), 항암제(anti-tumor agent), 전세포사멸성 펩타이드(pro-apoptotic peptide), 결합체(conjugate), ITGB2(integrin beta 2), M2 종양관련 대식세포(M2 tumor associated macrophage)		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2019-212324 A1 (경희대학교 산학협력단) 2019.11.07 단락 [0001], [0033], [0037], [0065], [0128]; 청구항 1-6, 11-12, 14 참조.	1,5-14,17
Y		2-4,15
Y	WU, JINDAO 등, 'M2 macrophage-derived exosomes facilitate HCC metastasis by transferring αMβ2 integrin to tumor cells', Hepatology, 2021, 73권, 4호, 페이지 1365-1380 요약; 페이지 1378 참조.	2-4,15
X	LEE, CHANJU 등, 'Targeting of M2-like tumor-associated macrophages with a melittin-based pro-apoptotic peptide', Journal for Immunotherapy of Cancer, 2019, 7권, article no. 147, 페이지 1-14 요약; 페이지 2, 4, 12 참조.	1,5-14,17
X	HAN, IK-HWAN 등, 'Therapeutic effect of melittin-dKLA targeting tumor-associated macrophages in melanoma', International Journal of Molecular Sciences, 2022.03.13, 23권, article no. 3094, 페이지 1-16 요약; 페이지 2, 9-11 참조.	1,5-14,17
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "I" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 <b>2023년07월19일(19.07.2023)</b>		국제조사보고서 발송일 <b>2023년07월19일(19.07.2023)</b>
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관  허주형 전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사보고서

국제출원번호  
PCT/KR2023/004674

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LEE, CHANJU 등, 'Combination of anti-PD-L1 antibody with peptide MEL-dKLA targeting M2 tumor-associated macrophages suppresses breast cancer metastasis', Cancer Communications, 2022.02.16(온라인 공개일), 42권, 4호, 페이지 345-349 페이지 345, 348 참조.	1,5-14,17
X	LEE, CHANJU 등, 'Development of melittin-based anti-cancer drug for targeting tumor-associated macrophages', The Journal of Immunology, 2018, 200권 (1 Supplement), 56.22 요약 참조.	1,5-14,17
PX	KIM, SOYOUNG 등, 'Enhanced therapeutic effect of optimized melittin-dKLA, a peptide agent targeting M2-like tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer', International Journal of Molecular Sciences, 2022.12.12, 23권, article no. 15751, 페이지 1-18 요약; 페이지 5-12; 도면 2 참조.	1,5-14,17

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/004674

제1기 재판      핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
- ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

10

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

20

30

40



국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/004674

제2기 재판      일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 16

이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 16은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:

이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:

이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

10

20

30

40

국 제 조 사 보 고 서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

**PCT/KR2023/004674**

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2019-212324 A1	2019/11/07	CN 112533640 A	2021/03/19
		EP 3789041 A1	2021/03/10
		JP 2021-526548 A	2021/10/07
		JP 7234349 B2	2023/03/07
		KR 10-2019-0127609 A	2019/11/13
		KR 10-2250412 B1	2021/05/17
		US 11484601 B2	2022/11/01
		US 2021-0244823 A1	2021/08/12

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード (参考)

A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	38/10 (2006.01)	A 6 1 K	38/10
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 K	31/337 (2006.01)	A 6 1 K	31/337
A 6 1 K	31/4745 (2006.01)	A 6 1 K	31/4745
A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/704
A 6 1 K	31/473 (2006.01)	A 6 1 K	31/473
A 6 1 K	31/131 (2006.01)	A 6 1 K	31/131
C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K	14/435

Z N A

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D  
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S  
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,  
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,  
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,L  
C,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,P  
L,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,V  
C,VN,WS,ZA,ZM,ZW

## (72)発明者

ハン, イク - ファン

大韓民国 1 2 1 6 0 , ギョンギ - ド, ナムヤンジュ - シ, ファド - ウプ, ビリョン - ロ 1 1 6 ボ  
ン - ギル, 3 5 , # 3 1 1 - 1 0 0 3

## (72)発明者

カン, ムンキュ

大韓民国 1 2 2 5 7 , ギョンギ - ド, ナムヤンジュ - シ, ダサンジグム - ロ 1 6 ボン - ギル, 5  
6 , # 1 0 2 - 5 0 4

## (72)発明者

リ, ヒキョン

大韓民国 1 6 9 2 7 , ギョンギ - ド, ヨンイン - シ, スジ - グ, ジンサン - ロ, 2 4 , # 1 1 5  
- 1 2 0 2

## (72)発明者

チェ, ジョンユン

大韓民国 0 1 7 7 5 , ソウル, ノウォン - グ, ドンイル - ロ 2 0 7 - ギル, 1 8 6 , # 1 0 9 -  
1 4 0 4

## (72)発明者

チェ, イルソプ

大韓民国 0 5 1 1 2 , ソウル, グァンジン - グ, ジャヤン - ロ, 4 4 - 1 2 , 3 エフ

## (72)発明者

ヤン, ジュウォン

大韓民国 0 2 4 5 1 , ソウル, ドンデムン - グ, フェギ - ロ 2 5 ガ - ギル, 2 7 , # 2 0 4

## (72)発明者

チェ, ホンソ

大韓民国 0 4 9 9 9 , ソウル, グァンジン - グ, ゲンジャ - ロ 1 5 - ギル, 4 2

## (72)発明者

シン, ジン ソン

大韓民国 0 1 8 5 4 , ソウル, ノウォン - グ, ソムバツ - ロ, 1 2 3 , # 3 0 4 - 8 1 1

## F ターム (参考)

4C076 AA95 CC07 CC27 CC41 EE41 EE59  
4C084 AA02 AA03 AA17 BA01 BA08 BA18 BA23 BA41 BA44 CA18  
CA43 CA59 DA42 DC50 NA13 ZB071 ZB072 ZB261 ZB262  
4C086 AA01 AA02 BA02 BC30 CB22 EA10 GA16 MA01 MA04 NA13  
ZB07 ZB26  
4C206 AA01 AA02 FA01 MA01 MA04 NA13 ZB07 ZB26  
4H045 AA30 BA09 BA18 BA56 BA62 BA72 CA51 DA83 EA20