

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-524871

(P2019-524871A)

(43) 公表日 令和1年9月5日 (2019.9.5)

(51) Int. Cl.	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 B 0 5 0
C 1 2 N 9/04 (2006.01)	C 1 2 N 9/04	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16	B 4 C 0 7 6
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	4 C 0 8 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-517203 (P2019-517203)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月13日 (2017.6.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月5日 (2019.2.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/037303
 (87) 国際公開番号 W02017/218569
 (87) 国際公開日 平成29年12月21日 (2017.12.21)
 (31) 優先権主張番号 62/349,615
 (32) 優先日 平成28年6月13日 (2016.6.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

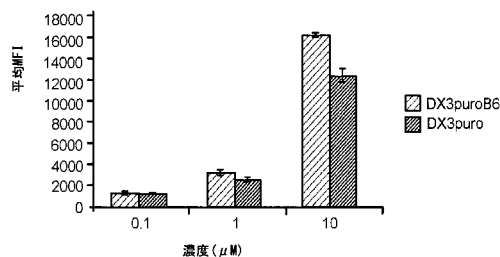
(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
 607-5200, オークランド, フラン
 クリン ストリート 1111, 12番
 フロア
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α (V) β (6) インテグリン結合ペプチドおよびその使用方法

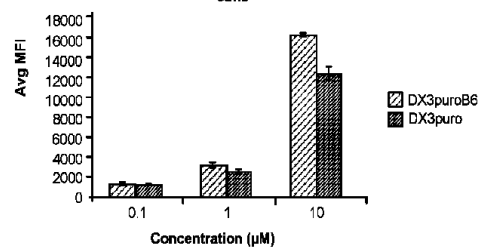
(57) 【要約】

本発明は、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリンなどのインテグリンを標的指向するペプチド結合体を提供する。特定の態様において、ペプチド結合体は、PEG部分、画像化剤、または治療剤などの部分を含む。本発明のペプチド結合体は、腫瘍、臓器、または組織を画像化するために特に有用である。本発明のペプチド結合体含有する組成物およびキットも、本明細書において提供される。

VGDLYLKK (FAM) と DX3puro β 6細胞対DX3puro細胞

濃度	DX3puroB6 (平均MFI)	DX3puro (平均MFI)
0.1	1406.66667	1379.66667
1	3340.33333	2677.66667
10	16549.33333	12683

FIG. 8A

VGDLYLKK(FAM) with DX3puro β 6 vs. DX3puro cells

Concentration	DX3puro β 6 (Avg MFI)	DX3puro (Avg MFI)
0.1	1406.66667	1379.66667
1	3340.33333	2677.66667
10	16549.33333	12683

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) アミノ酸配列

VGDLTYLK (SEQ ID NO:1)

を含むペプチドと、

(b) 部分と

を含む、結合体。

【請求項2】

前記部分が前記ペプチドに共有結合的に結合されている、請求項1記載の結合体。

【請求項3】

前記ペプチドの長さが約8～約20アミノ酸である、請求項1記載の結合体。

【請求項4】

1つまたは複数のさらなるリジン残基をさらに含む、請求項1記載の結合体。

【請求項5】

1つまたは複数のさらなるリジン残基が、前記ペプチドのC末端および/または1つもしくは複数の部分に結合されている、請求項4記載の結合体。

【請求項6】

アミノ酸配列

VGDLTYLKK (SEQ ID NO:10)

と、部分とを含む、請求項4記載の結合体。

【請求項7】

前記ペプチドがインテグリンに結合する、請求項1記載の結合体。

【請求項8】

インテグリンが $\alpha_v\beta_6$ インテグリンである、請求項7記載の結合体。

【請求項9】

前記部分が、ポリエチレングリコール(PEG)部分、フルオロベンゾイル(FB)基、メチル基、アセチル基、画像化剤、治療剤、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の結合体。

【請求項10】

PEG部分が約3,000ダルトン(Da)未満の分子量を有する、請求項9記載の結合体。

【請求項11】

PEG部分が、PEG₁₂(PEG 800)、PEG₂₈(PEG 1,500)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項9記載の結合体。

【請求項12】

PEG部分が、規定の鎖長を有する単分散PEG部分である、請求項9記載の結合体。

【請求項13】

単分散PEG部分が約95%を超えるオリゴマー純度を有する、請求項12記載の結合体。

【請求項14】

画像化剤が、FB基、放射性核種、ビオチン、フルオロフォア、蛍光タンパク質、抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項9記載の結合体。

【請求項15】

放射性核種が、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、¹¹¹In、¹²⁴I、¹²⁵I、および¹³¹Iからなる群より選択される、請求項14記載の結合体。

【請求項16】

放射性核種が¹⁸Fである、請求項14記載の結合体。

【請求項17】

前記部分が、前記ペプチド、1つもしくは複数のさらなるリジン残基、および/または別の部分に結合されている、請求項4記載の結合体。

【請求項18】

10

20

30

40

50

結合体が配列

VGDLTYLKK(FB) (SEQ ID NO:2)

を含むように、1つのさらなるリジン残基が前記ペプチドのC末端に結合され、かつFB基がさらなるリジン残基の側鎖に結合されている、請求項17記載の結合体。

【請求項 19】

結合体が配列

FB-VGDLTYLKK(FB)-PEG₂₈ (SEQ ID NO:3)

を含むように、前記ペプチドのN末端に結合されたFB基と、C末端リジン残基に結合されたPEG₂₈部分とをさらに含む、請求項18記載の結合体。

【請求項 20】

配列

(VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:4)

を含み、

アミノ酸配列

VGDLTYLK (SEQ ID NO:1)

の二量体を含む、結合体であって、

PEG₁₂部分が二量体の各メンバーのC末端に結合され、両方のPEG₁₂部分が2つのさらなるリジン残基の最初のリジン残基に結合され、かつFB基が2つのさらなるリジン残基の2番目のリジン残基の側鎖に結合されている、請求項17記載の結合体。

【請求項 21】

結合体が配列

(FB-VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:5)

を含むように、FB基が二量体の各ペプチドのN末端に結合されている、請求項20記載の結合体。

【請求項 22】

リジン残基に結合されたFB基が¹⁸Fで放射標識されている、請求項18または20記載の結合体。

【請求項 23】

治療剤が、放射性核種、アポトーシス促進ペプチド、ナノ粒子、化学療法剤、ナノドロップレット、リポソーム薬物、サイトカイン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項9記載の結合体。

【請求項 24】

請求項1記載の結合体または複数の請求項1記載の結合体を含む、組成物。

【請求項 25】

規定の鎖長を有する単分散PEG部分が複数の結合体に存在する、請求項24記載の組成物。

【請求項 26】

薬学的担体または賦形剤をさらに含む、請求項24記載の組成物。

【請求項 27】

請求項1記載の結合体または請求項24記載の組成物を含む、画像化または治療のためのキット。

【請求項 28】

使用のための説明書をさらに含む、請求項27記載のキット。

【請求項 29】

1種類または複数種の試薬をさらに含む、請求項27記載のキット。

【請求項 30】

以下の工程を含む、対象において標的組織を画像化するための方法：

(a) 請求項1記載の結合体または請求項24記載の組成物を対象に投与する工程であって、結合体が画像化剤を含む、工程、および

(b) 結合体を対象のどこに集まっているのか決定するために、結合体を検出する工程。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

画像化剤が、前記ペプチド、FB基、またはPEG部分に共有結合的に結合されている、請求項30記載の方法。

【請求項 3 2】

標的組織が、癌組織または臓器である、請求項30記載の方法。

【請求項 3 3】

癌組織が、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、または口腔扁平上皮癌に関連する、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

画像化剤が放射性核種である、請求項30記載の方法。

10

【請求項 3 5】

放射性核種がFB基に共有結合的に結合されている、請求項34記載の方法。

【請求項 3 6】

結合体が対象のどこに集まっているのか決定するために、放射性核種からの放射線が用いられる、請求項34記載の方法。

【請求項 3 7】

結合体が、インテグリンによって媒介される疾患または障害を診断または予後判定するために検出される、請求項30記載の方法。

【請求項 3 8】

疾患または障害が、インテグリンの発現、過剰発現、または活性化に関連する、請求項37記載の方法。

20

【請求項 3 9】

疾患または障害が、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害である、請求項37記載の方法。

【請求項 4 0】

治療的有効量の請求項1記載の結合体または請求項24記載の組成物を対象に投与する工程であって、結合体が治療剤を含む、工程を含む、対象においてインテグリン媒介性の疾患または障害を予防または処置するための方法。

【請求項 4 1】

治療剤が、前記ペプチドまたはPEG部分に共有結合的に結合されている、請求項40記載の方法。

30

【請求項 4 2】

疾患または障害が、インテグリンの発現、過剰発現、または活性化に関連する、請求項40記載の方法。

【請求項 4 3】

疾患または障害が、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、慢性線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺気腫、放射線誘発性肺線維症、および慢性創傷性皮膚疾患からなる群より選択される、請求項40記載の方法。

【請求項 4 4】

疾患または障害が、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害である、請求項40記載の方法。

40

【請求項 4 5】

$\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害が、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、または口腔扁平上皮癌である、請求項44記載の方法。

【請求項 4 6】

結合体または組成物の治療的有効量が、治療剤の送達をインテグリン発現細胞に標的指向するために十分な量である、請求項40記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年6月13日出願の米国仮出願第62/349,615号の優先権を主張し、その開示全体があらゆる目的で参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦政府の支援による研究および開発に基づいてなされた発明の権利に関する記載

本発明は、米国エネルギー省が授与した助成番号DE-SC0002061および国立衛生研究所が授与した助成番号NIH 1RC4EB01 2836-01に基づく政府支援によりなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

10

【0003】

発明の背景

インテグリンは、細胞-細胞接着および細胞-細胞外マトリックス(ECM)接着の媒介を担う細胞表面受容体の大きなファミリーである。少なくとも24種の異なるインテグリンが存在し、それぞれ α および β サブユニットで構成されるヘテロ二量体であり、その発現は、組織型、発生段階、ならびに炎症および癌などの様々な組織病態を含むいくつかの要因により決定される。インテグリンは固有の酵素活性を有さないが、リガンド結合の後に、インテグリンは細胞質構造分子とシグナル伝達分子の複合体を並置することで細胞外の合図を細胞内シグナルに変換し、次にこれらは相互作用して細胞応答を決定する。インテグリンが運動、増殖、浸潤、および生存を含む細胞挙動の大部分の要素に関与していることから、疾患におけるインテグリンの役割が広く報告されている。実際、いくつかのインテグリンは、癌を含む特定の疾患を促進する上で能動的役割を果たすと考えられる。例えば、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは、浸潤促進メタロプロテイナーゼを上方制御することならびに遊走促進シグナルおよび生存シグナルを与えることを含むその複数の能力の結果として、黒色腫および神経膠芽腫の浸潤性表現型を促進することに関与している。 $\alpha_v\beta_3$ が血管新生性血管の内皮細胞上でも上方制御されており、癌における新生血管の発生のために同様のシグナルを与えうることから、そのようなデータによって、多くの薬学的および学術的拠点は、その多くがペプチドまたはペプチド模倣体である $\alpha_v\beta_3$ アンタゴニストを、治療目的で開発するに至った。したがって、インテグリン-リガンド相互作用の構造的基礎を理解することは、改善されたインテグリンアンタゴニストの設計に役立つであろう。

20

30

【0004】

$\alpha_v\beta_6$ インテグリン受容体は上皮細胞上でのみ発現される。このインテグリンは正常組織および病理組織の両方のプロセスに関与している。例えば、 $\alpha_v\beta_6$ は創傷治癒および炎症中に上皮細胞により上方制御される。おそらくは、 $\alpha_v\beta_6$ がTGF- β の保護プロペプチド、すなわち潜在関連ペプチド(LAP)に結合することでTGF- β を局所的に活性化する能力が、これら一過性の病態におけるこのインテグリンの機能の理由である。したがって、TGF- β は炎症応答および上皮増殖を抑制することができ、このことは、 $\alpha_v\beta_6$ がこれらのプロセスを減弱させる負の制御として働くことを示している。しかし、慢性炎症はTGF- β の過剰な $\alpha_v\beta_6$ 依存性活性化を導くことがあり、これにより実験動物の肺中で線維症が生じる。結果として、ヒトにおいて線維症を生じさせるいくつかの病態に、 $\alpha_v\beta_6$ 依存性TGF- β 活性化が関与することもある。マウスの皮膚中での構成的 $\alpha_v\beta_6$ 過剰発現は、著しい数のトランスジェニック動物に現れる慢性創傷を生じさせる。したがって、ヒト疾患に関連する慢性創傷(例えば特定の形態の表皮水疱症)が、創傷ケラチノサイトにより発現される $\alpha_v\beta_6$ の上方制御によって促進されるかまたは悪化することもある。

40

【0005】

さらに、 $\alpha_v\beta_6$ は癌における主要標的である。 $\alpha_v\beta_6$ は上皮特異的であるが、大部分の上皮静止組織中では弱いまたは検出不能である。但し、多くの種類の癌では、しばしば浸潤先進部で強く上方制御される。例えば、 $\alpha_v\beta_6$ は口腔扁平上皮癌(OSCC)、膀胱癌、卵巣癌、および結腸癌において高度に上方制御される。癌細胞の生存がAkt上方制御によって促進されるようにメタロプロテイナーゼを上方制御しかつ運動性の増加を促進することで

50

、 $\alpha_v\beta_6$ が癌浸潤を促進することができることが示された。これらのデータは、 $\alpha_v\beta_6$ が浸潤性表現型を能動的に促進することを示している。また、 $\alpha_v\beta_6$ の高発現が結腸癌患者の生存期間中央値の有意な減少と相関していることも示された。

【0006】

上記に鑑み、当技術分野において、 $\alpha_v\beta_6$ 発現腫瘍に対する高い腫瘍選択性および腫瘍特異性を示す腫瘍標的化剤が必要である。本発明はこの必要性を満たし、関連する利点も同様に提供する。

【発明の概要】

【0007】

発明の簡単な概要

一局面において、本発明は、アミノ酸配列
VGDLTYLK (SEQ ID NO:1)

を含むペプチドと、部分とを含む、結合体を提供する。いくつかの態様において、前記部分は、前記ペプチドに共有結合的に結合されている。他の態様において、前記ペプチドの長さは約8～約20アミノ酸である。

【0008】

いくつかの態様において、結合体は1つまたは複数のさらなるリジン残基を含む。場合によっては、1つまたは複数のさらなるリジン残基は、前記ペプチドのC末端および/または1つもしくは複数の部分に結合されている。いくつかの態様において、結合体は、アミノ酸配列

VGDLTYLKK (SEQ ID NO:10)

と、部分とを含む。

【0009】

いくつかの態様において、前記ペプチドはインテグリンに結合する。場合によっては、インテグリンは $\alpha_v\beta_6$ インテグリンである。いくつかの態様において、前記部分は、ポリエチレングリコール(PEG)部分、フルオロベンゾイル(FB)基、メチル基、アセチル基、画像化剤、治療剤、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。特定の態様において、PEG部分は約3,000ダルトン(Da)未満の分子量を有する。場合によっては、PEG部分は、PEG₁₂(PEG 800)、PEG₂₈(PEG 1,500)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。いくつかの態様において、PEG部分は、規定の鎖長を有する単分散PEG部分である。場合によっては、単分散PEG部分は約95%を超えるオリゴマー純度を有する。

【0010】

いくつかの態様において、画像化剤は、FB基、放射性核種、ビオチン、フルオロフォア、蛍光タンパク質、抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。特定の態様において、放射性核種は、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、¹¹¹In、¹²⁴I、¹²⁵I、および¹³¹Iからなる群より選択される。場合によっては、放射性核種は¹⁸Fである。いくつかの態様において、前記部分は、前記ペプチド、1つもしくは複数のさらなるリジン残基、および/または別の部分に結合されている。

【0011】

いくつかの態様において、結合体が配列
VGDLTYLKK(FB) (SEQ ID NO:2)

を含むように、1つのさらなるリジン残基が前記ペプチドのC末端に結合され、FB基がさらなるリジン残基の側鎖には結合されている。特定の態様において、結合体は、配列

FB-VGDLTYLKK(FB)-PEG₂₈ (SEQ ID NO:3)

を含むように、前記ペプチドのN末端に結合されたFB基と、C末端リジン残基に結合されたPEG₂₈部分とをさらに含む。

【0012】

いくつかの態様において、結合体は、配列
(VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:4)

10

20

30

40

50

を含み、結合体は、アミノ酸配列
VGDLTYLK (SEQ ID NO:1)

の二量体を含み、PEG₁₂部分は二量体の各メンバーのC末端に結合され、両方のPEG₁₂部分は2つのさらなるリジン残基の最初のリジン残基に結合され、かつFB基は2つのさらなるリジン残基の2番目のリジン残基の側鎖に結合されている。特定の態様において、結合体が、配列

(FB-VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:5)

を含むように、FB基は二量体の各ペプチドのN末端に結合されている。いくつかの態様において、結合体は、配列

(VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:4)

を含み、結合体は、アミノ酸配列
VGDLTYLK (SEQ ID NO:1)

の四量体を含む。いくつかの態様において、リジン残基に結合されたFB基は¹⁸Fで放射線標識されている。

【0013】

いくつかの態様において、治療剤は、放射性核種、アポトーシス促進ペプチド、ナノ粒子、化学療法剤、ナノドロップレット(nanodroplet)、リポソーム薬物、サイトカイン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0014】

別の局面において、本発明は、本明細書に記載の結合体または複数の結合体を含む組成物を提供する。いくつかの態様において、規定の鎖長を有する単分散PEG部分が複数の結合体に存在する。他の態様において、前記組成物は薬学的担体または賦形剤をさらに含む。

【0015】

さらに別の局面において、本発明は、画像化または治療のためのキットを提供する。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載の結合体または本明細書に記載の組成物を含む。いくつかの態様において、キットは、使用のための説明書をさらに含む。他の態様において、キットは1種類または複数種の試薬をさらに含む。

【0016】

さらに別の局面において、本発明は、対象において標的組織を画像化するための方法を提供する。いくつかの態様において、前記方法は、本明細書に記載の結合体または本明細書に記載の組成物を対象に投与する工程であって、結合体が画像化剤を含む、工程、および結合体が対象のどこに集まっているのか決定するために、結合体を検出する工程を含む。いくつかの態様において、画像化剤は、前記ペプチド、FB基、またはPEG部分に共有結合的に結合されている。

【0017】

いくつかの態様において、標的組織は癌組織または臓器である。場合によっては、癌組織は、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、または口腔扁平上皮癌に関連する。いくつかの態様において、画像化剤は放射性核種である。場合によっては、放射性核種はFB基に共有結合的に結合されている。特定の態様において、放射性核種からの放射線は、結合体が対象のどこに集まっているのか決定するために用いられる。いくつかの態様において、結合体は、インテグリンによって媒介される疾患または障害を診断または予後判定するために検出される。場合によっては、前記疾患または障害はインテグリンの発現、過剰発現、または活性化に関連する。

【0018】

別の局面において、本発明は、治療的有効量の本明細書に記載の結合体または本明細書に記載の組成物を対象に投与する工程であって、結合体が治療剤を含む工程を含む、対象においてインテグリン媒介性の疾患または障害を予防または処置するための方法を提供する。いくつかの態様において、治療剤は、前記ペプチドまたはPEG部分に共有結合的に結合されている。

10

20

30

40

50

【0019】

いくつかの態様において、前記疾患または障害はインテグリンの発現、過剰発現、または活性化に関連する。特定の態様において、前記疾患または障害は、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、慢性線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺気腫、放射線誘発性肺線維症、および慢性創傷性皮膚疾患からなる群より選択される。いくつかの態様において、前記疾患または障害は、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害である。場合によっては、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害は、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、または口腔扁平上皮癌である。いくつかの態様において、結合体または組成物の治療の有効量は、治療剤の送達をインテグリン発現細胞に標的指向するために十分な量である。

【0020】

本発明の他の目的、特徴、および利点は以下の詳細な説明および図から当業者に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】1ビーズ1化合物(one-bead one-compound)(OBOC)フルオロベンゾイルペプチドライブラリーの作製をまとめたものである。

【図2A】蛍光細胞に基づくオンビーズスクリーニングを示す。図2Aは、蛍光細胞に基づくオンビーズスクリーニングに關与する工程の概要を示す。

【図2B】蛍光細胞に基づくオンビーズスクリーニングを示す。図2Bは、混合されたDX3 β_6 mCherry($\alpha_v\beta_6$ 陽性)細胞株およびDX3 EmGFP($\alpha_v\beta_6$ 陰性)細胞株を用いるオンビーズ2色スクリーニングアプローチを示す。

【図3】ペプチド1~5(SEQ ID NO:2および6~9)を含むオンビーズスクリーニングの結果を示す。

【図4】ペプチドヒット(ペプチド1~5; SEQ ID NO:2および6~9)のオンビーズ検証を示す。

【図5】本発明のペプチドの競合的結合ELISAを示す。図5Aは様々なインテグリンおよびその天然リガンドを示す。図5Bはペプチド1~5(SEQ ID NO:2および6~9)のELISA結果を示す。

【図6A】ペプチドの固相放射標識を示す。図6Aは放射標識プロセスの模式図を示す。

【図6B】ペプチドの固相放射標識を示す。図6Bは放射標識収率と純度のアッセイの結果を示す。

【図7A】血清安定性試験を示す。図7Aはペプチド1(ST1-62)(SEQ ID NO:2)の血清安定性試験の結果を示す。この試験ではC末端フルオロベンゾイル基を ^{18}F で放射標識した。

【図7B】血清安定性試験を示す。図7Bは、SEQ ID NO:3に示したアミノ酸配列を含むペグ化ペプチド(ST1-92)の血清安定性試験の結果を示す。この試験ではC末端フルオロベンゾイル基を ^{18}F で放射標識した。

【図8A】FAM-Xで標識されたペプチド(VGDLTYLKK-FAM-X; SEQ ID NO:15)と、DX3puro β_6 細胞およびDX3 puro細胞との結合を示す。図8Aは、3種類の濃度のペプチド(0.1 μM 、1 μM 、および10 μM)を用いて行った結合試験の結果を示す。各実験において150,000個の細胞を使用した。

【図8B】FAM-Xで標識されたペプチド(VGDLTYLKK-FAM-X; SEQ ID NO:15)と、DX3puro β_6 細胞およびDX3 puro細胞との結合を示す。図8Bは、100 μM のペプチド濃度を用いて行った結合試験の結果を示す。これらの試験では、1回の実験につき75,000個、150,000個、または300,000個の細胞を使用した。対照実験では300,000個の未染色細胞を使用した。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

I. 序論

本発明は、フルオロベンゾイル1ビーズ1化合物(OBOC)ペプチドライブラリーから、インテグリン $\alpha_v\beta_6$ を標的指向する結合体を同定する目的で混合蛍光細胞を用いる新規の一段

10

20

30

40

50

階オンビーズスクリーニングアプローチを用いて同定された結合体の発見に、一部基づいている。配列決定のために、アッセイから単離した5種類のビーズが選択され、競合的結合ELISAを用いて、 $\alpha_v \beta_6$ 、 $\alpha_v \beta_3$ 、 $\alpha_v \beta_5$ 、 $\alpha_v \beta_1$ 、および $\alpha_v \beta_8$ に対する結合特異性が評価された。引き続き、高い親和性および高い選択性比で $\alpha_v \beta_6$ インテグリンに結合した結合体が最適化され、ポジトロン放出断層撮影法(PET)による非侵襲画像化に有用な ^{18}F -結合体(すなわち、 ^{18}F 放射性核種がフルオロベンゾイル基に結合されている結合体)へと開発した。

【0023】

II. 定義

別途具体的に指示がない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解するものと同一の意味を有する。さらに、本明細書に記載の方法または材料と同様または等価である任意の方法または材料を、本発明の実施において使用することができる。本発明においては以下の用語が定義される。

【0024】

本明細書で使用する「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は1つのメンバーを用いる局面だけでなく、複数のメンバーを用いる局面も含む。例えば、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に文脈によってはっきりと規定されていない限り複数の指示物を含む。従って、例えば、「1つの細胞」についての言及は複数のこのような細胞を含み、「その薬剤」についての言及は、当業者に公知の1つまたは複数の薬剤についての言及を含む。

【0025】

「結合体」という用語は、2つ以上の化合物を連結または結合することによって形成された化合物を含むことが意図される。特に、本発明の結合体は、部分に結合された(例えば、共有結合的に結合された)ペプチド(例えば、インテグリン結合ペプチド)を含む。非限定的な例として、本発明の結合体は、1つもしくは複数のさらなるアミノ酸(例えば、さらなるリジン残基)、画像化剤(例えば、フルオロベンゾイル基および/もしくは放射性核種、例えば、 ^{18}F)、治療剤、またはペプチドに結合された他の部分、1つもしくは複数のさらなるアミノ酸、および/または1つもしくは複数の部分をさらに含んでよい。

【0026】

「インテグリン結合ペプチド」および「インテグリンに結合する」という用語は、特定のインテグリンまたは特定のインテグリン群との特定の相互作用の能力を示す結合体中のペプチドモチーフの結合/相互作用を意味する。特定の態様では、これらの用語は、ペプチドまたはその一部分が、標的インテグリンと、同様の配列または構造の分子との交差反応なしに相互作用しかつ/または結合する能力を意味する。いくつかの場合では、ペプチドは、標的インテグリンに、同様の配列または構造の分子よりも実質的に低い解離定数で結合する(すなわち、結合がより堅固である)場合に、標的インテグリンに特異的に結合する。例えば、特定の場では、特異的結合は、ペプチドが標的インテグリンに関連分子の約2、3、4、5、6、8、10、15、20、25、30、40、50、100、もしくは1000倍、またはそれ以上の親和性で結合する場合に生じる。標的インテグリン上の部位へのペプチドの結合は、イオン結合、水素結合、疎水性相互作用、双極子-双極子結合、および/またはファンデルワールス力などの分子間力によって生じうる。交差反応性は、例えば、通常条件下での標的インテグリンならびにいくつかの多少なりとも(例えば構造的および/または機能的に)密接に関連する分子へのペプチドの結合を評価することにより試験することができる。これらの方法としては、結合試験、密接に関連する分子を用いるブロック試験および競合試験、FACS解析、表面プラズモン共鳴法(例えばBIAcoreを用いる)、分析用超遠心法、等温滴定熱量測定、蛍光偏光測定、蛍光分光法、放射標識リガンド結合アッセイ、ならびにそれらの組み合わせを挙げることができるが、それに限定されない。

【0027】

「アミノ酸」という用語は、天然 α -アミノ酸およびそれらの立体異性体、ならびに非

天然アミノ酸およびそれらの立体異性体を含む。アミノ酸の「立体異性体」とは、アミノ酸の鏡像異性体、例えばL-アミノ酸またはD-アミノ酸を意味する。例えば、天然アミノ酸の立体異性体とは、天然アミノ酸の鏡像異性体、すなわちD-アミノ酸を意味する。

【0028】

天然アミノ酸とは、遺伝暗号によりコードされたアミノ酸、ならびに後に修飾されたそれらアミノ酸、例えば γ -カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリンのことである。天然 α -アミノ酸としてはアラニン(Ala)、システイン(Cys)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、フェニルアラニン(Phe)、グリシン(Gly)、ヒスチジン(His)、イソロイシン(Ile)、アルギニン(Arg)、リジン(Lys)、ロイシン(Leu)、メチオニン(Met)、アスパラギン(Asn)、プロリン(Pro)、グルタミン(Gln)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、バリン(Val)、トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、それに限定されない。天然 α -アミノ酸の立体異性体としてはD-アラニン(D-Ala)、D-システイン(D-Cys)、D-アスパラギン酸(D-Asp)、D-グルタミン酸(D-Glu)、D-フェニルアラニン(D-Phe)、D-ヒスチジン(D-His)、D-イソロイシン(D-Ile)、D-アルギニン(D-Arg)、D-リジン(D-Lys)、D-ロイシン(D-Leu)、D-メチオニン(D-Met)、D-アスパラギン(D-Asn)、D-プロリン(D-Pro)、D-グルタミン(D-Gln)、D-セリン(D-Ser)、D-スレオニン(D-Thr)、D-バリン(D-Val)、D-トリプトファン(D-Trp)、D-チロシン(D-Tyr)、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、それに限定されない。

10

【0029】

非天然アミノ酸としては、天然アミノ酸と同様に機能するL配置またはD配置のアミノ酸類似体、アミノ酸模倣体、合成アミノ酸、N-置換グリシン、およびN-メチルアミノ酸が挙げられるが、それに限定されない。例えば、「アミノ酸類似体」とは、天然アミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基に結合した α 炭素を有するが、修飾されたR(すなわち側鎖)基を有する、非天然アミノ酸のことである。

20

【0030】

非天然アミノ酸の非限定的な例としては1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸(Acp)、1-アミノシクロブタン-1-カルボン酸(Acb)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(Acpc)、シトルリン(Cit)、ホモシトルリン(HoCit)、 α -アミノヘキサニ二酸(Aad)、3-(4-ピリジル)アラニン(4-Pal)、3-(3-ピリジル)アラニン(3-Pal)、プロパルギルグリシン(Pra)、 α -アミノイソ酪酸(Aib)、 α -アミノ酪酸(Abu)、ノルバリン(Nva)、 α , β -ジアミノプロピオン酸(Dpr)、 α , γ -ジアミノ酪酸(Dbu)、 α -tert-ブチルグリシン(Bug)、3,5-ジニトロチロシン(Tyr(3,5-ジNO₂))、ノルロイシン(Nle)、3-(2-ナフチル)アラニン(Nal-2)、3-(1-ナフチル)アラニン(Nal-1)、シクロヘキシルアラニン(Cha)、ジ-n-プロピルグリシン(Dpg)、シクロプロピルアラニン(Cpa)、ホモロイシン(Hle)、ホモセリン(HoSer)、ホモアルギニン(Har)、ホモシステイン(Hcy)、メチオニンスルホキシド(Met(O))、メチオニンメチルスルホニウム(Met(S-Me))、 α -シクロヘキシルグリシン(Chg)、3-ベンゾ-チエニルアラニン(Bta)、タウリン(Tau)、ヒドロキシプロリン(Hyp)、O-ベンジル-ヒドロキシプロリン(Hyp(Bzl))、ホモプロリン(HoPro)、 β -ホモプロリン(β HoPro)、チアゾリジン-4-カルボン酸(Thz)、ニペコ酸(Nip)、イソニペコ酸(IsoNip)、3-カルボキシメチル-1-フェニル-1,3,8-トリアザスピロ[4,5]デカン-4-オン(Cptd)、テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボン酸(3-Tic)、5H-チアゾロ[3,2-a]ピリジン-3-カルボン酸(Btd)、3-アミノ安息香酸(3-Abz)、3-(2-チエニル)アラニン(2-Thi)、3-(3-チエニル)アラニン(3-Thi)、 α -アミノオクタン二酸(Asu)、ジエチルグリシン(Deg)、4-アミノ-4-カルボキシ-1,1-ジオキソ-テトラヒドロチオピラン(Acdt)、1-アミノ-1-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)カルボン酸(Ahch)、1-アミノ-1-(4-ケトシクロヘキシル)カルボン酸(Akch)、4-アミノ-4-カルボキシテトラヒドロピラン(Actp)、3-ニトロチロシン(Tyr(3-NO₂))、1-アミノ-1-シクロヘキサニカルボン酸(Ach)、1-アミノ-1-(3-ピペリジニル)カルボン酸(3-Apc)、1-アミノ-1-(4-ピペリジニル)カルボン酸(4-Apc)、2-アミノ-3-(4-ピペリジニル)プロピオン酸(4-App)、2-アミノインダン-2-カルボン酸(Aic)、2-アミノ-2-ナフチル酢酸(Ana)、(2S,5R)-5-フェニルピロリジン-2-カルボン酸(Ppca)、4-チアゾイルアラニン(Tha)、2-アミノオクタン酸(Aoa)

30

40

50

、2-アミノヘプタン酸(Aha)、オルニチン(Orn)、アゼチジン-2-カルボン酸(Aca)、 α -アミノ-3-クロロ-4,5-ジヒドロ-5-イソオキサゾール酢酸(Acdi)、チアゾリジン-2-カルボン酸(Thz(2-COOH))、アリルグリシン(Agl)、4-シアノ-2-アミノ酪酸(Cab)、2-ピリジルアラニン(2-Pal)、2-キノイルアラニン(2-Qal)、シクロブチルアラニン(Cba)、フェニルアラニン類似体、リジンの誘導体、オルニチン(Orn)の誘導体、および α 、 γ -ジアミノ酪酸(Db u)の誘導体、それらの立体異性体、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる(例えばLiu et al., Anal. Biochem., 295:9-16 (2001)を参照)。したがって、非天然 α -アミノ酸は非天然L- α -アミノ酸、非天然D- α -アミノ酸、またはそれらの組み合わせとして存在する。

【0031】

10

「アミノ酸模倣体」とは、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが天然アミノ酸と同様に機能する、化合物のことである。好適なアミノ酸模倣体としては β -アミノ酸および γ -アミノ酸が挙げられるがそれに限定されない。 β -アミノ酸では、アミノ基とカルボキシル基との間に2個の炭素原子が存在するように、アミノ基がカルボキシル基の β -炭素原子に結合している。 γ -アミノ酸では、アミノ基とカルボキシル基との間に3個の炭素原子が存在するように、アミノ基がカルボキシル基の γ -炭素原子に結合している。 β -または γ -アミノ酸に好適なR基としては、天然アミノ酸および非天然アミノ酸に存在する側鎖が挙げられるが、それに限定されない。

【0032】

20

「N-置換グリシン」とは、アミノ酸側鎖がグリシン窒素原子に結合した、グリシンに基づく非天然アミノ酸のことである。好適なアミノ酸側鎖(例えばR基)としては、天然アミノ酸に存在する側鎖、およびアミノ酸類似体などの非天然アミノ酸に存在する側鎖が挙げられるが、それに限定されない。N-置換グリシンの非限定的な例としてはN-(2-アミノエチル)グリシン、N-(3-アミノプロピル)グリシン、N-(2-メトキシエチル)グリシン、N-ベンジルグリシン、(S)-N-(1-フェニルエチル)グリシン、N-シクロヘキシルメチルグリシン、N-(2-フェニルエチル)グリシン、N-(3-フェニルプロピル)グリシン、N-(6-アミノガラクトシル)グリシン、N-(2-(3'-インドリルエチル)グリシン、N-(2-(p-メトキシフェニルエチル))グリシン、N-(2-(p-クロロフェニルエチル)グリシン、およびN-[2-(p-ヒドロキシフェニルエチル)]グリシンが挙げられる。本明細書において「ペプトイド」と呼ばれるN-置換グリシンオリゴマーは、プロテアーゼ抵抗性があることが示された(例えばMiller et al., Drug Dev. Res., 35:20-32 (1995)を参照)。

30

【0033】

本明細書においてアミノ酸は、一般的に知られている3文字記号で、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨する1文字記号で表されることがある。例えば、本明細書においてL-アミノ酸は、一般的に知られている3文字記号(例えばL-アルギニンはArg)で、または大文字の1文字アミノ酸記号(例えばL-アルギニンはR)で表されることがある。本明細書においてD-アミノ酸は、一般的に知られている3文字記号(例えばD-アルギニンはD-Arg)で、または小文字の1文字アミノ酸記号(例えばD-アルギニンはr)で表されることがある。

【0034】

40

アミノ酸配列に関して、当業者は、コード配列中で1つのアミノ酸または少ない割合のアミノ酸を改変し、付加し、または欠失させる、ペプチド配列、ポリペプチド配列、またはタンパク質配列に対する個々の置換、付加、または欠失が、改変によりアミノ酸が化学的に同様のアミノ酸で置換された「保存的修飾変異体」となることを認識するであろう。化学的に同様のアミノ酸としては、L-アミノ酸などの天然アミノ酸、D-アミノ酸などの天然アミノ酸の立体異性体、ならびにアミノ酸類似体、アミノ酸模倣体、合成アミノ酸、N-置換グリシン、およびN-メチルアミノ酸などの非天然アミノ酸が挙げられるがそれに限定されない。

【0035】

機能的に同様のアミノ酸を示す保存的置換表は、当技術分野において周知である。例え

50

ば、脂肪族アミノ酸(例えばG、A、I、L、またはV)がこの群の別のメンバーで置換される置換を行うことができる。同様に、C、S、T、M、N、またはQなどの極性無電荷脂肪族基はこの群の別のメンバーで置換することができ、塩基性残基、例えばK、R、またはHは互いに置換することができる。いくつかの態様では、酸性側鎖を有するアミノ酸、例えばEまたはDをそれぞれその無電荷対応物、例えばQまたはNで置換することができ、その逆も成り立つ。以下の8つの各群は、互いに対して保存的置換である他の例示的なアミノ酸を含む:

- 1) アラニン(A)、グリシン(G);
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E);
- 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q);
- 4) アルギニン(R)、リジン(K);
- 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V);
- 6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W);
- 7) セリン(S)、スレオニン(T); および
- 8) システイン(C)、メチオニン(M)

(例えばCreighton, Proteins, 1993を参照)。

【0036】

「ペプチド」という用語は、D-もしくはL-アミノ酸の1本の鎖で構成される化合物、またはペプチド結合により接合されたD-およびL-アミノ酸の混合物で構成される化合物を意味する。一般に、ペプチドは約2〜約50アミノ酸長である。非限定的な例として、本明細書に記載の結合体中に存在するペプチド(例えば、インテグリン結合ペプチド)は、約5〜約45アミノ酸長、約8〜約45アミノ酸長、約8〜約25アミノ酸長、約8〜約20アミノ酸長、約12〜約45アミノ酸長、約12〜約30アミノ酸長、約8アミノ酸長、または約20アミノ酸長である。特に定めのない限り、ペプチドのN末端アミン基は遊離であるとみなされる。従って、配列NH₂-VGDおよびVGDはいずれも、遊離N末端アミン基を有する3アミノ酸VGDペプチド配列を表す。さらに、配列NH₂-VGDおよびVGDはいずれも、配列FB-VGDを有する結合体を生じるように、N末端をフルオロベンゾイル(FB)基で保護することができるペプチドを表す。

【0037】

本明細書で使用する「ペグ化」という用語は、ポリエチレングリコール(PEG)分子を別の分子、例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、部分などに共有結合的にカップリングするプロセスを指し、その場合、別の分子は「ペグ化された」と呼ばれる。

【0038】

「治療的有効量」という用語は、治療効果の実現を、それを必要とする対象において行うことが可能な本発明の結合体または組成物の量を意味する。例えば、本発明の結合体または組成物の治療的有効量は、疾患または障害に関連する1つまたは複数の症状を予防または軽減することが可能な量でありうる。当業者は、本発明の結合体および組成物を抗癌剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、抗ウイルス剤、抗生物質、および/または抗真菌剤などの他の治療剤と同時投与することができることを認識するであろう。

【0039】

本明細書において使用される「投与すること」という用語は、対象に対する経口投与、局所接触、坐薬としての投与、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、病変内投与、くも膜下腔内投与、鼻腔内投与、もしくは皮下投与、または緩徐放出装置、例えばミニ浸透圧ポンプの埋め込みを含む。投与は、非経口および経粘膜(例えば頬側、舌下、口蓋、歯肉、経鼻、膣内、直腸、または経皮)を含む任意の経路による。非経口投与としては例えば静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、および頭蓋内投与が挙げられる。他の投与様式としてはリポソーム製剤、静脈内注入、経皮パッチなどの使用が挙げられるがそれに限定されない。当業者は、癌または炎症性疾患もしくは自己免疫疾患などの疾患または障害に関連する1つまたは複数の症状を予防または軽減するために治療的有効量の本発明の結合体または組成物を投与するためのさらなる方法について知っているであ

10

20

30

40

50

ろう。「同時投与する」とは、第2の薬物(例えば抗癌剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、抗ウイルス剤、抗生物質、抗真菌剤など)の投与と同時に、該投与の直前に、または該投与の直後に本発明の結合体または組成物を投与することを意味する。

【0040】

「放射性核種」という用語は、放射能を示す任意の核種を含むように意図されている。

「核種」とは、炭素14(^{14}C)などの、原子番号、原子質量、およびエネルギー状態により規定される原子の種類を意味する。「放射能」とは、 α 粒子、 β 粒子、核子、電子、陽電子、ニュートリノ、および γ 線を含む、放射性物質により放出される放射線を意味する。本発明における使用に好適な放射性核種の例としてはフッ素18(^{18}F)、リン32(^{32}P)、スカンジウム47(^{47}Sc)、コバルト55(^{55}Co)、銅60(^{60}Cu)、銅61(^{61}Cu)、銅62(^{62}Cu)、銅64(^{64}Cu)、ガリウム66(^{66}Ga)、銅67(^{67}Cu)、ガリウム67(^{67}Ga)、ガリウム68(^{68}Ga)、ルビジウム82(^{82}Rb)、イットリウム86(^{86}Y)、イットリウム87(^{87}Y)、ストロンチウム89(^{89}Sr)、イットリウム90(^{90}Y)、ロジウム105(^{105}Rh)、銀111(^{111}Ag)、インジウム111(^{111}In)、ヨウ素124(^{124}I)、ヨウ素125(^{125}I)、ヨウ素131(^{131}I)、スズ117m($^{117\text{m}}\text{Sn}$)、テクネチウム99m($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、プロメチウム149(^{149}Pm)、サマリウム153(^{153}Sm)、ホルミウム166(^{166}Ho)、ルテチウム177(^{177}Lu)、レニウム186(^{186}Re)、レニウム188(^{188}Re)、タリウム201(^{201}Tl)、アスタチン211(^{211}At)、およびビスマス212(^{212}Bi)が挙げられるがそれに限定されない。本明細書において使用される、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 中の「m」は準安定状態を表す。さらに、通常は放射性同位体の混合物であるウラン、ラジウム、およびトリウムなどの天然放射性元素が、放射性核種の好適な例である。 ^{67}Cu 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、および ^{186}Re は β 線および γ 線放出放射性核種である。 ^{212}Bi は α 線および β 線放出放射性核種である。 ^{211}At は α 線放出放射性核種である。 ^{32}P 、 ^{47}Sc 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、および ^{188}Re は β 線放出放射性核種の例である。 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、および ^{201}Tl は γ 線放出放射性核種の例である。 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{82}Rb 、および ^{86}Y は陽電子放出放射性核種の例である。 ^{64}Cu は β 線および陽電子放出放射性核種である。

【0041】

「対象」または「患者」という用語は、通常はヒトを意味するが、例えば他の霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなどの他の動物を含んでもよい。

【0042】

III. 態様の説明

本発明は、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリンなどのインテグリンを標的指向する結合体および組成物を提供する。いくつかの態様において、結合体は、アミノ酸配列VGDLTYLK(SEQ ID NO:1)を含むペプチドと、部分とを含む。部分または複数の部分は、ペプチドに共有結合的または非共有結合的に結合することができる。他の態様において、結合体は1つまたは複数のさらなるアミノ酸残基をさらに含む。好ましい態様において、結合体は1つまたは複数のさらなるリジン残基をさらに含む。1つまたは複数のさらなるアミノ酸残基(例えば、リジン残基)は、ペプチドのどこにでも(例えば、ペプチドのN末端、ペプチドのC末端、および/または1つもしくは複数の部分に)結合することができる。特定の態様において、もう1つのアミノ酸残基(例えば、リジン残基)がC末端および/または1つもしくは複数の部分に結合される。いくつかの態様において、結合体は、アミノ酸配列VGDLTYLKK(SEQ ID NO:10)

と、部分とを含む。

【0043】

いくつかの態様において、前記部分は、ポリエチレングリコール(PEG)部分、フルオロベンゾイル(FB)基(例えば、放射標識されていないFB基)、メチル基、アセチル基、本明細書に記載の画像化剤(例えば、FB基および/または放射性核種(例えば、 ^{18}F))、本明細書に記載の治療剤(例えば、放射性核種、アポトーシス促進ペプチド、ナノ粒子、化学療法剤、ナノドロップレット、リポソーム薬物、サイトカイン、およびそれらの組み合わせ)、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される。FB基が画像化剤として用いられる時、場合によっては、FB基は放射標識される(例えば、放射性核種がFB基に共有結合的

に結合される)。前記部分は、ペプチドに、1つもしくは複数のアミノ酸残基(例えば、リジン残基)に、および/または別の部分に共有結合的または非共有結合的に結合することができる。特定の態様において、結合体は、ペプチドまたはPEG部分に共有結合的に結合されたアルブミン結合モチーフをさらに含む。場合によっては、アルブミン結合モチーフは4-(4-ヨードフェニル)酪酸である。

【0044】

当業者は、結合体が複数のPEG部分を含む時に、それぞれのPEG部分のサイズまたは分子量を独立して選択できることを理解する。場合によっては、それぞれのPEG部分のサイズまたは分子量は異なる。他の場合において、結合体の中にある全てのPEG部分のサイズまたは分子量は同じである。いくつかの態様において、PEG部分は約5,000ダルトン(Da)未満の分子量を有する。特定の態様において、PEG部分は約3,000ダルトン(Da)未満の分子量を有する。好ましい態様において、PEG部分は、規定の鎖長を有する単分散PEG部分である。規定の鎖長を有するPEG部分は、一般的に、正確に規定された数の反復エチレングリコール単位を有する、別々の分子量のPEG分子を含む。規定の鎖長を有するPEG部分の非限定的な例には、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、または約95%超のオリゴマー純度を有する小さな単分散PEG分子が含まれる。特定の態様において、平均分子量を有するPEG化合物混合物は本発明の結合体において用いられない。

【0045】

ある特定の場では、PEG部分は、PEG₁₁、PEG₁₂(PEG 800)、PEG₂₈(PEG 1,500)、および(PEG₂₈)₂(PEG 1,500x2)からなる群より選択される。本発明の結合体における使用に適したPEG単位の他の非限定的な例には、PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 500、PEG 600、PEG 700、PEG 900、PEG 1,000、PEG 1,100、PEG 1,200、PEG 1,300、PEG 1,400、PEG 1,600、PEG 1,700、PEG 1,800、PEG 1,900、PEG 2,000、PEG 2,100、PEG 2,200、PEG 2,300、PEG 2,400、PEG 2,500、PEG 2,600、PEG 2,700、PEG 2,800、PEG 2,900、PEG 3,000、PEG 3,250、PEG 3,350、PEG 3,500、PEG 3,750、PEG 4,000、PEG 4,250、PEG 4,500、PEG 4,750、およびPEG 5,000、ならびにその誘導体、例えば、分岐PEG誘導体が含まれる。好ましい態様において、これらのPEG分子は、正確に規定された数の反復単位「n」を含有し、単分散である(例えば、約95%を超えるオリゴマー純度を有する)。本発明における使用に適したPEG部分はEMD Chemicals, Inc.(San Diego, CA)およびPolypure AS(Oslo, Norway)から市販されている。

【0046】

いくつかの態様において、ペプチドのC末端には、さらなるリジン残基が結合されている(例えば、共有結合的に結合されている)。他の態様において、さらなるリジン残基の側鎖にフルオロベンゾイル(FB)基が結合されている。場合によっては、結合体は、配列 **VGDLTYLKK(FB)** (SEQ ID NO:2)

を含む。特定の態様において、SEQ ID NO:2に示す結合体のFB基は放射標識されている。場合によっては、FB基は¹⁸Fで放射標識されている。

【0047】

いくつかの態様において、ペプチドのN末端には部分(例えば、FB基またはPEG部分(例えば、PEG₂₈))が結合されている(例えば、共有結合的に結合されている)。いくつかの態様において、SEQ ID NO:2に示す結合体は、ペプチドのN末端に結合されたFB基をさらに含む。他の態様において、SEQ ID NO:2に示す結合体は、C末端リジン残基に結合されたPEG₂₈基をさらに含む。特定の態様において、SEQ ID NO:2に示す結合体は、配列

FB-VGDLTYLKK(FB)-PEG₂₈ (SEQ ID NO:3)

を有するように、ペプチドのN末端に結合されたFB基と、C末端リジン残基に結合されたPEG₂₈基をさらに含む。N末端FB基および/またはリジン残基に結合されたFB基は(例えば、¹⁸Fで)放射標識することができる。

【0048】

本発明の結合体は直鎖構造でもよく、枝分かれ構造でもよい。いくつかの態様において、結合体は、本明細書に記載のペプチド配列(例えば、SEQ ID NO:1または10に示すアミノ

酸配列)の多量体(例えば、二量体または四量体)を含む。非限定的な例として、結合体は、配列

(VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:4)

を含んでもよく、結合体は、アミノ酸配列

VGDLTYLK (SEQ ID NO:1)

の二量体を含み、PEG₁₂部分は二量体の各メンバーのC末端に結合され、両方のPEG₁₂部分は2つのさらなるリジン残基の最初のリジン残基に結合され、かつFB基は2つのさらなるリジン残基の2番目のリジン残基の側鎖に結合されている。別の非限定的な例として、SEQ ID NO:4に示す結合体は、配列

(FB-VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:5)

を含むように、二量体の各ペプチドのN末端に結合されたFB基をさらに含んでよい。N末端FB基および/またはリジン残基に結合されたFB基の一方または両方を(例えば、¹⁸Fで)放射標識することができる。場合によっては、SEQ ID NO:4または5に示す結合体のリジン残基に結合されたFB基は(例えば、¹⁸Fで)放射標識される。

【0049】

さらに、本発明は、SEQ ID NO:11、12、13、または14のペプチドと、本明細書に記載の任意の部分を含む結合体を提供する。いくつかの態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:6、7、8、または9に示す配列を含む。

【0050】

本発明はまた、本明細書に記載の結合体または複数の結合体を含む組成物も提供する。いくつかの態様において、規定の鎖長を有する単分散PEG部分が、前記組成物中の複数の結合体に存在する。他の態様において、前記組成物中の複数の結合体は互いに連結して多量体結合体を形成する。多量体結合体は、例えば、複数の結合体の二量体または四量体でもよい。特定の態様において、前記組成物は、本明細書に記載の薬学的担体または賦形剤をさらに含む。

【0051】

A. インテグリン結合ペプチド

ある特定の局面において、本発明は、ペプチドを含む結合体を提供する。いくつかの態様において、ペプチドはインテグリン結合ペプチドである。インテグリンは、細胞外マトリックスリガンド、細胞表面リガンド、および可溶性リガンドに結合する細胞接着受容体のスーパーファミリーである。インテグリンは膜貫通 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体であり、少なくとも18種類の α サブユニットと8種類の β サブユニットがヒトにおいて公知であり、このため24種類のヘテロ二量体がある。 α サブユニットと β サブユニットは別個のドメイン構造を有し、各サブユニットからの細胞外ドメインがヘテロ二量体のリガンド結合部位に寄与する。インテグリンの非限定的な例には、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_8\beta_1$ 、 $\alpha_9\beta_1$ 、 $\alpha_{10}\beta_1$ 、 $\alpha_{11}\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_8$ 、 $\alpha_{11b}\beta_3$ 、 $\alpha_4\beta_7$ 、 $\alpha_E\beta_7$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 、 $\alpha_X\beta_2$ 、 $\alpha_D\beta_2$ 、およびそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの態様において、インテグリンは、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン、 $\alpha_{11b}\beta_3$ インテグリン、または $\alpha_v\beta_6$ インテグリンである。

【0052】

特定の態様において、ペプチドは $\alpha_v\beta_6$ インテグリンに結合する(例えば、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリンを標的指向する)。いくつかの態様において、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン結合ペプチドは、

VGDLTYLK (SEQ ID NO:1), VGDLTYLKK (SEQ ID NO:10),

RGDLMKLAK (SEQ ID NO:11), RGDADLRK (SEQ ID NO:12), GIDLTSCLK

(SEQ ID NO:13), および RGDRLAK (SEQ ID NO:14)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0053】

10

20

30

40

50

10

20

20

30

30

40

50

ルアラニン、p-I-フェニルアラニンなど)、L-アリル-グリシン、b-アラニン、L-a-アミノ酪酸、L-g-アミノ酪酸、L-a-アミノイソ酪酸、L-e-アミノカプロン酸、7-アミノヘプタン酸、L-メチオニンスルホン、L-ノルロイシン、L-ノルバリン、p-ニトロ-L-フェニルアラニン、L-ヒドロキシプロリン、L-チオプロリン、フェニルアラニンのメチル誘導体(例えば1-メチル-Phe、ペンタメチル-Phe、L-Phe(4-アミノ)、L-Tyr(メチル)、L-Phe(4-イソプロピル)、L-Tic(1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシル酸)、L-ジアミノプロピオン酸、L-Phe(4-ベンジル)など)が挙げられるがそれに限定されない。ペプチドをさらに修飾することができる。例えば、1つまたは複数のアミド結合をエステルまたはアルキル骨格結合で置き換えることができる。N-またはC-アルキル置換基、側鎖修飾、または、ジスルフィド架橋または側鎖アミドもしくはアルキル結合などの拘束が存在しうる。

10

【0057】

本発明の結合体において使用されるペプチドは、修飾ペプチドおよび合成ペプチド類似体の両方を含む。製剤化特性および貯蔵特性を改善するために、または弱いペプチド結合を保護するために、非ペプチド構造を取り込むことでペプチドを保護することができる。本発明のペプチドは、当技術分野において公知の方法を使用して調製することができる。例えば、化学合成によって、例えば固相技術および/もしくは自動ペプチド合成機を使用して、または組換え手段によって、ペプチドを生成することができる。特定の場合では、自動複数ペプチド合成機(Abimed AMS 422)上で固相戦略を使用して9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)化学反応によってペプチドを合成することができる。次にペプチドを逆相HPLCで精製し、凍結乾燥させることができる。あるいは、より長いペプチド配列または完全長タンパク質配列の切断によってペプチドを調製することもできる。いくつかの態様では、ペプチドは(例えば、Fmoc化学を用いるNova Syn TGR樹脂上で)手作業で作製される。

20

【0058】

他の態様では、本発明の結合体のペプチド成分は環化されていてもよい。安定性の強化をもたらす立体配座拘束を選択して構造に付与するために環状構造をペプチドに導入するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、酸化される際にペプチドがジスルフィド結合を含んで環状ペプチドを生み出すように、C末端またはN末端システインをペプチドに加えることができる。他のペプチド環化方法としては、チオエーテル、ならびにカルボキシル末端およびアミノ末端のアミドおよびエステルの形成が挙げられる。合成環状ペプチドを生み出すためのいくつかの合成技術が開発された(例えばTarn et al., Protein Sci., 7:1583-1592 (1998); Romanovskis et al., J. Pept. Res., 52: 356-374 (1998); Camarero et al., J. Amer. Chem. Soc., 121: 5597-5598 (1999); Valero et al., J. Pept. Res., 53(1): 56-67 (1999)を参照)。一般に、ペプチドを環化することの役割は以下の2つである: (1) インビボで加水分解を減少させること; および(2) アンフォールド状態を熱力学的に不安定化し、二次構造形成を促進すること。

30

【0059】

B. 投与方法

本発明の結合体(例えば、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸配列を含むペプチドと、部分とを含む)および本発明の組成物(例えば、本発明の結合体または複数の本発明の結合体を含む)は、ヒトおよび獣医学における画像化、治療用途、予後判定用途、ならびに診断用途において特に有用である。例えば、結合体および組成物は、臓器および癌組織を画像化するために使用することができる。適切な腫瘍の非限定的な例には、脾臓の悪性腫瘍(例えば、腺癌、漿液性嚢胞腺腫、腺房細胞癌、脾神経内分泌腫瘍、例えば、インスリノーマなど)、乳房、結腸、直腸、前立腺、頭頸部の悪性腫瘍(例えば、口腔扁平上皮癌)、または他の任意の組織もしくは臓器の悪性腫瘍が含まれる。結合体および組成物はまた、疾患および障害、例えば、癌(例えば、脾臓癌、乳癌、結腸癌、子宮頸癌、肺癌など)、炎症性疾患、自己免疫疾患、慢性線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺気腫、放射線誘発性肺線維症、および慢性創傷性皮膚疾患を処置するためにも有用である。特に、結合体は、インテグリン(例えば、 $\alpha_v \beta_6$ インテグリン)によって媒介される疾患または障害を画像化、処置、

40

50

診断、および予後判定するために有用である。場合によっては、前記疾患または障害はインテグリンの発現、過剰発現、または活性化に関連する。

【0060】

必要に応じて、一般に認められている任意の投与方法によって、本発明の結合体および組成物と適切な薬学的賦形剤との投与を行うことができる。従って、投与は、例えば、静脈内投与、局部投与、皮下投与、経皮(transcutaneous)投与、経皮(transdermal)投与、筋肉内投与、経口投与、関節内投与、非経口投与、小動脈内投与、皮内投与、室内投与、頭蓋内投与、腹腔内投与、病巣内投与、鼻腔内投与、直腸投与、腔投与、または吸入による投与でもよい。さらに、注射が腫瘍の処置を目的とする場合、投与は、腫瘍に、および/または腫瘍を取り囲む組織の中に直接行われてもよい。

10

【0061】

いくつかの態様において、複数の本発明の結合体、またはその複数の含む組成物が投与される。特定の態様において、複数の結合体は、異なる結合体の組み合わせを含む。

【0062】

本発明の結合体または組成物を反復的に、例えば少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、またはそれ以上投与することができ、あるいは持続注入により投与することができる。好適な投与部位としては皮膚、粘膜、気管支、胃腸、肛門、腔、眼、および耳が挙げられるがそれに限定されない。製剤(例えば、本発明の結合体または組成物)は、固体、半固体、凍結乾燥粉末、または液体の剤形、例えば錠剤、丸剤、舐剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、坐薬、停留浣腸剤、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、エアロゾル剤などの形態を、好ましくは正確な投与量の簡便な投与に好適な単位剤形として取りうる。

20

【0063】

「単位剤形」という用語は、ヒト対象および他の哺乳動物(例えばイヌ)用の単位剤形として好適な物理的に別々の単位を意味し、各単位は、所望の作用発現、耐容性、および/または治療効果を生じるように計算された所定量の有効物質と好適な薬学的賦形剤との組み合わせを含む(例えばアンプル)。さらに、濃縮組成物を調製することができ、次に該濃縮組成物から希釈単位投薬組成物を生成することができる。したがって、濃縮組成物は実質的により多くの、例えば少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上の量の結合体または複数の結合体または結合体の組み合わせを含む。

30

【0064】

そのような剤形を調製するための方法は当業者に公知である(例えばREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)を参照)。投与される組成物は、本発明の開示に従って投与される場合に、腫瘍、臓器、もしくは組織の画像化、または処置される状態の軽減のために薬学的に有効な量で、結合体または複数の結合体を含む。さらに、本発明の結合体の薬学的に許容される塩(例えば酸付加塩)を、有機合成化学分野の当業者に公知でありかつ例えばMarch, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, 4th Ed., New York, Wiley-Interscience (1992)に記載されている標準的手順を使用して調製し、組成物に取り込むことができる。

40

【0065】

いくつかの態様では、本発明の組成物は、従来の薬学的担体または賦形剤を含むものであり、他の薬剤、担体、補助剤、希釈剤、組織浸透促進剤、可溶化剤などをさらに含んでもよい。好ましくは、組成物は、本発明の結合体または複数の本発明の結合体約0.01重量%～約90重量%、約0.1重量%～約75重量%、約0.1重量%～50重量%、または約0.1重量%～10重量%を含み、残りは好適な薬学的担体および/または賦形剤からなる。当技術分野において周知の方法によって、適切な賦形剤を特定の組成および投与経路に適応させることができる。例えば前掲のREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCESを参照。

【0066】

好適な賦形剤の例としては乳糖、ブドウ糖、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、デ

50

ンブ、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、生理食塩水、シロップ、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、および、Carbopol、例えばCarbopol 941、Carbopol 980、Carbopol 981などのポリアクリル酸などが挙げられるがそれに限定されない。組成物は、タルク、ステアリン酸マグネシウム、およびミネラルオイルなどの潤滑剤；湿潤剤；乳化剤；懸濁化剤；ヒドロキシ安息香酸メチル、エチル、およびプロピル(すなわちパラベン)などの保存料；無機および有機の酸および塩基などのpH調整剤；甘味料；着色料；ならびに香料をさらに含んでもよい。組成物は生分解性ポリマービーズ、デキストラン、およびシクロデキストリン包接錯体を含んでもよい。

10

【0067】

経口投与では、組成物は錠剤、舐剤、カプセル剤、乳剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤、スプレー剤、散剤、および持続放出製剤の形態でありうる。経口投与に好適な賦形剤としては薬学的グレードのマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、ゼラチン、ショ糖、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。

【0068】

いくつかの態様では、組成物(例えば、薬学的組成物)は丸剤、錠剤、またはカプセル剤の形態を取り、したがって組成物は、結合体または複数の結合体または結合体の組み合わせと共に、以下のうちいずれかを含みうる：乳糖、ショ糖、リン酸二カルシウムなどの希釈剤；デンプンまたはその誘導体などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；ならびにデンプン、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロースおよびセルロース誘導体などの結合剤。組成物を、例えばポリエチレングリコール(PEG)担体中に配置することで坐薬として製剤化してもよい。

20

【0069】

液体組成物の調製を、結合体または複数の結合体または結合体の組み合わせ、および場合によっては1つまたは複数の薬学的に許容される補助剤を例えば生理食塩水(例えば0.9% w/v塩化ナトリウム)、ブドウ糖水溶液、グリセリン、エタノールなどの担体に溶解または懸濁させて、例えば経口投与、局所投与、または静脈内投与用の液剤または懸濁剤を形成することによって行うことができる。本発明の組成物を停留浣腸剤に製剤化してもよい。

30

【0070】

局所投与では、本発明の組成物は乳剤、ローション剤、ゲル剤、クリーム剤、ゼリー剤、液剤、懸濁剤、軟膏剤、および経皮パッチ剤の形態でありうる。吸入による送達では、組成物を乾燥散剤として、または液体形態でネブライザーによって送達することができる。非経口投与では、組成物は滅菌注射用液剤および滅菌包装散剤の形態でありうる。好ましくは、注射用液剤はpH約4.5～約7.5で製剤化される。

【0071】

本発明の組成物を凍結乾燥形態で提供してもよい。そのような組成物は投与前の再構成用に緩衝液、例えば炭酸水素緩衝液を含んでもよく、あるいは、この緩衝液は例えば水による再構成用に凍結乾燥組成物に含まれてもよい。凍結乾燥組成物は好適な血管収縮薬、例えばエピネフリンを含んでもよい。凍結乾燥組成物はシリンジ中で提供することができ、シリンジは、再構成組成物を患者に直ちに投与することができるよう再構成用の緩衝液との組み合わせで包装されていてもよい。

40

【0072】

一般に、投与される投与量は、ピコモル～マイクロモル濃度の結合体または複数の結合体または結合体の組み合わせを適切な部位に送達するために有効である。しかし、当業者は、投与される用量が、投与される特定の結合体または結合体のセット、投与様式、用途の種類(例えば画像化、診断、予後予測、治療など)、患者の年齢、および患者の体調を含むがそれに限定されないいくつかの要因に応じて変動することを理解する。好ましくは、

50

所望の結果を生じるために必要な最小用量および最小濃度を使用すべきである。子ども、高齢者、衰弱した患者、ならびに心疾患および/または肝疾患の患者に合わせて投与量を適切に調整すべきである。さらなる指針は、投与量を評価するために実験動物モデルを使用する当技術分野において公知の試験から得ることができる。しかし、本発明の結合体に関連して代謝安定性、腫瘍滞留性、および腫瘍対血液比が増加することで、投与濃度および反復投与に関する安全性の範囲が広がる。

【0073】

C. 画像化用途

本発明の結合体(例えば、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸配列を含むペプチドと、部分とを含む)および本発明の組成物(例えば、本発明の結合体または複数の本発明の結合体を含む)は、腫瘍の画像化、臓器の断層撮影画像化、臓器機能のモニタリング、冠動脈造影法、蛍光内視鏡検査、レーザー誘導手術、超音波法、および音響蛍光法などを含むが、これに限定されない様々な生物医学的用途における組織および臓器のインビボ光学画像化剤(例えば、放射性トレーサーまたは画像化プローブ)として有用である。いくつかの態様において、本発明の結合体および組成物は、特定の結合体が対象のどこに集まっているのかモニタリングすることによって腫瘍および他の異常の存在を検出するために有用である。他の態様において、結合体および組成物は、腹腔鏡検査の際に腫瘍の微小転移を検出するためのレーザー支援誘導手術に有用である。さらに他の態様では、結合体および組成物はアテローム性動脈硬化巣および血餅の診断において有用である。

【0074】

さらなる態様において、本発明の結合体および組成物は、(1)眼科学における眼疾患の画像化、例えば、直接的な顕微鏡画像化による脈絡網膜疾患、例えば、血管障害、網膜症、血管新生、および腫瘍の視覚化を強化するのを目的とした、眼科学における眼疾患の画像化;(2)直接的な顕微鏡画像化による皮膚病、例えば、皮膚腫瘍の画像化;(3)内視鏡検査による胃腸、口腔、気管支、子宮頸、および泌尿器の疾患および腫瘍の画像化;(4)軟性内視鏡カテーテルによるアテローム性動脈硬化巣および他の血管異常の画像化;ならびに(5)2D再建術または3D画像再建術による膵臓腫瘍、乳腺腫瘍、脳腫瘍、灌流、および脳卒中の画像化において有用である。

【0075】

いくつかの態様において、本発明の結合体または組成物は画像化用途と治療用途の両方に用いられる。例えば、本明細書に記載の画像化方法は、治療用結合体(すなわち、治療剤を含む結合体)を(例えば、画像化されている標的組織または臓器の中にある)対象に投与する工程をさらに含んでよい。いくつかの態様において、画像化用結合体(すなわち、画像化剤を含む結合体)と、画像化用結合体とは異なる治療用結合体が用いられる(例えば、対象に投与される)。異なる画像化用結合体と治療用結合体が用いられる場合、1種類の組成物の中に存在してもよく、異なる組成物の中に存在してもよく、異なる組成物は場合によっては同時投与されてもよい。他の態様において、画像化用結合体と治療用結合体は同じである。非限定的な例として、本発明の結合体は、(例えば、画像化の目的で)検出することができ、望ましい治療を(例えば、標的細胞、組織、または臓器に)送達することもできる放射性核種を含んでもよい。

【0076】

画像化手順の前に、本発明の結合体および組成物は全身投与されてもよく、画像化しようとする腫瘍、臓器、または組織に局所投与されてもよい。一般的に、結合体および組成物は、腫瘍、組織、または臓器の望ましい光学画像を得るために有効な用量で投与される。このような用量は、使用される特定の結合体、画像化手順に供される腫瘍、組織、または臓器、使用されている画像化装置などに応じて大きく異なる場合がある。

【0077】

いくつかの態様において、本明細書に記載の結合体および組成物は、試料が同定または定量され得るように、試料を直接、染色または標識するために用いられる。例えば、生物学的標的分析物(例えば、抗原)に対するアッセイの一環として、生物学的流体もしくは非

生物学的流体中での検出可能な追跡元素として、または当業者に公知の他のインビトロ目的で特定の結合体を添加することができる。典型的に、試料は、液体供給源から、あるいは固体的材料(有機もしくは無機)に由来する洗浄液として、または培養のために細胞が導入されている増殖培地として、または評価のために細胞が入れられている緩衝溶液として直接、得られる。試料が細胞を含む場合、細胞は、任意で、微生物を含む単一細胞であるか、または多細胞生物、胚、組織、生検材料、フィラメント、バイオフィームなどを含む、二次元層もしくは三次元層の形で他の細胞と関連付けられている複数の細胞である。

【0078】

検出可能な応答とは、一般的に、観察によって、または計器によって検出可能な光信号の変化または光信号の発生を指す。ある特定の場合では、検出可能な応答は、 α 粒子、 β 粒子、核子、電子、陽電子、ニュートリノ、および放射性物質、例えば、放射性核種から発せられた γ 線を含む放射能(すなわち、放射線)である。ある特定の他の場合において、検出可能な応答は、蛍光、あるいは蛍光の変化、例えば、蛍光強度、蛍光励起もしくは蛍光波長分布、蛍光寿命、および/または蛍光偏光の変化である。当業者は、対象または試料における標識の程度および/または場所を標準または対照(例えば、健全な組織または臓器)と比較できることを理解する。

【0079】

画像化用途において用いられる場合、本発明の結合体は、典型的には、ペプチド(例えば、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸配列を含む)の1つまたは複数、1つもしくは複数のさらなるアミノ酸残基(例えば、リジン残基)、または別の部分に共有結合的または非共有結合的に結合された画像化剤を有する。いくつかの態様において、画像化剤はペプチドに共有結合的または非共有結合的に結合されている。他の態様において、画像化剤は別の画像化剤(例えば、フルオロベンゾイル(FB)基)に共有結合的または非共有結合的に結合されている。他のいくつかの態様において、画像化剤はPEG部分(例えば、PEG₁₂(PEG 800)、PEG₂₈(PEG 1,500)、またはそれらの組み合わせ)に共有結合的または非共有結合的に結合されている。適切な画像化剤には、FB基、放射性核種、検出可能なタグ、フルオロフォア、蛍光タンパク質、酵素タンパク質などが含まれるが、これに限定されない。特定の態様において、画像化剤はFB基または放射性核種(例えば、¹⁸F)である。いくつかの態様において、画像化剤は、FB基と放射性核種の組み合わせ(例えば、FB基に共有結合的に結合された放射性核種(例えば、¹⁸F))を含む。

【0080】

当業者は、画像化剤を結合するための方法に精通している。例えば、画像化剤(例えば、フルオロベンゾイル基)は、画像化剤をペプチドに存在する第一級アミン基またはPEG部分に共有結合的に結合することによって、結合体のペプチド、1つもしくは複数のさらなるアミノ酸(例えば、リジン残基)、または部分(例えば、PEG部分)に直接結合することができる。さらに、当業者は、画像化剤(例えば、FB基)をリジン残基の側鎖に結合することができることを理解する。当業者は、非共有結合性相互作用(例えば、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、双極子-双極子結合など)を介して、画像化剤(例えば、FB基)を、結合体のペプチド、1つもしくは複数のさらなるアミノ酸(例えば、リジン残基)、または部分(例えば、PEG部分)にも結合できることを理解するであろう。

【0081】

非限定的な例として、4-[¹⁸F]-フルオロ安息香酸(「¹⁸F-FBA」)を用いて、本発明の結合体を放射標識することができる。さらなる場合において、放射性核種は、結合体に結合されたキレート剤またはキレート剤-リンカーに結合される。直接、結合体化するために適した放射性核種には、¹⁸F、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、およびその混合物が含まれるが、それに限定されるわけではない。キレート剤との使用に適した放射性核種には、⁴⁷Sc、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁸⁹Sr、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁹⁰Y、¹⁰⁵Rh、¹¹¹Ag、¹¹¹In、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹²Bi、およびその混合物が含まれるが、それに限定されるわけではない。本発明の結合体における使用に適した、さらなる放射性核種には、¹¹C、¹³N、¹⁵O、⁶¹Cu、⁶²Cu、および⁶⁸Gaが含まれる。特定の態様において、放射性核種は¹⁸Fであ

る。適切なキレート剤には、DOTA、NOTA、NOTA-TCO、BAD、TETA、DTPA、EDTA、NTA、HDTA、そのホスホネート類似体、およびその混合物が含まれるが、これに限定されない。当業者は、放射性核種、キレート剤、およびキレート剤-リンカーを本発明の結合体に結合するための方法に精通している。特に、結合は、都合よく、例えば、結合体の妨害しない位置に存在する官能基に結合することができ、次いで、放射性核種、キレート剤、またはキレート剤-リンカーにさらに連結することができる市販の二官能性連結基(一般的にヘテロ二官能性連結基)を用いて行うことができる。

【0082】

画像化剤として使用するために適したフルオロフォアまたは蛍光色素の非限定的な例には、Alexa Fluor(登録商標)色素(Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、オレゴングリーン(商標);ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート(tettrarhodamine isothiocynate)(TRITC)、CyDye(商標)蛍光物質(例えば、Cy2、Cy3、Cy5)などが含まれる。

【0083】

画像化剤として使用するために適した蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質(例えば、DsRed)、黄色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、およびその変種が含まれるが、これに限定されない(例えば、米国特許第6,403,374号、同第6,800,733号、および同第7,157,566号を参照されたい)。GFP変種の具体的な例には、強化(enhanced)GFP(EGFP)、不安定化(destabilized)EGFP、Doan et al., Mol. Microbiol., 55:1767-1781 (2005)に記載のGFP変種、Cramer et al., Nat. Biotechnol., 14:315-319 (1996)に記載のGFP変種、Rizzo et al., Nat. Biotechnol., 22:445 (2004)およびTsien, Annu. Rev. Biochem., 67:509 (1998)に記載のセルリアン(cerulean)蛍光タンパク質、ならびにNagal et al., Nat. Biotechnol., 20:87-90 (2002)に記載の黄色蛍光タンパク質が含まれるが、これに限定されない。DsRed変種は、例えば、Shaner et al., Nat. Biotechnol., 22:1567-1572 (2004)に記載されており、mStrawberry、mCherry、mOrange、mBanana、mHoneydew、およびmTangerineを含む。さらなるDsRed変種は、例えば、Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101:16745-16749 (2004)に記載されており、mRaspberry および mPlumを含む。DsRed 変種のさらなる例には、Fischer et al., FEBS Lett., 577:227-232 (2004)に記載のmRFPmarsおよびFischer et al., FEBS Lett., 580:2495-2502 (2006)に記載のmRFPrubyが含まれる。

【0084】

他の態様において、本発明の結合体に結合された画像化剤は、抗体、または検出可能なタグ、例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、もしくはニュートラアビジンを含む。さらなる態様において、画像化剤は、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、キシラナーゼ、アルカリホスファターゼなどを含むが、これに限定されない酵素タンパク質を含む。

【0085】

対象において放射性核種の放射電磁波を検出するための当技術分野において公知の任意の装置または方法が本発明における使用に適している。例えば、放射標識された本発明の結合体から発せられた放射線を検出するために、回転型ガンマカメラを用いる、単一光子 γ 線放射放射性核種からの放射線を検出する方法、例えば、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)、およびシンチレーションガンマカメラを用いる、組織、臓器、または身体の系における放射性核種分布の1枚の画像または一連の連続画像を得る放射性核種シンチグラフィが用いられる場合がある。ポジトロン放出断層撮影法(PET)は、対象における放射線を検出するための別の適切な技法である。さらに、米国特許第5,429,133号は、固体組織腫瘍に集まっている放射線を検出するための腹腔鏡下消息子(laparoscopic probe)について説明する。医療用途を目的とする小型かつ柔軟性のある放射線検出器がIntra-Medical LLC(Santa Monica, CA)により製造されている。磁気共鳴画像法(MRI)、磁気共鳴分光法(MRS)、または当業者に公知の他の任意の画像化法も、放射性核種の放射電磁

波を検出するために適している。いくつかの態様において、放射性核種からの放射線は、結合体または組成物が対象のどこに集まっているのか決定するために用いられる。使用する方法または装置に関係なく、このような検出は、結合体を対象のどこに集まっているのか決定することを目的とし、このような集中は腫瘍または腫瘍細胞の場所の指標である。

【0086】

動物およびヒトの非侵襲的蛍光画像化はまたインビボでの診断情報または予後情報も提供することができ、多種多様な臨床専門分野において使用することができる。例えば、UV励起後の目による簡単な観察から、最新式の装置を用いる精巧な分光画像化まで長年にわたって技法が開発されてきた(例えば、Andersson-Engels et al., Phys. Med. Biol., 42:815-824 (1997)を参照されたい)。蛍光、例えば、フルオロフォアまたは蛍光タンパク質からの蛍光をインビボ検出するための当技術分野において公知の具体的な装置または方法には、インビボ近赤外蛍光(例えば、Frangioni, Curr. Opin. Chem. Biol., 7:626-634 (2003)を参照されたい)、Maestro(商標)インビボ蛍光画像化システム(Cambridge Research & Instrumentation, Inc.; Woburn, MA)、フライングスポットスキャナーを用いるインビボ蛍光画像化(例えば、Ramanujam et al., IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 48:1034-1041 (2001)を参照されたい)などが含まれるが、これに限定されない。

【0087】

光応答を検出するための他の方法または装置には、目視検査、CCDカメラ、ビデオカメラ、写真フィルム、レーザースキャニング装置、蛍光光度計、光ダイオード、量子カウンター、落射蛍光顕微鏡、走査型顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光マイクロプレートリーダー、および光電子増倍管を用いる信号増幅が含まれるが、これに限定されるわけではない。

【0088】

D. 治療用途

本発明の結合体(例えば、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸配列を含むペプチドと、部分とを含む)および本発明の組成物(例えば、本発明の結合体または複数の本発明の結合体を含む)は、対象(例えば、疾患および障害の予防または処置を必要とする対象)における疾患および障害(例えば、インテグリン媒介性の疾患または障害)の予防または処置に有用である。いくつかの態様において、予防または処置の方法は、治療的有効量の本発明の結合体または組成物を投与する工程であって、結合体が治療剤を含む工程を含む。特定の態様において、結合体または組成物の治療的有効量は、治療剤の送達をインテグリン(例えば、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン)発現細胞に標的指向するために十分な量である。本発明の結合体および組成物は、インテグリン(例えば、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン)の発現、過剰発現、または活性化に関連する疾患および障害を処置するために特に有用である。本明細書に記載の結合体および組成物による処置に好適な疾患または障害の例としては、アレルギー、不安障害、自己免疫疾患、行動障害、先天性欠損、血液障害、骨疾患、癌、慢性線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、慢性創傷性皮膚疾患、循環器疾患、歯科疾患、うつ病性障害、解離性障害、耳状態、摂食障害、眼状態、食物アレルギー、食中毒、胃腸疾患、遺伝性障害、心疾患、ホルモン障害、免疫不全、感染性疾患、炎症性疾患、昆虫伝染病、栄養障害、腎疾患、白質ジストロフィー、肝疾患、肺気腫、メンタルヘルス障害、代謝疾患、気分障害、筋変性障害、神経障害、神経変性障害、神経筋障害、人格障害、恐怖症、妊娠合併症、プリオン病、前立腺疾患、心理障害、精神障害、呼吸器疾患、性障害、皮膚状態、睡眠障害、言語障害、スポーツ外傷、熱帯病、前庭障害、および消耗性疾患が挙げられるがそれに限定されない。好ましくは、 $\alpha_v\beta_6$ 媒介性の疾患または障害は癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、慢性線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺気腫、および慢性創傷性皮膚疾患(例えば表皮水疱症)である。

【0089】

特定の態様において、本明細書に記載される組成物および結合体(例えば、治療剤を含むもの)は、癌の予防または処置のために使用される。一般に、癌は、周囲組織に浸潤しかつ新たな身体部位に転移する傾向がある未分化細胞の増殖を特徴とする、様々な悪性腫

瘍のいずれかを含む。本発明の結合体または組成物を使用する処置に好適な異なる種類の癌の非限定的な例としては、卵巣癌、乳癌、肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、肝癌、胸膜癌、脾癌、子宮頸癌、前立腺癌、精巣癌、結腸直腸癌、結腸癌、肛門癌、胆管癌、消化管カルチノイド腫瘍、食道癌、胆嚢癌、直腸癌、虫垂癌、小腸癌、胃癌、腎癌(すなわち腎細胞癌)、中枢神経系癌、皮膚癌、口腔扁平上皮癌、絨毛癌、頭頸部癌、骨癌、骨肉腫、線維肉腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、黒色腫、白血病(例えば急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、またはヘアリーセル白血病)、リンパ腫(例えば非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、またはバーキットリンパ腫)、および多発性骨髄腫が挙げられる。いくつかの態様において、癌は $\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害である。

10

【0090】

また、当業者は、本発明の結合体および組成物を癌の処置のために他の治療剤と同時投与することができることを認識するであろう。併用療法に好適な抗癌剤としては、代謝拮抗剤、アルキル化剤、アントラサイクリン、抗生物質、有糸分裂阻害剤、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、コルチコステロイド、インターフェロン、放射性医薬、TNF- α などの抗腫瘍活性を有するペプチド、それらの薬学的に許容される塩、それらの誘導体、それらのプロドラッグ、およびそれらの組み合わせなどの、細胞毒および剤が挙げられるがそれに限定されない。例えば、本発明の1つまたは複数の結合体を含む薬学的組成物を、化学療法の前、途中、または後に、抗癌剤または抗癌剤の組み合わせの投与の前、途中、または後に、患者に投与することができる。腫瘍の再発または転移を減少させかつ/または予防するには、化学療法後の結合体による処置が特に有用でありうる。いくつかの態様では、抗癌剤は、本明細書に記載の結合体に直接的にまたは間接的に(例えばリポソームもしくはナノ粒子によって)共有結合しうる。

20

【0091】

通常、炎症性疾患は、炎症を特徴とするかまたは炎症により引き起こされる疾患または障害を含む。炎症は、細胞傷害に対する局所応答により生じうるものであり、この局所応答は、毛細血管拡張、白血球浸潤、発赤、熱、および疼痛を特徴とし、有害作用物質および損傷組織の除去を開始する機構としての役割を果たす。炎症部位としては例えば肺、胸膜、腱、リンパ節またはリンパ腺、口蓋垂、膣、脳、脊髄、鼻粘膜および咽頭粘膜、筋肉、皮膚、骨または骨組織、関節、膀胱、網膜、子宮頸部、眼角、腸管、椎骨、直腸、肛門、滑液包、濾胞などを挙げることができる。本発明の結合体および組成物を使用する処置に好適な炎症性疾患の例としては、炎症性腸疾患(例えばクローン病または潰瘍性大腸炎)、関節リウマチなどのリウマチ性疾患、結合織炎、骨盤内炎症性疾患、ざ瘡、乾癬、放線菌症、赤痢、胆汁性肝硬変、ライム病、紅色汗疹、スティーブンス・ジョンソン症候群、流行性耳下腺炎、尋常性天疱瘡、およびプラストミセス症が挙げられるがそれに限定されない。

30

【0092】

一般に、自己免疫疾患は、自己組織または組織成分に対する免疫応答、例えば自己抗体応答または細胞媒介性応答により生じる疾患または障害を含む。本発明の結合体および組成物を使用する処置に好適な自己免疫疾患の例としては、自己免疫応答が1つの組織に対して向けられる臓器特異的自己免疫疾患、例えばI型糖尿病、重症筋無力症、白斑、グレーブス病、橋本病、アジソン病、自己免疫性胃炎、および自己免疫性肝炎; ならびに、自己免疫応答が身体中のいくつかの臓器または多くの臓器に存在する成分に対して向けられる臓器非特異的自己免疫疾患、例えば全身性エリテマトーデス、進行性全身性硬化症および変種、多発性筋炎、ならびに皮膚筋炎が挙げられるがそれに限定されない。さらなる自己免疫疾患としては例えば悪性貧血、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性血小板減少症、シェーグレン症候群、および多発性硬化症が挙げられる。

40

【0093】

当業者は、本発明の結合体および組成物を炎症性疾患または自己免疫疾患の処置のために他の治療剤と同時投与することができることを認識するであろう。併用療法に好適な抗

50

炎症剤としてはコルチコステロイド、非ステロイド性抗炎症剤、インフリキシマブなどの抗体、5-アミノサリチル酸、抗生物質、それらの薬学的に許容される塩、それらの誘導体、それらのプロドラッグ、およびそれらの組み合わせが挙げられるがそれに限定されない。併用療法に好適な免疫抑制剤としてはアザチオプリンおよびその代謝物、メトトレキサートなどの代謝拮抗剤、免疫抑制抗体、ミゾリビンーリン酸、シクロスポリン、スコパロン、FK-506(タクロリムス)、FK-778、ラパマイシン(シロリムス)、グラチラマー酢酸塩、ミコフェノール酸、それらの薬学的に許容される塩、それらの誘導体、それらのプロドラッグ、およびそれらの組み合わせが挙げられるがそれに限定されない。

【0094】

別の態様では、本発明の結合体および組成物は、例えばウイルス、細菌、真菌、寄生虫、または任意の他の感染性作用物質により引き起こされる感染症または感染性疾患を処置するために有用である。処置に好適な感染性疾患の非限定的な例としては、後天性免疫不全症候群(AIDS/HIV)またはHIV関連障害、アルパース症候群、炭疽、ウシ海綿状脳症(狂牛病)、水痘、コレラ、結膜炎、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、デング熱、エボラ、象皮症、脳炎、致死性家族性不眠症、第五病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、ハンタウイルス感染症、ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)感染症、肝炎(A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎)、疱疹、インフルエンザ(例えばトリインフルエンザA型(鳥インフルエンザ))、クールー病、ハンセン病、ライム病、マラリア、出血熱(例えばリフトバレー熱、クリミア・コンゴ出血熱、ラッサ熱、マールブルグ病、およびエボラ出血熱)、麻疹、髄膜炎(ウイルス性、細菌性)、単核球症、院内感染症、中耳炎、骨盤内炎症性疾患(PID)、ペスト、肺炎、ポリオ、プリオン病、狂犬病、リウマチ熱、バラ疹、ロスリバーウイルス感染症、風疹、サルモネラ症、敗血症性関節炎、性行為感染症(STD)、带状疱疹、天然痘、連鎖球菌性咽頭炎、破傷風、毒素性ショック症候群、トキソプラズマ症、トラコーマ、結核、野兎病、腸チフス、溪谷熱、百日咳、ならびに黄熱病が挙げられるがそれに限定されない。

【0095】

特定の態様では、本発明の結合体および組成物は、神経障害または筋骨格障害を処置するために有用である。そのような障害の例としてはアルツハイマー病、アイカルディ症候群、健忘症、筋萎縮性側索硬化症(ルー・ゲーリック病)、無脳症、失語症、くも膜炎、アーノルド・キアリ奇形、毛細血管拡張性運動失調症、バッテン病、ベル麻痺、腕神経叢損傷、脳損傷、脳腫瘍、シャルコー・マリー・トゥース病、脳炎、てんかん、本態性振戦、ギラン・バレー症候群、水頭症、多汗症、クラッペ病、髄膜炎、メビウス症候群、筋ジストロフィー、多発性硬化症、パーキンソン病、末梢神経障害、体位性または起立性頻拍症候群、進行性核上性麻痺、ライ症候群、带状疱疹、シャイ・ドレーガー症候群、痙性斜頸、二分脊椎、脊髄性筋萎縮症、全身硬直症候群、共感覚、脊髄空洞症、胸郭出口症候群、トゥレット症候群、トキソプラズマ症、および三叉神経痛が挙げられるがそれに限定されない。

【0096】

治療用途で 사용되는場合、本発明の結合体は通常、1つもしくは複数のペプチド(例えば、SEQ ID NO: 1に示すアミノ酸配列を含むもの)、1つもしくは複数のさらなるアミノ酸残基(例えば、リジン残基)、または他の部分に共有結合的または非共有結合的に結合した治療剤を有する。いくつかの態様では、治療剤はペプチドに共有結合的または非共有結合的に結合する。いくつかの態様では、治療剤はPEG部分に共有結合的または非共有結合的に結合する。特定の場では、治療剤は細胞毒性のものである。好適な治療剤は、有益な予防特性および/または治療特性を対象に対して示すものであり、放射性核種、化学療法剤、ナノ粒子、ナノドロップレット、リポソーム薬物、およびサイトカインが挙げられるがそれに限定されない。当業者は、ペプチド、さらなるアミノ酸(例えば、リジン)、または部分(例えば、PEG部分)上に存在する官能基に治療剤を結合させるための方法を熟知しているであろう。例えば、結合体のペプチドまたはPEG部分に存在する第一級アミン基に治療剤を共有結合させることにより、治療剤をペプチドまたはPEG部分に直接共有結合さ

ることができる。当業者は、非共有結合性相互作用(例えばイオン結合、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、双極子-双極子結合など)によって治療剤を結合体のペプチドまたはPEG部分に結合させることもできることを認識するであろう。

【0097】

いくつかの態様では、治療剤は細胞毒性化学療法剤である。細胞毒性化学療法剤は当技術分野において周知であり、抗癌剤、例えば、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン(HN2)、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン(L-サルコリシン)、およびクロラムブシルなどのナイトロジェンマスタード、エチレンイミンおよびメチルメラミン(例えばヘキサメチルメラミン、チオテパ)、ブスルファンなどのアルキルスルホン酸エステル、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNLJ)、セムスチン(メチル-CCN-U)、およびストレプトゾシン(ストレプトゾトシン)などのニトロソ尿素、ならびにダカルバジン(DTIC; ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサミド)などのトリアゼン)、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキサート(アメトプテリン)などの葉酸類似体、フルオロウラシル(5-フルオロウラシル; 5-FU)、フロクスウリジン(フルオロデオキシウリジン; FUdR)、およびシタラビン(シトシンアラビノシド)などのピリミジン類似体、ならびにメルカプトプリン(6-メルカプトプリン; 6-MP)、チオグアニン(6-チオグアニン; 6-TG)、およびペントスタチン(2'-デオキシコホルマイシン)などのプリン類似体および関連阻害剤)、天然産物(例えば、ビンブラスチン(VLB)およびビンクリスチンなどのビンカアルカロイド、エトポシドおよびテニポシドなどのエピポドフィロトキシン、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ダウノルビシン(ダウノマイシン; ルビドマイシン)、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン(ミスラマイシン)、およびマイトマイシン(マイトマイシンQ)などの抗生物質、L-アスパラギナーゼなどの酵素、ならびにインターフェロンアルフェノーム(α lphenome)などの生体応答修飾物質)、種々の剤(例えば、シスプラチン(cis-DDP)およびカルボプラチンなどの白金配位錯体、ミトキサントロンおよびアントラサイクリンなどのアントラセンジオン、ヒドロキシ尿素などの置換尿素、プロカルバジン(N-メチルヒドラジン; MIH)などのメチルヒドラジン誘導体、ミトタン(o,p'-DDD)およびアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制剤、パクリタキセル(タキソール)および類似体/誘導体、ならびにフルタミドおよびタモキシフェンなどのホルモンアゴニスト/アンタゴニスト)、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。

【0098】

いくつかの態様では、結合体は、アポトーシス促進ペプチドである治療剤を含む(例えば、アポトーシス促進ペプチドである治療剤に共有結合的または非共有結合的に結合されている)。非限定的な例として、アポトーシス促進ペプチドは D_1 (KLAKLAK) $_2$ でもよい。いくつかの態様において、アポトーシス促進ペプチドはグリシンリンカーを介してペプチドまたはPEG部分に結合されている。

【0099】

他の態様では、結合体は、治療剤を含む粒子に連結される。この場合の粒子としてはナノ粒子および脂質ベースのベシクル、例えばリポソーム、または脂質で構成される他の同様の構造が挙げられるがそれに限定されない。ナノ粒子は、化学療法剤(例えば、パクリタキセル(PTX))が装填されたPEG^{5K}CA₈を含み得る。通常、リポソームは、薬物または他の化合物などの物質を送達するための剤として使用可能なリン脂質二重層を含んだ球状ベシクルである。リポソームは、混合脂質鎖を有する天然由来のリン脂質(卵ホスファチジルエタノールアミン)で構成されてもよく、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)のような純粋な成分で構成されてもよい。現在、リポソームの合成および使用は当技術分野において確立している。一般に、リポソームは水などの好適な媒体中でリン脂質を超音波処理することで作り出される。低い剪断速度によって、多層構造を有する多重膜リポソームが作り出される。連続高剪断超音波処理は、小さめの単層リポソームを形成する傾向がある。また、研究によって、例えばリポソームをポリエチレングリコール(PEG)でコーティングすることでリポソームが免疫系による検出を回避することを可能にすることができた。本発明のペプチド結合体などの種をリポソームに組み込むことで、これらの

種を送達部位に、例えば細胞、腫瘍、臓器、組織などに標的指向するのを促進することも可能である。

【0100】

ナノ粒子に会合または結合した物質の送達剤としてのナノ粒子の使用は、当技術分野において公知である。いくつかの種類のナノ粒子はコア、多くの場合では金属原子および/または半導体原子のコアを含み、このコアに結合体のペプチドまたは第1もしくは第2のPEG部分のうち1つまたは複数を連結させることができる(例えばPCT公開番号WO 02/32404、WO 05/10816、およびWO 05/116226を参照)。他の種類のナノ粒子はリボソームなどの材料から形成することができる。いくつかの場合では、ナノ粒子は、化学特性および物理特性がバルク固体のそれと著しく異なる半導体材料の量子ドット、例えばナノ結晶でありうる(例えばGleiter, Adv. Mater., 4:474-481 (1992)を参照)。量子ドットの量子サイズ効果が理解されている現在、これらの系に関する基礎研究および応用研究がますます盛んになっている。興味深い用途は、生体系の発光標識としてのナノ結晶の使用である(例えばBrucher et al., Science, 281:2013-2016 (1998); Chan et al., Science, 281:2016-2018 (1998); Mattousi et al., J. Am. Chem. Soc., 122:12142-12150 (2000); およびAlivisatos, Pure Appl. Chem., 72:3-9 (2000)を参照)。量子ドットは、従来の蛍光色素に対するいくつかの利点を有する。例えば、量子ドットは、サイズに応じて種々の正確な波長で発光し、長い発光寿命を有する。

【0101】

さらなる態様では、治療剤は、細胞死を促進することが可能な細胞毒性ペプチドまたはポリペプチドである。細胞毒性ペプチドおよびポリペプチドは当技術分野において周知であり、例えばリシン、アブリン、シュードモナス外毒素、組織因子などが挙げられる。細胞毒性剤としてのリシンの使用はBurrows et al., P.N.A.S. USA, 90:8996-9000 (1993)に記載されている。局所的な血液凝固および腫瘍の梗塞を誘導する、組織因子の使用は、Ran et al., Cancer Res., 58:4646-4653 (1998)およびHuang et al., Science, 275:547-550 (1997)に記載されている。Tsai et al., Dis. Colon Rectum, 38:1067-1074 (1995)では、モノクローナル抗体に結合したアブリンA鎖が記載されている。PCT公開番号WO 96/06641では他のリボソーム不活性化タンパク質が細胞毒性剤として記載されている。シュードモナス外毒素を細胞毒性ポリペプチドとして使用してもよい(例えばAiello et al., P.N.A.S. USA, 92:10457-10461 (1995)を参照)。TNF- α およびIL-2などの特定のサイトカインも細胞毒性剤および/または治療剤として有用でありうる。

【0102】

特定の放射性原子も、十分な用量で送達される際に、細胞毒性でありうる。したがって、治療剤は、細胞毒性であるために使用時に十分な量の放射能を標的部位に送達する、放射性原子を含みうる。本発明のペプチド結合体中での使用に好適な放射性原子としては、本明細書に記載の放射性核種のいずれか、または、標的の細胞、腫瘍、臓器、もしくは組織を破壊するために十分なエネルギーを放出する任意の他の同位体が挙げられる。好ましくは、結合体中の同位体および放射性原子密度は、少なくとも約4000、6000、8000、または10000cGyの線量が標的部位に、好ましくは標的部位における細胞、および細胞の小器官、特に核に送達されるようなものである。放射性原子を公知の手法で結合体に結合させることができる。例えば、EDTAまたは別のキレート剤を、ペプチドまたはPEG部分に結合させて、 ^{111}In または ^{90}Y を結合させるために使用することができる。いくつかの場合では、ペプチドに存在するチロシン残基を ^{125}I または ^{131}I で標識することができる。好ましくは、ベンゾイル基をペプチドまたはPEG部分に結合させて、 ^{18}F を結合させるために使用する。例えば、4- ^{18}F -フルオロ安息香酸を使用して本発明のペプチド結合体を放射標識することができる。

【0103】

E. キット

本発明はまた、本発明の結合体(例えば、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸配列を含むペプチドと、部分とを含む)および本発明の組成物(例えば、本発明の結合体または複数の本発明

の結合体を含む)の使用を容易にする、および/または標準化するための、ならびに本明細書に記載の方法を容易にするためのキットも提供する。いくつかの態様において、キットは本発明の結合体および/または組成物を含む。これらの様々な方法を行うための材料および試薬は、前記方法の実行を容易にするためにキットの形で提供することができる。本明細書で使用する「キット」という用語は、プロセス、アッセイ、分析、または操作を容易にする物品の組み合わせを含む。特に、本発明の結合体または組成物を含むキットは、例えば、治療(例えば、免疫療法)およびインビボ画像化(例えば、細胞、腫瘍、臓器、組織、生物凝集物(bioaggregate)、バイオフィルムなどのインビボ画像化)を含む広範囲の用途において有用である。

【0104】

キットは化学試薬および他の成分を含みうる。さらに、本発明のキットは、非限定的に、キットユーザーに対する指示書(例えば、免疫療法における結合体または組成物の使用説明書、細胞、腫瘍、臓器、または組織を画像化する上での結合体または組成物の使用説明書)、試料採取および/または精製の装置および試薬、生成物採取および/または精製の装置および試薬、細菌細胞形質転換用試薬、真核細胞遺伝子導入用試薬、既に形質転換または遺伝子導入された宿主細胞、試料管、ホルダー、トレー、ラック、ディッシュ、プレート、溶液、緩衝液、または他の化学試薬、標準化や正規化に使用されるために好適な試料、ならびに/あるいは対照試料を含みうる。本発明のキットを、好都合な貯蔵および安全な輸送のために、例えば蓋付きの箱に包装してもよい。

【実施例】

【0105】

IV. 実施例

本発明は、具体的な実施例によってさらに詳細に説明される。以下の実施例は例示目的のためだけに提供され、いかなる方法によっても本発明を限定することが意図されない。

【0106】

実施例1. 蛍光細胞に基づくオンビーズソーティングを用いた、PET画像化剤としての $\alpha_v\beta_6$ 標的結合体の迅速な同定および開発

概要

本実施例は、フルオロベンゾイルOBocペプチドライブラリーからインテグリン $\alpha_v\beta_6$ 標的ペプチドを含む結合体を同定するための、混合蛍光細胞を用いた新規の一段階オンビーズスクリーニングアプローチ(図1)と、その後の、ポジトロン放出断層撮影法(PET)による非侵襲画像化用の18F-ペプチドへの開発について説明する。オンビーズスクリーニングにおいて使用する蛍光細胞株DX3/ITGB6 mCherryおよびDX3 EmGFPを、ヒトメラノーマDX3puroB6($\alpha_v\beta_6$ 陽性)細胞株およびDX3puro($\alpha_v\beta_6$ 陰性)細胞株から作製した。インテグリン $\alpha_v\beta_6$ は、非常に多くの高悪性度癌において過剰発現している細胞表面受容体である。このフルオロベンゾイルペプチドライブラリーは、インテグリン $\alpha_v\beta_6$ 結合XXDLXXLモチーフと、18F-ペプチド開発用のフルオロベンゾイル(FB)部分の特徴とし、1) $\alpha_v\beta_6$ インテグリンを標的指向し、2)機能と標的特異性の喪失を引き起こす可能性がある、同定されたペプチドのスクリーニング後改変を無くすように設計された。このフルオロベンゾイルペプチドライブラリーは、Fmoc-Lys(alloc)-OHのカップリングから始まる標準的なFmoc-化学固相ペプチド合成を用いて1グラムの90 μ m TentaGel樹脂と一緒に組み立てた。スプリットミックス(split-mix)合成アプローチを利用し、XXDLXXLモチーフの中にXで示したランダムな位置に19種類の天然アミノ酸を用いてライブラリーを作製した。ライブラリー合成が終わったらalloc保護基を除去し、4-フルオロ安息香酸(FBA)とカップリングして、フルオロベンゾイル

NH2-XXDLXXLXK(FB)

ペプチドライブラリーを作製した。1ビーズ2色(one-bead-two-color)(OBTC)細胞スクリーニングアプローチを用いて、5日で185種類のインテグリン $\alpha_v\beta_6$ 標的ペプチドが直接同定された。概念実証として、配列決定のために、このアッセイから単離した5種類のビーズを選択し、競合的結合ELISAを用いて、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、および $\alpha_v\beta_8$

に対する結合特異性を評価した。ペプチドは、 $\alpha_v \beta_6$ インテグリンにはnM以下の親和性で(IC_{50} 値0.3~6.6nM)、 $\alpha_v \beta_5$ 、 $\alpha_v \beta_3$ 、および $\alpha_v \beta_1$ と比べて10,000:1、 $\alpha_v \beta_8$ インテグリンと比べて500:1という最も高い選択性比で結合することが確かめられた。

【0107】

混合蛍光細胞スクリーニングアッセイを用いることで一段階評価が可能になり、それにより、標的特異的ペプチドリガンドを同定するために複数回スクリーニングする代わりに、他の方法と比較してOBOCライブラリーのスクリーニングを迅速化することができた。スクリーニングのために4-フルオロ安息香酸がC末端リジンの側鎖に組み込まれているので、同定されたペプチドをインビトロ試験のために $[^{18}F]$ フルオロ安息香酸で放射標識しても、その結合プロファイルは妨げられないことが保証された。

10

【0108】

方法および結果

以下でさらに説明するように、9マー
XXDLXXLXK(FB)

ペプチドライブラリーを、標準的なFmoc化学を用いてTentaGel樹脂(1g、約3,000,000個のビーズ)上で組み立てた。少量のアリコート(50mg、約150,000個のビーズ)を、赤色蛍光DX3ITG β_6 mCherry($\alpha_v \beta_6$ 陽性)細胞および緑色蛍光DX3 EmGFP($\alpha_v \beta_6$ 陰性)細胞の混合物と3時間インキュベートし、蛍光顕微鏡下で評価した。赤色(すなわち、 $\alpha_v \beta_6$ 陽性)細胞でしか覆われていないビーズを単離した。その後、これらのビーズをEdman配列決定によって特徴付けた。同定されたペプチドを合成した後、標的 $\alpha_v \beta_6$ インテグリンならびに密接に関連する α_v -インテグリンに対する結合特異性を評価するために、精製インテグリンを用いて競合的結合ELISAを行った。

20

【0109】

細胞株

DX3Puro(1)およびDX3Puro β_6 (2)は以前に説明されており、Dr. John Marshallからの惜しめない贈り物であった。DX3/EmGFPおよびDX3/ITG β_6 mCherryを作製するために、DX3Puro細胞およびDX3Puro β_6 細胞に、EmGFPまたはmCherry(EF1 α プロモーターの制御下)およびブラストサイジン耐性遺伝子(ハイブリッドSV40/EM7プロモーターの制御下)を運ぶレンチウイルスを形質導入した。形質導入された細胞を、10%FBSおよびブラストサイジン(10 μ g/mL)を加えたダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中、空气中5%CO₂の存在下で超低密度で37℃で21日間培養した。次いで、DX3/EmGFPおよびDX3/ITG β_6 mCherryのクローン集団を単離し、拡大し、蛍光があるかどうか、DX3/ITG β_6 mCherryの場合はITG β_6 発現が保持されているかどうかスクリーニングした。

30

【0110】

フルオロベンゾイルペプチドライブラリー合成

TentaGel樹脂(1g、90 μ m)をN,N-ジメチルホルムアミド(DMF、10mL; EMD)に入れて1時間膨張させ、水気を切り、その後に、DMF(10mL)に溶解した、N α -Fmoc-N ϵ -alloc-L-リジン(3当量; GLS-China)、2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(HATU、2.7当量; GL Biochem)、およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA、6当量; Sigma)の混合物を添加した。カップリング反応を室温で2時間行い、DMFに溶解した20%v/vピペリジン溶液10mLを用いて30分にわたってFmocを脱保護した。いくつかに分けたDMF(3x各10mL)、メタノール(MeOH)、およびDMFを用いて減圧下でビーズを徹底的に洗浄した後に、19のアリコートに等分した。各アリコートに、1種類のN α -Fmoc-アミノ酸(3倍過剰、NovaBiochem)をHATU(2.7等量)およびDIPEA(6等量)と一緒に添加した。カップリング反応が終わったら、全アリコートを組み合わせ、徹底的に混合し、洗浄し、次いで、次のカップリング工程のために複数のアリコートに再分配した。ペプチドライブラリーが完全に組み立てられるまで「スプリットミックス」手順を繰り返した。5mol%Pd(PPh₃)₄およびフェニルシラン(20等量; Acros)を用いて、リジン上にあるアリルオキシカルボニル(alloc)保護基を除去し、その後に、HATU(2.7倍過剰)およびDIPEA(6倍過剰)で活性化した4-フルオロ安息香酸(FBA、3倍過剰; Sigma)をカップリ

40

50

ングした。樹脂をトリフルオロ酢酸(TFA、EMD)、1,2-エタンジチオール(EDT; Fluka)、水、およびトリイソプロピルシラン(TIPS; Aldrich)(94/2.5/2.5/1 vol/vol/vol/vol)の混合物で室温で3時間処理することによって、全ての保護基の側鎖脱保護を行った。MeOH、DMF、水、および70%エタノール(EtOH)溶液を用いて、樹脂を徹底的に洗浄した。TentaGelビーズ上にあるペプチドは、ビーズ1個あたり 10^{14} コピー(0.13 μ gのST1-62)で示された。

【0111】

ライブラリースクリーニング

1. ビーズ調製物のプレスクリーニング

ライブラリービーズ(凍結乾燥器に入れて一晚乾燥させた)を脱イオン水(10x)を用いて減圧下で洗浄し、水に入れて1時間膨張させ、その後に、PBS(Gibco)で5回洗浄し、PBSに15分間懸濁した。

【0112】

2. 混合蛍光細胞スクリーニング

前記のように、ヒトメラノーマ細胞株DX3からDX3/ITG β 6 mCherry細胞株およびDX3/EmGFP細胞株を調製した。図2Aおよび図2Bに示したように、各細胞株の等しい集団(合計500,000個の細胞)を10%胎仔ウシ血清(FBS)フェノールレッドフリーダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; Gibco)に懸濁し、TCで処理していない培養皿(100mm; Spectrum Chemicals and Laboratory Products)に添加し、次いで、インキュベーターに入れて37°Cで1時間混合した後に、ライブラリービーズを用いてスクリーニングした。混合したDX3/ITG β 6 mCherry細胞とDX3/EmGFP細胞を含有するペトリ皿にビーズを添加し、穏やかに混合しながら37°Cで3時間インキュベートした。インキュベートした後に、ビーズを蛍光顕微鏡下で分析した。DX3/ITG β 6 mCherry細胞($\alpha_v \beta_6$ 特異的)で>80%が覆われているビーズを、マイクロピペットを用いて手作業で選択した。アッセイから単離した陽性ビーズを、エドマン分解を用いて配列決定した(図3および図4)。ペプチド配列を表1に開示した。

【0113】

(表1)選択された5種類の $\alpha_v \beta_6$ 標的ペプチドの配列

化合物ID	配列	SEQ ID NO:
ST1-59	RGDLMKLAK(FB)	6
ST1-60	RGDLADLRK(FB)	7
ST1-61	RGDLRELAK(FB)	9
ST1-62	VGDLTYLKK(FB)	2
ST1-63	GIDLTSLTK(FB)	8

【0114】

ペプチド合成

C末端アミドが生じるように、標準的なFmoc化学を用いてペプチドをNova Syn TGR樹脂(0.25mmol/g)上で手作業で作製した。樹脂をDMF(5mL)に入れて1時間膨張させ、Fmoc-N ϵ -1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシ-1-リデン)-3-メチルブチル-L-リジン(Fmoc-Lys(ivDde))-OH、3倍過剰)を、2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(HATU、2.7倍過剰)およびN-Nジイソプロピルエチルアミン(DIPEA、6倍過剰)と一緒に添加した。20%ピペリジン溶液を用いてFmocを除去し、その後に、DMFおよびMeOHを用いて徹底的に洗浄した後に、次のアミノ酸をカップリングした。ペプチド鎖を伸張させ、最後に、tert-ブチルオキシカルボニル(Boc)で保護されたアミノ酸がN末端にくるようにカップリングサイクルを繰り返した。次に、DMFに溶解した新たに調製された2%ヒドラジン5mLを用いて、ivDde脱保護を30分間(2x15分)行った。最後に、2.7倍過剰のHATUおよび6倍過剰のDIPEAを用いて、4-フルオロ安息香酸(FBA、3等量)をC末端リジンの側鎖とカップリングした。合成が終わったら、TFA/H₂O/EDT/TIPS(1mL、94/2.5/2.5/1 vol/vol/vol/vol)の混合物を用いて、N-Boc基を含む全ての側鎖保護基を室温で3時間切断した。上清を収集し、TFA混合物を蒸発させた後に、ジエチルエー

テルで抽出するためにmilliQ水に再懸濁した。

【0115】

競合的結合ELISA

Nunc MaxiSorp96ウェルプレート上に抗 α_v 捕捉用抗体P2W7(5 μ g/mL, Novus Biologicals)をコーティングし、その後にBSAで4℃で一晩ブロックした。全てのウェルをPBSで3回洗浄し、その後に精製インテグリン(3 μ g/mL)をプレートし、高湿度のチャンバーに入れて室温で1時間インキュベートした。滴定し($\alpha_v\beta_6$ インテグリンの場合は1 μ M~1pM、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの場合は100 μ M~100pM)、ビオチン化天然リガンドと混合したペプチド溶液を、インテグリンでコーティングしたウェルに添加し、これを3回繰り返した。室温で1時間インキュベートした後に、プレートを洗浄用緩衝液で3回洗浄した。捕捉されたビオチン化天然リガンドをExtrAvidin-HRPによって検出し、TMB基質によって発色させた。GraphPad Prism 6.0においてS字形用量反応モデルにフィットさせて、ペプチドの最大半量阻害濃度(half-maximal inhibitory concentration)(IC₅₀)を求めた(図5A)。結果を図5Bおよび以下の表2に示した。

10

【0116】

(表2)競合的結合ELISAに由来する5種類全てのペプチドの結合親和性および特異性

化合物ID	配列	SEQ ID NO:	IC ₅₀ (μ M)				
			$\alpha_v\beta_6$	$\alpha_v\beta_1$	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$	$\alpha_v\beta_8$
ST1-59	RGDLMKLAK(FB)	6	0.0027	0.9	2.2	> 100	2.59
ST1-60	RGDLADLRK(FB)	7	0.0047	0.6	0.5	> 100	0.16
ST1-61	RGDLRELAK(FB)	9	0.0011	2.3	0.3	> 100	2.6
ST1-62	VGDLTYLKK(FB)	2	0.011	> 100	> 1 mM	> 100	5.3
ST1-63	GIDLTSLTK(FB)	8	> 1 mM	-	-	-	-

20

【0117】

ST1-62ペプチドの細胞結合試験

細胞結合試験のために、固相上でペプチドST1-62を[¹⁸F]フルオロ安息香酸で放射標識した(図6A)。この実験には、DX3puro β_6 ($\alpha_v\beta_6$ 陽性)細胞株およびDX3puro($\alpha_v\beta_6$ 陰性)細胞株を使用した。放射標識ペプチドを4 μ Ci/mLでPBSに溶解して処方した。DX3puro β_6 細胞およびDX3puro細胞を75x10⁶細胞/mLで無血清培地に懸濁し、1種類の細胞株につきエッペンドルフ1個につき50 μ Lのアリコートにした(n=3)。50 μ Lの4 μ Ci/mL放射性トレーサーを各エッペンドルフチューブに添加し、細胞と60分間インキュベートした。上清および細胞ペレットの活性をガンマカウンターで測定し、放射性トレーサーのパーセント結合を(細胞ペレットの放射能)/(細胞ペレットおよび上清の全放射能)で表した。例示的な放射化学アッセイ結果を図6Bに示した。

30

【0118】

ST1-62ペプチドの血清安定性試験

ペプチド1(ST1-62)(SEQ ID NO:2)の血清安定性試験分析は、最初に、放射標識されたペプチド([¹⁸F]; 25 μ Ci)を市販のマウス血清と37℃で1時間インキュベートすることによって行った。このタンパク質を冷EtOHを用いて沈殿させることによって、放射性トレーサーを血清から取り出し、次いで、分析のためにHPLCに注入した。多くのNH₂-ペプチドについて予想されたように、このペプチドは、HPLCトレースに示されたように1時間以内にプロテアーゼによって切断された。血清安定性アッセイの結果を図7Aおよび図7Bに示した。

40

【0119】

ST1-62ペプチドの最適化

全ペプチドの選択性プロファイルに基づいて、logP、血清安定性、および細胞結合試験のために、[¹⁸F]フルオロ安息香酸による放射標識に向けて前進するようにST1-62ペプチドを選択した。LogP=-1.09 $\pm$ 0.02(図6B)。ペプチドの血清安定性を、マウス血清と37℃で

50

インキュベートして1時間後に求めた(図7A)。

【0120】

フローサイトメトリーを用いて、FAM-Xで標識されたペプチド(VGDLTYLKK-FAM-X; SEQ ID NO:15)

とDX3puro β_6 細胞およびDX3puro細胞との結合をアッセイした。図8Aおよび図8Bに示したように、ペプチドは、10 μ Mおよび100 μ Mのペプチド濃度では、 $\alpha_v\beta_6$ 陰性細胞よりも $\alpha_v\beta_6$ 陽性細胞との結合の方が強いことを示した。

【0121】

一連の修飾、例えば、N-アセチル化、N-メチル化、N-ペグ化、N-フルオロベンゾイル化(fluorobenzoylation)、ならびにC-ペグ化を行い、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリンに対する、これらのペプチドの結合親和性をELISAによって評価した。結果を表3にまとめた。

【0122】

(表3)ST1-62ペプチド最適化

配列	SEQ ID NO:	IC ₅₀ ($\alpha_v\beta_6$ インテグリン)、nM
Me-VGDLTYLKK(FB)	16	500
Ac-VGDLTYLKK(FB)	17	1,600
PEG ₁₂ -VGDLTYLKK(FB)	18	> 1,000
FB-VGDLTYLKK(Ac)	19	4.3
FB-VGDLTYLKK(FB)	20	21.9
Ac-VGDLTYLKK(FB)-PEG ₂₈	21	> 10,000
FB-VGDLTYLKK(Ac)-PEG ₂₈	22	15.5
FB-VGDLTYLKK(FB)-PEG ₂₈	3	17.6

【0123】

結論

蛍光細胞を用いて、OBOCライブラリーオンビーズスクリーニングアプローチが簡素化された。 $\alpha_v\beta_6$ 標的ペプチドの一段階スクリーニングおよび予備的な配列決定によって、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリンに対して強い親和性と高い選択性をもつペプチドが得られた。

【0124】

参考文献

1. Albino, A. P.; Lloyd, K. O.; Houghton, A. N.; Oettgen, H. F.; Old, L. J., Heterogeneity in surface antigen and glycoprotein expression of cell lines derived from different melanoma metastases of the same patient. Implications for the study of tumor antigens. *The Journal of experimental medicine* 1981, 154 (6), 1764-78.

2. Dalvi, N.; Thomas, G. J.; Marshall, J. F.; Morgan, M.; Bass, R.; Ellis, V.; Speight, P. M.; Whawell, S. A., Modulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor by the beta6 integrin subunit. *Biochemical and biophysical research communications* 2004, 317 (1), 92-9.

10

3. Bandyopadhyay A, Raghavan S. Defining the role of integrin alphavbeta6 in cancer. *Current drug targets*. 2009;10(7):645-52.

4. Lam et. al. A new type of synthetic library for identifying ligand-binding activity. *Nature*, 354 (7), 1991, 82-84.

20

5. Kraft et. al. Definition of an Unexpected Ligand Recognition Motif for avb6 Integrin. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 1979-1985.

6. Udugamasooriya D. G, Kodadek T. On-bead Two-Color (OBTC) Cell Screen for Direct Identification of Highly Selective Cell Surface Receptor Ligands. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 2012 (4), 35-48.

【 0 1 2 5 】

V. 例示的な態様

開示された本発明の内容に従って提供される例示的な態様は、添付の特許請求の範囲および以下の態様を含むが、これに限定されない。

30

【 0 1 2 6 】

1. (a) アミノ酸配列

VGDLTYLK (SEQ ID NO:1)

を含むペプチドと、

(b) 部分と

を含む、結合体。

2. 前記部分が前記ペプチドに共有結合的に結合されている、態様1の結合体。

3. 前記ペプチドの長さが約8～約20アミノ酸である、態様1または2の結合体。

4. 1つまたは複数のさらなるリジン残基をさらに含む、態様1～3のいずれか一つの結合体

40

。

5. 1つまたは複数のさらなるリジン残基が、前記ペプチドのC末端および/または1つもしくは複数の部分に結合されている、態様4の結合体。

6. アミノ酸配列

VGDLTYLKK (SEQ ID NO:10)

と、部分とを含む、態様4または5の結合体。

7. 前記ペプチドがインテグリンに結合する、態様1～6のいずれか一つの結合体。

8. インテグリンが $\alpha_v \beta_6$ インテグリンである、態様7の結合体。

9. 前記ペプチドが、インテグリン、およびインテグリンと同時発現している受容体に結合する、態様7または8の結合体。

50

10. インテグリンと同時発現している受容体がCXCR4である、態様9の結合体。
11. 前記部分が、ポリエチレングリコール(PEG)部分、フルオロベンゾイル(FB)基、メチル基、アセチル基、画像化剤、治療剤、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、態様1～10のいずれか一つの結合体。
12. PEG部分が約3,000ダルトン(Da)未満の分子量を有する、態様11の結合体。
13. PEG部分が、PEG₁₂(PEG 800)、PEG₂₈(PEG 1,500)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、態様11または12の結合体。
14. PEG部分が、規定の鎖長を有する単分散PEG部分である、態様11～13のいずれか一つの結合体。
15. 単分散PEG部分が約95%を超えるオリゴマー純度を有する、態様14の結合体。
16. 画像化剤が、FB基、放射性核種、ビオチン、フルオロフォア、蛍光タンパク質、抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、態様11～15のいずれか一つの結合体。
17. 放射性核種が、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、¹¹¹In、¹²⁴I、¹²⁵I、および¹³¹Iからなる群より選択される、態様16の結合体。
18. 放射性核種が¹⁸Fである、態様16または17の結合体。
19. 前記部分が、前記ペプチド、1つもしくは複数のさらなるリジン残基、および/または別の部分に結合されている、態様4～18のいずれか一つの結合体。

10

20. 結合体が配列

VGDLTYLKK(FB) (SEQ ID NO:2)

20

を含むように、1つのさらなるリジン残基が前記ペプチドのC末端に結合され、かつFB基がさらなるリジン残基の側鎖に結合されている、態様19の結合体。

21. 結合体が配列

FB-VGDLTYLKK(FB)-PEG₂₈ (SEQ ID NO:3)

を含むように、前記ペプチドのN末端に結合されたFB基と、C末端リジン残基に結合されたPEG₂₈部分とをさらに含む、態様20の結合体。

22. 配列

(VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:4)

を含み、

アミノ酸配列

VGDLTYLK (SEQ ID NO:1)

30

の二量体を含む、結合体であって、

PEG₁₂部分が二量体の各メンバーのC末端に結合され、両方のPEG₁₂部分が2つのさらなるリジン残基の最初のリジン残基に結合され、かつFB基が2つのさらなるリジン残基の2番目のリジン残基の側鎖に結合されている、態様19の結合体。

23. 結合体が配列

(FB-VGDLTYLK-PEG₁₂)₂KK(FB) (SEQ ID NO:5)

を含むように、FB基が二量体の各ペプチドのN末端に結合されている、態様22の結合体。

24. リジン残基に結合されたFB基が¹⁸Fで放射標識されている、態様20～23のいずれか一つの結合体。

40

25. 治療剤が、放射性核種、アポトーシス促進ペプチド、ナノ粒子、化学療法剤、ナノドロップレット、リポソーム薬物、サイトカイン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、態様11～24のいずれか一つの結合体。

26. 放射性核種が、⁹⁰Yおよび¹⁷⁷Luからなる群より選択される、態様25の結合体。

27. 放射性核種が、キレート剤を介して前記ペプチドまたはPEG部分に結合されている、態様25または26の結合体。

28. アポトーシス促進ペプチドが_D(KLAKLAK)₂を含む、態様25の結合体。

29. アポトーシス促進ペプチドが、グリシンリンカーを介して前記ペプチドまたはPEG部分に結合されている、態様25または28の結合体。

30. ナノ粒子が、化学療法剤が装填されたPEG^{5K}CA₈を含む、態様25の結合体。

50

31. 化学療法剤がパクリタキセル(PTX)である、態様25または30の結合体。
32. 前記ペプチドまたはPEG部分に共有結合的に結合されたアルブミン結合モチーフをさらに含む、態様1~31のいずれか一つの結合体。
33. アルブミン結合モチーフが4-(4-ヨードフェニル)酪酸である、態様32の結合体。
34. 態様1~33のいずれか一つの結合体または複数のその結合体を含む、組成物。
35. 規定の鎖長を有する単分散PEG部分が複数の結合体に存在する、態様34の組成物。
36. 複数の結合体が互いに連結されて多量体結合体を形成している、態様34または35の組成物。
37. 多量体結合体が複数の結合体の二量体または四量体である、態様36の組成物。
38. 薬学的担体または賦形剤をさらに含む、態様34~37のいずれか一つの組成物。 10
39. 態様1~33のいずれか一つの結合体または態様34~38のいずれか一つの組成物を含む、画像化または治療のためのキット。
40. 使用のための説明書をさらに含む、態様39のキット。
41. 1種類または複数種の試薬をさらに含む、態様39または40のキット。
42. 以下の工程を含む、対象において標的組織を画像化するための方法：
(a) 態様1~33のいずれか一つの結合体または態様34~38のいずれか一つの組成物を対象に投与する工程であって、結合体が画像化剤を含む、工程、および
(b) 結合体が対象のどこに集まっているのか決定するために、結合体を検出する工程。
43. 画像化剤が、前記ペプチド、FB基、またはPEG部分に共有結合的に結合されている、態様42の方法。 20
44. 標的組織が、癌組織または臓器である、態様42または43の方法。
45. 癌組織が、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、または口腔扁平上皮癌に関連する、態様44の方法。
46. 画像化剤が放射性核種である、態様42~45のいずれか一つの方法。
47. 放射性核種がFB基に共有結合的に結合されている、態様46の方法。
48. 結合体が対象のどこに集まっているのか決定するために、放射性核種からの放射線が用いられる、態様46または47の方法。
49. 結合体が、磁気共鳴画像法(MRI)、磁気共鳴分光法(MRS)、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)、ポジトロン放出断層撮影法(PET)、または光学画像化によって検出される、態様42~48のいずれか一つの方法。 30
50. 結合体が、インテグリンによって媒介される疾患または障害を診断または予後判定するために検出される、態様42~49のいずれか一つの方法。
51. 疾患または障害が、インテグリンの発現、過剰発現、または活性化に関連する、態様50の方法。
52. 疾患または障害が、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害である、態様50または51の方法。
53. 治療の有効量の態様1~33のいずれか一つの結合体または態様34~38のいずれか一つの組成物を対象に投与する工程であって、結合体が治療剤を含む、工程を含む、対象においてインテグリン媒介性の疾患または障害を予防または処置するための方法。 40
54. 治療剤が、前記ペプチドまたはPEG部分に共有結合的に結合されている、態様53の方法。
55. 疾患または障害が、インテグリンの発現、過剰発現、または活性化に関連する、態様53または54の方法。
56. 疾患または障害が、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、慢性線維症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺気腫、放射線誘発性肺線維症、および慢性創傷性皮膚疾患からなる群より選択される、態様53~55のいずれか一つの方法。
57. 疾患または障害が、 $\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害である、態様53~56のいずれか一つの方法。
58. $\alpha_v\beta_6$ インテグリン媒介性の疾患または障害が、膵臓癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺 50

癌、または口腔扁平上皮癌である、態様57の方法。

59. 結合体または組成物の治療的有効量が、治療剤の送達をインテグリン発現細胞に標的指向するために十分な量である、態様53～58のいずれか一つの方法。

【0127】

本明細書に記載の実施例および態様は例示目的にすぎず、本明細書に記載の実施例および態様を考慮して様々な修正または変更が当業者に示唆され、本願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲の中に含まれることが理解される。本明細書において引用された、刊行物、特許、特許出願、および配列アクセッション番号は全て、その全体が全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

【0128】

非公式の配列表

SEQ ID NO:	配列	説明
1	VGDLTYLK	コアペプチド配列
2	VGDLTYLKK(FB)	ST1-62/ペプチド 1
3	FB-VGDLTYLKK(FB)-PEG ₂₈	ST1-92
4	(VGDLTYLK-PEG ₁₂) ₂ -KK(FB)	ST1-96
5	(FB-VGDLTYLK-PEG ₁₂) ₂ -KK(FB)	ST1-96F
6	RGDLMKLAK(FB)	ST1-59/ペプチド 2
7	RGDLADLRK(FB)	ST1-60/ペプチド 3
8	GIDLTSLTK(FB)	ST1-63/ペプチド 4
9	RGDLRELAK(FB)	ST1-61/ペプチド 5
10	VGDLTYLKK	フルオロベンゾイル基のないペプチド1
11	RGDLMKLAK	フルオロベンゾイル基のないペプチド2
12	RGDLADLRK	フルオロベンゾイル基のないペプチド3
13	GIDLTSLTK	フルオロベンゾイル基のないペプチド4
14	RGDLRELAK	フルオロベンゾイル基のないペプチド5
15	VGDLTYLKK-FAM-X	蛍光標識ペプチド
16	Me-VGDLTYLKK(FB)	改変ST1-62ペプチド
17	Ac-VGDLTYLKK(FB)	改変ST1-62ペプチド
18	PEG12-VGDLTYLKK(FB)	改変ST1-62ペプチド
19	FB-VGDLTYLKK(Ac)	改変ST1-62ペプチド
20	FB-VGDLTYLKK(FB)	改変ST1-62ペプチド
21	Ac-VGDLTYLKK(FB)-PEG28	改変ST1-62ペプチド
22	FB-VGDLTYLKK(Ac)-PEG28	改変ST1-62ペプチド

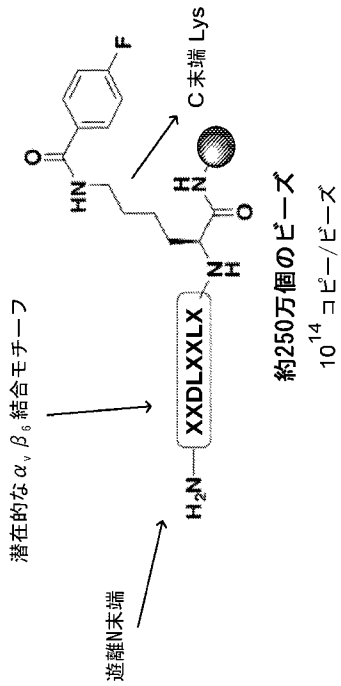
10

20

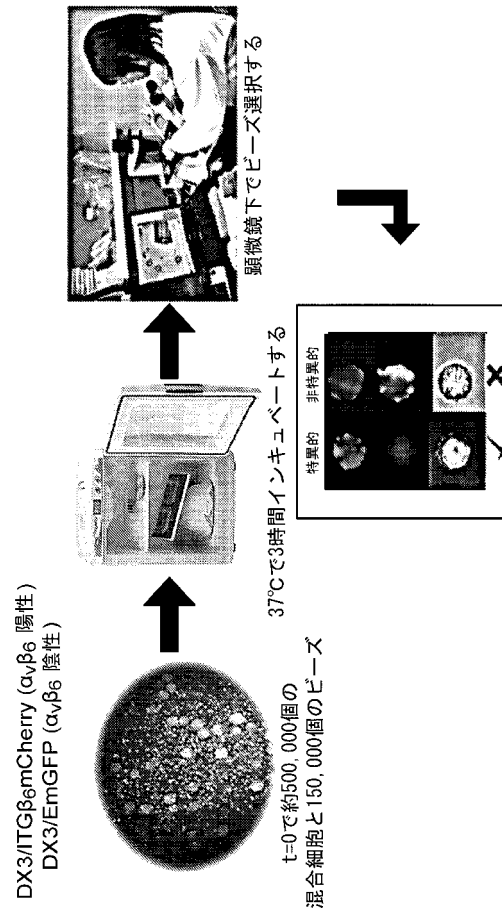
30

40

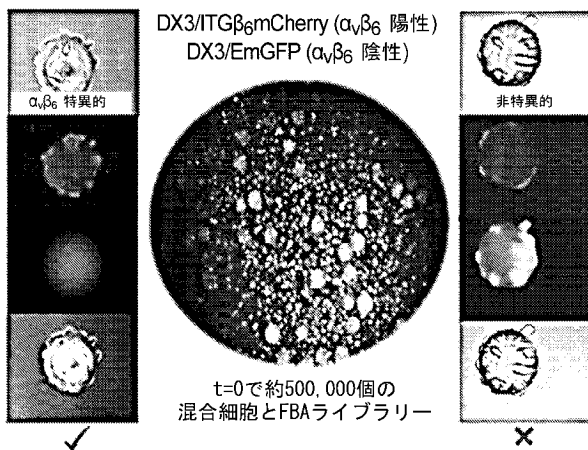
【図 1】



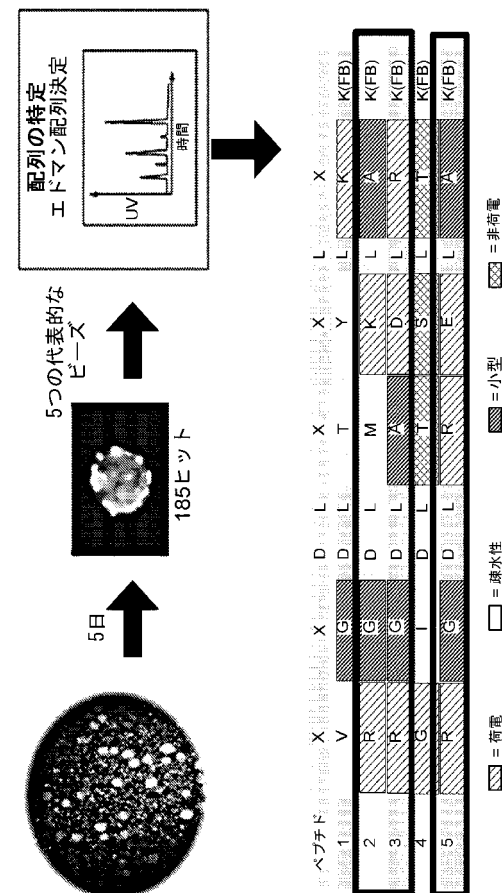
【図 2 A】



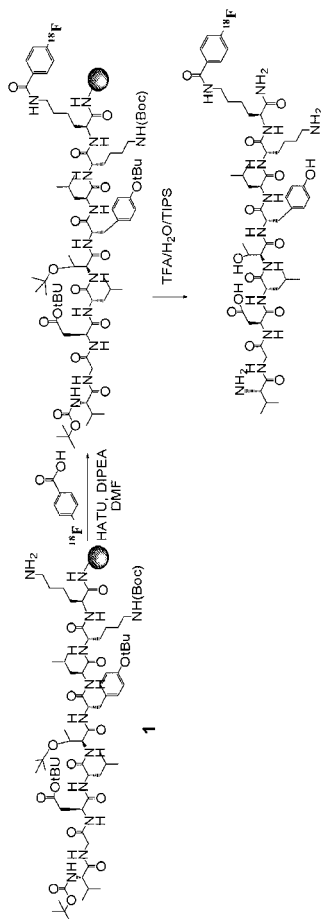
【図 2 B】



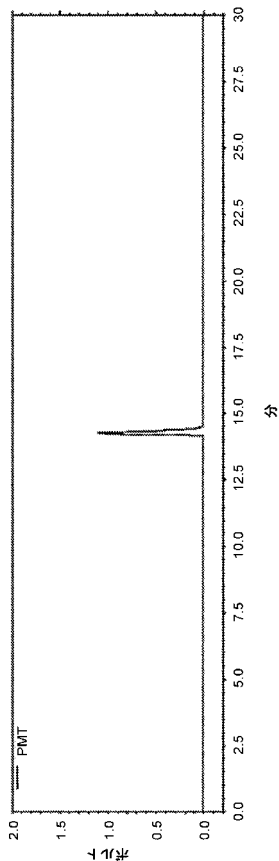
【図 3】



【図 6 A】



【図 6 B】

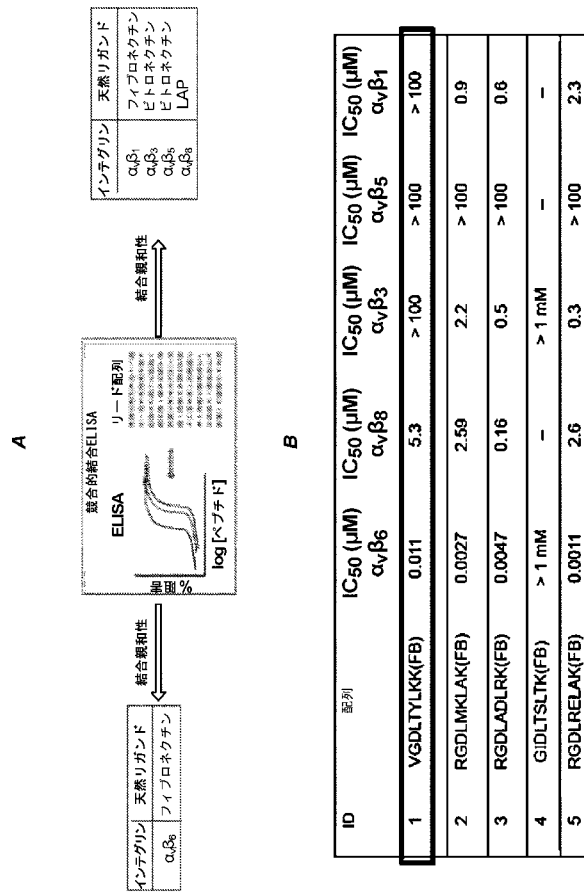


放射化学収率 = 12.2%
放射化学純度 > 99%
SA $\geq$ 0.76 Ci/ μ mol
LogP = -1.09

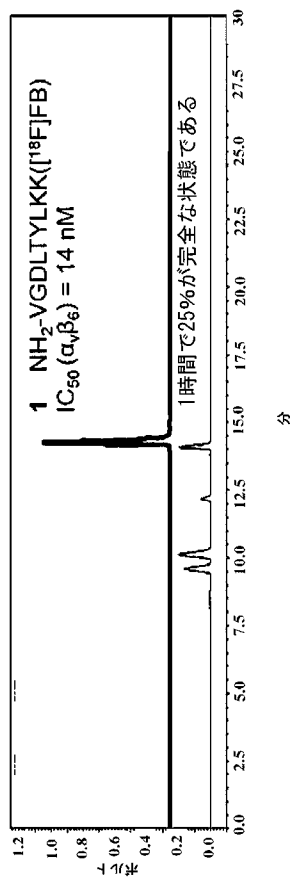
【図 4】

化合物	配列	DX3 β mCherry	DX3 EmGFP	混合細胞
1	VGDLTYLKK(FB)			
2	RGDLMKLAK(FB)			
3	RGDLADLRK(FB)			
4	GIDLTSLTK(FB)			
5	RGDLRELAK(FB)			

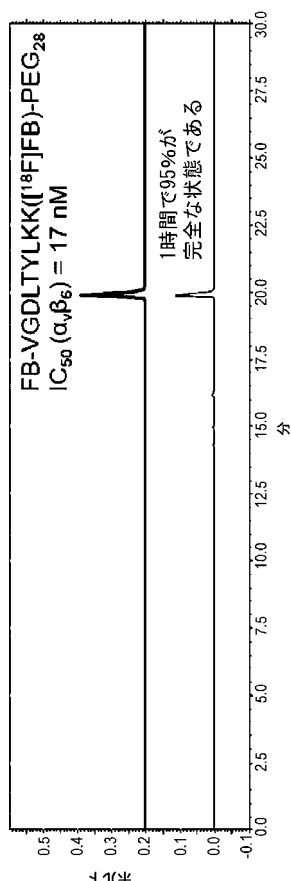
【図 5】



【図 7 A】

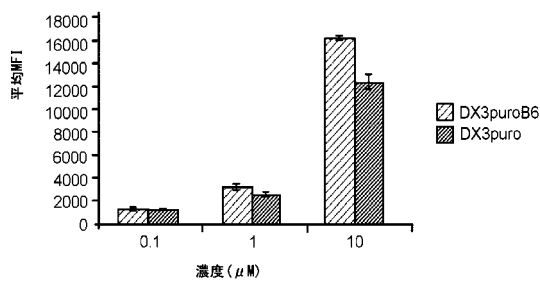


【図 7 B】



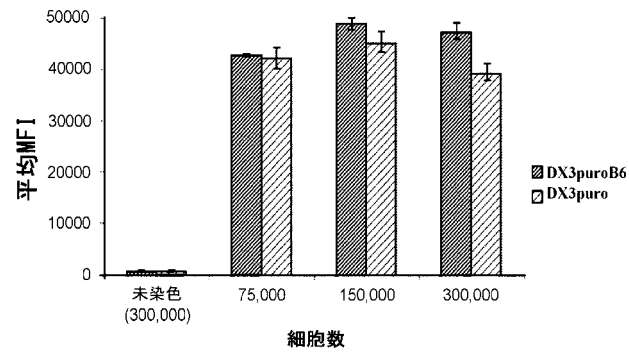
【図 8 A】

VGDLTYLKK (FAM) と DX3puro β 6細胞対DX3puro細胞



濃度	DX3puroβ6 (平均MFI)	DX3puro (平均MFI)
0.1	1406.666667	1379.666667
1	3340.333333	2677.666667
10	16549.33333	12683

【図 8 B】



細胞数	DX3puroβ6 (平均MFI ± SD)	DX3puro (平均MFI ± SD)
未染色 (バックグラウンド)	731 ± 22	715 ± 2
300,000個の細胞	42,813 ± 122	42,195 ± 2066
75,000	49,005 ± 1092	45,327 ± 1912
150,000	47,409 ± 1542	39,433 ± 1689
300,000		

【手続補正書】

【提出日】平成31年3月27日(2019.3.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2019524871000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/37303
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 7/06; A61K 47/60, 38/00 (2017.01) CPC - C07K 7/06, 1/077; A61K 46/60, 38/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/160770 A1 (The Regents of the University of California) 22 October 2015 (22.10.2015). Especially para [0008], [0020]	1-13
A	US 2007/0037262 A1 (Zelder et al.) 15 February 2007 (15.02.2007). Especially SEQ ID NO: 92	1-13
Y,P	Uniprot A0A1B3WS33. Uncharacterized Protein [online] 02 November 2016 [retrieved 09 October 2017]. Available on the internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/A0A1B3WS33.txt?version=1 >. Especially pg 1.	1-13
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 October 2017		Date of mailing of the international search report 21 NOV 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/37303

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
---Go to Extra Sheet for continuation---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-29, limited to the first named conjugate moiety, polyethylene glycol (PEG) (Claims 1-13)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/37303

Continuation of Box III: Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-29, drawn to a composition or kit comprising a peptide-moiety conjugate. The peptide and moiety conjugate will be searched to encompass the first named moiety, polyethylene glycol (PEG) (claim 9). It is believed that claims 1-13 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a peptide conjugated to a PEG moiety. Additional moieties will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional moieties. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: fluorobenzoyl (FB)(claims 1-9, 14, 18-21).

Group II: Claims 30-39, drawn to a method of imaging a target tissue in a subject.

Group III: Claims 40-48, drawn to a method of treating an integrin-mediated disease in a subject.

The inventions listed as Groups I+, II, III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I+ inventions have the special technical feature of a composition or kit comprising a peptide-moiety conjugate, not required by Groups II or III.

Groups II and III have the special technical feature of a method of administering a conjugate, not required by Group I+.

Group II has the special technical feature of a method involving administering a conjugate used for imaging a target within a subject, not required by Group III.

Group III has the special technical feature of a method of administering a therapeutic target conjugate to a subject, not required by Group II.

Among the inventions listed as Groups I+ is the specific conjugate moieties therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural or functional similarities can readily be ascertained among moieties. Each invention requires a specific conjugate, not required by any other inventions.

Common Technical Feature:

1. Groups I+, II, III share the common technical feature of claim 1.

2. Groups II and III share the common technical feature of administering a peptide conjugated to a moiety.

However, said common technical features do not represent a contribution over the prior art, and are anticipated by WO 2015/160770 A1 to The Regents of the University of California (hereinafter "Univ California").

As to common technical feature #1, Univ California teaches (claim 1), a conjugate comprising: (a) a peptide and (b) a moiety (para [0008]; "The present invention provides bi-terminal PEGylated peptide conjugates that target an integrin such as alpha(5)beta(6) integrin. In particular embodiments, the peptide conjugates of the present invention further comprise a biological agent such as an imaging agent or a therapeutic agent, e.g., covalently attached to one of the PEG moieties.).

As to common technical feature #2, Univ California teaches administering a peptide conjugated to a moiety (para [0123]; "Administration of the peptide conjugates of the present invention with a suitable pharmaceutical excipient as necessary can be carried out via any of the accepted modes of administration").

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I+, II, III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/435	(2006.01)	C 0 7 K	14/435	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/02		
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00		
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08		
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	41/00	(2006.01)	A 6 1 K	41/00		
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K	38/02		
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	38/19		
A 6 1 K	51/00	(2006.01)	A 6 1 K	51/00	2 0 0	
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00		
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/566		
G 0 1 N	33/534	(2006.01)	G 0 1 N	33/534		
G 0 1 N	33/532	(2006.01)	G 0 1 N	33/532	A	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A	
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08		

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, 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, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 タン ヤング

アメリカ合衆国 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0 カリフォルニア州 オークランド フランクリン ストリート 1 1 1 1 トゥエルフス フロア オフィス オブ テクノロジー トランスファー ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア内

(72)発明者 サトクリッフ ジュリー エル.

アメリカ合衆国 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0 カリフォルニア州 オークランド フランクリン ストリート 1 1 1 1 トゥエルフス フロア オフィス オブ テクノロジー トランスファー ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア内

F ターム(参考) 4B050 CC07 KK18 LL03

4B063 QA19 QQ02 QR48 QR56 QS36 QX07

4C076 AA95 CC04 CC07 CC15 CC16 CC17 CC19 CC27 CC50 EE23

EE41 EE59

4C084 AA02 AA03 AA12 AA17 BA03 DA01 NA13 ZA591 ZA592 ZA661

ZA662 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB261

ZB262

4C085 HH03 HH11 KA03 KA27 KA29 KA40 KB54 KB57 KB82 LL03

LL09 LL18

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA15 BA16 BA17 BA41 BA57 BA70

BA71 DA75 DA76 DA89 EA50 FA10 FA33 FA74

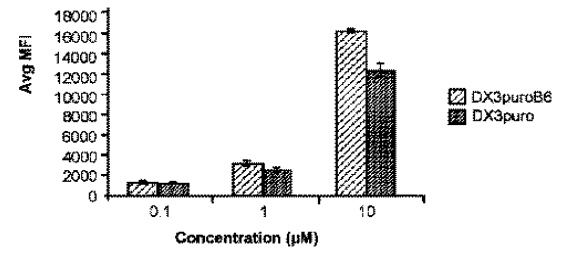
专利名称(译)	$\alpha(V)\beta(6)$ 整联蛋白结合肽及其使用方法		
公开(公告)号	JP2019524871A	公开(公告)日	2019-09-05
申请号	JP2019517203	申请日	2017-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
发明人	タン ヤング サトクリップ ジュリー エル.		
IPC分类号	A61K47/64 C12N9/04 C12N9/16 C07K16/00 C07K19/00 C07K14/435 A61K45/00 A61P1/02 A61P1/00 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 A61K41/00 A61K38/02 A61K38/19 A61K51/00 A61K49/00 G01N33/566 G01N33/534 G01N33/532 C12Q1/02 C07K7/06 C07K7/08		
CPC分类号	A61K47/60 A61K51/08 A61K51/088 A61P35/00 A61K38/1777 A61K47/62		
FI分类号	A61K47/64 C12N9/04.Z C12N9/16.B C07K16/00 C07K19/00 C07K14/435 A61K45/00 A61P1/02 A61P1/00 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.111 A61K41/00 A61K38/02 A61K38/19 A61K51/00.200 A61K49/00 G01N33/566 G01N33/534 G01N33/532.A C12Q1/02 C07K7/06.ZNA C07K7/08		
F-TERM分类号	4B050/CC07 4B050/KK18 4B050/LL03 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS36 4B063/QX07 4C076/AA95 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC15 4C076/CC16 4C076/CC17 4C076/CC19 4C076/CC27 4C076/CC50 4C076/EE23 4C076/EE41 4C076/EE59 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA12 4C084/AA17 4C084/BA03 4C084/DA01 4C084/NA13 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/KA03 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KA40 4C085/KB54 4C085/KB57 4C085/KB82 4C085/LL03 4C085/LL09 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/BA57 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA33 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/349615 2016-06-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了靶向整联蛋白的肽缀合物，例如 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白。在某些实施方案中，肽缀合物包含部分，例如PEG部分，显像剂或治疗剂。本发明的肽缀合物特别可用于使肿瘤，器官或组织成像。本文还提供了包含本发明的肽缀合物的组合物和试剂盒。

FIG. 8A

VGDLTYLKK(FAM) with DX3puro β 6 vs. DX3puro cells



Concentration	DX3puro β 6 (Avg MFI)	DX3puro (Avg MFI)
0.1	1406.666667	1379.666667
1	3340.333333	2677.666667
10	16549.333333	12683