

(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2006-514915

(P2006-514915A)

(43) 公表日 平成18年5月18日(2006.5.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/06 ZNA	4B024
<b>A61K 49/00 (2006.01)</b>	A61K 49/00	4B063
<b>A61P 31/12 (2006.01)</b>	A61P 31/12	4B065
<b>A61P 31/18 (2006.01)</b>	A61P 31/18	4C084
<b>A61P 33/06 (2006.01)</b>	A61P 33/06	4C085
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 206 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-572527 (P2003-572527)	(71) 出願人	502352519 ダイアックス、コープ DYAX CORP. アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケンブリッジ、テクノロジー、スクエア、300
(86) (22) 出願日	平成15年3月3日(2003.3.3)	(71) 出願人	593069934 ブラッコ インターナショナル ベスローテン フェンノートシャップ オランダ国1077ゼットイックス・アムステルダム、ストラウインスキーラーン3051番
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月1日(2004.11.1)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/006731		
(87) 国際公開番号	W02003/074005		
(87) 国際公開日	平成15年9月12日(2003.9.12)		
(31) 優先権主張番号	60/360, 851		
(32) 優先日	平成14年3月1日(2002.3.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/440, 411		
(32) 優先日	平成15年1月15日(2003.1.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 KDRおよびVEGF/KDR結合ペプチドならびに診断および治療におけるその使用

## (57) 【要約】

本発明は、KDRまたはVEGF/KDR複合体に対する結合ポリペプチドを提供する。それらは血管形成を治療、検出、単離または局在化することが好都合であるどのような場合でも多様な用途を有する。特に、KDRまたはVEGF/KDR複合体を高親和性（たとえば  $K_D < 1 \mu M$  を有する）で結合可能な、合成され、単離されたポリペプチドが開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下のアミノ酸配列の1つを含む、KDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する能力を有する単離されたポリペプチド：

コンセンサス配列I：Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - Cys (TN8)

ここで、

X<sub>2</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr (好ましくはAsp、Glu、またはTyr) であり；

10

X<sub>3</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal (好ましくはGlu、MetまたはTyr) であり；

X<sub>4</sub> はAla、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal (好ましくはAsp) であり；

X<sub>5</sub> はAla、Asp、Glu、Gly、Leu、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyr (好ましくはTrpまたはTyr) であり；

X<sub>6</sub> はArg、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Pro、Thr、Trp、TyrもしくはVal (好ましくはGlyまたはTyr) であり；そして

20

X<sub>7</sub> はAla、Arg、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Trp、もしくはTyr (好ましくはLysまたはTyr) である；または

コンセンサス配列II：Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> - Cys (TN12)、

ここで、

X<sub>2</sub> はArg、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal (好ましくはGlu、IleまたはTyr) であり；

X<sub>3</sub> はAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、Phe、Ser、Trp、もしくはTyr (好ましくはGlu、PheまたはTyr) であり；

30

X<sub>4</sub> はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal (好ましくはGlu) であり；

X<sub>5</sub> はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、TyrもしくはVal (好ましくはGlnまたはSer) であり；

X<sub>6</sub> はAsp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyr (好ましくはAsp) であり；

X<sub>7</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal (好ましくはLysまたはSer) であり；

40

X<sub>8</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Trp、Tyr、もしくはVal (好ましくはGlyまたはTyr) であり；

X<sub>9</sub> はAla、Arg、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal (好ましくはTrpまたはThr) であり；

X<sub>10</sub> はArg、Gln、Glu、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、もしくはVal (好ましくはGluまたはTrp) であり；そして

X<sub>11</sub> はArg、Asn、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal (好ましくはPhe) である；または

50

コンセンサス配列 III : Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - Gly - X<sub>6</sub> - Cys (TN7)

ここで、

X<sub>2</sub> は Asn、 Asp、 もしくは Glu であり；

X<sub>3</sub> は Glu、 His、 Lys、 もしくは Phe であり；

X<sub>4</sub> は Asp、 Gln、 Leu、 Lys、 Met もしくは Tyr であり；そして

X<sub>6</sub> は Arg、 Gln、 Leu、 Lys、 もしくは Val である；または

コンセンサス配列 IV : Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - Cys (TN9)、

ここで、

X<sub>2</sub> は Ala、 Asp、 Lys、 Ser、 Trp、 もしくは Val (好ましくは Lys) であり；

X<sub>3</sub> は Asn、 Glu、 Gly、 His、 もしくは Leu であり；

X<sub>4</sub> は Gln、 Glu、 Gly、 Met、 Lys、 Phe、 Tyr、 もしくは Val (好ましくは Met) であり；

X<sub>5</sub> は Ala、 Asn、 Asp、 Gly、 Leu、 Met、 Pro、 Ser、 もしくは Thr であり；

X<sub>6</sub> は His、 Pro、 もしくは Trp (好ましくは Pro または Trp) であり；

X<sub>7</sub> は Ala、 Gly、 His、 Leu、 Trp、 もしくは Tyr (好ましくは Trp) であり；そして

X<sub>8</sub> は Ala、 Asp、 Gln、 Leu、 Met、 Thr、 もしくは Trp である；または

コンセンサス配列 V : Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - Ser - Gly - Pro - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> - X<sub>12</sub> - Cys (MTN13 ; 配列番号 1)、

ここで、

X<sub>2</sub> は Asp、 Glu、 His、 もしくは Thr であり；

X<sub>3</sub> は Arg、 His、 Lys、 もしくは Phe であり；

X<sub>4</sub> は Gln、 Ile、 Lys、 Tyr、 もしくは Val であり；

X<sub>5</sub> は Gln、 Ile、 Leu、 Met、 もしくは Phe であり；

X<sub>9</sub> は Asn、 Asp、 Gly、 His、 もしくは Tyr であり；

X<sub>10</sub> は Gln、 Gly、 Ser、 もしくは Thr であり；

X<sub>11</sub> は Glu、 Lys、 Phe、 もしくは Ser であり；そして

X<sub>12</sub> は Glu、 Ile、 Ser、 もしくは Val である。

【請求項 2】

以下のアミノ酸配列の 1 つを含む、請求項 1 に記載のポリペプチド：

コンセンサス配列 VI : Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - Tyr - Cys (TN8)、

ここで、

X<sub>2</sub> は Ala、 Arg、 Glu、 Lys、 もしくは Ser (好ましくは Glu) であり；

X<sub>3</sub> は Ala、 Asp、 Gln、 Glu、 Thr もしくは Val (好ましくは Asp または Glu) であり；

X<sub>4</sub> は Asp もしくは Glu であり；

X<sub>5</sub> は Trp もしくは Tyr であり；そして

X<sub>6</sub> は Thr もしくは Tyr (好ましくは Tyr) である；または

コンセンサス配列 VII : Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - Gly - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - Cys (TN8)、

ここで、

X<sub>2</sub> は Asp、 Gln、 もしくは His であり；

X<sub>3</sub> は His もしくは Tyr (好ましくは Tyr) であり；

X<sub>4</sub> は His、 Ile、 もしくは Tyr であり；

10

20

30

40

50

$X_6$  は I l e、M e t、もしくは V a l であり；そして

$X_7$  は G l y もしくは T y r である；または

コンセンサス配列 V I I I : C y s -  $X_2$  -  $X_3$  -  $X_4$  -  $X_5$  - G l y -  $X_7$  - C y s ( T N 8 )、

ここで、

$X_2$  は A l a、A r g、A s n、A s p、H i s、P h e、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは T y r、T r p、または P h e ) であり；

$X_3$  は A l a、A s p、G l n、H i s、L y s、M e t、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり；

$X_4$  は A l a、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、P r o、S e r、T h r、もしくは V a l であり； 10

$X_5$  は A s p、P h e、S e r、T h r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは T h r、S e r、または A s p ) であり；そして

$X_7$  は A l a、A r g、G l n、H i s、I l e、L e u、L y s、M e t、P h e、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは A r g、または L y s ) である。

【請求項 3】

以下のアミノ酸配列の 1 つを含む、請求項 1 に記載のポリペプチド：

コンセンサス配列 I X : C y s -  $X_2$  -  $X_3$  -  $X_4$  -  $X_5$  - T r p - G l y - G l y -  $X_9$  -  $X_{10}$  - C y s ( 配列番号 3 ; T N 1 1、すなわち T N 1 2 ライブラリーの単離物に基づいた 1 1 量体 )、 20

ここで、

$X_2$  は A l a、P h e、もしくは T r p ( 好ましくは T r p もしくは P h e ) であり；

$X_3$  は G l u、もしくは L y s ( 好ましくは G l u ) であり；

$X_4$  は A s p、S e r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは A s p、T r p、もしくは T y r ) であり；

$X_5$  は P h e、P r o、もしくは S e r ( 好ましくは S e r ) であり；

$X_9$  は G l n もしくは G l u ( 好ましくは G l u ) であり；そして

$X_{10}$  は I l e、P h e もしくは V a l である；または

コンセンサス配列 X : C y s -  $X_2$  - G l u -  $X_4$  - S e r -  $X_6$  - S e r -  $X_8$  -  $X_9$  -  $X_{10}$  - P h e - C y s ( 配列番号 4 ; T N 1 2 )、 30

ここで、

$X_2$  は H i s もしくは T y r であり；

$X_4$  は L e u、H i s、もしくは T h r であり；

$X_6$  は A s p もしくは L e u ( 好ましくは A s p ) であり；

$X_8$  は G l y もしくは V a l ( 好ましくは V a l ) であり；

$X_9$  は T h r もしくは V a l ( 好ましくは T h r ) であり；そして

$X_{10}$  は A r g もしくは T r p ( 好ましくは A r g ) である；または

コンセンサス配列 X I : C y s -  $X_2$  -  $X_3$  -  $X_4$  -  $X_5$  -  $X_6$  -  $X_7$  - G l y -  $X_9$  - T r p -  $X_{11}$  - C y s ( T N 1 2 ; 配列番号 5 )、 40

ここで、

$X_2$  は G l u、M e t、もしくは T h r ( 好ましくは G l u ) であり；

$X_3$  は I l e、L e u、M e t、もしくは P h e ( 好ましくは M e t、L e u、P h e ) であり；

$X_4$  は A r g、A s p、G l u、M e t、T r p、もしくは V a l であり；

$X_5$  は A s n、G l n、G l y、S e r、もしくは V a l であり；

$X_6$  は G l u もしくは A s p であり；

$X_7$  は L y s、S e r、T h r、もしくは V a l ( 好ましくは L y s ) であり；

$X_9$  は A r g、G l n、L y s、もしくは T r p ( 好ましくは T r p、A r g、または L y s ) であり；そして

$X_{11}$  は A s n、L e u、P h e、もしくは T y r ( 好ましくは T y r、P h e、または 50

A s n ) である ; または

コンセンサス配列 X I I : C y s - X <sub>2</sub> - X <sub>3</sub> - X <sub>4</sub> - X <sub>5</sub> - X <sub>6</sub> - X <sub>7</sub> - X <sub>8</sub> - X <sub>9</sub>  
- X <sub>10</sub> - X <sub>11</sub> - C y s ( T N 1 2 ) 、

ここで、

X <sub>2</sub> は G l u もしくは G l y であり ;

X <sub>3</sub> は T r p もしくは T y r であり ;

X <sub>4</sub> は S e r もしくは T h r であり ;

X <sub>5</sub> は A s n もしくは G l n であり ;

X <sub>6</sub> は G l y もしくは M e t であり ;

X <sub>7</sub> は P h e もしくは T y r であり ;

X <sub>8</sub> は A s p もしくは G l n であり ;

X <sub>9</sub> は L y s もしくは T y r であり ;

X <sub>10</sub> は G l u もしくは T h r であり ; そして

X <sub>11</sub> は G l u もしくは P h e である。

10

【請求項 4】

以下のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド :

C y s - X <sub>2</sub> - X <sub>3</sub> - X <sub>4</sub> - G l y - X <sub>6</sub> - C y s ( T N 7 ) 、

ここで、

X <sub>2</sub> は A s n 、 A s p 、 または G l u であり ;

X <sub>3</sub> は G l u 、 H i s 、 L y s 、 または P h e であり ;

X <sub>4</sub> は A s p 、 G l n 、 L e u 、 L y s 、 M e t 、 または T y r であり ; そして

X <sub>6</sub> は A r g 、 G l n 、 L e u 、 L y s 、 または V a l である。

20

【請求項 5】

以下のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド :

C y s - X <sub>2</sub> - X <sub>3</sub> - X <sub>4</sub> - X <sub>5</sub> - X <sub>6</sub> - X <sub>7</sub> - X <sub>8</sub> - C y s ( T N 9 ) 、

ここで、

X <sub>2</sub> は A l a 、 L y s 、 S e r 、 T r p 、 または V a l ( 好ましくは L y s ) であり ;

X <sub>3</sub> は A s n 、 G l u 、 G l y 、 H i s 、 または L e u であり ;

X <sub>4</sub> は G l u 、 G l y 、 L y s 、 M e t 、 または T y r ( 好ましくは M e t ) であり ;

X <sub>5</sub> は A l a 、 A s n 、 A s p 、 L e u 、 M e t 、 P r o 、 または S e r であり ;

X <sub>6</sub> は H i s 、 P r o 、 または T r p ( 好ましくは P r o ) であり ;

X <sub>7</sub> は H i s 、 L e u 、 T r p または T y r ( 好ましくは T r p または H i s ) であり ;

そして

X <sub>8</sub> は A l a 、 A s p 、 G l n 、 L e u 、 M e t 、 T h r 、 または T r p である。

30

【請求項 6】

以下のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド :

C y s - X <sub>2</sub> - X <sub>3</sub> - X <sub>4</sub> - X <sub>5</sub> - S e r - G l y - P r o - X <sub>9</sub> - X <sub>10</sub> - X <sub>11</sub> -  
X <sub>12</sub> - C y s ( 配列番号 1 ; M T N 1 3 ) 、

ここで、

X <sub>2</sub> は A s p 、 G l u 、 H i s 、 または T h r であり ;

X <sub>3</sub> は A r g 、 H i s 、 L y s 、 または P h e であり ;

X <sub>4</sub> は G l n 、 I l e 、 L y s 、 T y r 、 または V a l であり ;

X <sub>5</sub> は G l n 、 I l e 、 L e u 、 M e t 、 または P h e であり ;

X <sub>9</sub> は A s n 、 A s p 、 G l y 、 H i s 、 または T y r であり ;

X <sub>10</sub> は G l n 、 G l y 、 S e r 、 または T h r であり ;

X <sub>11</sub> は G l u 、 L y s 、 P h e 、 または S e r であり ; そして

X <sub>12</sub> は G l u 、 I l e 、 S e r 、 または V a l である。

40

【請求項 7】

以下のアミノ酸配列の 1 つを含む、K D R または V E G F / K D R 複合体に結合する能力を有する単離されたポリペプチド :

50

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - \text{Cys} - X_{12}$   
 $- X_{13} - X_{14}$  (TN8)、

ここで、

$X_1$  は Ala、Arg、Asp、Gly、His、Leu、Lys、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val であり；

$X_2$  は Asn、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val であり；

$X_3$  は Asn、Asp、Gln、Glu、Ile、Leu、Met、Thr、Trp、もしくは Val であり；

$X_5$  は Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくは Tyr であり； 10

$X_6$  は Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val であり；

$X_7$  は Ala、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val であり；

$X_8$  は Ala、Asp、Glu、Gly、Leu、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくは Tyr であり；

$X_9$  は Arg、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val であり； 20

$X_{10}$  は Ala、Arg、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Trp、もしくは Tyr であり；

$X_{12}$  は Arg、Asp、Cys、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val であり；

$X_{13}$  は Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、もしくは Tyr であり；そして

$X_{14}$  は Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくは Tyr である；または

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12}$   
 $- X_{13} - X_{14} - \text{Cys} - X_{16} - X_{17} - X_{18}$  (TN12)、 30

ここで、

$X_1$  は Ala、Asn、Asp、Gly、Leu、Pro、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Asn、Asp、Pro、または Tyr) であり；

$X_2$  は Ala、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Asp、Gly、Pro、Ser、または Trp) であり；

$X_3$  は Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Trp) であり；

$X_5$  は Arg、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Glu、Ile、または Tyr) であり； 40

$X_6$  は Ala、Arg、Asn、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、Phe、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Glu、Phe、又は Tyr) であり；

$X_7$  は Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Glu) であり；

$X_8$  は Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Gln または Ser) であり；

$X_9$  は Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Met、Phe、P 50

ro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsp）であり；  
 X<sub>10</sub>はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはLysまたはSer）であり；  
 X<sub>11</sub>はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlyまたはTyr）であり；  
 X<sub>12</sub>はAla、Arg、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはTrpまたはThr）であり；  
 X<sub>13</sub>はArg、Gln、Glu、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、もしくはVal（好ましくはGluまたはTrp）であり； 10  
 X<sub>14</sub>はArg、Asn、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはPhe）であり；  
 X<sub>16</sub>はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはAsp）であり；  
 X<sub>17</sub>はArg、Asn、Asp、Cys、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはProまたはTyr）であり；  
 X<sub>18</sub>はAla、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsn、ProまたはTrp）である；または  
 X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - Gly - X<sub>9</sub> - Cys - X<sub>11</sub> - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> (TN7)、 20  
 ここで、  
 X<sub>1</sub>はGlyもしくはTrpであり；  
 X<sub>2</sub>はIle、Tyr、もしくはValであり；  
 X<sub>3</sub>はGln、Glu、Thr、もしくはTrpであり；  
 X<sub>5</sub>はAsn、Asp、もしくはGluであり；  
 X<sub>6</sub>はGlu、His、Lys、もしくはPheであり；  
 X<sub>7</sub>はAsp、Gln、Leu、Lys、Met、もしくはTyrであり；  
 X<sub>9</sub>はArg、Gln、Leu、Lys、もしくはValであり；  
 X<sub>11</sub>はArg、Phe、Ser、Trp、もしくはValであり； 30  
 X<sub>12</sub>はGlu、His、もしくはSerであり；そして  
 X<sub>13</sub>はGlu、Gly、Trp、もしくはTyrである；または  
 X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> - Cys - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - X<sub>15</sub> (TN9)、  
 ここで、  
 X<sub>1</sub>はArg、Asp、Gly、Ile、Met、Pro、もしくはTyr（好ましくはTyr）であり；  
 X<sub>2</sub>はAsp、Gly、His、ProもしくはTrp（好ましくはGlyまたはTrp）であり；  
 X<sub>3</sub>はGly、Pro、Phe、Thr、もしくはTrp（好ましくはPro）であり； 40  
 X<sub>5</sub>はAla、Asp、Lys、Ser、Trp、もしくはVal（好ましくはLys）であり；  
 X<sub>6</sub>はAsn、Glu、Gly、His、もしくはLeuであり；  
 X<sub>7</sub>はGln、Glu、Gly、Met、Lys、Phe、Tyr、もしくはVal（好ましくは好ましくはMet）であり；  
 X<sub>8</sub>はAla、Asn、Asp、Gly、Leu、Met、Pro、Ser、もしくはThrであり；  
 X<sub>9</sub>はHis、Pro、もしくはTrp（好ましくはPro）であり；  
 X<sub>10</sub>はAla、Gly、His、Leu、Trp、もしくはTyr（好ましくはHisまたはTrp）であり；

X<sub>11</sub> は Ala、Asp、Gln、Leu、Met、Thr、もしくは Trp であり；  
 X<sub>13</sub> は Ala、Lys、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Trp) であり；

X<sub>14</sub> は Asp、Gly、Leu、His、Met、Thr、Trp、もしくは Tyr (好ましくは His、Trp、または Tyr) であり；そして

X<sub>15</sub> は Asn、Gln、Glu、Leu、Met、Pro、もしくは Trp (好ましくは Glu、Met、または Trp) である；または

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - Ser - Gly - Pro - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - X<sub>15</sub> - Cys - X<sub>17</sub> - X<sub>18</sub> - X<sub>19</sub> (配列番号 1；MTN 13)、

10

ここで、

X<sub>1</sub> は Arg、Glu、His、Ser、もしくは Trp であり；

X<sub>2</sub> は Asn、Asp、Leu、Phe、Thr、もしくは Val であり；

X<sub>3</sub> は Arg、Asp、Glu、His、Lys、もしくは Thr であり；

X<sub>5</sub> は Asp、Glu、His、もしくは Thr であり；

X<sub>6</sub> は Arg、His、Lys、もしくは Phe であり

X<sub>7</sub> は Gln、Ile、Lys、Tyr、もしくは Val であり；

X<sub>8</sub> は Gln、Ile、Leu、Met、もしくは Phe であり；

X<sub>12</sub> は Asn、Asp、Gly、His、もしくは Tyr であり；

X<sub>13</sub> は Gln、Gly、Ser、もしくは Thr であり；

20

X<sub>14</sub> は Glu、Lys、Phe、もしくは Ser であり；

X<sub>15</sub> は Glu、Ile、Ser、もしくは Val であり；

X<sub>17</sub> は Glu、Gly、Lys、Phe、Ser、もしくは Val であり；

X<sub>18</sub> は Arg、Asn、Ser、もしくは Tyr であり；そして

X<sub>19</sub> は Asp、Gln、Glu、Gly、Met、もしくは Tyr である。

【請求項 8】

以下のアミノ酸配列の 1 つを含む、請求項 7 に記載のポリペプチド：

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - Tyr - Cys - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub>、

ここで、

30

X<sub>1</sub> は Ala、Arg、Asp、Leu、Lys、Pro、Ser、もしくは Val であり；

X<sub>2</sub> は Asn、Asp、Glu、Lys、Thr、もしくは Ser (好ましくは Asn、Asp、Glu、または Lys) であり；

X<sub>3</sub> は Ile、Leu、Trp であり；

X<sub>5</sub> は Ala、Arg、Glu、Lys、もしくは Ser (好ましくは Glu) であり；

X<sub>6</sub> は Ala、Asp、Gln、Glu、Thr、もしくは Val (好ましくは Asp、または Glu) であり；

X<sub>7</sub> は Asp もしくは Glu であり；

X<sub>8</sub> は Trp もしくは Tyr であり；

40

X<sub>9</sub> は Thr もしくは Tyr (好ましくは Tyr) であり；

X<sub>12</sub> は Glu、Met、Phe、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Trp、Phe、Met、または Tyr) であり；

X<sub>13</sub> は Ile、Leu、もしくは Met であり；そして

X<sub>14</sub> は Ile、Leu、Met、Phe、もしくは Thr (好ましくは Thr または Leu) である；または

Trp - Tyr - Trp - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - Gly - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - Cys - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub>、

ここで、

X<sub>5</sub> は Asp、Gln、もしくは His であり；

50

X<sub>6</sub> は His もしくは Tyr (好ましくは Tyr) であり;

X<sub>7</sub> は Ile、His、もしくは Tyr であり;

X<sub>9</sub> は Ile、Met、もしくは Val であり;

X<sub>10</sub> は Gly もしくは Tyr であり;

X<sub>12</sub> は Asp、Lys、もしくは Pro であり;

X<sub>13</sub> は Gln、Gly、もしくは Trp であり;そして

X<sub>14</sub> は Phe、Ser、もしくは Thr である;または

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - Gly - X<sub>10</sub> - Cys - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub>、

ここで、

X<sub>1</sub> は Gly、Leu、His、Thr、Trp、Tyr、(好ましくは Trp、Tyr、Leu、His) であり;

X<sub>2</sub> は Ile、Leu、Thr、Trp、もしくは Val (好ましくは Val、Ile、または Leu) であり;

X<sub>3</sub> は Asp、Glu、Gln、Trp、もしくは Thr (好ましくは Glu、Asp または Gln) であり;

X<sub>5</sub> は Ala、Arg、Asn、Asp、His、Phe、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Tyr、Trp または Phe) であり;

X<sub>6</sub> は Ala、Asp、Gln、His、Lys、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val であり;

X<sub>7</sub> は Ala、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、もしくは Val であり;

X<sub>8</sub> は Asp、Phe、Ser、Thr、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Thr、Ser または Asp) であり;

X<sub>10</sub> は Ala、Arg、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Arg または Lys) であり;

X<sub>12</sub> は Arg、Gln、His、Ile、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Tyr、Trp、Phe、Ile、または Val) であり;

X<sub>13</sub> は Arg、Asn、Asp、Glu、His、Met、Pro、Ser、もしくは Thr であり;そして

X<sub>14</sub> は Arg、Gln、Glu、Gly、Phe、Ser、Trp、もしくは Tyr である。

#### 【請求項9】

以下のアミノ酸配列の1つを含む、請求項7に記載のポリペプチド:

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - Trp - Gly - Gly - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - Cys - X<sub>15</sub> - X<sub>16</sub> - X<sub>17</sub> (配列番号3)、

ここで、

X<sub>1</sub> は Ser、Phe、Trp、Tyr、もしくは Gly (好ましくは Ser) であり;

X<sub>2</sub> は Arg、Gly、Ser、もしくは Trp (好ましくは Arg) であり;

X<sub>3</sub> は Ala、Glu、Ile、もしくは Val (好ましくは Val または Ile) であり;

X<sub>5</sub> は Ala、Phe、もしくは Trp (好ましくは Trp または Phe) であり;

X<sub>6</sub> は Glu もしくは Lys (好ましくは Glu) であり;

X<sub>7</sub> は Asp、Ser、Trp、もしくは (好ましくは Asp、Trp、または Tyr) であり;

X<sub>8</sub> は Phe、Pro、もしくは Ser (好ましくは Ser) であり;

X<sub>12</sub> は Gln もしくは Glu (好ましくは Glu) であり;

X<sub>13</sub> は Ile、Phe、もしくは Val であり;

10

20

30

40

50

$X_{15}$  はGln、Ile、Leu、Phe、もしくは(好ましくはPhe、Tyr、またはLeu)であり；

$X_{16}$  はArg、Gly、もしくはPro(好ましくはArg)であり；そして

$X_{17}$  はGln、His、Phe、Ser、Tyr、もしくはVal(好ましくはTyr、Phe、His、またはVal)である；または

Tyr - Pro -  $X_3$  - Cys -  $X_5$  - Glu -  $X_7$  - Ser -  $X_9$  - Ser -  $X_{11}$  -  $X_{12}$  -  $X_{13}$  - Phe - Cys -  $X_{16}$  -  $X_{17}$  -  $X_{18}$  (配列番号4；TN12)、  
ここで、

$X_3$  はGlyもしくはTrp(好ましくはTrp)であり；

$X_5$  はHisもしくはTyr(好ましくはHis、またはTyr)であり；

10

$X_7$  はHis、Leu、もしくはThrであり；

$X_9$  はAspもしくはLeu(好ましくはAsp)であり；

$X_{11}$  はGlyもしくはVal(好ましくはVal)であり；

$X_{12}$  はThrもしくはVal(好ましくはThr)であり；

$X_{13}$  はArgもしくはTrp(好ましくはArg)であり；

$X_{16}$  はAlaもしくはVal(好ましくはVal)であり；

$X_{17}$  はAspもしくはPro(好ましくはPro)であり；そして

$X_{18}$  はGlyもしくはTrp(好ましくはTrp)であり、

ここで、ポリペプチドはKDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する；または

$X_1$  -  $X_2$  -  $X_3$  - Cys -  $X_5$  -  $X_6$  -  $X_7$  -  $X_8$  -  $X_9$  -  $X_{10}$  - Gly -  $X_{12}$  - Trp -  $X_{14}$  - Cys -  $X_{16}$  -  $X_{17}$  -  $X_{18}$  (配列番号5；TN12)、

20

ここで、

$X_1$  はAsp、Gly、Pro、もしくはSer(好ましくはAsp)であり；

$X_2$  はArg、Asn、Asp、Gly、もしくはSer(好ましくはAsp、Asn、またはSer)であり；

$X_3$  はGly、Thr、Trp、もしくはTyr(好ましくはTrpまたはTyr)であり；

$X_5$  はGlu、Met、もしくはThr(好ましくはGlu)であり；

$X_6$  はIle、Leu、Met、もしくはPhe(好ましくはMet、Leu、またはPhe)であり；

30

$X_7$  はArg、Asp、Glu、Met、Trp、もしくはValであり；

$X_8$  はAsn、Gln、Gly、Ser、もしくはValであり；

$X_9$  はAsp、もしくはGluであり；

$X_{10}$  はLys、Ser、Thr、もしくはVal(好ましくはLys)であり；

$X_{12}$  はArg、Gln、Lys、もしくはTrp(好ましくはTrp、Arg、またはLys)であり；

$X_{14}$  はAsn、Leu、Phe、もしくはTyr(好ましくはTyr、PheまたはAsn)であり；

$X_{16}$  はGly、Phe、Ser、もしくはTyr(好ましくはTyr、またはPhe)であり；

40

$X_{17}$  はGly、Leu、Pro、もしくはSer(好ましくはProまたはSer)であり；そして

$X_{18}$  はAla、Asp、Pro、Ser、Trp、もしくはTyrである；または

Asn - Trp -  $X_3$  - Cys -  $X_5$  -  $X_6$  -  $X_7$  -  $X_8$  -  $X_9$  -  $X_{10}$  -  $X_{11}$  -  $X_{12}$  -  $X_{13}$  -  $X_{14}$  - Cys -  $X_{16}$  -  $X_{17}$  -  $X_{18}$  (配列番号6；TN12)、

ここで、

$X_3$  はGluもしくはLysであり；

$X_5$  はGluもしくはGlyであり；

$X_6$  はTrpもしくはTyrであり；

$X_7$  はSerもしくはThrであり；

50

$X_8$  は  $Asn$  もしくは  $Gln$  であり ;  
 $X_9$  は  $Gly$  もしくは  $Met$  であり ;  
 $X_{10}$  は  $Phe$  もしくは  $Tyr$  であり ;  
 $X_{11}$  は  $Asp$  もしくは  $Gln$  であり ;  
 $X_{12}$  は  $Lys$  もしくは  $Tyr$  であり ;  
 $X_{13}$  は  $Glu$  もしくは  $Thr$  であり ;  
 $X_{14}$  は  $Glu$  もしくは  $Phe$  であり ;  
 $X_{16}$  は  $Ala$  もしくは  $Val$  であり ;  
 $X_{17}$  は  $Arg$  もしくは  $Tyr$  であり ; そして  
 $X_{18}$  は  $Leu$  もしくは  $Pro$  である。

10

## 【請求項10】

以下のアミノ酸配列の1つを含む、KDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する能力を有する単離されたポリペプチド：

$Z_1 - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - Z_2$  (Lin 20) ;

ここで、

$Z_1$  は少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであるか、もしくは存在せず ;

$X_1$  は  $Ala$ 、 $Asp$ 、 $Gln$ 、もしくは  $Glu$  (好ましくは  $Gln$  または  $Glu$ ) であり ;

$X_2$  は  $Ala$ 、 $Asp$ 、 $Gln$ 、 $Glu$ 、 $Pro$  (好ましくは  $Asp$ 、 $Glu$ 、または  $Gln$ ) であり ;

20

$X_3$  は  $Ala$ 、 $Leu$ 、 $Lys$ 、 $Phe$ 、 $Pro$ 、 $Trp$ 、もしくは  $Tyr$  (好ましくは  $Trp$ 、 $Tyr$ 、 $Phe$ 、または  $Leu$ ) であり ;

$X_4$  は  $Asp$ 、 $Leu$ 、 $Ser$ 、 $Trp$ 、 $Tyr$ 、もしくは  $Val$  (好ましくは  $Tyr$ 、 $Trp$ 、 $Leu$ 、または  $Val$ ) であり ;

$X_5$  は  $Ala$ 、 $Arg$ 、 $Asp$ 、 $Glu$ 、 $Gly$ 、 $Leu$ 、 $Trp$ 、もしくは  $Tyr$  (好ましくは  $Trp$ 、 $Tyr$  または  $Leu$ ) であり ; そして

$Z_2$  は少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない ; または

$X_1 - X_2 - X_3 - Tyr - Trp - Glu - X_7 - X_8 - X_9 - Leu$  (Lin 20 ; 配列番号7) ;

ここで、配列 (配列番号7 ; Lin 20) は場合によりN末端ポリペプチド、C末端ポリペプチド、または両末端において少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドを有することができる ;

30

ここで、

$X_1$  は  $Asp$ 、 $Gly$ 、もしくは  $Ser$  (好ましくは  $Gly$ ) であり ;

$X_2$  は  $Ile$ 、 $Phe$ 、もしくは  $Tyr$  であり ;

$X_3$  は  $Ala$ 、 $Ser$ 、もしくは  $Val$  であり ;

$X_7$  は  $Gln$ 、 $Glu$ 、 $Ile$ 、もしくは  $Val$  であり ;

$X_8$  は  $Ala$ 、 $Ile$ 、もしくは  $Val$  (好ましくは  $Ile$  または  $Val$ ) であり ;

$X_9$  は  $Ala$ 、 $Glu$ 、 $Val$ 、もしくは  $Thr$  である ; そして

## 【請求項11】

40

配列番号20~86、87~136、187~192、193~203、および207~259から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項7に記載のポリペプチド。

## 【請求項12】

配列番号137~186から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項10に記載のポリペプチド。

## 【請求項13】

1以上のアミノ酸のN末端および/またはC末端フランキングペプチドをさらに含む、請求項1のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項14】

50

アミノ酸置換、およびアミド結合置換、D-アミノ酸置換、グリコシル化アミノ酸、ジスルフィド様置換、アミノ酸転位、レトロインベルソペプチド、ペプチド、レトロインベルソペプチド、ならびに合成ペプチドから成る群より選択される改変を含む、請求項1のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項15】

検出可能な標識または治療薬に結合し、場合によりポリペプチドと検出可能な標識または治療薬との間にリンカーまたはスペーサーをさらに含む、請求項1のいずれか1つに記載のポリペプチド。

【請求項16】

検出可能な標識または治療薬が：酵素、蛍光化合物、リポソーム、光学色素、常磁性金属イオン、超音波造影剤および放射性核種から成る群より選択される、請求項15に記載のポリペプチド。

10

【請求項17】

治療薬または検出可能な標識が放射性核種を含む、請求項16に記載のポリペプチド。

【請求項18】

放射性核種が： $^{18}\text{F}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{167}\text{Tm}$ 、 $^{141}\text{Ce}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{168}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{88}\text{Y}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{165}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{203}\text{Pb}$ 、 $^{211}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{214}\text{Bi}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{198}\text{Au}$ および $^{199}\text{Au}$ から成る群より選択される、請求項17に記載のポリペプチド。

20

【請求項19】

治療薬または検出可能な標識がキレート剤をさらに含む、請求項18に記載のポリペプチド。

【請求項20】

キレート剤が式20、21、22、23a、23b、24a、24b、および25から成る群より選択される化合物を含む、請求項19に記載のポリペプチド。

【請求項21】

放射性核種が $^{99\text{m}}\text{Tc}$ または $^{111}\text{In}$ である、請求項19に記載のポリペプチド。

30

【請求項22】

放射性核種が $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ および $^{166}\text{Ho}$ から成る群より選択される、請求項19に記載のポリペプチド。

【請求項23】

検出可能な標識が超音波造影剤を含む、請求項16に記載のポリペプチド。

【請求項24】

超音波造影剤がリン脂質安定化マイクロバブルであるか、または気体を含む超音波造影剤を含む、請求項23に記載のポリペプチド。

【請求項25】

超音波造影剤がフッ素化ガスを含む、請求項23または24に記載のポリペプチド。

40

【請求項26】

検出可能な標識が常磁性金属イオンおよびキレート剤を含む、請求項16に記載のポリペプチド。

【請求項27】

治療薬が：生理活性物質、細胞毒性物質、薬物、化学療法剤または放射線療法剤から成る群より選択される、請求項15に記載のポリペプチド。

【請求項28】

KDRまたはVEGF/KDR複合体に対する見かけの $K_D$ が $10\mu\text{M}$ 未満である、請求項1または7に記載のポリペプチド。

50

## 【請求項 29】

KDRまたはVEGF/KDR複合体に対する見かけの $K_D$ が $1.0 \mu M$ 未満である、請求項1または7に記載のポリペプチド。

## 【請求項 30】

KDRまたはVEGF/KDR複合体に対する見かけの $K_D$ が $0.1 \mu M$ 未満である、請求項1または7に記載のポリペプチド。

## 【請求項 31】

KDRまたはVEGF/KDR複合体に対する見かけの $K_D$ が $0.05 \mu M$ 未満である、請求項1または7に記載のポリペプチド。

## 【請求項 32】

KDRまたはVEGF/KDR複合体に結合するファージを単離するための方法であって、以下の工程：

- (a) 固体支持体上にKDRまたはVEGF/KDR複合体の標的を固定化すること；
  - (b) 潜在的なKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ファージのライブラリーを固体支持体と接触させて、ライブラリーのKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ファージを結合させること；および
  - (c) 固体支持体から未結合のファージライブラリー部分を除去すること、
- を含み、それによりKDRまたはVEGF/KDR複合体に結合するファージを単離する前記方法。

## 【請求項 33】

動物またはヒト対象においてKDRまたはVEGF/KDR複合体を検出し、そして場合により動物またはヒト対象の少なくとも一部を画像化する方法であって、以下の工程：

- (a) 請求項1のいずれか1つに記載のポリペプチドを検出可能に標識すること；
  - (b) 標識ポリペプチドを対象に投与すること；ならびに
  - (c) 対象において標識ポリペプチドを検出すること、および場合により画像を構築すること、
- を含む、前記方法。

## 【請求項 34】

標識が：酵素、蛍光化合物、超音波造影剤、リポソームおよび光学色素から成る群より選択され、該標識が場合によりさらにリンカーまたはスペーサーを含む、請求項33に記載の方法。

## 【請求項 35】

超音波造影剤がリン脂質安定化マイクロバブルであるか、または気体を含む超音波造影剤である、請求項34に記載の方法。

## 【請求項 36】

超音波造影剤がフッ素化ガスを含む、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 37】

標識が放射性標識または常磁性金属イオンであり、場合によりリンカーまたはスペーサーをさらに含む、請求項33に記載の方法。

## 【請求項 38】

放射性標識が： $^{18}F$ 、 $^{124}I$ 、 $^{125}I$ 、 $^{131}I$ 、 $^{123}I$ 、 $^{77}Br$ 、 $^{76}Br$ 、 $^{99m}Tc$ 、 $^{51}Cr$ 、 $^{67}Ga$ 、 $^{68}Ga$ 、 $^{47}Sc$ 、 $^{51}Cr$ 、 $^{167}Tm$ 、 $^{41}Ce$ 、 $^{111}In$ 、 $^{168}Yb$ 、 $^{175}Yb$ 、 $^{140}La$ 、 $^{90}Y$ 、 $^{88}Y$ 、 $^{153}Sm$ 、 $^{166}Ho$ 、 $^{165}Dy$ 、 $^{166}Dy$ 、 $^{62}Cu$ 、 $^{64}Cu$ 、 $^{67}Cu$ 、 $^{97}Ru$ 、 $^{103}Ru$ 、 $^{186}Re$ 、 $^{188}Re$ 、 $^{203}Pb$ 、 $^{211}Bi$ 、 $^{212}Bi$ 、 $^{213}Bi$ 、 $^{214}Bi$ 、 $^{105}Rh$ 、 $^{109}Pd$ 、 $^{117m}Sn$ 、 $^{149}Pm$ 、 $^{161}Tb$ 、 $^{177}Lu$ 、 $^{198}Au$ および $^{199}Au$ から成る群より選択される放射性核種を含む、請求項37に記載の方法。

## 【請求項 39】

放射性標識がキレート剤をさらに含む、請求項38に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 40】

キレート剤が：式 20、21、22、23a、23b、24a、24b、および 25 から成る群より選択される、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 41】

放射性核種が  $^{99m}\text{Tc}$  または  $^{111}\text{In}$  である、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 42】

常磁性標識が： $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Gd}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$ 、 $\text{Pr}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ti}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Nd}^{3+}$ 、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Ho}^{3+}$ 、 $\text{Er}^{3+}$ 、 $\text{Pa}^{4+}$  および  $\text{Eu}^{2+}$  から成る群より選択される常磁性金属原子を含む、請求項 37 に記載の方法。

10

## 【請求項 43】

常磁性標識がキレート剤をさらに含む、請求項 42 に記載の方法。

## 【請求項 44】

キレート剤が：DTPA、DO3A、DOTA、EDTA、TETA、EHPG、HBED、NOTA、DOTMA、TETMA、PDTA、TTHA、LICAM、および MECAM から成る群より選択される、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

標識ポリペプチドの検出がマラリア株、HIV、SIV、サル出血熱ウイルスおよび腸管出血性大腸菌株から成る群より選択される病原体の存在を示す、請求項 35 に記載の方法。

20

## 【請求項 46】

標識ポリペプチドの検出が血管形成または血管新生を示す、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 47】

超音波造影剤が、 $\text{SF}_6$  フレオン、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{C}_2\text{F}_6$ 、 $\text{C}_3\text{F}_8$ 、 $\text{C}_4\text{F}_{10}$ 、 $\text{CBrF}_3$ 、 $\text{CCl}_2\text{F}_2$ 、 $\text{C}_2\text{ClF}_5$ 、 $\text{CBrClF}_2$  およびペルフルオロカーボンの群より選択されるフッ素化ガスを含む、請求項 35 に記載の方法。

## 【請求項 48】

超音波造影剤が式  $\text{C}_n\text{F}_{n+2}$  ( $n$  は 1 ~ 12 である) を有するペルフルオロカーボンガスを含む、請求項 47 に記載の方法。

## 【請求項 49】

請求項 1 に記載の少なくとも 1 つのポリペプチドを含む組成物を、KDR の活性化に関連する状態の治療が必要な動物またはヒト対象に投与することを含む、そのような状態を治療する方法。

30

## 【請求項 50】

請求項 1 に記載のポリペプチドを含む組成物を、マラリア、HIV 感染、SIV 感染、サル出血熱ウイルス感染、および腸管出血性大腸菌感染の治療が必要な動物またはヒト対象に投与することを含む、そのような状態を治療する方法。

## 【請求項 51】

状態が固形腫瘍増殖である、請求項 49 に記載の方法。

## 【請求項 52】

ポリペプチドが殺腫瘍剤に結合する、請求項 49 に記載の方法。

40

## 【請求項 53】

KDR 結合または VEGF / KDR 複合体結合ポリペプチドを提示する組換えバクテリオファージであって、そのポリペプチドが以下のアミノ酸配列の 1 つを含む、前記組換えバクテリオファージ：

$\text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{X}_3 - \text{Cys} - \text{X}_5 - \text{X}_6 - \text{X}_7 - \text{X}_8 - \text{X}_9 - \text{X}_{10} - \text{Cys} - \text{X}_{12} - \text{X}_{13} - \text{X}_{14}$  (TN8)、

ここで、

$\text{X}_1$  は Ala、Arg、Asp、Gly、His、Leu、Lys、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val であり；

50

- $X_2$  は Asn、 Asp、 Glu、 Gly、 Ile、 Leu、 Lys、 Phe、 Ser、 Thr、 Trp、 Tyr、 もしくは Val であり；  
 $X_3$  は Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 Ile、 Leu、 Met、 Thr、 Trp、 もしくは Val であり；  
 $X_5$  は Ala、 Arg、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 His、 Ile、 Lys、 Phe、 Pro、 Ser、 Trp、 もしくは Tyr であり；  
 $X_6$  は Ala、 Arg、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 Gly、 His、 Ile、 Lys、 Met、 Phe、 Pro、 Ser、 Thr、 Trp、 Tyr もしくは Val であり；  
 $X_7$  は Ala、 Asn、 Asp、 Glu、 Gly、 His、 Ile、 Leu、 Lys、 Phe、 Pro、 Ser、 Thr、 Trp、 Tyr、 もしくは Val であり； 10  
 $X_8$  は Ala、 Asp、 Glu、 Gly、 Leu、 Phe、 Pro、 Ser、 Thr、 Trp、 もしくは Tyr であり；  
 $X_9$  は Arg、 Gln、 Glu、 Gly、 Ile、 Leu、 Met、 Pro、 Thr、 Trp、 Tyr、 もしくは Val であり；  
 $X_{10}$  は Ala、 Arg、 Gln、 Glu、 Gly、 His、 Ile、 Leu、 Lys、 Met、 Phe、 Trp もしくは Tyr であり；  
 $X_{12}$  は Arg、 Asp、 Cys、 Gln、 Glu、 His、 Ile、 Leu、 Lys、 Met、 Phe、 Pro、 Ser、 Thr、 Trp、 Tyr、 もしくは Val であり；  
 $X_{13}$  は Arg、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 Gly、 His、 Ile、 Leu、 Lys、 Met、 Phe、 Ser、 Thr、 Trp、 もしくは Tyr であり；そして 20  
 $X_{14}$  は Gln、 Glu、 Gly、 His、 Ile、 Leu、 Lys、 Met、 Phe、 Pro、 Ser、 Thr、 Trp、 もしくは Tyr である；または  
 $X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - Cys - X_{16} - X_{17} - X_{18}$  (TN12)、  
 ここで、  
 $X_1$  は Ala、 Asn、 Asp、 Gly、 Leu、 Pro、 Ser、 Trp、 もしくは Tyr (好ましくは Asn、 Asp、 Pro、 または Tyr) であり；  
 $X_2$  は Ala、 Arg、 Asn、 Asp、 Gly、 His、 Phe、 Pro、 Ser、 Trp、 もしくは Tyr (好ましくは Asp、 Gly、 Pro、 Ser、 または Trp) であり； 30  
 $X_3$  は Ala、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 Gly、 His、 Leu、 Lys、 Met、 Phe、 Ser、 Thr、 Trp、 Tyr、 もしくは Val (好ましくは Trp) であり；  
 $X_5$  は Arg、 Asp、 Gln、 Glu、 Gly、 His、 Ile、 Lys、 Met、 Thr、 Trp、 Tyr、 もしくは Val (好ましくは Glu、 Ile、 または Tyr) であり；  
 $X_6$  は Ala、 Arg、 Asn、 Cys、 Glu、 Ile、 Leu、 Met、 Phe、 Ser、 Trp、 もしくは Tyr (好ましくは Glu、 Phe、 または Tyr) であり；  
 $X_7$  は Arg、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 His、 Ile、 Leu、 Pro、 Ser、 Thr、 Trp、 Tyr、 もしくは Val (好ましくは Glu) であり； 40  
 $X_8$  は Ala、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 Gly、 His、 Met、 Phe、 Pro、 Ser、 Trp、 Tyr、 もしくは Val (好ましくは Gln または Ser) であり；  
 $X_9$  は Asp、 Gln、 Glu、 Gly、 His、 Ile、 Leu、 Met、 Phe、 Pro、 Ser、 Thr、 Trp、 もしくは Tyr (好ましくは Asp) であり；  
 $X_{10}$  は Ala、 Arg、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 Gly、 Leu、 Lys、 Met、 Phe、 Pro、 Ser、 Thr、 Trp、 Tyr、 もしくは Val (好ましくは Lys または Ser) であり；  
 $X_{11}$  は Ala、 Arg、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 Gly、 His、 Lys、 50

Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlyまたはTyr）であり；  
 $X_{12}$ はAla、Arg、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはTrpまたはThr）であり；

$X_{13}$ はArg、Gln、Glu、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、もしくはVal（好ましくはGluまたはTrp）であり；

$X_{14}$ はArg、Asn、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはPhe）であり；

$X_{16}$ はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはAsp）であり；

$X_{17}$ はArg、Asn、Asp、Cys、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはProまたはTyr）であり；そして

$X_{18}$ はAla、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsn、ProまたはTrp）である；または

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - Gly - X_9 - Cys - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ （TN7）、

ここで、

$X_1$ はGlyもしくはTrpであり；

$X_2$ はIle、Tyr、もしくはValであり；

$X_3$ はGln、Glu、Thr、もしくはTrpであり；

$X_5$ はAsn、Asp、もしくはGluであり；

$X_6$ はGlu、His、Lys、もしくはPheであり；

$X_7$ はAsp、Gln、Leu、Lys、Met、もしくはTyrであり；

$X_9$ はArg、Gln、Leu、Lys、もしくはValであり；

$X_{11}$ はArg、Phe、Ser、Trp、もしくはValであり；

$X_{12}$ はGlu、His、もしくはSerであり；そして

$X_{13}$ はGlu、Gly、Trp、もしくはTyrである；または

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - Cys - X_{13} - X_{14} - X_{15}$ （TN9）、

ここで、

$X_1$ はArg、Asp、Gly、Ile、Met、Pro、もしくはTyr（好ましくはTyr）であり；

$X_2$ はAsp、Gly、His、ProもしくはTrp（好ましくはGlyまたはTrp）であり；

$X_3$ はGly、Pro、Phe、Thr、もしくはTrp（好ましくはPro）であり；

$X_5$ はAla、Asp、Lys、Ser、Trp、もしくはVal（好ましくはLys）であり；

$X_6$ はAsn、Glu、Gly、His、もしくはLeuであり；

$X_7$ はGln、Glu、Gly、Met、Lys、Phe、Tyr、もしくはVal（好ましくはMet）であり；

$X_8$ はAla、Asn、Asp、Gly、Leu、Met、Pro、Ser、もしくはThrであり；

$X_9$ はHis、Pro、もしくはTrp（好ましくはPro）であり；

$X_{10}$ はAla、Gly、His、Leu、Trp、もしくはTyr（好ましくはHisまたはTrp）であり；

$X_{11}$ はAla、Asp、Gln、Leu、Met、Thr、もしくはTrpであり；

$X_{13}$ はAla、Lys、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはTrp）であり；

$X_{14}$ はAsp、Gly、Leu、His、Met、Thr、Trp、もしくはTyr（好ましくはHis、Trp、またはTyr）であり；そして

10

10

20

30

40

50

X<sub>15</sub> は A s n、G l n、G l u、L e u、M e t、P r o、もしくは T r p (好ましくは G l u、M e t、または T r p) である ; かまたは

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - C y s - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - S e r - G l y - P r o - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - X<sub>15</sub> - C y s - X<sub>17</sub> - X<sub>18</sub> - X<sub>19</sub> (配列番号 1 ; M T N 13)、

ここで、

X<sub>1</sub> は A r g、G l u、H i s、S e r、もしくは T r p であり ;

X<sub>2</sub> は A s n、A s p、L e u、P h e、T h r、もしくは V a l であり ;

X<sub>3</sub> は A r g、A s p、G l u、H i s、L y s、もしくは T h r であり ;

X<sub>5</sub> は A s p、G l u、H i s、もしくは T h r であり ;

X<sub>6</sub> は A r g、H i s、L y s、もしくは P h e であり ;

X<sub>7</sub> は G l n、I l e、L y s、T y r、もしくは V a l であり ;

X<sub>8</sub> は G l n、I l e、L e u、M e t、もしくは P h e であり ;

X<sub>12</sub> は A s n、A s p、G l y、H i s、もしくは T y r であり ;

X<sub>13</sub> は G l n、G l y、S e r、もしくは T h r であり ;

X<sub>14</sub> は G l u、L y s、P h e、もしくは S e r であり ;

X<sub>15</sub> は G l u、I l e、S e r、もしくは V a l であり ;

X<sub>17</sub> は G l u、G l y、L y s、P h e、S e r、もしくは V a l であり ;

X<sub>18</sub> は A r g、A s n、S e r、もしくは T y r であり ; そして

X<sub>19</sub> は A s p、G l n、G l u、G l y、M e t、もしくは T y r である、

ここで、ポリペプチドは組換えバクテリオファージの表面に提示される。

#### 【請求項 54】

以下のアミノ酸配列の 1 つを含み、場合により 1 以上のアミノ酸の N 末端および / または C 末端フランキングペプチドをさらに含む、K D R または V E G F / K D R 複合体結合ポリペプチドを含む、核磁気共鳴画像用造影剤 :

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - C y s - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - C y s - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> ( T N 8 )、

ここで、

X<sub>1</sub> は A l a、A r g、A s p、G l y、H i s、L e u、L y s、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり ;

X<sub>2</sub> は A s n、A s p、G l u、G l y、I l e、L e u、L y s、P h e、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり ;

X<sub>3</sub> は A s n、A s p、G l n、G l u、I l e、L e u、M e t、T h r、T r p、もしくは V a l であり ;

X<sub>5</sub> は A l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、H i s、I l e、L y s、P h e、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r であり ;

X<sub>6</sub> は A l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L y s、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり ;

X<sub>7</sub> は A l a、A s n、A s p、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l ;

X<sub>8</sub> は A l a、A s p、G l u、G l y、L e u、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、もしくは T y r であり ;

X<sub>9</sub> は A r g、G l n、G l u、G l y、I l e、L e u、M e t、P r o、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり ;

X<sub>10</sub> は A l a、A r g、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、M e t、P h e、T r p もしくは T y r であり ;

X<sub>12</sub> は A r g、A s p、C y s、G l n、G l u、H i s、I l e、L e u、L y s、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり ;

X<sub>13</sub> は A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、

10

20

30

40

50

Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、もしくはTyrであり；そして  
 $X_{14}$ はGln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、  
 Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyrである；または  
 $X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12}$   
 $- X_{13} - X_{14} - Cys - X_{16} - X_{17} - X_{18}$  (TN12)、

ここで、

$X_1$ はAla、Asn、Asp、Gly、Leu、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsn、Asp、Pro、またはTyr）であり；

$X_2$ はAla、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsp、Gly、Pro、Ser、またはTrp）であり； 10

$X_3$ はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはTrp）であり；

$X_5$ はArg、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlu、Ile、またはTyr）であり；

$X_6$ はAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、Phe、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはGlu、Phe、またはTyr）であり；

$X_7$ はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlu）であり； 20

$X_8$ はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlnまたはSer）であり；

$X_9$ はAsp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsp）であり；

$X_{10}$ はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはLysまたはSer）であり；

$X_{11}$ はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlyまたはTyr）であり； 30

$X_{12}$ はAla、Arg、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはTrpまたはThr）であり；

$X_{13}$ はArg、Gln、Glu、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、もしくはVal（好ましくはGluまたはTrp）であり；

$X_{14}$ はArg、Asn、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはPhe）であり；

$X_{16}$ はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはAsp）であり； 40

$X_{17}$ はArg、Asn、Asp、Cys、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはProまたはTyr）であり；

$X_{18}$ はAla、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsn、ProまたはTrp）である；または

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - Gly - X_9 - Cys - X_{11} - X_{12} - X_{13}$  (TN7)、

ここで、

$X_1$ はGlyもしくはTrpであり；

$X_2$ はIle、Tyr、もしくはValであり；

$X_3$ はGln、Glu、Thr、もしくはTrpであり； 50

$X_5$  は  $Asn$ 、 $Asp$ 、もしくは  $Glu$  であり；  
 $X_6$  は  $Glu$ 、 $His$ 、 $Lys$ 、もしくは  $Phe$  であり；  
 $X_7$  は  $Asp$ 、 $Gln$ 、 $Leu$ 、 $Lys$ 、 $Met$ 、もしくは  $Tyr$  であり；  
 $X_9$  は  $Arg$ 、 $Gln$ 、 $Leu$ 、 $Lys$ 、もしくは  $Val$  であり；  
 $X_{11}$  は  $Arg$ 、 $Phe$ 、 $Ser$ 、 $Trp$ 、もしくは  $Val$  であり；  
 $X_{12}$  は  $Glu$ 、 $His$ 、もしくは  $Ser$  であり；そして  
 $X_{13}$  は  $Glu$ 、 $Gly$ 、 $Trp$ 、もしくは  $Tyr$  である；かまたは  
 $X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - Cys$   
 $- X_{13} - X_{14} - X_{15}$  (TN9)、

ここで、

$X_1$  は  $Arg$ 、 $Asp$ 、 $Gly$ 、 $Ile$ 、 $Met$ 、 $Pro$ 、もしくは  $Tyr$  (好ましくは  $Tyr$ ) であり；

$X_2$  は  $Asp$ 、 $Gly$ 、 $His$ 、 $Pro$ 、もしくは  $Trp$  (好ましくは  $Gly$  または  $Trp$ ) であり；

$X_3$  は  $Gly$ 、 $Pro$ 、 $Phe$ 、 $Thr$ 、もしくは  $Trp$  (好ましくは  $Pro$ ) であり；

$X_5$  は  $Ala$ 、 $Asp$ 、 $Lys$ 、 $Ser$ 、 $Trp$ 、もしくは  $Val$  (好ましくは  $Lys$ ) であり；

$X_6$  は  $Asn$ 、 $Glu$ 、 $Gly$ 、 $His$ 、もしくは  $Leu$  であり；

$X_7$  は  $Gln$ 、 $Glu$ 、 $Gly$ 、 $Met$ 、 $Lys$ 、 $Phe$ 、 $Tyr$ 、もしくは  $Val$  (好ましくは好ましくは  $Met$ ) であり；

$X_8$  は  $Ala$ 、 $Asn$ 、 $Asp$ 、 $Gly$ 、 $Leu$ 、 $Met$ 、 $Pro$ 、 $Ser$ 、もしくは  $Thr$  であり；

$X_9$  は  $His$ 、 $Pro$ 、もしくは  $Trp$  (好ましくは  $Pro$ ) であり；

$X_{10}$  は  $Ala$ 、 $Gly$ 、 $His$ 、 $Leu$ 、 $Trp$ 、もしくは  $Tyr$  (好ましくは  $His$  または  $Trp$ ) であり；

$X_{11}$  は  $Ala$ 、 $Asp$ 、 $Gln$ 、 $Leu$ 、 $Met$ 、 $Thr$ 、もしくは  $Trp$  であり；

$X_{13}$  は  $Ala$ 、 $Lys$ 、 $Ser$ 、 $Trp$ 、もしくは  $Tyr$  (好ましくは  $Trp$ ) であり；

$X_{14}$  は  $Asp$ 、 $Gly$ 、 $Leu$ 、 $His$ 、 $Met$ 、 $Thr$ 、 $Trp$ 、もしくは  $Tyr$  (好ましくは  $His$ 、 $Trp$ 、または  $Tyr$ ) であり；そして

$X_{15}$  は  $Asn$ 、 $Gln$ 、 $Glu$ 、 $Leu$ 、 $Met$ 、 $Pro$ 、もしくは  $Trp$  (好ましくは  $Glu$ 、 $Met$ 、または  $Trp$ ) である；または

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - Ser - Gly - Pro - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - Cys - X_{17} - X_{18} - X_{19}$  (配列番号1; MTN13)、

ここで、

$X_1$  は  $Arg$ 、 $Glu$ 、 $His$ 、 $Ser$ 、もしくは  $Trp$  であり；

$X_2$  は  $Asn$ 、 $Asp$ 、 $Leu$ 、 $Phe$ 、 $Thr$ 、もしくは  $Val$  であり；

$X_3$  は  $Arg$ 、 $Asp$ 、 $Glu$ 、 $His$ 、 $Lys$ 、もしくは  $Thr$  であり；

$X_5$  は  $Asp$ 、 $Glu$ 、 $His$ 、もしくは  $Thr$  であり；

$X_6$  は  $Arg$ 、 $His$ 、 $Lys$ 、もしくは  $Phe$  であり

$X_7$  は  $Gln$ 、 $Ile$ 、 $Lys$ 、 $Tyr$ 、もしくは  $Val$  であり；

$X_8$  は  $Gln$ 、 $Ile$ 、 $Leu$ 、 $Met$ 、もしくは  $Phe$  であり；

$X_{12}$  は  $Asn$ 、 $Asp$ 、 $Gly$ 、 $His$ 、もしくは  $Tyr$  であり；

$X_{13}$  は  $Gln$ 、 $Gly$ 、 $Ser$ 、もしくは  $Thr$  であり；

$X_{14}$  は  $Glu$ 、 $Lys$ 、 $Phe$ 、もしくは  $Ser$  であり；

$X_{15}$  は  $Glu$ 、 $Ile$ 、 $Ser$ 、もしくは  $Val$  であり；

$X_{17}$  は  $Glu$ 、 $Gly$ 、 $Lys$ 、 $Phe$ 、 $Ser$ 、もしくは  $Val$  であり；

$X_{18}$  は  $Arg$ 、 $Asn$ 、 $Ser$ 、もしくは  $Tyr$  であり；そして

$X_{19}$  は  $Asp$ 、 $Gln$ 、 $Glu$ 、 $Gly$ 、 $Met$ 、もしくは  $Tyr$  である、

10

20

30

40

50

ここで、ポリペプチドは常磁性金属と錯体を形成可能な少なくとも1つのキレート剤に結合する。

【請求項55】

少なくとも1つの常磁性金属原子、および請求項1に記載のポリペプチドを含む少なくとも1つのKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分を含む、核磁気共鳴画像用造影剤。

【請求項56】

DTPA、DOTA、EDTA、TETA、EHPG、HBED、NOTA、DOTMA、TETMA、PDTA、TTHA、LICAM、およびMECAMから成る群より選択される少なくとも1つのキレート剤をさらに含む、請求項55に記載の前記核磁気共鳴画像用造影剤。 10

【請求項57】

キレート剤が：ジエチレントリアミン、テトラアザシクロドデカンおよびそのカルボキシメチル置換誘導体から成る群より選択される、請求項56に記載の核磁気共鳴画像用造影剤。

【請求項58】

常磁性金属原子が： $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Gd^{3+}$ 、 $Eu^{3+}$ 、 $Dy^{3+}$ 、 $Pr^{3+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Co^{3+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Ti^{3+}$ 、 $Tb^{3+}$ 、 $Nd^{3+}$ 、 $Sm^{3+}$ 、 $Ho^{3+}$ 、 $Er^{3+}$ 、 $Pa^{4+}$  および  $Eu^{2+}$  から成る群より選択される、請求項55に記載の核磁気共鳴画像用造影剤。 20

【請求項59】

多価カチオンが  $Gd^{3+}$  である、請求項55に記載の核磁気共鳴画像用造影剤。

【請求項60】

以下の工程を含む、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合化合物を同定するための方法：

(a) 請求項1のいずれか1つに記載のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを利用して、KDRまたはVEGF/KDR複合体の標的と複合体を形成すること；

(b) 複合体と1以上の潜在的なKDRまたはVEGF/KDR複合体結合化合物とを接触させること；および 30

(c) 潜在的なKDRまたはVEGF/KDR複合体結合化合物が、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドと競合して、KDRまたはVEGF/KDR複合体の標的と複合体を形成するかどうかを確認すること。

【請求項61】

請求項1に記載のポリペプチドを含む、診断画像用造影剤。

【請求項62】

少なくとも1つの請求項1に記載のポリペプチドを含む造影剤の製剤を動物またはヒト対象に投与し、核磁気共鳴画像法、超音波画像法、光学画像法、音ルミネセンス画像法、光音響画像法、および放射性画像法から成る群より選択される方法により造影剤を画像化する工程を含む、医用画像法。 40

【請求項63】

放射線療法に有用な放射性核種に結合した少なくとも1つの請求項1に記載のポリペプチドを含む化合物を、そのような療法が必要な動物またはヒト対象に投与することを含む、放射線療法の方法。

【請求項64】

化合物がキレート剤をさらに含む、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

化合物がスパーサーまたはリンカーをさらに含む、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

キレート剤が式20、21、22、23、24および25から成る群より選択される化 50

合物である、請求項 6 4 に記載の方法

【請求項 6 7】

放射性核種が<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>177</sup>Lu、<sup>90</sup>Y、<sup>153</sup>Smまたは<sup>166</sup>Hoである、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

請求項 1 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド、放射性核種に対するキレート剤、および還元剤を含む放射性医薬品の調製のためのキット。

【請求項 6 9】

遺伝物質が必要な動物またはヒトに、遺伝物質に結合もしくは会合した請求項 1 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド、またはそのような遺伝物質を含有する送達ビヒクルを投与することを含む、遺伝物質を K D R 発現細胞に標的化する方法。 10

【請求項 7 0】

ファージディスプレイにより同定した結合ポリペプチドを、標的を発現する細胞に結合する能力に関してスクリーニングする方法であって、1以上の結合ポリペプチドを含む多量体構築物を作製し；標的を発現する細胞と多量体構築物を接触させ、多量体構築物が標的に結合する能力を評価する工程を含む、前記方法。

【請求項 7 1】

細胞が組換え D N A 技術により標的を発現するように操作されている、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】 20

多量体構築物が検出可能に標識されている、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

多量体構築物が標的に結合する能力が血清の存在下で評価される、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 4】

多量体構築物が、アビジン、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンと複合体を形成したビオチン化結合ポリペプチドを含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 5】

標的が K D R または V E G F / K D R 複合体である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 6】 30

以下の配列から成る群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸を含む、K D R または V E G F / K D R 複合体に結合する能力を有する多量体ポリペプチド構築物：

コンセンサス配列 I : C y s - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 - C y s ( T N 8 )、

ここで、

X 2 は A l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、H i s、I l e、L y s、P h e、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r (好ましくは A s p、G l u、または T y r) であり；

X 3 は A l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L y s、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l (好ましくは G l u、M e t または T y r) であり； 40

X 4 は A l a、A s n、A s p、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l (好ましくは A s p) であり；

X 5 は A l a、A s p、G l u、G l y、L e u、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、もしくは T y r (好ましくは T r p または T h r) であり；

X 6 は A r g、G l n、G l u、G l y、I l e、L e u、M e t、P r o、T h r、T r p、T y r もしくは V a l (好ましくは G l y または T y r) であり；そして

X 7 は A l a、A r g、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、M e t、P h e、T r p、もしくは T y r (好ましくは L y s または T y r) である；また 50

は

コンセンサス配列 I I : C y s - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 - X 1 0 - X 1 1 - C y s ( T N 1 2 ) 、

ここで、

X 2 は A r g 、 A s p 、 G l n 、 G l u 、 G l y 、 H i s 、 I l e 、 L y s 、 M e t 、 T h r 、 T r p 、 T y r 、 もしくは V a l ( 好ましくは G l u 、 I l e または T y r ) であり ;

X 3 は A l a 、 A r g 、 A s n 、 C y s 、 G l u 、 I l e 、 L e u 、 M e t 、 P h e 、 S e r 、 T r p 、 もしくは T y r ( 好ましくは G l u 、 P h e または T y r ) であり ;

X 4 は A r g 、 A s n 、 A s p 、 G l n 、 G l u 、 H i s 、 I l e 、 L e u 、 P r o 、 S e r 、 T h r 、 T r p 、 T y r もしくは V a l ( 好ましくは G l u ) であり ;

X 5 は A l a 、 A s n 、 A s p 、 G l n 、 G l u 、 G l y 、 H i s 、 M e t 、 P h e 、 P r o 、 S e r 、 T r p 、 T y r もしくは V a l ( 好ましくは G l n または S e r ) であり ;

X 6 は A s p 、 G l n 、 G l u 、 G l y 、 H i s 、 I l e 、 L e u 、 M e t 、 P h e 、 P r o 、 S e r 、 T h r 、 T r p 、 もしくは T y r ( 好ましくは A s p ) であり ;

X 7 は A l a 、 A r g 、 A s n 、 A s p 、 G l n 、 G l u 、 G l y 、 L e u 、 L y s 、 M e t 、 P h e 、 P r o 、 S e r 、 T h r 、 T r p 、 T y r 、 もしくは V a l ( 好ましくは L y s または S e r ) であり ;

X 8 は A l a 、 A r g 、 A s n 、 A s p 、 G l n 、 G l u 、 G l y 、 H i s 、 L y s 、 T r p 、 T y r 、 もしくは V a l ( 好ましくは G l y または T y r ) であり ;

X 9 は A l a 、 A r g 、 G l n 、 G l y 、 H i s 、 I l e 、 L y s 、 M e t 、 P h e 、 S e r 、 T h r 、 T r p 、 T y r 、 もしくは V a l ( 好ましくは T r p または T h r ) であり ;

X 1 0 は A r g 、 G l n 、 G l u 、 H i s 、 L e u 、 L y s 、 M e t 、 P h e 、 P r o 、 T h r 、 T r p 、 もしくは V a l ( 好ましくは G l u または T r p ) であり ; そして

X 1 1 は A r g 、 A s n 、 A s p 、 G l u 、 H i s 、 I l e 、 L e u 、 M e t 、 P h e 、 P r o 、 T h r 、 T r p 、 T y r 、 もしくは V a l ( 好ましくは P h e ) である ; または

コンセンサス配列 I I I : C y s - X 2 - X 3 - X 4 - G l y - X 6 - C y s ( T N 7 ) 、

ここで、

X 2 は A s n 、 A s p 、 もしくは G l u であり ;

X 3 は G l u 、 H i s 、 L y s 、 もしくは P h e であり ;

X 4 は A s p 、 G l n 、 L e u 、 L y s 、 M e t 、 もしくは T y r であり ; そして

X 6 は A r g 、 G l n 、 L e u 、 L y s 、 もしくは V a l である ; または

コンセンサス配列 I V : C y s - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - C y s ( T N 9 ) 、

ここで、

X 2 は A l a 、 A s p 、 L y s 、 S e r 、 T r p 、 もしくは V a l ( 好ましくは L y s ) であり ;

X 3 は A s n 、 G l u 、 G l y 、 H i s 、 もしくは L e u であり ;

X 4 は G l n 、 G l u 、 G l y 、 M e t 、 L y s 、 P h e 、 T y r 、 もしくは V a l ( 好ましくは M e t ) であり ;

X 5 は A l a 、 A s n 、 A s p 、 G l y 、 L e u 、 M e t 、 P r o 、 S e r 、 もしくは T h r であり ;

X 6 は H i s 、 P r o 、 もしくは T r p ( 好ましくは P r o または T r p ) であり ;

X 7 は A l a 、 G l y 、 H i s 、 L e u 、 T r p 、 もしくは T y r ( 好ましくは T r p ) であり ; そして

X 8 は A l a 、 A s p 、 G l n 、 L e u 、 M e t 、 T h r 、 もしくは T r p である ; または

は

10

20

30

40

50

コンセンサス配列 V : C y s - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - S e r - G l y - P r o - X  
9 - X 1 0 - X 1 1 - X 1 2 - C y s ( M T N 1 3 ; 配列番号 1 )、

ここで、

X 2 は A s p、G l u、H i s、もしくは T h r であり；  
X 3 は A r、H i s、L y s、もしくは P h e であり；  
X 4 は G l n、I l e、L y s、T y r、もしくは V a l であり；  
X 5 は G l n、I l e、L e u、M e t、もしくは P h e であり；  
X 9 は A s n、A s p、G l y、H i s、もしくは T y r であり；  
X 1 0 は G l n、G l y、S e r、もしくは T h r であり；  
X 1 1 は G l u、L y s、P h e、もしくは S e r であり；そして  
X 1 2 は G l u、I l e、S e r、もしくは V a l である。

10

【請求項 77】

以下から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む、K D R または V E G F / K  
D R 複合体に結合する能力を有する多量体ポリペプチド構築物：

X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 - X 1 0 - C y s - X 1 2  
- X 1 3 - X 1 4 ( T N 8 )、

ここで、

X 1 は A l a、A r g、A s p、G l y、H i s、L e u、L y s、P r o、S e r、T  
h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり；  
X 2 は A s n、A s p、G l u、G l y、I l e、L e u、L y s、P h e、S e r、T  
h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり；  
X 3 は A s n、A s p、G l n、G l u、I l e、L e u、M e t、T h r、T r p、も  
しくは V a l であり；  
X 5 は A l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、H i s、I l e、L y s、P  
h e、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r であり；  
X 6 は A l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L  
y s、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり  
；  
X 7 は A l a、A s n、A s p、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、P  
h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり；  
X 8 は A l a、A s p、G l u、G l y、L e u、P h e、P r o、S e r、T h r、T  
r p、もしくは T y r であり；  
X 9 は A r g、G l n、G l u、G l y、I l e、L e u、M e t、P r o、T h r、T  
r p、T y r、もしくは V a l であり；  
X 1 0 は A l a、A r g、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、  
M e t、P h e、T r p、もしくは T y r であり；  
X 1 2 は A r g、A s p、C y s、G l n、G l u、H i s、I l e、L e u、L y s、  
M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l であり；  
X 1 3 は A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、  
L y s、M e t、P h e、S e r、T h r、T r p、もしくは T y r であり；そして  
X 1 4 は G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、M e t、P h e、  
P r o、S e r、T h r、T r p、もしくは T y r である；

20

30

40

X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 - X 1 0 - X 1 1 - X 1 2  
- X 1 3 - X 1 4 - C y s - X 1 6 - X 1 7 - X 1 8 ( T N 1 2 )、

ここで、

X 1 は A l a、A s n、A s p、G l y、L e u、P r o、S e r、T r p、もしくは T  
y r ( 好ましくは A s n、A s p、P r o、または T y r ) であり；  
X 2 は A l a、A r g、A s n、A s p、G l y、H i s、P h e、P r o、S e r、T  
r p、もしくは T y r ( 好ましくは A s p、G l y、P r o、S e r、または T r p ) であ  
り；

50

X3はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはTrp)であり；

X5はArg、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはGlu、Ile、またはTyr)であり；

X6はAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、Phe、Ser、Trp、もしくはTyr(好ましくはGlu、Phe、またはTyr)であり；

X7はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはGlu)であり；

X8はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはGlnまたはSer)であり；

X9はAsp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyr(好ましくはAsp)であり；

X10はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはLysまたはSer)であり；

X11はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはGlyまたはTyr)であり；

X12はAla、Arg、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはTrpまたはThr)であり；

X13はArg、Gln、Glu、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、もしくはVal(好ましくはGluまたはTrp)であり；

X14はArg、Asn、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはPhe)であり；

X16はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはAsp)であり；

X17はArg、Asn、Asp、Cys、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr(好ましくはProまたはTyr)であり；そして

X18はAla、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr(好ましくはAsn、ProまたはTrp)である；または

X1 - X2 - X3 - Cys - X5 - X6 - X7 - Gly - X9 - Cys - X11 - X12 - X13 (TN7)、

ここで、

X1はGlyもしくはTrpであり；

X2はIle、Tyr、もしくはValであり；

X3はGln、Glu、Thr、もしくはTrpであり；

X5はAsn、Asp、もしくはGluであり；

X6はGlu、His、Lys、もしくはPheであり；

X7はAsp、Gln、Leu、Lys、Met、もしくはTyrであり；

X9はArg、Gln、Leu、Lys、もしくはValであり；

X11はArg、Phe、Ser、Trp、もしくはValであり；

X12はGlu、His、もしくはSerであり；そして

X13はGlu、Gly、Trp、もしくはTyrである；

X1 - X2 - X3 - Cys - X5 - X6 - X7 - X8 - X9 - X10 - X11 - Cys - X13 - X14 - X15 (TN9)、

ここで、

X1はArg、Asp、Gly、Ile、Met、Pro、もしくはTyr(好ましくは

10

20

30

40

50

Tyr) であり ;  
 X2 は Asp、Gly、His、Pro もしくは Trp (好ましくは Gly または Trp)  
 ) であり ;  
 X3 は Gly、Pro、Phe、Thr、もしくは Trp (好ましくは Pro) であり ;  
 X5 は Ala、Asp、Lys、Ser、Trp、もしくは Val (好ましくは Lys)  
 であり ;  
 X6 は Asn、Glu、Gly、His、もしくは Leu であり ;  
 X7 は Gln、Glu、Gly、Met、Lys、Phe、Tyr、もしくは Val (好  
 ましくは好ましくは Met) であり ;  
 X8 は Ala、Asn、Asp、Gly、Leu、Met、Pro、Ser、もしくは T 10  
 hr であり ;  
 X9 は His、Pro、もしくは Trp (好ましくは Pro) であり ;  
 X10 は Ala、Gly、His、Leu、Trp、もしくは Tyr (好ましくは His  
 まは Trp) であり ;  
 X11 は Ala、Asp、Gln、Leu、Met、Thr、もしくは Trp であり ;  
 X13 は Ala、Lys、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Trp) であり  
 ;  
 X14 は Asp、Gly、Leu、His、Met、Thr、Trp、もしくは Tyr (好  
 ましくは His、Trp、または Tyr) であり ; そして  
 X15 は Asn、Gln、Glu、Leu、Met、Pro、もしくは Trp (好ましく 20  
 は Glu、Met、または Trp) である ; および  
 X1 - X2 - X3 - Cys - X5 - X6 - X7 - X8 - Ser - Gly - Pro - X1  
 2 - X13 - X14 - X15 - Cys - X17 - X18 - X19 (配列番号 1 ; MTN 1  
 3)、  
 ここで、  
 X1 は Arg、Glu、His、Ser、もしくは Trp であり ;  
 X2 は Asn、Asp、Leu、Phe、Thr、もしくは Val であり ;  
 X3 は Arg、Asp、Glu、His、Lys、もしくは Thr であり ;  
 X5 は Asp、Glu、His、もしくは Thr であり ;  
 X6 は Arg、His、Lys、もしくは Phe であり 30  
 X7 は Gln、Ile、Lys、Tyr、もしくは Val であり ;  
 X8 は Gln、Ile、Leu、Met、もしくは Phe であり ;  
 X12 は Asn、Asp、Gly、His、もしくは Tyr であり ;  
 X13 は Gln、Gly、Ser、もしくは Thr であり ;  
 X14 は Glu、Lys、Phe、もしくは Ser であり ;  
 X15 は Glu、Ile、Ser、もしくは Val であり ;  
 X17 は Glu、Gly、Lys、Phe、Ser、もしくは Val であり ;  
 X18 は Arg、Asn、Ser、もしくは Tyr であり ; そして  
 X19 は Asp、Gln、Glu、Gly、Met、もしくは Tyr である。

【請求項 78】

以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つを含む、KDR または VEGF / KDR 複合体に  
 結合する能力を有する多量体ポリペプチド構築物 :

Z1 - X1 - X2 - X3 - X4 - X5 - Z2 (Lin 20) ;

ここで、

Z1 は少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在せず ;

X1 は Ala、Asp、Gln、もしくは Glu (好ましくは Gln または Glu) であり ;

X2 は Ala、Asp、Gln、Glu、Pro (好ましくは Asp、Glu、または Gln) であり ;

X3 は Ala、Leu、Lys、Phe、Pro、Trp、もしくは Tyr (好ましくは 50

Trp、Tyr、Phe、またはLeu)であり；  
 X4はAsp、Leu、Ser、Trp、Tyr、もしくはVal(好ましくはTyr、  
 Trp、Leu、またはVal)であり；  
 X5はAla、Arg、Asp、Glu、Gly、Leu、Trp、もしくはTyr(好  
 ましくはTrp、TyrまたはLeu)であり；そして  
 Z2は少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない；または  
 X1 - X2 - X3 - Tyr - Trp - Glu - X7 - X8 - X9 - Leu (Lin20  
 ; 配列番号7)；  
 ここで、配列(配列番号7；Lin20)は場合によりN末端ポリペプチド、C末端ポリ  
 ペプチド、または両末端において少なくとも1つのアミノ酸のポリペプチドを有すること  
 10  
 ができ；

ここで、

X1はAsp、Gly、もしくはSer(好ましくはGly)であり；  
 X2はIle、Phe、もしくはTyrであり；  
 X3はAla、Ser、もしくはValであり；  
 X7はGln、Glu、Ile、もしくはValであり；  
 X8はAla、Ile、もしくはVal(好ましくはIleまたはVal)であり；  
 X9はAla、Glu、Val、もしくはThrである。

【請求項79】

配列番号20～86、87～136、187～192、193～203、および207  
 ~259から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、請求項77に  
 20  
 記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項80】

配列番号137～186から成る群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含  
 む、請求項78に記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項81】

少なくとも1つのアミノ酸配列が1以上のアミノ酸のN末端および/またはC末端フラ  
 ンキングペプチドをさらに含む、請求項76、77または78のいずれか1項に記載の多  
 量体ポリペプチド構築物。

【請求項82】

少なくとも1つのアミノ酸配列が、アミノ酸置換、およびアミド結合置換、D-アミノ  
 酸置換、グリコシル化アミノ酸、ジスルフィド様置換、アミノ酸転位、レトロインベルソ  
 ペプチド、ペプトイド、レトロ-インベルソペプトイド、ならびに合成ペプチドから成る  
 群より選択される改変を含む、請求項76、77または78のいずれかに記載の多量体ポ  
 リペプチド構築物。

30

【請求項83】

検出可能な標識または治療薬に結合し、場合によりポリペプチドと検出可能な標識また  
 は治療薬との間にリンカーまたはスペーサーをさらに含む、請求項76、77または78  
 のいずれか1つに記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項84】

検出可能な標識または治療薬が：酵素、蛍光化合物、リポソーム、光学色素、常磁性金  
 属イオン、超音波造影剤および放射性核種から成る群より選択される、請求項83に記載  
 の多量体ポリペプチド構築物。

40

【請求項85】

治療薬または検出可能な標識が放射性核種を含む、請求項84に記載の多量体ポリペ  
 チド構築物。

【請求項86】

放射性核種が：<sup>18</sup>F、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>77</sup>Br、<sup>76</sup>B  
 r、<sup>99m</sup>Tc、<sup>51</sup>Cr、<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>47</sup>Sc、<sup>51</sup>Cr、<sup>167</sup>Tm、<sup>1</sup>  
<sup>41</sup>Ce、<sup>111</sup>In、<sup>168</sup>Yb、<sup>175</sup>Yb、<sup>140</sup>La、<sup>90</sup>Y、<sup>88</sup>Y、<sup>153</sup>  
 50

$^{166}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{165}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{203}\text{Pb}$ 、 $^{211}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{214}\text{Bi}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{198}\text{Au}$ および $^{199}\text{Au}$ から成る群より選択される、請求項85に記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項87】

治療薬または検出可能な標識がキレート剤をさらに含む、請求項86に記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項88】

キレート剤が：式20、21、22、23a、23b、24a、24b、および25から成る群より選択される化合物を含む、請求項87に記載の多量体ポリペプチド構築物。 10

【請求項89】

放射性核種が $^{99\text{m}}\text{Tc}$ または $^{111}\text{In}$ である、請求項87に記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項90】

放射性核種が： $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ および $^{166}\text{Ho}$ から成る群より選択される、請求項87に記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項91】

検出可能な標識が超音波造影剤を含む、請求項84に記載の多量体ポリペプチド構築物。 20

【請求項92】

超音波造影剤がリン脂質安定化マイクロバブル、または気体を含むマイクロバルーンを含む、請求項91に記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項93】

超音波造影剤がフッ素化ガスを含む、請求項91に記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項94】

検出可能な標識が常磁性金属イオンおよびキレート剤を含む、請求項84に記載の多量体ポリペプチド構築物。

【請求項95】

治療薬が：生理活性物質、細胞毒性物質、薬物、化学療法剤または放射線療法剤から成る群より選択される、請求項84に記載の多量体ポリペプチド構築物。 30

【請求項96】

以下のアミノ酸配列の1つを含み、そして場合により1以上のアミノ酸のN末端および/またはC末端フランキングペプチドをさらに含む、少なくとも1つのKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを含む超音波造影剤：

X1 - X2 - X3 - Cys - X5 - X6 - X7 - X8 - X9 - X10 - Cys - X12 - X13 - X14 (TN8)、

ここで、

X1はAla、Arg、Asp、Gly、His、Leu、Lys、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり； 40

X2はAsn、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり；

X3はAsn、Asp、Gln、Glu、Ile、Leu、Met、Thr、Trp、もしくはValであり；

X5はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyrであり；

X6はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

X7はAla、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、P 50

he、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり；  
 X8はAla、Asp、Glu、Gly、Leu、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyrであり；  
 X9はArg、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり；  
 X10はAla、Arg、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、TrpもしくはTyrであり；  
 X12はArg、Asp、Cys、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり；  
 X13はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、もしくはTyrであり；そして  
 X14はGln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyrである；または  
 X1 - X2 - X3 - Cys - X5 - X6 - X7 - X8 - X9 - X10 - X11 - X12 - X13 - X14 - Cys - X16 - X17 - X18 (TN12)、  
 ここで、  
 X1はAla、Asn、Asp、Gly、Leu、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsn、Asp、Pro、またはTyr）であり；  
 X2はAla、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsp、Gly、Pro、Ser、またはTrp）であり；  
 X3はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはTrp）であり；  
 X5はArg、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlu、Ile、またはTyr）であり；  
 X6はAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、Phe、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはGlu、Phe、またはTyr）であり；  
 X7はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlu）であり；  
 X8はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlnまたはSer）であり；  
 X9はAsp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsp）であり；  
 X10はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはLysまたはSer）であり；  
 X11はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlyまたはTyr）であり；  
 X12はAla、Arg、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはTrpまたはThr）であり；  
 X13はArg、Gln、Glu、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、もしくはVal（好ましくはGluまたはTrp）であり；  
 X14はArg、Asn、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはPhe）であり；  
 X16はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはAsp）であり；

X 1 7 は A r g、A s n、A s p、C y s、G l y、H i s、P h e、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r (好ましくは P r o または T y r) であり；

X 1 8 は A l a、A s n、A s p、G l y、H i s、L e u、P h e、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r (好ましくは A s n、P r o または T r p) である；または  
X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - G l y - X 9 - C y s - X 1 1 - X 1 2 - X 1 3 (T N 7)、

ここで、

X 1 は G l y もしくは T r p であり；

X 2 は I l e、T y r、もしくは V a l であり；

X 3 は G l n、G l u、T h r、もしくは T r p であり；

X 5 は A s n、A s p、もしくは G l u であり；

X 6 は G l u、H i s、L y s、もしくは P h e であり；

X 7 は A s p、G l n、L e u、L y s、M e t、もしくは T y r であり；

X 9 は A r g、G l n、L e u、L y s、もしくは V a l であり；

X 1 1 は A r g、P h e、S e r、T r p、もしくは V a l であり；

X 1 2 は G l u、H i s、もしくは S e r であり；そして

X 1 3 は G l u、G l y、T r p、もしくは T y r である；または

X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 - X 1 0 - X 1 1 - C y s - X 1 3 - X 1 4 - X 1 5 (T N 9)、

ここで、

X 1 は A r g、A s p、G l y、I l e、M e t、P r o、もしくは T y r (好ましくは T y r) であり；

X 2 は A s p、G l y、H i s、P r o もしくは T r p (好ましくは G l y または T r p) であり；

X 3 は G l y、P r o、P h e、T h r、もしくは T r p (好ましくは P r o) であり；

X 5 は A l a、A s p、L y s、S e r、T r p、もしくは V a l (好ましくは L y s) であり；

X 6 は A s n、G l u、G l y、H i s、もしくは L e u であり；

X 7 は G l n、G l u、G l y、M e t、L y s、P h e、T y r、もしくは V a l (好ましくは好ましくは M e t) であり；

X 8 は A l a、A s n、A s p、G l y、L e u、M e t、P r o、S e r、もしくは T h r であり；

X 9 は H i s、P r o、もしくは T r p (好ましくは P r o) であり；

X 1 0 は A l a、G l y、H i s、L e u、T r p、もしくは T y r (好ましくは H i s または T r p) であり；

X 1 1 は A l a、A s p、G l n、L e u、M e t、T h r、もしくは T r p であり；

X 1 3 は A l a、L y s、S e r、T r p、もしくは T y r (好ましくは T r p) であり；

X 1 4 は A s p、G l y、L e u、H i s、M e t、T h r、T r p、もしくは T y r (好ましくは H i s、T r p、または T y r) であり；そして

X 1 5 は A s n、G l n、G l u、L e u、M e t、P r o、もしくは T r p (好ましくは G l u、M e t、または T r p) である；または

X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - S e r - G l y - P r o - X 1 2 - X 1 3 - X 1 4 - X 1 5 - C y s - X 1 7 - X 1 8 - X 1 9 (配列番号 1；M T N 1 3)、

ここで、

X 1 は A r g、G l u、H i s、S e r、もしくは T r p であり；

X 2 は A s n、A s p、L e u、P h e、T h r、もしくは V a l であり；

X 3 は A r g、A s p、G l u、H i s、L y s、もしくは T h r であり；

X 5 は A s p、G l u、H i s、もしくは T h r であり；

X 5 は A s p、G l u、H i s、もしくは T h r であり；

10

20

30

40

50

X 6はA r g、H i s、L y s、もしくはP h eであり  
 X 7はG l n、I l e、L y s、T y r、もしくはV a lであり；  
 X 8はG l n、I l e、L e u、M e t、もしくはP h eであり；  
 X 1 2はA s n、A s p、G l y、H i s、もしくはT y rであり；  
 X 1 3はG l n、G l y、S e r、もしくはT h rであり；  
 X 1 4はG l u、L y s、P h e、もしくはS e rであり；  
 X 1 5はG l u、I l e、S e r、もしくはV a lであり；  
 X 1 7はG l u、G l y、L y s、P h e、S e r、もしくはV a lであり；  
 X 1 8はA r g、A s n、S e r、もしくはT y rであり；そして  
 X 1 9はA s p、G l n、G l u、G l y、M e t、もしくはT y rである、  
 ここで、少なくとも1つのポリペプチドは、気体で満たされたマイクロ小胞または気体で  
 満たされたマイクロ小胞を作製するのに有用な物質に結合する。

10

【請求項97】

気体で満たされたマイクロ小胞がリン脂質安定化マイクロバブルまたはマイクロバルーンを含む、請求項96に記載の超音波造影剤。

【請求項98】

リン脂質安定化マイクロバブルまたはマイクロバルーンがフッ素化ガスをさらに含む、請求項97に記載の超音波造影剤。

【請求項99】

以下のアミノ酸配列の1つを含み、そして場合により1以上のアミノ酸のN末端および  
 /またはC末端フランキングペプチドをさらに含む、少なくとも1つのKDRまたはVE  
 GF/KDR複合体結合ポリペプチドを含むシンチグラフィイメージング剤：

20

X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 - X 1 0 - C y s - X 1 2  
 - X 1 3 - X 1 4 ( T N 8 )、

ここで、

X 1はA l a、A r g、A s p、G l y、H i s、L e u、L y s、P r o、S e r、T  
 h r、T r p、T y r、もしくはV a lであり；

X 2はA s n、A s p、G l u、G l y、I l e、L e u、L y s、P h e、S e r、T  
 h r、T r p、T y r、もしくはV a lであり；

X 3はA s n、A s p、G l n、G l u、I l e、L e u、M e t、T h r、T r p、も  
 しくはV a lであり；

30

X 5はA l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、H i s、I l e、L y s、P  
 h e、P r o、S e r、T r p、もしくはT y rであり；

X 6はA l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L  
 y s、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくはV a lであ  
 り；

X 7はA l a、A s n、A s p、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、P  
 h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくはV a lであり；

X 8はA l a、A s p、G l u、G l y、L e u、P h e、P r o、S e r、T h r、T  
 r p、もしくはT y rであり；

40

X 9はA r g、G l n、G l u、G l y、I l e、L e u、M e t、P r o、T h r、T  
 r p、T y rもしくはV a lであり；

X 1 0はA l a、A r g、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、  
 M e t、P h e、T r pもしくはT y rであり；

X 1 2はA r g、A s p、C y s、G l n、G l u、H i s、I l e、L e u、L y s、  
 M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y rもしくはV a lであり；

X 1 3はA r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、  
 L y s、M e t、P h e、S e r、T h r、T r p、もしくはT y rであり；そして

X 1 4はG l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、M e t、P h e、  
 P r o、S e r、T h r、T r p、もしくはT y rである；または

50

X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 - X 1 0 - X 1 1 - X 1 2  
- X 1 3 - X 1 4 - C y s - X 1 6 - X 1 7 - X 1 8 ( T N 1 2 )、

ここで、

X 1 は A l a、A s n、A s p、G l y、L e u、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは A s n、A s p、P r o、または T y r ) であり；

X 2 は A l a、A r g、A s n、A s p、G l y、H i s、P h e、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは A s p、G l y、P r o、S e r、または T r p ) であり；

X 3 は A l a、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、L e u、L y s、M e t、P h e、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは T r p ) であり； 10

X 5 は A r g、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L y s、M e t、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは G l u、I l e、または T y r ) であり；

X 6 は A l a、A r g、A s n、C y s、G l u、I l e、L e u、M e t、P h e、S e r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは G l u、P h e、または T y r ) であり；

X 7 は A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、H i s、I l e、L e u、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは G l u ) であり；

X 8 は A l a、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、M e t、P h e、P r o、S e r、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは G l n または S e r ) であり； 20

X 9 は A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは A s p ) であり；

X 1 0 は A l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、L e u、L y s、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは L y s または S e r ) であり；

X 1 1 は A l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、L y s、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは G l y または T y r ) であり；

X 1 2 は A l a、A r g、G l n、G l y、H i s、I l e、L y s、M e t、P h e、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは T r p または T h r ) であり； 30

X 1 3 は A r g、G l n、G l u、H i s、L e u、L y s、M e t、P h e、P r o、T h r、T r p、もしくは V a l ( 好ましくは G l u または T r p ) であり；

X 1 4 は A r g、A s n、A s p、G l u、H i s、I l e、L e u、M e t、P h e、P r o、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは P h e ) であり；

X 1 6 は A l a、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、L y s、M e t、P h e、S e r、T h r、T r p、T y r、もしくは V a l ( 好ましくは A s p ) であり；

X 1 7 は A r g、A s n、A s p、C y s、G l y、H i s、P h e、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは P r o または T y r ) であり；そして

X 1 8 は A l a、A s n、A s p、G l y、H i s、L e u、P h e、P r o、S e r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは A s n、P r o、または T r p ) である；または 40

X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - G l y - X 9 - C y s - X 1 1 - X 1 2 - X 1 3 ( T N 7 )、

ここで、

X 1 は G l y、もしくは T r p であり；

X 2 は I l e、T y r、もしくは V a l であり；

X 3 は G l n、G l u、T h r、もしくは T r p であり；

X 5 は A s n、A s p、もしくは G l u であり；

X 6 は G l u、H i s、L y s、もしくは P h e であり；

X 7 は A s p、G l n、L e u、L y s、M e t、もしくは T y r であり； 50

X 9 は A r g、G l n、L e u、L y s、もしくは V a l であり；  
 X 1 1 は A r g、P h e、S e r、T r p、もしくは V a l であり；  
 X 1 2 は G l u、H i s、もしくは S e r であり；そして  
 X 1 3 は G l u、G l y、T r p、もしくは T y r である；または  
 X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - X 9 - X 1 0 - X 1 1 - C y s  
 - X 1 3 - X 1 4 - X 1 5 ( T N 9 )、  
 ここで、  
 X 1 は A r g、A s p、G l y、I l e、M e t、P r o、もしくは T y r ( 好ましくは  
 T y r ) であり；  
 X 2 は A s p、G l y、H i s、P r o もしくは T r p ( 好ましくは G l y または T r p 10  
 ) であり；  
 X 3 は G l y、P r o、P h e、T h r、もしくは T r p ( 好ましくは P r o ) であり；  
 X 5 は A l a、A s p、L y s、S e r、T r p、もしくは V a l ( 好ましくは L y s )  
 であり；  
 X 6 は A s n、G l u、G l y、H i s、もしくは L e u であり；  
 X 7 は G l n、G l u、G l y、M e t、L y s、P h e、T y r、もしくは V a l ( 好  
 ましくは好ましくは M e t ) であり；  
 X 8 は A l a、A s n、A s p、G l y、L e u、M e t、P r o、S e r、もしくは T  
 h r であり；  
 X 9 は H i s、P r o、もしくは T r p ( 好ましくは P r o ) であり； 20  
 X 1 0 は A l a、G l y、H i s、L e u、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは H i s  
 まは T r p ) であり；  
 X 1 1 は A l a、A s p、G l n、L e u、M e t、T h r、もしくは T r p であり；  
 X 1 3 は A l a、L y s、S e r、T r p、もしくは T y r ( 好ましくは T r p ) であり  
 ；  
 X 1 4 は A s p、G l y、L e u、H i s、M e t、T h r、T r p、もしくは T y r ( 好  
 ましくは H i s、T r p、または T y r ) であり；そして  
 X 1 5 は A s n、G l n、G l u、L e u、M e t、P r o、もしくは T r p ( 好ましく  
 は G l u、M e t、または T r p ) である；または  
 X 1 - X 2 - X 3 - C y s - X 5 - X 6 - X 7 - X 8 - S e r - G l y - P r o - X 1 30  
 2 - X 1 3 - X 1 4 - X 1 5 - C y s - X 1 7 - X 1 8 - X 1 9 ( 配列番号 1；M T N 1  
 3 )、  
 ここで、  
 X 1 は A r g、G l u、H i s、S e r、もしくは T r p であり；  
 X 2 は A s n、A s p、L e u、P h e、T h r、もしくは V a l であり；  
 X 3 は A r g、A s p、G l u、H i s、L y s、もしくは T h r であり；  
 X 5 は A s p、G l u、H i s、もしくは T h r であり；  
 X 6 は A r g、H i s、L y s、もしくは P h e であり  
 X 7 は G l n、I l e、L y s、T y r、もしくは V a l であり；  
 X 8 は G l n、I l e、L e u、M e t、もしくは P h e であり； 40  
 X 1 2 は A s n、A s p、G l y、H i s、もしくは T y r であり；  
 X 1 3 は G l n、G l y、S e r、もしくは T h r であり；  
 X 1 4 は G l u、L y s、P h e、もしくは S e r であり；  
 X 1 5 は G l u、I l e、S e r、もしくは V a l であり；  
 X 1 7 は G l u、G l y、L y s、P h e、S e r、もしくは V a l であり；  
 X 1 8 は A r g、A s n、S e r、もしくは T y r であり；そして  
 X 1 9 は A s p、G l n、G l u、G l y、M e t、もしくは T y r である、  
 ここで、少なくとも 1 つのポリペプチドはシンチグラフィイメーキングに有用な放射性  
 核種と錯体を形成可能な少なくとも 1 つのキレート剤に結合する。

【請求項 100】

シンチグラフィイメージングに有用な少なくとも1つの放射性核種、および請求項99に記載のポリペプチドを含む少なくとも1つのKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分を含む、シンチグラフィイメージング剤。

【請求項101】

式20、21、22、23a、23b、24a、24b、および25から成る群より選択される少なくとも1つのキレート剤をさらに含む、請求項100に記載のシンチグラフィイメージング剤。

【請求項102】

放射性核種が $^{99m}\text{Tc}$ および $^{111}\text{In}$ から成る群より選択される、請求項101に記載のシンチグラフィイメージング剤。

10

【請求項103】

以下のアミノ酸配列の1つを含み、そして場合により1以上のアミノ酸のN末端および/またはC末端フランキングペプチドをさらに含む、少なくとも1つのKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを含む、放射線療法に有用な物質：

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - \text{Cys} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$  (TN8)、

ここで、

$X_1$  はAla、Arg、Asp、Gly、His、Leu、Lys、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり；

$X_2$  はAsn、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり；

20

$X_3$  はAsn、Asp、Gln、Glu、Ile、Leu、Met、Thr、Trp、もしくはValであり；

$X_5$  はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyrであり；

$X_6$  はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり；

$X_7$  はAla、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくはValであり；

30

$X_8$  はAla、Asp、Glu、Gly、Leu、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyrであり；

$X_9$  はArg、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Pro、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

$X_{10}$  はAla、Arg、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、TrpもしくはTyrであり；

$X_{12}$  はArg、Asp、Cys、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

$X_{13}$  はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、もしくはTyrであり；そして

40

$X_{14}$  はGln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyrである；または

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - \text{Cys} - X_{16} - X_{17} - X_{18}$  (TN12)、

ここで、

$X_1$  はAla、Asn、Asp、Gly、Leu、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsn、Asp、Pro、またはTyr）であり；

$X_2$  はAla、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくはTyr（好ましくはAsp、Gly、Pro、Ser、またはTrp）であり；

50

X<sub>3</sub> は Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Trp) であり；

X<sub>5</sub> は Arg、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Glu、Ile、または Tyr) であり；

X<sub>6</sub> は Ala、Arg、Asn、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、Phe、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Glu、Phe、または Tyr) であり；

X<sub>7</sub> は Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Glu) であり；

X<sub>8</sub> は Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Gln または Ser) であり；

X<sub>9</sub> は Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Asp) であり；

X<sub>10</sub> は Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Lys または Ser) であり；

X<sub>11</sub> は Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Gly または Tyr) であり；

X<sub>12</sub> は Ala、Arg、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Trp または Thr) であり；

X<sub>13</sub> は Arg、Gln、Glu、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、もしくは Val (好ましくは Glu または Trp) であり；

X<sub>14</sub> は Arg、Asn、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Phe) であり；

X<sub>16</sub> は Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Asp) であり；

X<sub>17</sub> は Arg、Asn、Asp、Cys、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Pro または Tyr) であり；そして

X<sub>18</sub> は Ala、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Asn、Pro、または Trp) である；または

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - Gly - X<sub>9</sub> - Cys - X<sub>11</sub> - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> (TN7)、

ここで、

X<sub>1</sub> は Gly、もしくは Trp であり；

X<sub>2</sub> は Ile、Tyr、もしくは Val であり；

X<sub>3</sub> は Gln、Glu、Thr、もしくは Trp であり；

X<sub>5</sub> は Asn、Asp、もしくは Glu であり；

X<sub>6</sub> は Glu、His、Lys、もしくは Phe であり；

X<sub>7</sub> は Asp、Gln、Leu、Lys、Met、もしくは Tyr であり；

X<sub>9</sub> は Arg、Gln、Leu、Lys、もしくは Val であり；

X<sub>11</sub> は Arg、Phe、Ser、Trp、もしくは Val であり；

X<sub>12</sub> は Glu、His、もしくは Ser であり；そして

X<sub>13</sub> は Glu、Gly、Trp、もしくは Tyr である；または

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> - Cys - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - X<sub>15</sub> (TN9)、

ここで、

X<sub>1</sub> は Arg、Asp、Gly、Ile、Met、Pro、もしくは Tyr (好ましくは

10

20

30

40

50

Tyr) であり；

X<sub>2</sub> は Asp、Gly、His、Pro、もしくは Trp (好ましくは Gly または Trp) であり；

X<sub>3</sub> は Gly、Pro、Phe、Thr、もしくは Trp (好ましくは Pro) であり；

X<sub>5</sub> は Ala、Asp、Lys、Ser、Trp、もしくは Val (好ましくは Lys) であり；

X<sub>6</sub> は Asn、Glu、Gly、His、もしくは Leu であり；

X<sub>7</sub> は Gln、Glu、Gly、Met、Lys、Phe、Tyr、もしくは Val (好ましくは Met) であり；

X<sub>8</sub> は Ala、Asn、Asp、Gly、Leu、Met、Pro、Ser、もしくは Thr であり； 10

X<sub>9</sub> は His、Pro、もしくは Trp (好ましくは Pro) であり；

X<sub>10</sub> は Ala、Gly、His、Leu、Trp、もしくは Tyr (好ましくは His または Trp) であり；

X<sub>11</sub> は Ala、Asp、Gln、Leu、Met、Thr、もしくは Trp であり；

X<sub>13</sub> は Ala、Lys、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Trp) であり；

X<sub>14</sub> は Asp、Gly、Leu、His、Met、Thr、Trp、もしくは Tyr (好ましくは His、Trp、または Tyr) であり；そして

X<sub>15</sub> は Asn、Gln、Glu、Leu、Met、Pro、もしくは Trp (好ましくは Glu、Met、または Trp) である；または 20

X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - Ser - Gly - Pro - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - X<sub>15</sub> - Cys - X<sub>17</sub> - X<sub>18</sub> - X<sub>19</sub> (配列番号 1；MTN 13)、

ここで、

X<sub>1</sub> は Arg、Glu、His、Ser、もしくは Trp であり；

X<sub>2</sub> は Asn、Asp、Leu、Phe、Thr、もしくは Val であり；

X<sub>3</sub> は Arg、Asp、Glu、His、Lys、もしくは Thr であり；

X<sub>5</sub> は Asp、Glu、His、もしくは Thr であり；

X<sub>6</sub> は Arg、His、Lys、もしくは Phe であり 30

X<sub>7</sub> は Gln、Ile、Lys、Tyr、もしくは Val であり；

X<sub>8</sub> は Gln、Ile、Leu、Met、もしくは Phe であり；

X<sub>12</sub> は Asn、Asp、Gly、His、もしくは Tyr であり；

X<sub>13</sub> は Gln、Gly、Ser、もしくは Thr であり；

X<sub>14</sub> は Glu、Lys、Phe、もしくは Ser であり；

X<sub>15</sub> は Glu、Ile、Ser、もしくは Val であり；

X<sub>17</sub> は Glu、Gly、Lys、Phe、Ser、もしくは Val であり；

X<sub>18</sub> は Arg、Asn、Ser、もしくは Tyr であり；そして

X<sub>19</sub> は Asp、Gln、Glu、Gly、Met、もしくは Tyr である、

ここで、少なくとも 1 つのポリペプチドは放射線療法に有用な放射性核種と錯体を形成可能な少なくとも 1 つのキレート剤に結合する。 40

#### 【請求項 104】

放射線療法に有用な少なくとも 1 つの放射性核種、および請求項 1 に記載のポリペプチドを含む少なくとも 1 つの KDR または VEGF / KDR 複合体結合部分を含む、放射線療法に有用な物質。

#### 【請求項 105】

式 20、21、22、23a、23b、24a、24b、および 25 から成る群より選択される少なくとも 1 つのキレート剤をさらに含む、請求項 103 に記載の放射線療法に有用な物質。

#### 【請求項 106】

放射性核種が $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ および $^{166}\text{Ho}$ から成る群より選択される、請求項103に記載の放射線療法に有用な物質。

【請求項107】

組成物が治療薬をさらに含む、請求項49に記載の方法。

【請求項108】

2つの側鎖間にアミド結合を導入することにより形成される環状ポリペプチドを含む、KDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する能力を有するポリペプチドまたは多量体ポリペプチド構築物を合成する方法。

【請求項109】

セリン、スレオニンおよびホモセリンから成る群より選択される少なくとも1つのグリコシル化アミノ酸を含むポリペプチドまたはリンカーを含む、KDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する能力を有するポリペプチドまたは多量体ポリペプチド構築物を合成する方法。 10

【請求項110】

D1、2、D3、D4、D5、D8、D9、D10、D11、D12、D13、D14、D15、D16、D17、D18、D19、D20、D21、D22、D23、D24、D25、D26およびD27から成る群より選択される、KDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する能力を有する多量体ポリペプチド構築物を合成する方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

20

【0001】

関連出願

本出願は2002年3月1日に出願された米国仮出願第60/360,851号および2003年1月15日に出願された米国仮出願第60/440,411号に基づく利益を主張する。

【0002】

発明の背景

成長中の胚では、主要な血管ネットワークは脈管形成と呼ばれる過程において中胚葉細胞の*in situ*での分化により確立される。しかし胚の脈管形成後、胚または成体におけるその後のすべての新しい血管の生成は血管新生と呼ばれる過程における現存の血管からの新しい毛細血管の成長または分離により支配される(Pepper, M, et al., 1996. *Enzyme Protein*, 49: 138-162; Risau, W., 1997. *Nature*, 386: 671-674)。血管新生は胚の成長ならびに正常組織の成長および修復に関与するだけでなく、女性の生殖周期、妊娠の確立および維持、ならびに創傷および骨折の修復にも関与する。正常な個体において起こる血管新生に加えて、血管形成事象は多数の病的過程、とりわけ腫瘍増殖および転移、ならびに糖尿病性網膜症、乾癬、および関節疾患のような、血管増殖が増大する他の状態にも関与する。過形成性から腫瘍形成性増殖への腫瘍の転換に血管新生は非常に重要であるため、血管新生の障害が有効な癌治療となっている(Kim, K. et al., 1993. *Nature*, 362: 841-844)。 30

40

【0003】

腫瘍誘発血管新生は腫瘍細胞による前血管新生増殖因子の産生に依存し、それは現存する血管を静止および安定に保つ傾向がある他の影響力を圧倒する(Hanahan, D. and Folkman, J., 1996. *Cell*, 86: 353-364)。これらの前血管新生因子の中で最も性状が解析されているものは血管内皮増殖因子(VEGF)である(Neufeld, G. et al., 1999. *FASEB J.*, 13: 9-22)。

【0004】

VEGFは低酸素およびいくつかの他の刺激に反応して多様な細胞型により本来産生される。また、多くの腫瘍も多量のVEGFを産生し、および/または近くの間質細胞を誘 50

導してVEGFを産生させる(Fukumura, D. et al., 1998. Cell, 94: 715-725)。VEGFはVEGF-Aとも表し、5種の異なるスプライスアイソフォームの121、145、165、189、および206アミノ酸として合成される。VEGF<sub>121</sub>およびVEGF<sub>165</sub>はとりわけ腫瘍において産生される主要な型である(Neufeld, G. et al., 1999, 上記を参照されたい)。VEGF<sub>121</sub>はVEGF遺伝子のエクソン6および7によりコードされる塩基性ドメインを欠失し、VEGF<sub>165</sub>とは異なり、ヘパリンまたは細胞外マトリックスに結合しない。

#### 【0005】

VEGFファミリーメンバーは主に受容体チロシンキナーゼに結合することにより作用する。一般に、受容体チロシンキナーゼは1以上の具体的な成長因子に結合できる細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン(通常ヘリックス)、膜近接ドメイン(ここで受容体は、たとえばリン酸化により調節されてよい)、チロシンキナーゼドメイン(受容体の触媒成分)、および多くの受容体においてチロシンキナーゼの基質の認識および結合に参与するカルボキシ末端尾部を有する糖タンパク質である。これらはVEGFに結合することが既知の3種の内皮細胞特異的受容体チロシンキナーゼ: VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(KDRまたはFlk-1)、およびVEGFR-3(Flt4)である。Flt-1およびKDRは主要な高親和性VEGF受容体として同定されている。Flt-1はVEGFに対してより高い親和性を有するが、KDRは内皮細胞でより豊富に発現する(Bikfalvi, A. et al., 1991. J. Cell. Physiol., 149: 50-59)。さらに、KDRは血管新生反応を支配すると考えられ、そのためより高い治療的および診断的関心事である(Neufeld, G. et al., 1999, 上記を参照されたい)。KDRの発現は、新生血管、とりわけ強い血管新生反応を誘発する腫瘍において非常にアップレギュレーションされている(Veikkola, T. et al., 2000. Cancer Res., 60: 203-212)。

#### 【0006】

KDRはその成熟型では1336アミノ酸からなる。グリコシル化のために、SDS-PAGEゲル上で約205kDaの見かけの分子量として移動する。KDRはその細胞外ドメイン中に7つのイムノグロブリン様ドメインを含み、そのうちはじめの3つがVEGF結合において最も重要である(Neufeld, G. et al., 1999, 上記を参照されたい)。VEGF自体は同時に2つのKDR分子に結合することができるホモ二量体である。その結果として、2つのKDR分子が結合時に二量体になり、自己リン酸化され、はるかに活性になる。次に上昇したキナーゼ活性はVEGFのKDR特異的生物学的作用が介在するシグナル伝達経路を開始する。

#### 【0007】

上記より、KDRのVEGF結合活性が*in vivo*での血管新生に重要であるだけでなく、内皮細胞においてKDRアップレギュレーションを検出し、またはVEGF/KDR結合複合体を検出する能力が、悪性腫瘍増殖検出のような具体的な診断的適用を含む、血管新生の検出またはモニタリングにおいてきわめて好都合であろうということを理解することができる。また、腫瘍部位に殺腫瘍剤もしくは血管新生阻害剤を導くか、またはKDR、VEGF/KDR、または血管新生アゴニストを所望の部位に標的化するような治療的適用において好都合であろう。

#### 【発明の開示】

#### 【0008】

##### 発明の概要

本発明は、血管内皮増殖因子(VEGF)に対する内皮細胞上の主要受容体、すなわち血管内皮増殖因子受容体-2(VEGFR-2、キナーゼドメイン領域(KDR)および胎児肝キナーゼ-1(Flk-1)としても公知)を検出し標的にすること、およびVEGFおよびKDRにより形成される複合体を画像化し標的にすることに有用なポリペプチドおよび組成物に関する。血管新生にVEGFおよびKDRが関与することは、たとえば新生物性腫瘍のような血管新生の重要な部位の画像化、たとえば放射線治療薬を含む治療

薬のような物質のそのような部位への標的化、および不適切な血管新生に関連したある種の疾患状態を含む、そのような状態の治療に、本発明の V E G F および K D R 結合ポリペプチドをとりわけ有用にする。

【 0 0 0 9 】

K D R または V E G F / K D R 複合体に結合する一群のポリペプチド（本明細書では「K D R 結合ポリペプチド」または「K D R 結合部分」およびその相同体として表す）が見出されている。そのような K D R および V E G F / K D R 結合ポリペプチドは、血管新生部位において濃縮され、新生物性腫瘍増殖部位を含む活発な血管新生部位を検出し、そして画像化するための手段を提供するであろう。そのような K D R および V E G F / K D R 結合ポリペプチドは、たとえば血管新生を阻害するかまたは促進するための新規治療薬を提供する。たとえば造影剤としてまたは K D R もしくは V E G F / K D R - 指向性治療薬の融合パートナーとしてのそのようなポリペプチドの調製、使用およびスクリーニングが本明細書に詳細に記載される。

10

【 0 0 1 0 】

たとえば血管新生を検出し、部位を限定し、測定し、あるいは阻害するための改善された物質および方法に関する必要性に答えるために、本発明者らは驚くべくことに K D R または V E G F / K D R 複合体に特異的に結合する、非天然の 7 種のポリペプチドファミリーを現在発見している。そのようなポリペプチドの適切な標識は、たとえば K D R 発現内皮細胞または V E G F / K D R 複合体を提示する細胞に高濃度で結合することができる検出可能な造影剤を提供し、血管新生特異的造影剤を提供する。したがって、本発明の K D R および V E G F / K D R 結合ポリペプチドは、そのような血管新生関連疾患の検出および診断に使用することができる。また、V E G F 阻害剤または殺腫瘍剤のような効果的な物質とそのようなポリペプチドとの結合または融合は、たとえば活発な血管新生部位に結合物または融合物を「指向」させ、それにより血管新生に関連した病的状態を治療するための効果的な手段を提供することによって病的腫瘍を治療するために使用することができる。

20

【 0 0 1 1 】

本発明は K D R または V E G F / K D R 結合ポリペプチドに関し、単量体としての、または多量体もしくはポリマー構築物での単一結合ポリペプチドの使用、および多量体もしくはポリマー構築物での 1 以上の本発明の結合ポリペプチドの使用を含む。本発明に記載の結合ポリペプチドは、ポリペプチド結合部位を保持する K D R または V E G F / K D R 複合体、またはそのフラグメントを結合し、検出し、または単離することが好都合である任意の適用において有用である。本明細書に開示された結合ポリペプチドのとりわけ好都合な用途は *in vivo* での血管新生を画像化する方法にある。該方法は、血管新生部位の検出に本発明に記載の特異的結合ポリペプチドの使用を必要とし、ここで結合ポリペプチドは核磁気共鳴画像用 ( M R I ) 造影剤、X 線造影剤、放射線医薬品造影剤、超音波造影剤、および光造影剤を含む、造影剤として使用するために検出可能に標識されている。

30

【 0 0 1 2 】

本明細書に開示された K D R および V E G F / K D R 複合体結合ポリペプチドの他の好都合な使用は、血管新生部位または K D R を発現する他の組織に、治療薬（治療、放射線治療、または細胞毒性効果を提供可能な化合物を含む）、または治療薬（薬物、遺伝物質などを含む）の送達ビヒクルを標的化することである。

40

【 0 0 1 3 】

2 以上の K D R または V E G F / K D R 結合ポリペプチドを含む構築物は、対応する単量体結合ポリペプチドと比較して、標的分子への改善された結合能力を示す。たとえば、実施例 5 に示すように、本明細書に提供された K D R 結合ポリペプチドの四量体構築物は、K D R を形質移入した 2 9 3 H 細胞に結合するための改善された能力を示した。単一分子構築物中に 2 以上の結合ポリペプチドを組み合わせると、K<sub>D</sub> の減少により示されるように、単量体結合ポリペプチド以上に構築物の結合活性を改善すると考えられる。

50

## 【0014】

さらに、本明細書に示すように、KDRおよび/またはKDR/VEGFの異なるエピトープに特異的な2以上の結合ポリペプチドを含む構築物(たとえば、「ヘテロマー」または「ヘテロ多量体」構築物、米国特許出願第60/440,201号、およびそれと共に出願された代理人整理番号50203/01004号を有する出願を参照されたい。それぞれの内容は本明細書に援用される)を作製した。本明細書に提供される2以上の結合ポリペプチドを含む構築物は、KDRまたはVEGF/KDR上の複数の部位をブロックすることが予想される。ヘテロマー構築物は、対応する単量体、および同一結合ポリペプチドの複数のコピーを含む多量体構築物によりも優れた結合能力を示す。さらに、異なるエピトープに特異的な2以上の結合ペプチドと対照ペプチドと一緒に含むヘテロマー構築物もKDRを形質移入した293H細胞に効率的に結合することが可能であった。したがって、異なるエピトープを認識する2以上の結合ポリペプチドの含有は、K<sub>D</sub>の減少により示されるように、標的分子への構築物の結合活性をさらに改善する。

10

## 【0015】

本明細書に提供される結合ポリペプチドのヘテロマー構築物は受容体チロシンキナーゼ機能を阻害するための改善された能力を示す。本明細書に記載された実施例に基づき、KDRおよび/またはKDR/VEGFの異なるエピトープに特異的な少なくとも2種の結合ポリペプチドを含む本発明の二量体および他の多量体構築物は、受容体チロシンキナーゼの機能を阻害すると予想される。とりわけ、そのような構築物はVEGF-2/KDR、VEGF-1/Flt-1およびVEGF-3/Flt-4の機能を阻害すると予想される。

20

## 【0016】

本発明の目的のために、受容体チロシンキナーゼ機能は：受容体のオリゴマー化、受容体リン酸化、受容体のキナーゼ活性、下流シグナル伝達分子の動員、遺伝子の誘導、細胞増殖の誘導、細胞遊走の誘導、またはその組み合わせのいずれか1つを含むことができる。たとえば、本明細書に提供される結合ポリペプチドのヘテロマー構築物は、KDR受容体のVEGF誘導リン酸化の阻害により示されるように、ヒト内皮細胞においてVEGF誘導KDR受容体活性化を阻害する。さらに、本明細書に提供される結合ペプチドのヘテロマー構築物はVEGFで刺激される内皮細胞遊走を阻害する。本明細書に示すように、単一結合構築物によるKDR上の2以上の異なるエピトープへの標的化は受容体機能を阻害する構築物の能力を著しく改善する。受容体活性をブロックする能力が弱い結合ペプチドでさえ、VEGF誘導受容体機能をブロックする能力が改善されたヘテロマー構築物を作製するために使用することができる。

30

## 【0017】

したがって、本発明は2以上の結合ポリペプチドを含む構築物について記載する。一つの態様では、多量体構築物は単一結合ポリペプチドの2以上のコピーを含む。他の態様では、本発明の多量体構築物は、2以上の結合ポリペプチドを含み、構築物中の少なくとも2つの結合ポリペプチドはKDRまたはKDR/VEGF上の異なるエピトープに特異的である。これらの構築物は本明細書で「ヘテロマー構築物」「ヘテロ多量体」などとも呼ばれる。また、本発明の構築物は関連のないまたは対照のペプチドを包含してもよい。該構築物は2以上、3以上、または4以上の結合ポリペプチドを包含してもよい。本明細書に提供される教示に基づき、当業者は本明細書に提供される結合ポリペプチドを多量体構築物に組み立て、改善された特性、たとえば標的分子を結合するための改善された能力、または受容体チロシンキナーゼ機能を阻害するための改善された能力を有する多量体構築物を選択することができる。そのような改善された特性を有する多量体構築物は本発明に包含される。

40

## 【0018】

コンセンサス配列(1~14)は表1~7に示される具体的KDRおよびVEGF/KDR結合ポリペプチドに基づいて決定されている。具体的態様において、本発明のKDRおよびVEGF/KDR結合ポリペプチドは1以上のこれらの配列を含む。そのような好ま

50

しいKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、以下のコンセンサス配列1～5から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいはそれから成る、不変システイン残基間に環状構造またはループ構造を形成する可能性を有するポリペプチドを包含する：

コンセンサス配列1：X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - Cys - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> (TN8)、ここで、

X<sub>1</sub> はAla、Arg、Asp、Gly、His、Leu、Lys、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

X<sub>2</sub> はAsn、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

X<sub>3</sub> はAsn、Asp、Gln、Glu、Ile、Leu、Met、Thr、TrpもしくはValであり； 10

X<sub>5</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Ser、TrpもしくはTyrであり；

X<sub>6</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

X<sub>7</sub> はAla、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

X<sub>8</sub> はAla、Asp、Glu、Gly、Leu、Phe、Pro、Ser、Thr、TrpもしくはTyrであり； 20

X<sub>9</sub> はArg、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Pro、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

X<sub>10</sub> はAla、Arg、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、TrpもしくはTyrであり；

X<sub>12</sub> はArg、Asp、Cys、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはValであり；

X<sub>13</sub> はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、TrpもしくはTyrであり；そして

X<sub>14</sub> はGln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、TrpもしくはTyrである、 30

ここで、ポリペプチドはKDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する；または

コンセンサス配列2：X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - Cys - X<sub>16</sub> - X<sub>17</sub> - X<sub>18</sub> (TN12)、ここで、

X<sub>1</sub> はAla、Asn、Asp、Gly、Leu、Pro、Ser、TrpもしくはTyr（好ましくはAsn、Asp、Pro、またはTyr）であり；

X<sub>2</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Pro、Ser、TrpもしくはTyr（好ましくはAsp、Gly、Pro、Ser、またはTrp）であり；

X<sub>3</sub> はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはTrp）であり； 40

X<sub>5</sub> はArg、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはGlu、IleまたはTyr）であり；

X<sub>6</sub> はAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、Phe、Ser、TrpもしくはTyr（好ましくはGlu、PheまたはTyr）であり；

X<sub>7</sub> はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはGlu）であり；

X<sub>8</sub> はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Met、Phe、P 50

r o、S e r、T r p、T y rもしくはV a l（好ましくはG l nまたはS e r）であり；

X<sub>9</sub>はA s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r pもしくはT y r（好ましくはA s p）であり；

X<sub>10</sub>はA l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、L e u、L y s、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T r p、T y rもしくはV a l（好ましくはL y sまたはS e r）であり；

X<sub>11</sub>はA l a、A r g、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、L y s、T r p、T y rもしくはV a l（好ましくはG l yまたはT y r）であり；

X<sub>12</sub>はA l a、A r g、G l n、G l y、H i s、I l e、L y s、M e t、P h e、S e r、T h r、T r p、T y rもしくはV a l（好ましくはT r pまたはT h r）であり； 10

X<sub>13</sub>はA r g、G l n、G l u、H i s、L e u、L y s、M e t、P h e、P r o、T h r、T r pもしくはV a l（好ましくはG l uまたはT r p）であり；

X<sub>14</sub>はA r g、A s n、A s p、G l u、H i s、I l e、L e u、M e t、P h e、P r o、T h r、T r p、T y rもしくはV a l（好ましくはP h e）であり；

X<sub>16</sub>はA l a、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、L y s、M e t、P h e、S e r、T h r、T r p、T y rもしくはV a l（好ましくはA s p）であり；

X<sub>17</sub>はA r g、A s n、A s p、C y s、G l y、H i s、P h e、P r o、S e r、T r pもしくはT y r（好ましくはP r oまたはT y r）であり；そして 20

X<sub>18</sub>はA l a、A s n、A s p、G l y、H i s、L e u、P h e、P r o、S e r、T r pもしくはT y r（好ましくはA s n、P r oまたはT r p）である、

ここで、ポリペプチドはK D RまたはV E G F / K D R複合体に結合する；または

コンセンサス配列3：X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - C y s - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - G l y - X<sub>9</sub> - C y s - X<sub>11</sub> - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub>（T N 7）、ここで、

X<sub>1</sub>はG l yもしくはT r pであり；

X<sub>2</sub>はI l e、T y rもしくはV a lであり；

X<sub>3</sub>はG l n、G l u、T h rもしくはT r pであり；

X<sub>5</sub>はA s n、A s pもしくはG l uであり；

X<sub>6</sub>はG l u、H i s、L y sもしくはP h eであり； 30

X<sub>7</sub>はA s p、G l n、L e u、L y s、M e tもしくはT y rであり；

X<sub>9</sub>はA r g、G l n、L e u、L y sもしくはV a lであり；

X<sub>11</sub>はA r g、P h e、S e r、T r pもしくはV a lであり；

X<sub>12</sub>はG l u、H i sもしくはS e rであり；そして

X<sub>13</sub>はG l u、G l y、T r pもしくはT y rである、

ここで、ポリペプチドはK D RまたはV E G F / K D R複合体に結合する；または

コンセンサス配列4：X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - C y s - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> - C y s - X<sub>13</sub> - X<sub>14</sub> - X<sub>15</sub>（T N 9）、

ここで、

X<sub>1</sub>はA r g、A s p、G l y、I l e、M e t、P r oもしくはT y r（好ましくはT y r）であり； 40

X<sub>2</sub>はA s p、G l y、H i s、P r oもしくはT r p（好ましくはG l yまたはT r p）であり；

X<sub>3</sub>はG l y、P r o、P h e、T h rもしくはT r p（好ましくはP r o）であり；

X<sub>5</sub>はA l a、A s p、L y s、S e r、T r pもしくはV a l（好ましくはL y s）であり；

X<sub>6</sub>はA s n、G l u、G l y、H i sもしくはL e uであり；

X<sub>7</sub>はG l n、G l u、G l y、M e t、L y s、P h e、T y rもしくはV a l（好ましくは好ましくはM e t）であり；

X<sub>8</sub>はA l a、A s n、A s p、G l y、L e u、M e t、P r o、S e rもしくはT h 50

r であり；

$X_9$  は His、Pro もしくは Trp (好ましくは Pro) であり；

$X_{10}$  は Ala、Gly、His、Leu、Trp もしくは Tyr (好ましくは His または trp) であり；

$X_{11}$  は Ala、Asp、Gln、Leu、Met、Thr もしくは Trp であり；

$X_{13}$  は Ala、Lys、Ser、Trp、もしくは Tyr (好ましくは Trp) であり；

$X_{14}$  は Asp、Gly、Leu、His、Met、Thr、Trp もしくは Tyr (好ましくは His、Trp、または Tyr) であり；そして

$X_{15}$  は Asn、Gln、Glu、Leu、Met、Pro もしくは Trp (好ましくは Glu、Met、または Trp) である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する；または

コンセンサス配列 5 :  $X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - Ser - Gly - Pro - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - Cys - X_{17} - X_{18} - X_{19}$  (MTN13 ; 配列番号 1)、ここで、

$X_1$  は Arg、Glu、His、Ser もしくは Trp であり；

$X_2$  は Asn、Asp、Leu、Phe、Thr もしくは Val であり；

$X_3$  は Arg、Asp、Glu、His、Lys もしくは Thr であり；

$X_5$  は Asp、Glu、His もしくは Thr であり；

$X_6$  は Arg、His、Lys もしくは Phe であり；

$X_7$  は Gln、Ile、Lys、Tyr もしくは Val であり；

$X_8$  は Gln、Ile、Leu、Met もしくは Phe であり；

$X_{12}$  は Asn、Asp、Gly、His もしくは Tyr であり；

$X_{13}$  は Gln、Gly、Ser もしくは Thr であり；

$X_{14}$  は Glu、Lys、Phe もしくは Ser であり；

$X_{15}$  は Glu、Ile、Ser もしくは Val であり；

$X_{17}$  は Glu、Gly、Lys、Phe、Ser、もしくは Val であり；

$X_{18}$  は Arg、Asn、Ser もしくは Tyr であり；そして

$X_{19}$  は Asp、Gln、Glu、Gly、Met もしくは Tyr である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する。

#### 【0019】

TN8 ライブラリー (コンセンサス配列 1 を参照されたい) から単離されたポリペプチドのさらなる解析は、好ましい結合ポリペプチドのサブファミリーを明らかにし、それらは以下のコンセンサス配列 6、7 および 8 に記載される：

コンセンサス配列 6 :  $X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - Tyr - Cys - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ 、ここで、

$X_1$  は Ala、Arg、Asp、Leu、Lys、Pro、Ser もしくは Val であり；

$X_2$  は Asn、Asp、Glu、Lys、Thr もしくは Ser (好ましくは Asn、Asp、Glu、または Lys) であり；

$X_3$  は Ile、Leu もしくは Trp であり；

$X_5$  は Ala、Arg、Glu、Lys もしくは Ser (好ましくは Glu) であり；

$X_6$  は Ala、Asp、Gln、Glu、Thr もしくは Val (好ましくは Asp または Glu) であり；

$X_7$  は Asp もしくは Glu であり；

$X_8$  は Trp もしくは Tyr であり；

$X_9$  は Thr もしくは Tyr (好ましくは Tyr) であり；

$X_{12}$  は Glu、Met、Phe もしくは Tyr (好ましくは Trp、Phe、Met、または Tyr) であり；

$X_{13}$  は Ile、Leu もしくは Met であり；そして

$X_{14}$  は Ile、Leu、Met、Phe もしくは Thr (好ましくは Thr または Leu) である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する ; または

コンセンサス配列 7 : Trp - Tyr - Trp - Cys -  $X_5$  -  $X_6$  -  $X_7$  - Gly -  $X_9$  -  $X_{10}$  - Cys -  $X_{12}$  -  $X_{13}$  -  $X_{14}$  (配列番号 2)、ここで、

$X_5$  は Asp、Gln もしくは His であり ;

$X_6$  は His もしくは Tyr (好ましくは Tyr) であり ;

$X_7$  は Ile、His もしくは Tyr であり ;

$X_9$  は Ile、Met もしくは Val であり ;

$X_{10}$  は Gly もしくは Tyr であり ;

$X_{12}$  は Asp、Lys もしくは Pro であり ;

$X_{13}$  は Gln、Gly もしくは Trp であり ; そして

$X_{14}$  は Phe、Ser もしくは Thr である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する ; または

コンセンサス配列 8 :  $X_1$  -  $X_2$  -  $X_3$  - Cys -  $X_5$  -  $X_6$  -  $X_7$  -  $X_8$  - Gly -  $X_{10}$  - Cys -  $X_{12}$  -  $X_{13}$  -  $X_{14}$ 、ここで、

$X_1$  は Gly、Leu、His、Thr、Trp もしくは Tyr、(好ましくは Trp、Tyr、Leu または His) であり ;

$X_2$  は Ile、Leu、Thr、Trp もしくは Val (好ましくは Val、Ile、または Leu) であり ;

$X_3$  は Asp、Glu、Gln、Trp もしくは Thr (好ましくは Glu、Asp または Gln) であり ;

$X_5$  は Ala、Arg、Asn、Asp、His、Phe、Trp もしくは Tyr (好ましくは Tyr、Trp または Phe) であり ;

$X_6$  は Ala、Asp、Gln、His、Lys、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr もしくは Val であり ;

$X_7$  は Ala、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr もしくは Val であり ;

$X_8$  は Asp、Phe、Ser、Thr、Trp もしくは Tyr (好ましくは Thr、Ser または Asp) であり ;

$X_{10}$  は Ala、Arg、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Trp もしくは Tyr (好ましくは Arg または Lys) であり ;

$X_{12}$  は Arg、Gln、His、Ile、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr もしくは Val (好ましくは Tyr、Trp、Phe、Ile、または Val) であり ;

$X_{13}$  は Arg、Asn、Asp、Glu、His、Met、Pro、Ser もしくは Thr であり ; そして

$X_{14}$  は Arg、Gln、Glu、Gly、Phe、Ser、Trp もしくは Tyr である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する。

#### 【0020】

TN12 ライブラリー (コンセンサス配列 2 を参照されたい) から単離されたポリペプチドのさらなる解析は、好ましい結合ポリペプチドのサブファミリーを明らかにし、それらは以下のコンセンサス配列 9 ~ 12 に記載される :

コンセンサス配列 9 :  $X_1$  -  $X_2$  -  $X_3$  - Cys -  $X_5$  -  $X_6$  -  $X_7$  -  $X_8$  - Trp - Gly - Gly -  $X_{12}$  -  $X_{13}$  - Cys -  $X_{15}$  -  $X_{16}$  -  $X_{17}$  (TN11、すなわち TN12 ライブラリーから単離された 11 量体結合体 ; 配列番号 3)、ここで、

$X_1$  は Ser、Phe、Trp、Tyr もしくは Gly (好ましくは Ser) であり ;

$X_2$  は Arg、Gly、Ser もしくは Trp (好ましくは Arg) であり ;

$X_3$  は Ala、Glu、Ile もしくは Val (好ましくは Val または Ile) であり

10

20

30

40

50

;

X<sub>5</sub> は Ala、Phe もしくは Trp (好ましくは Trp または Phe) であり;

X<sub>6</sub> は Glu もしくは Lys (好ましくは Glu) であり;

X<sub>7</sub> は Asp、Ser、Trp もしくは Tyr (好ましくは Asp、Trp または Tyr) であり;

X<sub>8</sub> は Phe、Pro もしくは Ser (好ましくは Ser) であり;

X<sub>12</sub> は Gln もしくは Glu (好ましくは Glu) であり;

X<sub>13</sub> は Ile、Phe もしくは Val であり;

X<sub>15</sub> は Gln、Ile、Leu、Phe もしくは Tyr (好ましくは Phe、Tyr、または Leu) であり;

X<sub>16</sub> は Arg、Gly もしくは Pro (好ましくは Arg) であり; そして

X<sub>17</sub> は Gln、His、Phe、Ser、Tyr もしくは Val (好ましくは Tyr、Phe、His または Val) である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する; または

コンセンサス配列 10: Tyr - Pro - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - Glu - X<sub>7</sub> - Ser - X<sub>9</sub> - Ser - X<sub>11</sub> - X<sub>12</sub> - X<sub>13</sub> - Phe - Cys - X<sub>16</sub> - X<sub>17</sub> - X<sub>18</sub> (TN12; 配列番号 4);、ここで、

X<sub>3</sub> は Gly もしくは Trp (好ましくは Trp) であり;

X<sub>5</sub> は His もしくは Tyr (好ましくは His、または Tyr) であり;

X<sub>7</sub> は His、Leu もしくは Thr であり;

X<sub>9</sub> は Asp もしくは Leu (好ましくは Asp) であり;

X<sub>11</sub> は Gly もしくは Val (好ましくは Val) であり;

X<sub>12</sub> は Thr もしくは Val (好ましくは Thr) であり;

X<sub>13</sub> は Arg もしくは Trp (好ましくは Arg) であり;

X<sub>16</sub> は Ala もしくは Val (好ましくは Val) であり;

X<sub>17</sub> は Asp もしくは Pro (好ましくは Pro) であり; そして

X<sub>18</sub> は Gly もしくは Trp (好ましくは Trp) である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する; または

コンセンサス配列 11: X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - Cys - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - Gly - X<sub>12</sub> - Trp - X<sub>14</sub> - Cys - X<sub>16</sub> - X<sub>17</sub> - X<sub>18</sub> (TN12; 配列番号 5);、ここで、

X<sub>1</sub> は Asp、Gly、Pro、もしくは Ser (好ましくは Asp) であり;

X<sub>2</sub> は Arg、Asn、Asp、Gly、もしくは Ser (好ましくは Asp、Asn、または Ser) であり;

X<sub>3</sub> は Gly、Thr、Trp もしくは Tyr (好ましくは Trp または Tyr) であり;

X<sub>5</sub> は Glu、Met もしくは Thr (好ましくは Glu) であり;

X<sub>6</sub> は Ile、Leu、Met もしくは Phe (好ましくは Met、Leu、または Phe) であり;

X<sub>7</sub> は Arg、Asp、Glu、Met、Trp もしくは Val であり;

X<sub>8</sub> は Asn、Gln、Gly、Ser もしくは Val であり;

X<sub>9</sub> は Asp もしくは Glu であり;

X<sub>10</sub> は Lys、Ser、Thr もしくは Val (好ましくは Lys) であり;

X<sub>12</sub> は Arg、Gln、Lys もしくは Trp (好ましくは Trp、Arg、または Lys) であり;

X<sub>14</sub> は Asn、Leu、Phe もしくは Tyr (好ましくは Tyr、Phe、または Asn) であり;

X<sub>16</sub> は Gly、Phe、Ser もしくは Tyr (好ましくは Tyr、または Phe) であり;

X<sub>17</sub> は Gly、Leu、Pro もしくは Ser (好ましくは Pro または Ser) であ

10

20

30

40

50

り；そして

$X_{18}$  は  $A l a$ 、 $A s p$ 、 $P r o$ 、 $S e r$ 、 $T r p$ 、もしくは  $T y r$  である、  
ここで、ポリペプチドは  $K D R$  または  $V E G F / K D R$  複合体に結合する；または  
コンセンサス配列 12： $A s n - T r p - X_3 - C y s - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - C y s - X_{16} - X_{17} - X_{18}$  ( $T N$   
12；配列番号 6)、ここで、

$X_3$  は  $G l u$  もしくは  $L y s$  であり；  
 $X_5$  は  $G l u$  もしくは  $G l y$  であり；  
 $X_6$  は  $T r p$  もしくは  $T y r$  であり；  
 $X_7$  は  $S e r$  もしくは  $T h r$  であり；  
 $X_8$  は  $A s n$  もしくは  $G l n$  であり；  
 $X_9$  は  $G l y$  もしくは  $M e t$  であり；  
 $X_{10}$  は  $P h e$  もしくは  $T y r$  であり；  
 $X_{11}$  は  $A s p$  もしくは  $G l n$  であり；  
 $X_{12}$  は  $L y s$  もしくは  $T y r$  であり；  
 $X_{13}$  は  $G l u$  もしくは  $T h r$  であり；  
 $X_{14}$  は  $G l u$  もしくは  $P h e$  であり；  
 $X_{16}$  は  $A l a$  もしくは  $V a l$  であり；  
 $X_{17}$  は  $A r g$  もしくは  $T y r$  であり；そして  
 $X_{18}$  は  $L e u$  もしくは  $P r o$  である、  
ここで、ポリペプチドは  $K D R$  または  $V E G F / K D R$  複合体に結合する。

#### 【0021】

線状ディスプレイライブラリー ( $L i n 20$ ) から単離された結合ポリペプチドの解析は、以下のコンセンサス配列 13 および 14 のアミノ酸配列を含む好ましい態様の 2 種のファミリーを明らかにした：

コンセンサス配列 13： $Z_1 - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - Z_2$  ( $L i n 20$ )、  
ここで、

$Z_1$  は少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在せず；  
 $X_1$  は  $A l a$ 、 $A s p$ 、 $G l n$  もしくは  $G l u$  (好ましくは  $G l n$  または  $G l u$ ) であり；  
 $X_2$  は  $A l a$ 、 $A s p$ 、 $G l n$ 、 $G l u$ 、 $P r o$  (好ましくは  $A s p$ 、 $G l n$  または  $G l u$ ) であり；  
 $X_3$  は  $A l a$ 、 $L e u$ 、 $L y s$ 、 $P h e$ 、 $P r o$ 、 $T r p$ 、もしくは  $T y r$  (好ましくは  $T r p$ 、 $T y r$ 、 $P h e$  または  $L e u$ ) であり；  
 $X_4$  は  $A s p$ 、 $L e u$ 、 $S e r$ 、 $T r p$ 、 $T y r$ 、もしくは  $V a l$  (好ましくは  $T y r$ 、 $T r p$ 、 $L e u$  または  $V a l$ ) であり；  
 $X_5$  は  $A l a$ 、 $A r g$ 、 $A s p$ 、 $G l u$ 、 $G l y$ 、 $L e u$ 、 $T r p$ 、もしくは  $T y r$  (好ましくは  $T r p$ 、 $T y r$  または  $L e u$ ) であり；そして

$Z_2$  は少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドであるか、または存在しない、  
ここで、ポリペプチドは  $K D R$  または  $V E G F / K D R$  複合体に結合する；または  
コンセンサス配列 14： $X_1 - X_2 - X_3 - T y r - T r p - G l u - X_7 - X_8 - X_9 - L e u$  ( $L i n 20$ ；配列番号 7)；ここで、配列は場合により N 末端ポリペプチド、C 末端ポリペプチド、または両末端において少なくとも 1 つのアミノ酸のポリペプチドを有することができ、ここで、

$X_1$  は  $A s p$ 、 $G l y$  もしくは  $S e r$  (好ましくは  $G l y$ ) であり；  
 $X_2$  は  $I l e$ 、 $P h e$  もしくは  $T y r$  であり；  
 $X_3$  は  $A l a$ 、 $S e r$  もしくは  $V a l$  であり；  
 $X_7$  は  $G l n$ 、 $G l u$ 、 $I l e$  もしくは  $V a l$  であり；  
 $X_8$  は  $A l a$ 、 $I l e$  もしくは  $V a l$  (好ましくは  $I l e$  または  $V a l$ ) であり；  
 $X_9$  は  $A l a$ 、 $G l u$ 、 $V a l$  もしくは  $T h r$  である、

ここで、ポリペプチドはKDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する。

【0022】

上記コンセンサス配列1を含む好ましい態様には、 $X_3$ がTrpであり、そして $X_7 \sim X_{10}$ のアミノ酸配列がAsp-Trp-Tyr-Tyr(配列番号8)であるポリペプチドが挙げられる。より好ましい構造には、コンセンサス配列1を含むポリペプチドが挙げられ、ここで $X_3$ はTrpであり、そして $X_5 \sim X_{10}$ のアミノ酸配列はGlu-Glu-Asp-Trp-Tyr-Tyr(配列番号9)である。コンセンサス配列1を含む別の好ましい配列には、 $X_3$ がTrpであり、 $X_5 \sim X_{10}$ のアミノ酸配列がGlu-Glu-Asp-Trp-Tyr-Tyr(配列番号9)であり、そしてペプチド $X_{13} \sim X_{14}$ がIle-Thrであるポリペプチドが挙げられる。これらの好ましいポリペプチドの中で、 $X_1$ がProであり、そして $X_{12}$ がPhe、TrpまたはTyrの1つであるものがさらに好ましい。

10

【0023】

上記環状ポリペプチドファミリーの具体的な態様は以下の表1、2、4、5および7に開示される。

KDRまたはVEGF/KDR標的を結合させることが見出されたさらなる環状ポリペプチドは、2つのシステイン残基間のジスルフィド結合により形成され、たとえば以下のような10アミノ酸から成る環状部分(またはループ)を有する:

Asn-Asn-Ser-Cys-Trp-Leu-Ser-Thr-Thr-Leu-Gly-Ser-Cys-Phe-Phe-Asp(配列番号10)、  
Asp-His-His-Cys-Tyr-Leu-His-Asn-Gly-Gln-Trp-Ile-Cys-Tyr-Pro-Phe(配列番号11)、  
Asn-Ser-His-Cys-Tyr-Ile-Trp-Asp-Gly-Met-Trp-Leu-Cys-Phe-Pro-Asp(配列番号12)。

20

【0024】

さらなる好ましい態様は、以下の表3に示すアミノ酸配列の群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはそれから成るKDRまたはVEGF/KDR標的を結合可能な線状ポリペプチドを包含する。

【0025】

本発明のポリペプチドは、場合によりN末端およびC末端のいずれかまたは両方に結合した付加的なアミノ酸を有していてもよい。好ましい態様において、1以上、好ましくは2アミノ酸のN末端および/またはC末端フランキングペプチドを有する本発明に記載の結合ポリペプチドを作製することができ、該アミノ酸は結合ポリペプチドが単離されたファージ選択物のディスプレイ構築物のフランキングペプチドに対応する。好ましいN末端フランキングペプチドには、Ala-Gly-(TN7、TN8、TN9配列に最も好ましい)、Gly-Ser-(TN10配列に最も好ましい)、Gly-Asp-(TN12配列に最も好ましい)、Ala-Gln-(線状配列に最も好ましい)、およびSer-Gly-(MTN13配列に最も好ましい)が挙げられる。好ましいC末端フランキングペプチドには、-Gly-Thr(TN7、TN8、TN9配列に最も好ましい)、-Ala-Pro(TN10配列に最も好ましい)、-Asp-Pro(TN12配列に最も好ましい)、-Gly-Gly(線状配列に最も好ましい)、および-Gly-Ser(MTN13配列に最も好ましい)が挙げられる。また、単一の末端アミノ酸を本発明の結合ポリペプチドに付加してもよく、そして好ましい末端アミノ酸は親ファージディスプレイ構築物に対応することになり、たとえば最も好ましくは、N末端アミノ酸はGly-(TN7、TN8、TN9、MTN13配列に最も好ましい)、Ser-(TN10配列に最も好ましい)、Asp-(TN12配列に最も好ましい)、およびGln-(線状配列に最も好ましい)から選択され、そして最も好ましいC末端アミノ酸は-Gly(TN7、TN8、TN9、MTN13および線状配列に最も好ましい)、-Ala(TN10配列に最も好ましい)、および-Asp(TN12配列に最も好ましい)から選択されることになる。そのようなフランキングアミノ酸に対する保存的置換(すなわち、以下の群

30

40

50

から選択されるアミノ酸置換：{Arg、His、Lys}、{Glu、Asp}、{Asp、Cys、Glu、Gly、Ser、Thr、Tyr}、{Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pr、Trp、Val}も企図される。

【0026】

ループ構造を形成する可能性を有するポリペプチドを含有するライブラリー（たとえば、TN7、TN8、TN9、TN10、TN12およびMTN13と呼ばれるライブラリー）の単離物由来の配列情報および結合データの検索により、ループ構造を形成することができる一連のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを同定する。具体的な態様において、本発明の環状KDRまたはVEGF/KDR結合ポリペプチドは、以下のループコンセンサス配列15～20から選択されるアミノ酸配列を包含するか、あるいはそれから成る：

ループコンセンサス配列15：Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - Cys (TN8)、ここで、

X<sub>2</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Ser、TrpもしくはTyr（好ましくはAsp、Glu、またはTyr）であり；

X<sub>3</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはGlu、MetまたはTyr）であり；

X<sub>4</sub> はAla、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはAsp）であり；

X<sub>5</sub> はAla、Asp、Glu、Gly、Leu、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、もしくはTyr（好ましくはTrpまたはThr）であり；

X<sub>6</sub> はArg、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Pro、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはGlyまたはTyr）であり；そして

X<sub>7</sub> はAla、Arg、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Trp、もしくはTyr（好ましくはLysまたはTyr）である；

ここで、ポリペプチドはKDRまたはVEGF/KDR複合体に結合する；または

ループコンセンサス配列16：Cys - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - X<sub>11</sub> - Cys (TN12)、ここで、

X<sub>2</sub> はArg、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはGlu、IleまたはTyr）であり；

X<sub>3</sub> はAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、Phe、Ser、TrpもしくはTyr（好ましくはGlu、PheまたはTyr）であり；

X<sub>4</sub> はArg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはGlu）であり；

X<sub>5</sub> はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはGlnまたはSer）であり；

X<sub>6</sub> はAsp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、TrpもしくはTyr（好ましくはAsp）であり；

X<sub>7</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはLysまたはSer）であり；

X<sub>8</sub> はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Trp、Tyr、もしくはVal（好ましくはGlyまたはTyr）であり；

X<sub>9</sub> はAla、Arg、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrもしくはVal（好ましくはTrpまたはThr）であり

;

$X_{10}$  は Arg、Gln、Glu、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp もしくは Val (好ましくは Glu または Trp) であり;そして

$X_{11}$  は Arg、Asn、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、もしくは Val (好ましくは Phe) である;

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する;または

ループコンセンサス配列 17: Cys -  $X_2$  -  $X_3$  -  $X_4$  - Gly -  $X_6$  - Cys (TN7)、ここで、

$X_2$  は Asn、Asp もしくは Glu であり;

$X_3$  は Glu、His、Lys もしくは Phe であり;

$X_4$  は Asp、Gln、Leu、Lys、Met もしくは Tyr であり;そして

$X_6$  は Arg、Gln、Leu、Lys もしくは Val である;

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する;または

ループコンセンサス配列 18: Cys -  $X_2$  -  $X_3$  -  $X_4$  -  $X_5$  -  $X_6$  -  $X_7$  -  $X_8$  - Cys (TN9)、ここで、

$X_2$  は Ala、Asp、Lys、Ser、Trp もしくは Val (好ましくは Lys) であり;

$X_3$  は Asn、Glu、Gly、His もしくは Leu であり;

$X_4$  は Gln、Glu、Gly、Met、Lys、Phe、Tyr もしくは Val (好ましくは Met) であり;

$X_5$  は Ala、Asn、Asp、Gly、Leu、Met、Pro、Ser もしくは Thr であり;

$X_6$  は His、Pro もしくは Trp (好ましくは Pro または Trp) であり;

$X_7$  は Ala、Gly、His、Leu、Trp もしくは Tyr (好ましくは Trp) であり;そして

$X_8$  は Ala、Asp、Gln、Leu、Met、Thr もしくは Trp である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する;または

ループコンセンサス配列 19: Cys -  $X_2$  -  $X_3$  -  $X_4$  -  $X_5$  - Ser - Gly - Pro -  $X_9$  -  $X_{10}$  -  $X_{11}$  -  $X_{12}$  - Cys (MTN13; 配列番号 13)、ここで、

$X_2$  は Asp、Glu、His もしくは Thr であり;

$X_3$  は Arg、His、Lys もしくは Phe であり;

$X_4$  は Gln、Ile、Lys、Tyr もしくは Val であり;

$X_5$  は Gln、Ile、Leu、Met もしくは Phe であり;

$X_9$  は Asn、Asp、Gly、His もしくは Tyr であり;

$X_{10}$  は Gln、Gly、Ser もしくは Thr であり;

$X_{11}$  は Glu、Lys、Phe もしくは Ser であり;そして

$X_{12}$  は Glu、Ile、Ser もしくは Val である、

ここで、ポリペプチドは KDR または VEGF / KDR 複合体に結合する。

#### 【0027】

ループコンセンサス配列 15 の環状ペプチドの好ましい態様には、以下のループコンセンサス配列 20 ~ 22 を含む、KDR および / または VEGF / KDR 複合体結合ポリペプチドが挙げられる:

ループコンセンサス配列 20: Cys -  $X_2$  -  $X_3$  -  $X_4$  -  $X_5$  -  $X_6$  - Tyr - Cys (TN8)、ここで、

$X_2$  は Ala、Arg、Glu、Lys もしくは Ser (好ましくは Glu) であり;

$X_3$  は Ala、Asp、Gln、Glu、Thr もしくは Val (好ましくは Asp または Glu) であり;

$X_4$  は Asp もしくは Glu であり;

$X_5$  は Trp もしくは Tyr であり;そして

$X_6$  は Thr もしくは Tyr (好ましくは Tyr) である;または

10

20

30

40

50

ループコンセンサス配列 2 1 : C y s - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - G l y - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - C y s ( T N 8 )、ここで、

X<sub>2</sub> は A s p、G l n もしくは H i s であり；

X<sub>3</sub> は H i s もしくは T y r ( 好ましくは T y r ) であり；

X<sub>4</sub> は H i s、I l e もしくは T y r であり；

X<sub>6</sub> は I l e、M e t もしくは V a l であり；そして

X<sub>7</sub> は G l y もしくは T y r である；または

ループコンセンサス配列 2 2 : C y s - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - G l y - X<sub>7</sub> - C y s ( T N 8 )、ここで、

X<sub>2</sub> は A l a、A r g、A s n、A s p、H i s、P h e、T r p もしくは T y r ( 好ましくは T y r、T r p、または P h e ) であり； 10

X<sub>3</sub> は A l a、A s p、G l n、H i s、L y s、M e t、S e r、T h r、T r p、T y r もしくは V a l であり；

X<sub>4</sub> は A l a、A s n、A s p、G l n、G l u、G l y、H i s、I l e、L e u、L y s、P r o、S e r、T h r もしくは V a l であり；

X<sub>5</sub> は A s p、P h e、S e r、T h r、T r p もしくは T y r ( 好ましくは T h r、S e r、または A s p ) であり；そして

X<sub>7</sub> は A l a、A r g、G l n、H i s、I l e、L e u、L y s、M e t、P h e、T r p もしくは T y r ( 好ましくは A r g または L y s ) である。

【 0 0 2 8 】

ループコンセンサス配列 1 6 の環状ペプチドの好ましい態様には、以下のループコンセンサス配列 2 3 ~ 2 6 の配列を含む、K D R および / または V E G F / K D R 複合体結合ポリペプチドが挙げられる：

ループコンセンサス配列 2 3 : C y s - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - T r p - G l y - G l y - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - C y s ( T N 1 1、すなわち T N 1 2 ライブラリーの単離物に基づいた 1 1 量体；配列番号 1 4 )、ここで、

X<sub>2</sub> は A l a、P h e もしくは T r p ( 好ましくは T r p または P h e ) であり；

X<sub>3</sub> は G l u もしくは L y s ( 好ましくは G l u ) であり；

X<sub>4</sub> は A s p、S e r、T r p もしくは T y r ( 好ましくは A s p、T r p または T y r ) であり； 30

X<sub>5</sub> は P h e、P r o もしくは S e r ( 好ましくは S e r ) であり；

X<sub>9</sub> は G l n もしくは G l u ( 好ましくは G l u ) であり；そして

X<sub>10</sub> は I l e、P h e もしくは V a l である；または

ループコンセンサス配列 2 4 : C y s - X<sub>2</sub> - G l u - X<sub>4</sub> - S e r - X<sub>6</sub> - S e r - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> - X<sub>10</sub> - P h e - C y s ( T N 1 2；配列番号 1 5 )、ここで、

X<sub>2</sub> は H i s もしくは T y r であり；

X<sub>4</sub> は L e u、H i s もしくは T h r であり；

X<sub>6</sub> は A s p もしくは L e u ( 好ましくは A s p ) であり；

X<sub>8</sub> は G l y もしくは V a l ( 好ましくは V a l ) であり；

X<sub>9</sub> は T h r もしくは V a l ( 好ましくは T h r ) であり；そして 40

X<sub>10</sub> は A r g もしくは T r p ( 好ましくは A r g ) である；または

ループコンセンサス配列 2 5 : C y s - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - G l y - X<sub>9</sub> - T r p - X<sub>11</sub> - C y s ( T N 1 2；配列番号 1 6 )、ここで、

X<sub>2</sub> は G l u、M e t もしくは T h r ( 好ましくは G l u ) であり；

X<sub>3</sub> は I l e、L e u、M e t もしくは P h e ( 好ましくは M e t、L e u または P h e ) であり；

X<sub>4</sub> は A r g、A s p、G l u、M e t、T r p もしくは V a l であり；

X<sub>5</sub> は A s n、G l n、G l y、S e r もしくは V a l であり；

X<sub>6</sub> は G l u もしくは A s p であり；

X<sub>7</sub> は L y s、S e r、T h r もしくは V a l ( 好ましくは L y s ) であり； 50

$X_9$  は  $Arg$ 、 $Gln$ 、 $Lys$  もしくは  $Trp$  (好ましくは  $Trp$ 、 $Arg$  または  $Lys$ ) であり;そして

$X_{11}$  は  $Asn$ 、 $Leu$ 、 $Phe$  もしくは  $Tyr$  (好ましくは  $Tyr$ 、 $Phe$  または  $Asn$ ) である;または

ループコンセンサス配列 26:  $Cys - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - Cys$  (TN12)、ここで、

$X_2$  は  $Glu$  もしくは  $Gly$  であり;

$X_3$  は  $Trp$  もしくは  $Tyr$  であり;

$X_4$  は  $Ser$  もしくは  $Thr$  であり;

$X_5$  は  $Asp$  もしくは  $Gln$  であり;

$X_6$  は  $Gly$  もしくは  $Met$  であり;

$X_7$  は  $Phe$  もしくは  $Tyr$  であり;

$X_8$  は  $Asp$  もしくは  $Gln$  であり;

$X_9$  は  $Lys$  もしくは  $Tyr$  であり;

$X_{10}$  は  $Glu$  もしくは  $Thr$  であり;そして

$X_{11}$  は  $Glu$  もしくは  $Phe$  である。

【0029】

ループコンセンサス配列 17 の環状ペプチドの好ましい態様には、以下のループコンセンサス配列 27 の配列を含む、KDR および / または VEGF / KDR 複合体結合ポリペプチドが挙げられる;

ループコンセンサス配列 27:  $Cys - X_2 - X_3 - X_4 - Gly - X_6 - Cys$  (TN7)、ここで、

$X_2$  は  $Asn$ 、 $Asp$  または  $Glu$  であり;

$X_3$  は  $Glu$ 、 $His$ 、 $Lys$  または  $Phe$  であり;

$X_4$  は  $Asp$ 、 $Gln$ 、 $Leu$ 、 $Lys$ 、 $Met$  または  $Tyr$  であり;そして

$X_6$  は  $Arg$ 、 $Gln$ 、 $Leu$ 、 $Lys$  または  $Val$  である。

【0030】

ループコンセンサス配列 18 の環状ペプチドの好ましい態様には、以下のループコンセンサス配列 28 の配列を含む、KDR および / または VEGF / KDR 複合体結合ポリペプチドが挙げられる;

ループコンセンサス配列 28:  $Cys - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - Cys$  (TN9)、ここで、

$X_2$  は  $Ala$ 、 $Lys$ 、 $Ser$ 、 $Trp$  または  $Val$  (好ましくは  $Lys$ ) であり;

$X_3$  は  $Asn$ 、 $Glu$ 、 $Gly$ 、 $His$  または  $Leu$  であり;

$X_4$  は  $Glu$ 、 $Gly$ 、 $Lys$ 、 $Met$  または  $Tyr$  (好ましくは  $Met$ ) であり;

$X_5$  は  $Ala$ 、 $Asn$ 、 $Asp$ 、 $Leu$ 、 $Met$ 、 $Pro$  または  $Ser$  であり;

$X_6$  は  $His$ 、 $Pro$  または  $Trp$  (好ましくは  $Pro$ ) であり;

$X_7$  は  $His$ 、 $Leu$ 、 $Trp$  または  $Tyr$  (好ましくは  $Trp$  または  $His$ ) であり;

そして

$X_8$  は  $Ala$ 、 $Asp$ 、 $Gln$ 、 $Leu$ 、 $Met$ 、 $Thr$  または  $Trp$  である。

【0031】

ループコンセンサス配列 19 の環状ペプチドの好ましい態様には、以下のループコンセンサス配列 29 の配列を含む、KDR および / または VEGF / KDR 複合体結合ポリペプチドが挙げられる;

ループコンセンサス配列 29:  $Cys - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - Ser - Gly - Pro - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - Cys$  (MTN13; 配列番号 17)、ここで、

$X_2$  は  $Asp$ 、 $Glu$ 、 $His$  または  $Thr$  であり;

$X_3$  は  $Arg$ 、 $His$ 、 $Lys$  または  $Phe$  であり;

$X_4$  は  $Gln$ 、 $Ile$ 、 $Lys$ 、 $Tyr$  または  $Val$  であり;

$X_5$  は  $Gln$ 、 $Ile$ 、 $Leu$ 、 $Met$  または  $Phe$  であり;

10

20

30

40

50

X<sub>9</sub> は A s n、A s p、G l y、H i s または T y r であり；  
 X<sub>10</sub> は G l u、G l y、S e r もしくは T h r であり；  
 X<sub>11</sub> は G l u、L y s、P h e または S e r であり；そして  
 X<sub>12</sub> は G l u、I l e、S e r または V a l である。

【0032】

本明細書に開示された任意の特定配列、および/または本明細書に記載の任意のコンセンサス配列に適合する任意の具体的配列に使用される、化学的または物理的改変、および本明細書に記載の任意の配列改変が包含される。

【0033】

上記の K D R および V E G F / K D R 結合ポリペプチドは、場合により N 末端および C 末端のいずれかまたは両方に結合する付加的なアミノ酸を有していてもよく、多量体構築物に改変するか、最適化するか、または使用してよい。さらに、本発明は本明細書に記載の K D R および V E G F / K D R 複合体結合ペプチドの相同体を包含する。

【0034】

本発明の他の側面は、本発明に記載のポリペプチドを検出可能に標識することにより特定の血管新生造影剤を提供するための上記ポリペプチドの改変に関する。そのような検出可能な標識には、放射性標識、酵素標識もしくは M R 常磁性キレート剤もしくは微小粒子による標識；超音波パルス、微小粒子、マイクロスフェア、エマルジョンもしくはリポソームへの取込；または光学色素との結合を挙げることができる。

【0035】

本発明の他の側面では、本発明の結合ポリペプチドを使用して、K D R または K D R 発現細胞を単離するための方法が提供される。

さらに、本発明の K D R および V E G F / K D R 複合体結合ポリペプチドは、薬剤的に受容できる組成物中の単独生理活性物質として、または血管新生もしくはたとえばマラリア、H I V、S I V、サル出血熱等を含む多数の病原体に関連する疾患に關与する状態または疾患を治療するための他の治療薬と結合して（または組み合わせて）治療薬として使用することができる。

【0036】

治療薬として使用する場合、ペプチドの血清滞留時間を延長することが好都合であるかもしれない。これは、a) 血清アルブミンのような血清タンパク質上の遊離スルフヒドリル基と反応する、マレイミドのような部分をペプチドに結合させること、b) 血清アルブミンのような血清タンパク質に非共有結合的に結合する、脂肪酸のような部分をペプチドに結合させること、c) 血清滞留時間を延長させることが公知の P E G のようなポリマーをペプチドに結合させること、および d) ヒト血清アルブミンのような血清タンパク質または抗体をコードする D N A に、K D R 結合ペプチドをコードする D N A を融合させ、コードされた融合タンパク質を発現させることにより達成することができる。

【0037】

本発明のこれらおよび他の側面は以下の詳細な説明を参照することにより明らかになるであろう。

本発明の他の側面では、標的発現細胞に結合する能力についてファージディスプレイにより同定されたポリペプチドをスクリーニングする方法が提供される。これらの方法は、標準の細胞結合アッセイで評価するには単量体親和性が低すぎるポリペプチドを含むポリペプチドの結合能力の迅速なスクリーニングを可能にする。

【0038】

定義

以下のセクションにおいて、「組換え体」という用語は、非天然に変換または操作された核酸、異種核酸を形質移入された宿主細胞、または単離された D N A の操作および宿主細胞の形質転換により非天然に発現されたポリペプチドを説明するために使用される。組換え体は、遺伝子工学的技術を使用して、i n v i t r o で構築されている D N A 分子を特に包含し、そして分子、構築物、ベクター、細胞、ポリペプチドまたはポリヌクレオ

チドを説明するための形容詞としての「組換え体」という用語の使用は、天然に存在するそのような分子、構築物、ベクター、細胞、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを特に除外する。

【0039】

「バクテリオファージ」という用語は、DNAコア、および多数の異なるタンパク質分子の凝集により構築された保護殻を含む細菌ウイルスとして定義される。「バクテリオファージ」および「ファージ」という用語は、本明細書では互換性がある。

【0040】

「ポリペプチド」という用語は、ペプチドアミド結合(-C(=O)NH-)により主鎖(側鎖に対して)を介して結合した2以上のアミノ酸の化合物を表すために使用される。本明細書では、「ペプチド」という用語は「ポリペプチド」と互換性があるが、通常40以下、好ましくは25以下のアミノ酸を有するポリペプチドを表すために使用される。

10

【0041】

本明細書で使用される「結合ポリペプチド」という用語は、他の分子と結合複合体を形成可能ないずれかのポリペプチドを表す。本明細書で時々使用される同じ意味の用語は「結合部分」である。「KDR結合ポリペプチド」は、血管内皮増殖因子受容体-2(またはKDR、Flk-1)と*in vitro*または*in vivo*で複合体を形成するポリペプチドであり;「VEGF/KDR複合体結合ポリペプチド」は、血管内皮増殖因子(VEGF)とKDRとのあいだで形成される結合複合体、とりわけ血管新生中に内皮細胞の表面において形成されると考えられる、ホモ二量体VEGFと1つまたは2つのKDR分子との複合体と*in vitro*または*in vivo*で複合体を形成するポリペプチドである。KDRおよびVEGF/KDR結合ポリペプチドの具体的な例としては、以下の表1~7に提示されるペプチドが挙げられるが、それらに限定されるものではない。そしてそのようなペプチドを取り込むハイブリッドおよびキメラポリペプチドを包含する。また、本明細書に記載のように改変または最適化されたポリペプチドは、KDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの定義内に包含される。

20

【0042】

そのような改変の具体的な例は以下に詳細に説明されるが、特性を最適化する、酵素開裂部位を削除するなどのために親ポリペプチド配列をアミノ酸置換すること;たとえば結合ポリペプチドを検出可能な画像化標識または他の基質に連結させるためのC末端またはN末端のアミノ酸置換または伸長、その例としては、たとえば精製を補助するためにポリヒスチジン「尾部」を付加することが挙げられる;切断;アミド結合変化;転位;レトロインベルソペプチド;ペプトイド;レトロインベルソペプトイド;N末端もしくはC末端の改変またはリンカー、たとえばポリグリシンまたはポリリジンセグメントの使用;固体支持体上に本発明の結合ポリペプチドを固定化させるのを補助するか、または蛍光色素を結合するために、官能基、とりわけヒドラジド(-NH-NH<sub>2</sub>)官能基もしくはC末端リンカー-Gly-Gly-Gly-Lys(配列番号18)を含むように変換すること;薬物動態学的改変、構造特性を保持するための構造改変、水溶性を増加させるためもしくは製剤化し易くするための塩形成などが挙げられる。

30

【0043】

本明細書にさらに記載される検出可能な標識に加え、結合ポリペプチドのための他の適切な基質には、殺腫瘍剤もしくは酵素、リポソーム(たとえば治療薬、超音波適合ガスまたは両方を負荷したもの)、または固体支持体、ウェル、プレート、ビーズ、チューブ、スライド、フィルター、もしくはディッシュが挙げられる。さらに、1以上のKDRまたはVEGF/KDR結合ポリペプチドの二量体または多量体が形成されてもよい。そのような構築物は、たとえば促進されたKDRへの結合能を示すことができる。また、そのような改変された結合ポリペプチドのすべては、それらがKDRまたはVEGF/KDR標的に結合する能力を保持する限り、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドであると見なされる。

40

【0044】

50

本明細書に記載の結合ポリペプチドの「相同体」は、本明細書に記載のまたは当業者に公知の改変または最適化技術のいずれかを使用して作製することができる。そのような相同体ポリペプチドは、アミノ酸の置換、付加、もしくは欠失または他のそのような改変がKDRまたはVEGF/KDR複合体のいずれかに結合するその能力を除去しない限り、本発明の範囲およびKDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの定義内に包含される。本明細書で使用する「相同性」という用語は、2種のポリマー（すなわち、ポリペプチド分子または核酸分子）間の配列相同性の程度を表す。同じ核酸もしくはアミノ酸残基または実質的に類似した特性を有するもの（すなわち保存的置換）が比較される2種のポリマーにおいてある配列位置を占める場合、ポリマーはその位置において相同である。たとえば、2種のポリペプチド配列において100のアミノ酸位置のうち60アミノ酸残基が一致するか相同である場合、2種の配列は60%相同性である。本明細書で表された相同性%の数字は、2種のポリマー間で可能な最大相同性、すなわち、一致した（相同性の）位置が最も多くなるように2種のポリマーを並べた場合の%相同性を意味する。本発明の範囲内のポリペプチド相同体は、本明細書に開示された少なくとも1つのKDRまたはVEGF/KDR結合配列に少なくとも70%、好ましくは80%以上相同性である。

10

## 【0045】

「結合」という用語は、結合ポリペプチドが所定の標的を認識し、それに可逆的に結合するという、本明細書に記載のアッセイを含む標準アッセイによる確定を表す。そのような標準アッセイには、平衡透析、ゲルろ過、および結合によるスペクトル変化のモニタリングを含むが、それらに限定されない。

20

## 【0046】

「特異性」という用語は、ある標的に対して他のものより高い結合親和性を有する結合ポリペプチドを表す。「KDR特異性」という用語は、KDRに対して他の無関係な標的より高い親和性を有するKDR結合部分を表す。「VEGF/KDR特異性」という用語は、VEGF/KDR複合体に対して所定の標的より高い親和性を有するVEGF/KDR複合体結合部分を表す。結合特異性は、2種の試験される標的物質に対する解離平衡定数( $K_D$ )または会合平衡定数( $K_a$ )により特徴付けられるか、または相対的結合強度の任意の尺度であってもよい。本発明に記載の結合ポリペプチドは、KDRまたはVEGF/KDR複合体に特異的で、好ましくはKDRまたはVEGF/KDR複合体に対する $K_D$ が10  $\mu$ M未満、より好ましくは1.0  $\mu$ M未満、最も好ましくは0.5  $\mu$ M未満またはずっと低い。

30

## 【0047】

本明細書で使用する「患者」という用語はいずれかの哺乳動物、特にヒトを表す。

「薬剂的に受容できる」担体または賦形剤という用語は、本発明の化合物と一緒に患者に投与でき、その生物活性または薬理活性を破壊しない、非毒性の担体または賦形剤を表す。

## 【0048】

以下の一般的な略語を、本明細書を通じて使用する：9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(fmocまたはFmoc)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、無水酢酸( $Ac_2O$ )、(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシ-1-イリデン)-3-メチルブチル(ivddee)、トリフルオロ酢酸(TFA)、試薬B(TFA:H<sub>2</sub>O:フェノール:トリイソプロピルシラン、88:5:5:2)、N,N'-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)、O-(7-アザ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ェート(HATU)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、固相ペプチド合成(SPPS)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジクロロメタン(DCM)、ジメチルホルムアミド(DMF)、およびN-メチルピロリジノン(NMP)。

40

50

## 【0049】

## 発明の詳細な説明

本発明は、KDRまたはVEGFとKDRとの複合体に結合する新規結合部分を提供する。そのような結合部分は、アップレギュレーションされたKDR発現を示しVEGFに結合する、活性化内皮細胞の効率的な検出、画像化および局在化を可能にする。そのような内皮細胞は活発な血管新生に特徴的であり、したがって本明細書に記載のポリペプチドは血管新生部位の検出、モニタリングおよび局在化の手段を提供する。とりわけ、本発明の結合ポリペプチドは、適切に標識された場合、腫瘍誘発血管新生の検出、画像化および局在化に有用である。したがって、結合ポリペプチドは、新生物性腫瘍増殖または他の病理性血管新生事象の診断および治療のための多様な診断薬および治療薬の作製に使用することができる。さらに、結合ポリペプチド自体を治療薬として使用することができる。

10

## 【0050】

本発明に記載の具体的KDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、初めにファージディスプレイライブラリーのスクリーニング、すなわち表面に外来ペプチドを発現するように形質転換された組換えバクテリオファージ集団のスクリーニングにより単離された。KDRまたはVEGF/KDRのような特定の標的に対する新規ポリペプチド結合部分を単離するために、たとえばファージディスプレイライブラリーを使用して、大きなペプチドライブラリーをスクリーニングすることは、非常に大量（たとえば、 $5 \times 10^9$ ）の潜在的結合体を試験することができ、好結果の結合体を短期間で単離できる点でとりわけ好都合である。

20

## 【0051】

KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドのような結合ポリペプチドをスクリーニングするためのポリペプチドを提示するファージライブラリーを作製するために、ライブラリーに提示されるペプチドに対する構造テンプレートとして作用するように結合ドメイン候補が選択される。ファージライブラリーは多数の親ドメインまたはテンプレートの類似体から構成される。結合ドメインテンプレートは天然でも合成タンパク質でもよく、またはタンパク質の領域もしくはドメインであってもよい。結合ドメインテンプレートは、結合ドメインテンプレートと結合標的とのあいだの公知の相互作用に関する知識に基づき選択することができるが、このことは重要ではない。実際、ライブラリーのテンプレートとして作用するように選択されたドメインが標的に対して任意の親和性を有することは少しも重要ではない。その目的は、類似構造をしたポリペプチド（類似体）の多様性（ライブラリー）を作製できる構造を提供することであり、その類似体の多様性は好ましくは所望の結合特性（およびスクリーニングされるいずれか他の特性）を示す1以上の類似体を包含するであろう。

30

## 【0052】

ライブラリーの多様なアミノ酸配列の基礎となる親結合ドメインまたはテンプレートの選択において考慮すべき最も重要なことは、多様なペプチドドメインがどのように標的に提示されるかということ、すなわちどのようなコンホメーションにおいてペプチド類似体が標的と接触することになるかということである。ファージディスプレイ法において、たとえば類似体は、類似体をコードする合成DNAをファージに挿入することにより作製され、ファージの表面に類似体を提示することになる。多様な異なるポリペプチドを提示するM13ファージのようなファージのライブラリーは、たとえば、本明細書に援用されるKay et al., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego, 1996)および米国特許第5,223,409号(Ladner et al.)に記載の技術を使用して作製することができる。

40

## 【0053】

本発明に記載の具体的なポリペプチドの単離において、TN6/V1、TN7/IV、TN8/IX、TN9/IV、TN10/IX、TN12/I、およびMTN3/1と呼ばれる7種の環状ペプチド（またはループ）ライブラリー、ならびにLin20と呼ばれ

50

る線状ライブラリーが使用された。それぞれのライブラリーはM13ファージ上に多様なポリペプチドを発現するために構築された。「TN」表示を有する7種のライブラリーは、それぞれタンパク質IIIのアミノ末端の6、7、8、9、10、12または13アミノ酸の、短い多様な外来ペプチドループをM13ファージの表面に提示するように設計された。該ライブラリーは、TN6/VI（潜在的に $3.3 \times 10^{12}$ アミノ酸配列多様性を有する）、TN7/IV（潜在的に $1.2 \times 10^{14}$ アミノ酸配列多様性を有する）、TN8/IX（潜在的に $2.2 \times 10^{15}$ アミノ酸配列多様性を有する）、TN9/IV（潜在的に $4.2 \times 10^{16}$ アミノ酸配列多様性を有する）、TN10/IX（潜在的に $3.0 \times 10^{16}$ アミノ酸配列多様性を有する）、TN12/I（潜在的に $4.6 \times 10^{19}$ アミノ酸配列多様性を有する）、MTN13/I（潜在的に $8.0 \times 10^{17}$ アミノ酸配列多様性を有する）、およびLin20（潜在的に $3.8 \times 10^{25}$ アミノ酸配列多様性を有する）と呼ばれる。

10

## 【0054】

TN6/VIライブラリーは、12アミノ酸のテンプレートに含有される単一の微小タンパク質結合ループを提示するように構築された。TN6/VIライブラリーはXaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Cys-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub>のテンプレート配列を使用した。テンプレートの2、3、5、6、7、8、10、および11番目のアミノ酸はシステイン(Cys)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。テンプレートの1および12番目のアミノ酸はシステイン(Cys)、グルタミン酸(Glu)、イソロイシン(Ile)、リジン(Lys)、メチオニン(Met)、およびスレオニン(Thr)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。

20

## 【0055】

TN7/IVライブラリーは、13アミノ酸のテンプレートに含有される単一の微小タンパク質結合ループを提示するように構築された。TN7/IVライブラリーはXaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Cys-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub>-Xaa<sub>13</sub>のテンプレート配列を使用した。テンプレートの1、2、3、5、6、7、8、9、11、12、および13番目のアミノ酸は、システイン(Cys)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。

30

## 【0056】

TN8/IXライブラリーは、14アミノ酸のテンプレートに含有される単一の微小タンパク質結合ループを提示するように構築された。TN8/IXライブラリーはXaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Cys-Xaa<sub>12</sub>-Xaa<sub>13</sub>-Xaa<sub>14</sub>のテンプレート配列を使用した。テンプレートの1、2、3、5、6、7、8、9、10、12、13および14番目のアミノ酸はシステイン(Cys)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。

40

## 【0057】

TN9/IVライブラリーは、15アミノ酸のテンプレートに含有される単一の微小タンパク質結合ループを提示するように構築された。TN9/IVライブラリーはXaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Cys-Xaa<sub>13</sub>-Xaa<sub>14</sub>-Xaa<sub>15</sub>のテンプレート配列を使用した。テンプレートの1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、13、14および15番目のアミノ酸はシステイン(Cys)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。

40

## 【0058】

TN10/IXライブラリーは、16アミノ酸のテンプレートに含有される単一の微小タンパク質結合ループを提示するように構築された。TN10/IXライブラリーはXaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub>-Cys-Xaa<sub>14</sub>-Xaa<sub>15</sub>-Xaa<sub>16</sub>のテンプレート配列を使用した。テンプレートの1、2、15および16番目のアミノ

50

酸は、10アミノ酸：D、F、H、L、N、P、R、S、W、またはYの群から選択される任意のアミノ酸に変化可能であった。テンプレートの3および14番目のアミノ酸は、14アミノ酸：A、D、F、G、H、L、N、P、Q、R、S、V、W、またはYの群から選択される任意のアミノ酸に変化可能であった。テンプレートの5、6、7、8、9、10、11、および12番目のアミノ酸はシステイン(Cys)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。

【0059】

TN12 / Iライブラリーは、18アミノ酸のテンプレートに含有される単一の微小タンパク質結合ループを提示するように構築された。TN12 / IライブラリーはXaa<sub>1</sub> - Xaa<sub>2</sub> - Xaa<sub>3</sub> - Cys - Xaa<sub>5</sub> - Xaa<sub>6</sub> - Xaa<sub>7</sub> - Xaa<sub>8</sub> - Xaa<sub>9</sub> - Xaa<sub>10</sub> - Xaa<sub>11</sub> - Xaa<sub>12</sub> - Xaa<sub>13</sub> - Xaa<sub>14</sub> - Cys - Xaa<sub>16</sub> - Xaa<sub>17</sub> - Xaa<sub>18</sub>のテンプレート配列を使用した。テンプレートの1、2、17および18番目のアミノ酸は、12アミノ酸：A、D、F、G、H、L、N、P、R、S、W、またはYの群から選択される任意のアミノ酸に変化可能であった。テンプレートの3、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、および16番目のアミノ酸はシステイン(Cys)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。

10

【0060】

MTN13 / Iライブラリーは、3アミノ酸(Ser - Gly - Pro)の一定領域により分離された等しいサイズ(すなわち8アミノ酸)の2つの可変領域を特徴とする19アミノ酸のテンプレートに含有される単一の微小タンパク質結合ループを提示するように構築された。MTN13 / IライブラリーはXaa<sub>1</sub> - Xaa<sub>2</sub> - Xaa<sub>3</sub> - Cys - Xaa<sub>5</sub> - Xaa<sub>6</sub> - Xaa<sub>7</sub> - Xaa<sub>8</sub> - Ser - Gly - Pro - Xaa<sub>12</sub> - Xaa<sub>13</sub> - Xaa<sub>14</sub> - Xaa<sub>15</sub> - Cys - Xaa<sub>16</sub> - Xaa<sub>17</sub> - Xaa<sub>18</sub> - Xaa<sub>19</sub>(配列番号19)のテンプレート配列を使用した。テンプレートの1、2、3、5、6、7、8、12、13、14、15、17、18、および19番目のアミノ酸はシステイン(Cys)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。

20

【0061】

Lin20ライブラリーは、20アミノ酸のテンプレート中に単一線状ペプチドを提示するように構築された。テンプレートのそれぞれの位置におけるアミノ酸はシステイン(Cys)以外の任意のアミノ酸に変化可能であった。

30

【0062】

本明細書に提供される結合ポリペプチドは、N末端および/またはC末端に付加または切断を包含することができる。そのような改変された結合ポリペプチドはKDRまたはVEGF / KDR複合体に結合することが予想される。たとえば、本明細書に提供される結合ポリペプチドのいくつかのN末端に存在する - GGGKリンカーは任意のリンカーである。したがって、末端の - GGGK配列がない以外は同じ配列を有するポリペプチドも本発明に包含される。さらに、本明細書に提供されるテンプレートおよび配列のループ部分を含む結合ポリペプチドはKDRおよび/またはVEGF / KDR複合体に結合することが予想され、やはり本発明に包含される。テンプレートおよび配列のループ部分は、ジスルフィド結合を形成すると考えられる2つのシステイン残基の間であって、それらを含む配列を包含し、それによってペプチドループ構造を生成する。さらに、本発明の結合ポリペプチドは付加的なアミノ酸残基をN末端および/またはC末端に含むことができる。

40

【0063】

ファージディスプレイライブラリーは、ポリペプチドテンプレートのコーディング配列内に、設計された一連の変異または変化を作製することにより作られ、それぞれの変異配列は、テンプレート配列中に1以上のアミノ酸変化を有すること以外は、全体的な構造においてテンプレートに対応するペプチド類似体をコードする。新規に変化した(変異した)DNAは配列多様性を提供し、そしてそれぞれの形質転換ファージは、DNAによりコードされる初期のテンプレートアミノ酸配列の1変異体を提示し、極めて多数の異なるが構造的に関連したアミノ酸配列をファージ集団(ライブラリー)に提示させる。アミノ酸

50

変化は、少なくとも大部分の置換物において著しい構造変化なしに、結合ペプチドまたはドメインの結合特性を変化させると考えられる。変化のために選択されるアミノ酸位置（可変アミノ酸位置）は、表面のアミノ酸位置、すなわち、ドメインが最も安定なコンホメーションであるとき外部表面（すなわち溶液に曝される表面）に現れるドメインのアミノ酸配列における位置であることが好ましい。最も好ましくは、変化させるアミノ酸位置は、置換による効果を最大にするために、隣接するかまたは接近しているであろう。

#### 【0064】

先に示したように、Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego, 1996) および米国特許第5,223,409号に記載の技術は、選択された親テンプレートに対応する潜在的な結合体ライブラリーの作製にとりわけ有用である。先に説明した7種のライブラリーはそのような技術に従って作製され、それらは以下の実施例で説明するように、固定した標的に対するKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドに関してスクリーニングされた。

#### 【0065】

代表的なスクリーニングにおいて、ファージライブラリーを標的またはその特定のサブコンポーネントに接触させて結合させる。結合体と非結合体の分離を容易にするには、固体支持体上に標的を固定することが好都合である。標的結合部分を有するファージは固体支持体上で標的と複合体を形成するが、非結合ファージは溶液に残り、過剰なバッファーで洗浄することができる。次に結合ファージは、バッファーを極端なpH（pH2またはpH10）に変え、バッファーのイオン強度を変え、変性剤を添加し、または他の公知の手段により、標的から遊離される。本発明のポリペプチドを示す結合ファージを単離するためにタンパク質溶出が行われる。すなわち、あるファージは溶液中でVEGFを使用し、標的から溶出され（競合的溶出）；また、VEGFと一晚インキュベートしても競合阻害されない非常に高親和性の結合ファージは、大腸菌細胞に感染させるための依然として基質に結合したファージを使用することにより、捕捉される。

#### 【0066】

その後、回収されたファージは、細菌細胞に感染させ、非結合体が枯渇して結合体に富んだ新規プールを用いて繰り返されたスクリーニング工程により増幅することができる。少しの結合ファージの回収でさえ、工程を完了させるのに十分である。数ラウンドの選択後、結合プール中の選択されたファージクローンに由来する結合部分をコードする遺伝子配列を以下に記載の慣用の方法により決定し、ファージの結合親和性を標的に付与するペプチド配列を明らかにする。選択工程を行う場合、集団の配列多様性は所望の結合体が残るまでそれぞれの選択ラウンドごとに低下する。配列は、少数の関連する結合体、通常それぞれのライブラリーに由来する1千万以上のオリジナル候補から10~50に収束する。それぞれの選択ラウンドで回収されるファージ数が増加し、そしてもちろん、密接に関連する配列が回収されることは、スクリーニング中にライブラリーの収束が起こったことを示す良い指標である。1組の結合ポリペプチドが同定された後、配列情報を使用して、付加的な所望の特性を有するメンバーに関してバイアスをかけた他の二次的なファージライブラリーを設計することができる。

#### 【0067】

ジスルフィド結合ループの形成はそのようなペプチドに対する親和性および特異性を増すため、その形成は好都合である。しかし、血清中では、遊離システインまたは他のチオール含有分子により、ジスルフィド結合は開裂されるかもしれない。したがって、システイン残基を改変して、ジスルフィド架橋を別の反応性の低い結合に置換することが有用であるかもしれない。-CH<sub>2</sub>-S-S-CH<sub>2</sub>-架橋は、硫黄間の二面結合が90度に近い、好ましい幾何配置を有するが、正確な幾何配置は他の側鎖の構造および分子の結合状態により決定される。結合ループの閉鎖架橋の好ましい改変は、全体の結合の長さおよび角度を可能な限り保持するであろう。そのような代わりとなる適切な架橋には、-CH<sub>2</sub>

- S - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - 、 - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - S - CH<sub>2</sub> - 、 - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - S - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - のようなチオエーテル結合； - CH<sub>2</sub> - NH - CO - CH<sub>2</sub> - および - CH<sub>2</sub> - CO - NH - CH<sub>2</sub> - のようなラクタム結合； - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - のようなエーテル結合； - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - (n = 4、5、または6) のようなアルキレンブリッジ； - CH<sub>2</sub> - NH - CO - NH - CH<sub>2</sub> - 結合、および当該技術分野で公知の類似した基が挙げられる。

【0068】

安定なジスルフィド結合の結合ループを含むポリペプチドが最も好ましいが、上記の配列に由来する線状ポリペプチドは、たとえば一方または両方のシステイン残基の置換により容易に作製することができ、それらはジスルフィド結合を含有するオリジナルポリペプチドのKDRまたはVEGF/KDR結合活性の少なくとも一部を保持できる。Cysを置換するには、アミノ酸Gly、Ser、およびAlaが好ましく、また、ポリペプチドが溶液中の他の遊離チオール基と二量体化または反応することができる単一Cysを残さないように、両方のCys残基を置換することが好ましい。KDRまたはVEGF/KDR結合特性を保持するそのような線状誘導体はすべて本発明の範囲内である。

10

【0069】

本発明のポリペプチドの直接合成は、固相ペプチド合成、溶液相合成などを含む慣用の技術を使用して行うことができる。固相合成が好ましい。本明細書に援用される、Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman Co. San Francisco, 1989) ; Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963) ; Bodanszky and Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, New York, 1984) を参照されたい。

20

【0070】

本発明に記載のポリペプチドは、業務としてペプチド合成を提供する会社（たとえば、BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, P. A. ; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA) により商業的に作製することもできる。Perkin-Elmer Applied Biosystems製の自動ペプチド合成機も利用できる。

30

【0071】

ポリペプチド化合物は、化学的にまたは組換え技術により単離または合成されると、好ましくは精製される。精製のためには、アルキル化シリカカラム、たとえばC<sub>4</sub> - 、C<sub>8</sub> - 、またはC<sub>18</sub> - シリカを使用する逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を含む、多くの標準法が使用できる。一般に有機物含有量が増加するグラジエント移動相、たとえば、通常少量のトリフルオロ酢酸を含有する、水性バッファー中のアセトニトリルを使用して精製する。イオン交換クロマトグラフィーを使用し、電荷に基づいてペプチドを分離することもできる。ポリペプチドの純度は、HPLC上の主要な大ピークの同定を含む種々の方法により測定することができる。HPLCカラムに投入した物質の少なくとも95%である単一ピークを生じるポリペプチドが好ましい。HPLCカラムに投入した物質の少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または99.5%以上上の単一ピークを生じるポリペプチドがさらにより好ましい。

40

【0072】

上記の技術のいずれかを使用して得られたペプチドが本発明の組成物に使用する所望のペプチドであることを確かめるために、ペプチド組成の解析を行うことができる。そのような組成解析は高分解能質量分析法を使用して行い、ペプチドの分子量を決定することができる。あるいは、水性酸中でペプチドを加水分解し、HPLCまたはアミノ酸分析機を使用して混合物の成分を分離、同定、および定量することにより、ペプチドのアミノ酸含量を確かめることができる。順次ペプチドを分解し、アミノ酸を順番に同定するペプチド

50

配列決定装置もペプチドの配列を決定するために使用することができる。

【0073】

本発明に記載のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、組換えDNA技術を用いて、本発明に記載のポリペプチドをコードする核酸(ポリヌクレオチド)を利用し、それらを組換え技術により発現させる、すなわち公知の方法で外来核酸分子を導入し、所望のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを産生するよう宿主細胞を操作することにより作製することもできる。そのような手順は当業者の能力の範囲内である(援用されるDavis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)を参照されたい)。本明細書に記載されるような短いペプチドの組換えによる作製は、直接合成に比べて実用的ではないかもしれないが、本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分がハイブリッドポリペプチドまたは融合タンパク質中に取り込まれている場合、組換えによる作製手段は非常に好都合である。

10

【0074】

本発明の実施において、KDRまたはVEGF/KDR複合体に対するKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分の親和性を、他のタンパク質または標的と比較して測定することは有用な尺度となり、KDRまたはVEGF/KDR複合体に対する特異性として表される。結合を定量し親和性を測定するための標準アッセイには、平衡透析、平衡結合、ゲルろ過、または結合部分とその標的との相互作用の結果生じる多くのスペクトル変化(たとえば蛍光偏光の変化)のモニタリングが挙げられる。これらの技術は、リガンド(またはタンパク質)濃度の関数として、結合および遊離リガンドの濃度を測定する。結合ポリペプチドの濃度([結合])は、以下の等式に記載されるように、遊離ポリペプチドの濃度([遊離])およびポリペプチドの結合部位、すなわちKDRまたはVEGF/KDR複合体上の結合部位の濃度(N)に関連する。

20

【0075】

$$[\text{結合}] = N \times [\text{遊離}] / ((1/K_a) + [\text{遊離}])$$

この等式に対するデータの解は、結合親和性の定量的尺度である結合定数 $K_a$ を生じる。結合定数 $K_a$ は解離定数 $K_D$ の逆数である。 $K_D$ は親和性の測定においてより頻繁に報告される。好ましいKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、KDRまたはVEGF/KDR複合体に対する $K_D$ が1 nM ~ 100  $\mu$ Mの範囲であり、10 nM未満、20 nM未満、40 nM未満、60 nM未満、80 nM未満、1  $\mu$ M未満、5  $\mu$ M未満、10  $\mu$ M未満、20  $\mu$ M未満、40  $\mu$ M未満、60  $\mu$ M未満、および80  $\mu$ M未満の $K_D$ を含む。

30

【0076】

KDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分が造影剤として使用される場合、結合特異性の他の側面がより重要になるかもしれない：造影剤は動的な系において機能し、そこでは標的(たとえば活性化内皮上の、KDRまたはVEGF/KDR複合体、)への造影剤の結合は、画像化手順のあいだ安定な平衡状態であってはならない。たとえば、造影剤を初めに注入するとき、造影剤の濃度および造影剤-標的複合体の濃度は速やかに増大する。しかし、注入後すぐに、循環する(遊離)造影剤は腎臓または肝臓により排除されはじめ、造影剤の血漿濃度は低下し始める。血漿中の遊離造影剤濃度のこの低下は、最終的に造影剤-標的複合体の解離を引き起こす。造影剤の有用性は、造影剤の排除速度と造影剤-標的の解離速度が異なることに依存する。解離速度は排除速度に比べて遅いことが理想であり、血漿中に造影剤-標的複合体が高濃度でおよび遊離造影剤(バックグラウンドシグナル)が低濃度であるあいだ、長く画像化を行うことになる。

40

【0077】

解離速度の定量的測定は、当該技術分野で公知の以下のいくつかの方法を使用して容易に行うことができる：光ファイバー蛍光分光法(たとえば、Anderson & Miller, Clin. Chem., 34(7): 1417-21 (1988)を参照されたい)、表面プラズモン共鳴(Malmberg et al., J. Immunol. Me

50

thods, 198 (1): 51-7 (1996) and Schuck, Current Opinion in Biotechnology, 8: 498-502 (1997)、共鳴ミラー、および回折格子結合平面光導波路(たとえば Hutchinson, Molec. Biotechnology, 3: 47-54 (1995)を参照されたい)。結合速度を測定するための自動バイオセンサーが市販されている: BIAcore 表面プラズモン共鳴センサー (Biacore AB, Uppsala SE)、Lasy共鳴ミラーセンサー (Fisons Applied Sensor Technology, Cambridge GB)、BIOS-1 回折格子結合平面光導波センサー (Artificial Sensor Instruments, Zurich CH)。

10

**【0078】**

ファージディスプレイで同定されたポリペプチドを標的発現細胞に対する結合能に関してスクリーニングする方法:

本発明の他の側面において、ファージディスプレイで同定された結合ポリペプチドを、標的発現細胞に対する結合能(標的を発現しない細胞には結合しない)に関してスクリーニングする方法が提供される。これらの方法は、ファージディスプレイにより同定されるペプチドのスクリーニングに関連した重大な問題に取り組んでいる: そのように同定されるペプチドは、慣用のアッセイにおいて、標的発現細胞に対してスクリーニングされることになる標的に対し十分な親和性をもたないことが多い。しかし、ファージで同定された特定のペプチドが標的発現細胞に結合する(発現しない細胞には結合しない)のを確かめることは、*in vivo*での潜在的な標的部分である結合ペプチドを同定する上で情報の重要な部分となる。該方法は、多価性結合に伴う親和性および結合活性の増大を利用して、標的発現細胞に低親和性のポリペプチドのスクリーニングを可能にする。

20

**【0079】**

この方法は、通常1以上の結合ポリペプチドを含む多量体構築物の作製およびスクリーニングから成る。たとえば、ファージディスプレイにより標的に結合するとして同定されるポリペプチドは、ビオチン化され、アビジン、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンと複合体を形成して、四量体構築物を形成する。次にこれらの四量体構築物を、所望の標的を発現する細胞および発現しない細胞とインキュベートし、四量体構築物の結合を検出する。結合は当該技術分野で公知のいずれかの検出方法を使用して検出することができる。たとえば、結合を検出するためにアビジン、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンは検出可能なマーカーに結合させることができる(たとえば、放射性標識、蛍光標識、または色調が変化する酵素標識、たとえばHRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)、TMB(テトラメチルベンジジン)またはアルカリ性ホスファターゼ)。

30

**【0080】**

ビオチン化ペプチドは好ましくは、ニュートラアビジン-HRPと複合体を形成する。ニュートラアビジンにはレクチン結合炭水化物部分および細胞接着受容体結合RYDドメインがないため、ニュートラアビジンは他の代替物より分子への非特異的結合が低い。Hiller et al., Biochem. J., 248: 167-171 (1987); Alon et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 170: 1236-41 (1990)を参照されたい。

40

**【0081】**

四量体構築物は、本来標的を発現する細胞、または標的を発現するように組換えDNA技術により操作されている細胞(たとえば形質移入体、形質転換体など)に対してスクリーニングすることができる。標的を発現するように形質移入されている細胞を使用する場合、mock形質移入細胞(すなわち、標的をコードする遺伝物質なしに形質移入された細胞)を対照として使用することができる。

**【0082】**

四量体複合体は、場合により血清存在下でスクリーニングすることができる。したがって、アッセイを用いて、ペプチドの標的への結合に対する血清の作用を速やかに評価する

50

ことができる。

【0083】

本明細書に開示される方法は、2以上の結合ポリペプチドを含有する二量体または多量体の標的化構築物に使用するために異なる結合ポリペプチドの組み合わせを作製し、評価する上で特に有用である。ビオチン/アビジン複合体を使用することで、1~4種の異なる結合ペプチドを含有する四量体構築物を比較的容易に作製することができる。さらに、同じ標的上の異なるエピトープに結合する2以上の標的化部分を含むことにより、標的化構築物の親和性および結合活性の増大が可能であることが見出されている。本明細書に記載のスクリーニング法は、そのような多量体構築物に含まれるとき増大する親和性を有することができる結合ポリペプチドの組み合わせの同定に有用である。

10

【0084】

好ましい態様において、本明細書に記載のスクリーニング法は、本明細書に記載されるような、ファージディスプレイにより同定されるKDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドのスクリーニングに使用することができる。以下の実施例5に詳細に記載されるように、これらの方法は、KDR発現細胞またはKDRを発現するように操作されている細胞へのKDR結合ポリペプチドの特異的結合を評価するために使用することができる。本発明のビオチン化KDR結合ポリペプチドとニュートラアビジン-HRPとの四量体複合体を作製して、KDRを発現するように形質移入された細胞およびmock形質移入細胞(いかなるKDRも含まない)に対してスクリーニングすることができる。

20

【0085】

実施例5に示すように、たとえポリペプチドの単座配位 $K_D$ が200nM~300nMの位数である場合であっても、KDR発現細胞に特異的に結合する(KDRを発現しない細胞には結合しない)KDR結合ポリペプチドを同定するために、アッセイを使用することができる。アッセイは、本発明の単一KDR結合ポリペプチドを4コピー含有するホモ四量体構築物、および2以上の異なるKDR結合ポリペプチドを含有するヘテロ四量体構築物をスクリーニングするために使用することができる。本発明に記載の方法は、多量体構築物、とりわけKDRの異なるエピトープに結合する2以上のKDR結合ポリペプチドを含有する構築物に使用するためのKDR結合ポリペプチドの組み合わせを評価するのにとりわけ有用である。

30

【0086】

アッセイは、KDR結合ポリペプチドに対する血清の効果を評価するために使用することもできる。実際、本明細書に開示されるスクリーニング方法を使用して、結合が血清により著しく影響を受けない配列番号264、294、および356のようなKDR結合ポリペプチドが同定された。

【0087】

KDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの改変または最適化：

説明したように、KDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの改変または最適化は本発明の範囲内であり、改変または最適化されたポリペプチドは「KDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチド」の定義の範囲内に包含される。とりわけ、ファージディスプレイにより同定されるポリペプチド配列を改変してその潜在力、薬物動態学的挙動、安定性および/または他の生物学的、物理的および化学的特性を最適化することができる。

40

【0088】

アミノ酸残基の置換

たとえば、得られるポリペプチドが上記の特性と類似するかまたは改善された特性を有すると予想して、親ポリペプチド配列に以下の等配電子的および/または保存的アミノ酸変化を行うことができる：

アルキル置換された疎水性アミノ酸の置換：分枝、環状および直鎖アルキル、アルケニルまたはアルキニル置換を含むC1~C10炭素由来の脂肪族側鎖によって置換されたアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、ノルロイシン、S-2-アミノ酪酸、S-シ

50

クロヘキシルアラニンまたは他の単純な - アミノ酸を含む。

【0089】

芳香族で置換された疎水性アミノ酸の置換：フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、ピフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、2-ベンゾチエニルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、ヒスチジン、先に記載の芳香族アミノ酸のアミノ化、アルキルアミノ化、ジアルキルアミノ化、アザ化、ハロゲン化（フルオロ、クロロ、ブromo、またはヨード）またはアルコキシ化（C1～C4）置換体を含み、これらの具体例としては：2-、3-または4-アミノフェニルアラニン、2-、3-、4-クロロフェニルアラニン、2-、3-または4-メチルフェニルアラニン、2-、3-または4-メトキシフェニルアラニン、5-アミノ-、5-クロロ-、5-メチル-または5-メトキシトリプトファン、2'-、3'-または4'-アミノ-、2'-、3'-または4'-クロロ-、2、3-または4-ピフェニルアラニン、2'-、3'-または4'-メチル-2、3または4-ピフェニルアラニン、および2-または3-ピリジルアラニンが挙げられる。

10

【0090】

塩基性官能基を含有するアミノ酸の置換：アルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン、2,3-ジアミノプロピオン酸、ホモアルギニン、先のアミノ酸のアルキル置換、アルケニル置換またはアリール置換（C1～C10までの分枝、線状または環状）誘導体であって、置換基はたとえばヘテロ原子（たとえば窒素または遠位窒素）、またはプロ-R位の炭素上のいずれであってもよい。実例となる化合物には以下のものが挙げられる：N-イソプロピル-リジン、3-(4-テトラヒドロピリジル)-グリシン、3-(4-テトラヒドロピリジル)-アラニン、N,N'-ジエチル-ホモアルギニン。アルキル基が炭素のプロ-R位を占める、-メチルアルギニン、-メチル2,3-ジアミノプロピオン酸、-メチルヒスチジン、-メチルオルニチンのような化合物も包含される。また、アルキル、芳香族、ヘテロ芳香族（ここでヘテロ芳香族基は1以上の窒素、酸素または硫黄原子を単独または組み合わせて有する）カルボン酸、または酸塩化物、活性エステル、活性アゾリドおよび関連する誘導体のような多くの周知の活性化誘導体のいずれか、ならびにリジン、オルニチン、または2,3-ジアミノプロピオン酸から形成されるアミドも包含される。

20

【0091】

酸性アミノ酸の置換：アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、2,4-ジアミノプロピオン酸のチロシン、アルキル、アリール、アリールアルキル、およびヘテロアリールスルホンアミド、オルニチンまたはリジンおよびテトラゾール-置換アルキルアミノ酸を含む。

30

【0092】

側鎖アミド残基の置換：アスパラギン、グルタミン、およびアスパラギンまたはグルタミンのアルキルまたは芳香族置換誘導体を含む。

ヒドロキシル含有アミノ酸の置換：セリン、スレオニン、ホモセリン、2,3-ジアミノプロピオン酸、およびセリンまたはスレオニンのアルキルまたは芳香族置換誘導体を含む。また、上記のそれぞれのカテゴリ-内のアミノ酸は同じ群の別のものに置換してもよいことが理解される。

40

【0093】

アミド結合の置換

特許の範囲内での他の型の改変は、ポリペプチドの骨格内のアミド結合を置換することである。たとえば、望ましくないタンパク質分解、または血清安定性を減少させて生物活性を低下もしくは消失させる他の分解経路を減らすかもしくは除去するため、またはコンホメーションの柔軟性を制限するかもしくは増大させるため、所望の方法で、存在するコンホメーションを模倣するかまたはコンホメーションを変化させる官能基でペプチド骨格内のアミド結合を置換することはよくあることである。そのような改変は、増大した結合親和性または改善された薬物動態学的挙動を生み出すことができる。ペプチド合成技術の

50

分野に精通している者は、得られるペプチドが同じかまたは改善された活性を有することができるかと予想して、2つのアミノ酸を結合するいずれかのアミド結合に対し、以下のようにアミド結合を変化させることができると理解される： - N - メチルアミドまたはペプチドアミド骨格チオアミドの挿入、同系の第2アミンを生み出すためのカルボニルの除去、セミカルバゾン誘導体を生み出すためのアザ - アミノ酸による1アミノ酸の置換、ならびにアミド結合代替物としてのE - オレフィンおよび置換したE - オレフィンの使用。

【0094】

D - アミノ酸の導入

特許の範囲内での他のアプローチは、不安定なペプチド結合に遠位または近位のD - アラニンまたは他のD - アミノ酸の導入である。この場合、置換されるL - アミノ酸に対し、D - アミノ酸の側鎖が保存的置換ではないようなD - アミノ酸で、そのようなD - アミノ酸置換をすることが可能であり、そして時に置換する必要があることが当業者には理解される。これはキラリティーの違い、したがって側鎖配向性の違いのためであり、置換されたL - アミノ酸の側鎖により提供されるものとは荷電、疎水性、立体的必要条件などが異なる部分を有する標的が、未検討の結合部位領域に接近することを可能にする。

10

【0095】

薬物動態学的および薬力学的特性を改善するための改変

具体的な適用におけるKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの使用は、薬物動態学的および薬力学的挙動を改善するためにペプチドの改変またはペプチドの製剤化を必要としてよいことも理解される。ペプチドの特性は、所望の物理的または化学的特性を付与すると考えられる部分の結合により変えられると予想される。そのような部分は、酸またはアミンを使用してそれぞれアミド結合もしくは尿素結合を介してペプチドに付加させてよく、ペプチドのN末端もしくはC末端、またはペプチド中に適切に位置するリジンもしくはリジン誘導体、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、オルニチン、またはペンダントアミン基またはペンダントアルコキシアミンもしくはヒドラジン基を有するペプチド中の他のアミノ酸のペンダントアミノ基に付加させてよい。導入される部分は、目的のペプチドおよびその特性を改変するための現存している要件に依存して、親水性、塩基性、または無極性アルキルもしくは芳香族基である基であってよい。

20

【0096】

アミノ酸残基のグリコシル化

本発明の範囲内でのさらに他の改変は、グリコシル化アミノ酸残基（たとえば、セリン、スレオニンまたはアスパラギン残基）を、単独で、または結合部分（または複数の部分）もしくはリンカー部分または両方のいずれかにおいて組み合わせて使用することである。標準状態を使用して行うことができるグリコシル化は溶解度を高めるため、薬物動態学および薬力学的を変化させるため、またはグリコシド部分を含む特異的または非特異的相互作用を介して結合を促進するために使用することができる。別の方法では、O - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - 3, 4, 6 - トリ - O - アセチル - D - グルコピラノシル)セリンまたは類似のスレオニン誘導体（D - またはL - アミノ酸）のようなグリコシル化アミノ酸を、手動もしくは自動固相ペプチド合成中に、または手動もしくは自動溶液相ペプチド合成においてペプチドに取り込むことができる。同様に、D - またはL - N - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - 3, 4, 6 - トリ - O - アセチル - D - グルコピラノシル) - アスパラギンを使用することができる。グリコシル化に使用することができる適切に官能化および活性化された炭水化物部分の作用により、ペンダント酸素、窒素または硫黄官能基上でグリコシル化されたアミノ酸の使用が期待される。そのような炭水化物官能基は単糖、二糖、またはオリゴ糖のより大きな集合体であってよい（Kihlberg, Jan. (2000) Glycopeptide synthesis. In; Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach (Chan, W. C. and White, P. D. 編) Oxford University Press, New York, NY 8章、pp 195 - 213)。

30

40

50

## 【0097】

また、アノマー炭素での脱離基の活性化を介した、グリコシル化以外の手段によるアミノ酸の炭水化物官能基の付加が期待される。グリコシドへのアミノ酸の結合は炭水化物官能基のアノマー炭素への結合の形成に限定されない。そのかわり、アミノ酸への炭水化物部分の結合は、C - ヘテロ原子、C - Cまたはヘテロ原子 - ヘテロ原子（例としてはS - S、O - N、N - N、P - O、P - Nが挙げられる）結合のために使用される、当該技術分野で公知の方法によるいずれかの適切で十分に反応性の酸素原子、窒素原子、炭素原子、または他の炭水化物官能基のペンダント原子を使用するものであってよい。

## 【0098】

## 塩の形成

これらのペプチドの水溶性または形成し易さを増すことができる、異なる塩を形成することも本発明の範囲内である。これらには、N - メチルグルカミン（メグルミン）、酢酸塩、シュウ酸塩、アスコルビン酸塩などが挙げられるが、それらに限定されない。

## 【0099】

## 構造特性を保持する構造改変

本発明の範囲内でのさらに他の改変は、環状ポリペプチドの切断である。本発明の多くのポリペプチドの環の性質は、とりわけ環の内部で、ペプチド配列が利用できる立体構造の空間を限定する。したがって、N末端またはC末端領域のいずれかにおいて、環から遠位のまたは近位であっても1以上の残基によりペプチドを切断すると、類似または改善された生物活性を有する短鎖ペプチドを提供することができる。結合活性にかかわるアミノ酸の特有の配列は、3アミノ酸程度であっても同定され、RGDペプチドとして表される（たとえばPlow et al., Blood, 70(1):110-5(1987); Oldberg et al., Journal of Biological Chemistry, 263(36):19433-19436(1988); Taub et al., Journal of Biological Chemistry, 264(1):259-65(1989); Andrieux et al., Journal of Biological Chemistry, 264(16):9258-65(1989); および米国特許第5,773,412号および米国特許第5,759,996号を参照されたい。これらはそれぞれ本明細書中に援用される。

## 【0100】

また、無関係なアミノ酸は取り除くが、実質的に重要な結合残基は含むように大きなペプチド環を実質的に短縮できることが文献に示されている。本明細書中に援用される米国特許第5,556,939号を参照されたい。

## 【0101】

短縮された環状ペプチドは、ジスルフィド結合または適切に位置するカルボン酸基とアミノ基とのアミド結合を使用して形成することができる。

さらに、D - アミノ酸をペプチド配列に添加して、回転特性を安定化することができる（とりわけグリシンの場合）。別の方法では、、 またはジペプチドまたは回転模倣物（たとえば $\beta$ -アラニン、 $\beta$ -グルタミン酸、または $\beta$ -アミノ酸模倣物）（そのいくつかは図26の1、2および3に図式化されている）を使用して、ペプチド中の構造モチーフおよび回転特性を模倣し、同時にタンパク質分解に対する安定性を提供し、たとえば立体構造の安定性および溶解度のような他の特性を促進することができる（構造1：Hart et al., J. Org. Chem., 64:2998-2999(1999); 構造2：Hanesian et al., "Synthesis of a Versatile Peptidomimetic Scaffold" in Methods in Molecular Medicine, Vol. 23: Peptidomimetics Protocols, W.M. Kazmierski, 編 (Humana Press Inc., Totowa, N.J., 1999), 10章, pp. 161-174; 構造3：WO 01/1635)。

## 【0102】

10

20

30

40

50

### ジスルフィド模倣物の置換

本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチド内のジスルフィド結合に対するジスルフィド模倣物の置換も本発明の範囲内である。

#### 【0103】

$^{99m}\text{Tc}$ を基にした放射性医薬品作製にジスルフィド含有ペプチドを使用する場合、重大な問題はジスルフィド結合の存在である。過テクネチウム酸イオンの還元、およびその後のTc特異的キレート基を生じる物質への還元Tc種の取込に依存する経路を介して $^{99m}\text{Tc}$ を取り込むように設計された手順中に、ジスルフィド結合の完全性を維持することは困難である。これは、放射性医薬品をワンステップで作製するように考案されたキット製品において一般的に使用される還元剤により、ジスルフィド結合がかなり容易に還元されるためである。したがって、Tcキレート化中にジスルフィド結合が還元されやすいことが、ジスルフィド結合の模倣物による置換を必要とするかもしれない。したがって、本発明の範囲内での他の改変は、本発明のKDR結合ポリペプチドの活性および他の所望の特性を維持しながら、本明細書に開示されるかまたは当業者に公知の方法を使用してジスルフィド部分を模倣物で置換することである：

#### 1) オキシムリンカー

オキシム部分は多くの状況において研究者らによりリンカーとして使用されている。Mutter et al., の研究 (Wahl and Mutter, Tetrahedron Lett., 37: 6861 - 6864 (1996)) は最も興味深いものである。アミノアルコール官能基を含有するアミノ酸4、およびアルコキシアミノ官能基を含有する5はペプチド鎖に取り込まれるが、必ずしもペプチド鎖の末端ではない(図27)。ペプチド形成後、側鎖保護基は除去される。アルデヒド基は暴露され、オキシム結合が形成される。

#### 【0104】

#### 2) ランチオニンリンカー

ランチオニンは環状スルフィドであり、ジスルフィド結合(S-S)は炭素-硫黄(C-S)結合により置換される。したがって、還元に対する不安定性はかなり低い。ランチオニンは1971年以来、多数の方法により作製されている。

#### 【0105】

プロモアセチル化ペプチドを使用したランチオニンの作製

ランチオニンは公知の方法により容易に作製することができる。たとえば、Robey et al., Anal. Biochem., 177: 373 - 377 (1989); Inman et al., Bioconjugate Chem., 2: 458 - 463 (1991); Ploinsky et al., Med. Chem., 35: 4185 - 4194 (1992); Mayer et al., "Peptides, Frontiers of Peptide Science" in Proceedings of the 15<sup>th</sup> American Peptide Symposium, Tam & Kaumaya (編), June 14 ~ 19, 1995, Nashville, Tenn. (Kluwer Academic Pub., Boston), pp. 291 - 292; Wakao et al., Jpn. Kokai Tokyo Koho, JP 07300452 A2 (1995) を参照されたい。Boc自動ペプチド合成機を使用したペプチドの作製、その後のペプチド末端とプロモ酢酸とのカップリングにより十分な収率でプロモアセチル化ペプチドが得られる。ペプチドの開裂および脱保護はHF/アニソールを使用して行われる。ペプチドがシステイン基を有する場合、その反応性は低いpHにより制御できる。培地のpHを6~7に上げると、ポリマー化または環化のいずれかが起こる。ポリマー化は高濃度(100mg/mL)が好都合であるが、一方環化は低濃度(1mg/mL)が好都合であり、たとえば6は7に環化する(スキーム1: 図28)。

#### 【0106】

Inman et al., は、Bocペプチド合成に使用して配列のどこかにプロモ

アセチルを生じる部分を配置することが可能であるブロモアセチル基の担体としての N - ( B o c ) - N - [ N - ( ブロモアセチル ) - - アラニル ] - L - リジンの使用を示した。予備的な実験において、かれらはシステインからブロモアセチル - リジン誘導体を分離する 4 ~ 6 アミノ酸を持つペプチドが環化する傾向があることを見出し、この方法の潜在的な有用性を示した。

【 0 1 0 7 】

アクリルアミドへのシステインチオール付加によるランチオニンの作製

この方法のいくつかの変法を使用することができる。樹脂結合セリンは、ブロム化 - デヒドロブロム化 - チオール付加の順序を使用するか、またはジスクシニミジルカーボネートによる脱水、その後のチオール付加のいずれかにより作製することができる。 P l o i n s k y e t a l . , M . J . M e d . C h e m . , 3 5 : 4 1 8 5 - 4 1 9 4 ( 1 9 9 2 ) ; M a y e r e t a l . , " P e p t i d e s , F r o n t i e r s o f P e p t i d e S c i e n c e " i n P r o c e e d i n g s o f t h e 1 5 <sup>t h</sup> A m e r i c a n P e p t i d e S y m p o s i u m , T a m & K a u m a y a ( 編 ) , J u n e 1 4 ~ 1 9 , 1 9 9 5 , N a s h v i l l e , T e n n . ( K l u m e r A c a d e m i c P u b . , B o s t o n ) , p p . 2 9 1 - 2 9 2 。 ア ク リ ル ア ミ ド へ の チ オ ー ル 共 役 物 付 加 も 詳 細 に 記 載 さ れ 、 ア ク リ ル ア ミ ド へ の 2 - メ ル カ プ ト エ タ ノ ー ル の 付 加 に つ い て 言 及 さ れ て い る 。 W a k a o e t a l . , J p n . K o k a i T o k y o K o h o , J P 0 7 3 0 0 4 5 2 A 2 ( 1 9 9 5 ) 。

10

【 0 1 0 8 】

3) ジアリアルエーテルまたはジアリアルアミン結合：アリアルボロン酸およびチロシンの分子内環化に由来するジアリアルエーテル結合

最近、空气中、周囲温度で、ジクロロメタン中において塩基としてピリジンまたはトリエチルアミンを使用した、酢酸銅存在下におけるフェノール、アミンおよびヘテロ環式アミンとアリアルボロン酸の反応が十分な収率(98%の高率)で非対称ジアリアルエーテルおよび関連するアミンを提供することが報告されている。 E v a n s e t a l . , T e t r a h e d r o n L e t t . , 39 : 2 9 3 7 - 2 9 4 0 ( 1 9 9 8 ) ; C h a m e t a l . , T e t r a h e d r o n L e t t . , 39 : 2 9 3 3 - 2 9 3 6 ( 1 9 9 8 ) ; L a m e t a l . , T e t r a h e d r o n L e t t . , 39 : 2 9 4 1 - 2 9 4 4 ( 1 9 9 8 ) を 参 照 さ れ たい。 N - 保 護 チ ロ シ ン 誘 導 体 が フ ェ ノ ー ル 成 分 の 場 合 、 収 率 は 同 様 に 9 8 % の 高 さ で あ っ た 。 こ の こ と は 、 ア ミ ノ 酸 ア ミ ド ( ペ プ チ ド ) が 形 質 転 換 に 安 定 で 、 収 率 が 高 い こ と を 示 す 。 ペ プ チ ド か ら ラ ク タ ム へ の 容 易 な 分 子 内 環 化 、 S<sub>N</sub>Ar 反 応 に 基 づ いた 分 子 内 ビ ア リ ー ル エ ー テ ル 形 成 お よ び 高 度 の 希 釈 条 件 下 ま た は 樹 脂 上 で の 分 子 内 環 化 反 応 の 一 般 性 の 点 か ら 見 て 、 分 子 内 反 応 に 関 す る 先 例 が 存 在 す る 。 こ こ で 擬 希 釈 効 果 は 高 度 な 希 釈 条 件 を 模 倣 す る 。

20

30

【 0 1 0 9 】

4) システイン部分とペプチドアルデヒドの分子内反応を介したチアゾリジン結合による環状ペプチドの形成

使用可能な別の方法としては、近接アミノメルカプタン官能基(たとえば、通常線状配列の末端におけるシステインの配置に由来するか、またはリジンの側鎖窒素を介して配列に結合する)およびアルデヒド官能基の分子内環化が挙げられ、それはチアゾリジンを提供して二環式ペプチドを形成し、その環の一方は主鎖の残基により形成され、2番目の環はチアゾリジン環である。スキーム2(図29)は1つの例を提供する。必要なアルデヒド官能基は、適切に配置された近接アミノアルコール官能基のメタ過ヨウ素酸ナトリウム開裂により作製可能であり、そしてそれはリジン部分への側鎖アミノ基への付加により鎖に結合した非保護セリンとして存在することができる。ある場合には、必要なアルデヒド官能基は、鎖のC末端またはN末端での保護されたアルデヒド誘導体の暴露により作製される。この方法の実例は B o t t i e t a l . , J . A m . C h e m . S o c . , 1 1 8 : 1 0 0 1 8 - 1 0 0 3 4 ( 1 9 9 6 ) に 見 出 さ れ る 。

40

【 0 1 1 0 】

50

## 5) 樹脂上のカルボキシル基とペンダントアミノ基の分子内環化に基づくラクタム

大環状ペプチドは頭部から尾部への環化またはペンダント基の環化によるラクタム形成により作製されている。基本的な方法は、アミン保護基およびカルボキシル保護基を選択的に除去することができる、十分に保護されたペプチドを作製することである。直交保護法が開発されている。開発されているものの中で、アリル、トリチル、およびDde法が最も使用されている。Mellor et al., "Synthesis of Modified Peptides", in Fmoc Solid Phase Synthesis: A Practical Approach, White and Chan (編) (Oxford University Press, New York, 2000), 6章, pp. 169-178を参照されたい。Dde法は、カルボン酸官能基 (Dmabエステル) およびアミノ基 (Dde基) の両方に対して類似した保護基を使用するため興味を持たれる。両基は周囲温度でDMF中2~10%ヒドラジンにより除去される。あるいは、Ddeはアミノ基に対して使用され、そしてアリル基がカルボキシルに対して使用されてもよい。

10

## 【0111】

標準ペプチドカップリング試薬 (たとえばHATU、PyBOPなど) を使用した分子内カップリングにより得られるラクタム官能基は、ジスルフィド結合の代替物として作用することができる。Dde/Dmab法は、スキーム3a (図30) に示す。

## 【0112】

したがって、たとえばDde保護リジンおよびDmabエステルを含む線状配列は、低負荷 (約0.1~0.2 mmol/g) において、Tentagelを基礎にしたRinkアミド樹脂上で作製することができる。ヒドラジンによる両官能基の脱保護、続く樹脂上の環化により所望の生成物が得られる。

20

## 【0113】

アリル法では、スキーム3b (図31) に示すように、環化を受けることになるペンダントカルボキシル基はアリルエステルとして保護され、そしてペンダントアミノ基はアロック (alloc) 基として保護される。樹脂上で、両基はDMF中、N-メチルモルホリンおよび酢酸の存在下、パラジウムトリス-トリフェニルホスフィンによる処理により選択的に暴露される。残りのパラジウム塩はDMF中DIEAの存在下でジエチルチオカルバメートナトリウムを使用して取り除き、その後DMFで洗浄する。ラクタム環は、N-メチルモルホリンの存在下でHATU/HOAtを使用して形成される。上記のように、他のカップリング試薬も使用することができる。上記のようにペプチドプロセッシングが行われ、所望のペプチドラクタムを提供する。

30

## 【0114】

その後、樹脂からの開裂および精製も行うことができる。ペプチドのN末端の官能基化に関しては、アミノ酸、たとえばトランス-4-(iV-Dde)メチルアミノシクロヘキサンカルボン酸、トランス-4-(iV-Dde)メチルアミノ安息香酸、またはそれらのアロック同族体を使用できると理解すべきである。さらに別の方法は、樹脂からの開裂中の分子内ラクタム形成にセーフティーキャッチ法を使用することである。

## 【0115】

したがって、たとえばDde保護リジンおよびDmabエステルを含む線状配列は、低負荷 (約0.1~0.2 mmol/g) において、Tentagelを基礎にしたRinkアミド樹脂上で作製することができる。ヒドラジンによる両官能基の脱保護、続く樹脂上の環化により所望の生成物が得られる。その後、樹脂からの開裂および精製も行うことができる。ペプチドのN末端の官能基化に関しては、ジアミノ酸、たとえばトランス-4-(iV-Dde)メチルアミノシクロヘキサンカルボン酸またはトランス-4-(iV-Dde)メチルアミノ安息香酸が必要であると理解すべきである。別の方法は、樹脂からの開裂中の分子内ラクタム形成にセーフティーキャッチ法を使用することである。

40

## 【0116】

## 6) オレフィン複分解に基づく環状ペプチド

50

Grubbs 反応 (スキーム 4、図 32) はオレフィン結合の複分解/環化を含み、そして以下に示すように説明される。Schuster et al., *Angewandte Chem. Int. Edn. Engl.*, 36:2036-2056 (1997); Miller et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 118:9606-9614 (1996) を参照されたい。

【0117】

出発物質がジオレフィン (16) である場合、得られる産物は環状化合物 (17) であることは容易に理解される (図 32)。反応は、実際オレフィン官能化ペプチドからの環状化合物の作製に適用されている。たとえば、Pernerstorfer et al., *Chem. Commun.*, 20:1949-50 (1997) を参照されたい; また Covalent Capture and stabilization of cylindrical-sheet peptide assemblies, Clark et al., *Chem. Eur. J.*, 5(2):782-792 (1999); Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis, Blackwell et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37(23):3281-3284 (1998); Synthesis of novel cyclic protease inhibitors using Grubbs olefin metathesis, Ripka et al., *Med. Chem. Lett.*, 8(4):357-3760 (1998); Application of Ring-closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides, Miller et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 118(40):9606-9614 (1996); Supramolecular Design by Covalent Capture, Design of a Peptide Cylinder via Hydrogen-Bond-Promoted Intermolecular Olefin Metathesis, Clark et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117(49):12364-12365 (1995); Synthesis of Conformationally Restricted Amino Acids and Peptides Employing Olefin Metathesis, Miller et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117(21):5855-5856 (1995) を参照されたい。ジスルフィド結合含有ペプチドの代替物としてのカルバブリッジ環状ペプチドを作製するために、C-アシル化アミノ酸またはおそらく N-アシル化アミノ酸のいずれかを作製し、この反応においてそれらを使用することができる。

【0118】

また、オレフィン基を持つ新規化合物を作製することができる。オレフィン含有テザーを持つチロシンヒドロキシルの官能化は一選択肢である。リジン-アミノ基はたとえばアシル化部分の一部としてのオレフィン含有ユニットの付加物を持つ別の選択肢である。かわりにリジン側鎖アミノ基がオレフィン含有テザーによりアルキル化される場合、それはさらにレポーターの結合点として依然として機能することができる。リジン、オルニチン、またはジアミノプロピオン側鎖アミノ基のアシル化剤としての 5-ペンタン酸の使用は、別の可能性である。オレフィン含有テザーの長さも構造活性関連を調べるために変化させることができる。

【0119】

ペプチド配列の操作

本発明の範囲内での他の改変にはペプチド配列の一般的な操作が挙げられ、それは類似または改善した生物学的特性を有するペプチドを生じると考えることができる。これらには、アミノ酸転位 (配列中のアミノ酸を交換する)、元の配列または改変した元の配列のかわりのレトロインベルソペプチドの使用、ペプトイドおよびレトロ-インベルソペプト

イド配列が挙げられる。具体的な残基がペプチドのかわりにペプトイドであり、それらが完全にペプチドでもなく、完全にペプトイドでもないハイブリッド分子を生じる構造も同様に考えられる。

#### 【0120】

##### リンカー

本発明の範囲内でのさらなる改変には、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチドの標的化配列と検出可能な標識または治療薬間へのリンカーまたはスペーサーの導入が挙げられる。そのようなリンカー/スペーサーの使用は、結合ペプチドの適切な特性を改善する（たとえば、血清安定性を増大させる、など）ことができる。これらのリンカーには、当該技術分野で一般的な、置換、または非置換アルキル鎖、ポリエチレングリコール誘導体、アミノ酸スペーサー、糖、または脂肪族もしくは芳香族スペーサーが挙げられるが、それらに限定されない。さらにまた、上記の部分の組み合わせであるリンカーを使用して、ペプチドの特性に特定の利点を与えることができる。リンカーを持つ脂質分子は結合して超音波バブル、リポソームまたは他の凝集に基づいた構築物を形成することができる。そのような構築物は診断レポーター、治療薬（たとえば、治療のための化学的「弾頭」）またはこれらの組み合わせの標的化および送達のための物質として使用することができる。

10

#### 【0121】

##### KDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの多量体構築物

また、本発明の1種以上のVEGFまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの二量体、多量体、またはポリマーを使用する構築物が企図される。実際、二量体および多量体の形成によって効力の低いペプチドまたは低分子の結合を実質的に増加できるという十分な文献報告がある。したがって、二量体および多量体構築物（同種または異種の両方）は本発明の範囲内である。実際、実施例でより詳細に説明するように、二量体または多量体構築物中に複数のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチド配列を含むことは本発明の範囲内である。さらに、以下の実施例4で示すように、これらの構築物は単量体構築物に比べ改善された結合を示すことができる。二量体構築物のポリペプチド配列は、それらのN末端、もしくはC末端、または適切に配置されたリジン部分（またはペンダントオキシアミノまたは他の求核基のような選択的に誘導体化可能な基を生じる別の官能基）のN-窒素に結合可能であるか、または適切な結合化学を使用して1以上のリンカーを介して一緒になることができる。このカップリング化学には、アミド、尿素、チオウレア、オキシム、またはアミノアセチルアミド（クロロ-またはプロモアセトアミド誘導体由来）が挙げられるが、それらに限定されない。たとえば、以下の方法のいずれかを使用して、本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの二量体または多量体構築物を作製することができる。

20

30

#### 【0122】

##### 方法A

十分に保護されたKDR結合ペプチドは、自動または手動Fmocペプチド合成プロトコールを使用してEllman型セーフティーキャッチ樹脂上で構築することができる。Backs et al., J. Am. Chem. Soc., 118(12): 3055-56 (1996)。それとは別に、当該技術分野で公知のペプチド合成の標準法を使用して、ジ-リジン誘導体を2-クロロトリチル樹脂上で合成することができる。たとえば、Fields et al., "Principles and Practice of Solid Phase Synthesis" in Synthetic Peptides, A Users Guide, Grand, 編. (W. H. Freeman Co. New York, 1992), 3章, pp. 77-183; Barlos et al., "Convergent Peptide Synthesis" in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Chan, W. C. and White, P. D., 編 (Oxford University Press, New York, 2000), 9章, pp. 215-228を参照されたい

40

50

。側鎖保護基を除去せずに、2-クロロトリチル樹脂からのこの遊離、カルボキシ基の活性化、およびいずれかのアミン官能化標識基とのカップリングはジ-リジン誘導体を提供し、そのペンダント窒素原子は暴露されて2種の遊離アミノ基を得ることができる。先に記載のセーフティーキャッチ樹脂は活性化され、所望するN-脱保護標識基-官能化ジ-リジン誘導体が活性化セーフティーキャッチ樹脂に付加される。ペンダントアミノ基は、今度は樹脂から離れ、ジ-リジン構造の構成部分であるセーフティーキャッチ樹脂結合ペプチドのカルボキシ末端によりアシル化される。過剰なセーフティーキャッチ樹脂結合ペプチドを使用してジ-リジン構築物のアミノ基の完全な反応を保證することができる。このスキームにおける反応パートナーの比の最適化は収率を最適化する。KDR結合ペプチド上の保護基はトリフルオロ酢酸を基礎にした開裂プロトコールを使用して取り除く。

10

## 【0123】

1つの構築物中に2以上のKDR結合ペプチドが存在する二量体および多量体構築物の合成は容易に行うことができる。直交保護スキーム(たとえば、1窒素上にアリルオキシカルボニル基および他の窒素上にFmoc基、または他の窒素上にiV-Dde保護基と結合したFmoc基を使用する)を使用して、上記のジ-リジン誘導体のペンダント窒素原子を区別することができる。

## 【0124】

アミノ基の1つを暴露し、得られた産物を上記の活性化セーフティーキャッチ樹脂結合KDR結合ペプチドと反応させると、結合した単一のKDR結合ペプチドを有するジ-リジン構築物が提供される。第2の保護基の除去は残っている窒素を暴露する。Mellor et al., "Synthesis of Modified Peptides" in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Chan, W.C. and White, P.D., 編(Oxford University Press, New York, 2000), 6章, pp. 169-176も参照されたい。得られた産物と別のKDR結合ペプチドを提示する第2のセーフティーキャッチ樹脂を反応させて十分に保護されたホモ二量体構築物を提供し、トリフルオロ酢酸により保護基を除去した後、所望する物質を提供する。

20

## 【0125】

## 方法B

通常Fmocペプチド合成プロトコールを使用して、KDR結合ペプチドは自動または手動ペプチドカップリング法によりRinkアミド樹脂上に集められる。ペプチドは、たとえばリジン部分の-アミノ基のような付加的な求核基を有してよいリンカーまたはリンカー標識基構築物により官能化されたC末端またはN末端を有してよい。保護基の開裂は、トリフルオロ酢酸を使用して、ペプチドの性質に依存した適切な調節物質により行うことができる。十分に脱保護されたペプチドはその後、市販のグルタル酸ビス-N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Tyger Scientific, Inc.)のような過剰な二官能求電子試薬と反応する。得られたグルタル酸のモノアミド化、モノ-N-ヒドロキシスクシニミジルエステルは次に同じペプチドの付加的な当量、または異なるKDR-結合ペプチドの当量で処理する。得られた物質のHPLCによる精製により適切な標識基を生じる所望のホモ二量体構築物が得られる。

30

40

## 【0126】

## 方法C

モジュール式スキームを使用して、上記の適切な標識基を生じる二量体またはより重合した多量体構築物を作製することができる。簡単に説明すると、fmoc-リジン(iV-Dde)Rinkアミド樹脂をピペリジンで処理し、fmoc部分を除去する。次に標識官能基、たとえばピオチン、5-カルボキシフルオレセインまたは、N,N-ジメチル-Gly-Ser(O-t-Bu)-(AcM)-Gly-OHを窒素原子に結合させる。樹脂は次にヒドラジンで処理してiV-Dde基を除去する。完全な洗浄後、樹脂をDMF、NMPまたはジクロロメタンのような適切な溶媒中で、塩化シアヌル、およびジイ

50

ソプロピルエチルアミンのようなヒンダード塩基で処理し、樹脂に結合した単官能化ジクロロトリアジンを提供する。その後、残余塩素原子のKDR結合ペプチドの2当量による順次置換は、樹脂結合ホモ二量体標識基官能化構築物を提供する。Falorni et al., Tetrahedron Lett., 39(41):7607-7610(1998); Johnson et al., Tetrahedron Lett., 54(16):4097-4106(1998); Stankova et al., Mol. Diversity, 2(1/2):75-80(1996)。生じるペプチドは、状態が保証するので保護されても保護されなくてもよい。保護基の開裂は上記のようなトリフルオロ酢酸を基礎にした脱保護試薬を使用して行われ、そして所望の物質は高速液体クロマトグラフィーにより精製される。

10

## 【0127】

これらの方法のそれぞれにおいて、リジン誘導体を順次使用して多量体の多重度を増やすことができる。KDR結合ペプチド間の距離を変化させる足場として作用するために必要数のマスクされまたは直交保護された窒素原子を有する関連したより堅い分子を使用して(互いにおよびレポーターに対してKDR結合ペプチドの運動および相対的位置を束縛することにより)構築物の堅さを増すことは、完全にA~Cの方法および本明細書に記載されるすべての他の方法の範囲内である。先に引用された参考文献はそのまま本明細書に援用される。

## 【0128】

KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの用途

20

本発明に記載のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分は*in vitro*および*in vivo*でKDRまたはVEGF/KDR複合体の検出および/または画像化、とりわけ先に説明したように、VEGFおよびKDRが密接に関連する血管新生部位の検出および/または画像化に非常に有用である。KDRまたはVEGF/KDR複合体のアッセイまたは画像化のいずれが適切な方法を使用することができる。本発明のKDRおよびVEGF/KDR複合体結合部分はまた、血管新生に関連した疾患状態または多数の病因に関連した状態を含む、多様なそのような疾患状態の治療に役立つ。本発明のKDRおよびVEGF/KDR複合体結合部分は、それら自体治療薬として使用してよく、または血管新生部位を含むKDR発現細胞に1以上の治療薬(たとえば、化学療法剤、放射線治療剤、遺伝物質など)を局在化させるために使用できる。

30

## 【0129】

*in vitro*

溶液でのKDRまたはVEGF/KDR複合体の検出には、本発明に記載の結合ポリペプチドを検出可能に標識して、たとえば蛍光的に標識、酵素的に標識、または放射性もしくは常磁性金属で標識して溶液と接触させてよく、その後結合ポリペプチドとKDRまたはVEGF/KDR複合体標的間の複合体の形成を検出することができる。例としては、蛍光標識KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチドは*in vitro*でのKDRまたはVEGF/KDR複合体検出アッセイに使用してよく、ここでペプチドは溶液に添加され、結合が起きる条件下でKDRまたはVEGF/KDR複合体が試験される。蛍光標識KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチドとKDRまたはVEGF/KDR複合体標的間の複合体は、遊離ペプチドと比較した、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチドから生じる増大した蛍光偏光を測定することにより、検出し、定量することができる。

40

## 【0130】

あるいは、サンドイッチ型「ELISA」を使用してもよく、ここでKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、プラスチックチューブまたはウェルのような固体支持体上に固定化され、そしてKDRまたはVEGF/KDR複合体標的を含むと推定される溶液と固定化結合部分を接触させ、非複合体を洗浄し、複合体形成したポリペプチドをKDRまたはVEGF/KDR複合体を認識するモノクローナル抗体のような適切な検出試薬を使用して検出する。モノクローナル抗体は、たとえば放射標識、ホースラディ

50

ツシュペルオキシダーゼなどのような酵素との結合、蛍光標識などで検出可能に標識されていることを含む、当該技術分野で公知の慣用の手段により検出可能である。

【0131】

溶液中または溶液由来の可溶性KDRまたはVEGF/KDR複合体の検出または精製のために、本発明の結合ポリペプチドをクロマトグラフィー支持体または他のマトリクス材料のような固体基質上に固定化し、固定化された結合体を結合ポリペプチド：KDR複合体、または結合ポリペプチド：VEGF/KDR複合体の形成に適切な条件下で、溶液に負荷するか、または溶液と接触させることができる。溶液の非結合部分はたとえば、抗KDRもしくは抗VEGF/KDR複合体抗体または抗結合ポリペプチド抗体を使用して検出してよく、またはKDRまたはVEGF/KDR複合体標識は適切な溶出条件で結合部分から遊離させてもよい。

10

【0132】

血管新生の生物学およびそれを開始し、維持することにおけるVEGFおよびKDRの役割は多くの研究者によって検討されていて、研究および開発の活発な分野であり続けている。そのような研究および開発の促進において、大量のKDRまたはVEGF/KDR複合体を純粋な形状で精製する方法が好ましく、そして上記の通常の精製法を使用した本発明に記載の結合ポリペプチドはその目的にとりわけ有用である。

*in vivo*

診断画像法

本発明に記載のポリペプチドのとおりわけ好ましい用途は、たとえば生存および転移に血管新生を必要とする新生物性腫瘍、または他の血管新生活性部位のような、KDR発現組織の肉眼的に判読し易い画像の作製である。本明細書に開示されたKDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、所望によりリンカーを介して、診断用検出に適切な標識とポリペプチドを結合することにより造影剤に変換させることができる。好ましくは、他の血清タンパク質よりKDRまたはVEGF/KDR複合体に対してより高い特異性を示すペプチドを、使用することになる検出方法に適切な標識に結合または連結する。たとえば、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、核磁気共鳴画像法(MRI)に適切な常磁性キレート剤に対するリンカー(またはリンカーなしに)、X線、PET、もしくはシンチグラフィーイメージングに適切な放射性標識(放射性金属に対するキレート剤を含む)、超音波検出に適切な超音波造影剤(たとえば安定化マイクロバブル、超音波造影剤、ミクロスフェアまたはガス封入「リポソーム」と呼ばれているもの)、または光学画像化色素と結合することができる。

20

30

【0133】

適切なリンカーは、当該技術分野で公知の置換または非置換アルキル鎖、アミノ酸鎖(たとえばポリグリシン)、ポリエチレングリコール、ポリアミド、および他の簡単な高分子リンカーであってよい。

【0134】

一般に、検出可能に標識されたKDRまたはVEGF/KDR複合体部分を使用する技術は、患者の身体外部で検出可能なシグナルを標識が発生するという前提に基づく。たとえば、検出可能に標識されたKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分が、たとえば血管新生の検出が望ましい患者に投与される場合、KDRまたはVEGF/KDR複合体に対するKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分の高親和性が、結合部分を血管新生部位に結合させ、そして血管新生部位に標識を蓄積させる。血管新生部位に標識した結合部分が局在するには十分な時間が予想される。標識ペプチドにより発生したシグナルは使用する標識の型に従って変化するスキャンニング装置により検出され、そしてシグナルは血管新生部位の画像に変換される。

40

【0135】

別の態様において、検出可能な標識または放射線治療用造影剤によりKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを直接標識するかわりに、本発明のペプチドをたとえば、アビジン、ビオチン、または検出可能な標識もしくは放射線治療剤に結合する抗体

50

もしくは抗体フラグメントと結合させることができる。たとえば、1以上のKDR結合ペプチドはKDR発現細胞に*in vivo*で結合するために、ストレプトアビジン(潜在的に多価結合する)に結合させてよい。非結合標的化構築物が体内から排出された後、標的化構築物が結合する部位に速やかに濃縮される、ビオチン化された検出可能な標識もしくは放射線治療用造影剤(たとえば放射性金属と複合体形成したキレート分子)を注入することができる。いくつかの状況におけるこの方法は、検出可能な標識投与後の画像化が可能になるまでに要する時間を少なくすることができる。それはまた、標的部位でのシグナル対ノイズ比を高め、必要な放射性標識または放射線治療用造影剤の量を減らすことができる。これは、たとえば骨髄、腎臓、および肝臓のような正常であるが照射に感受性が高い身体部位に送達される放射線の線量として放射性標識または放射線治療剤が使用される場合、とりわけ有用である。ときどきプレターゲットティング法、または2ステップもしくは3ステップ法と呼ばれるこの方法は、S. F. RosebroughのQ. J. Nucl. Med., 40: 234-251 (1996)に総説され、これを本明細書に援用する。

#### 【0136】

##### A. 核磁気共鳴画像法

本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分は好都合には、MRIで使用する造影剤を形成するために1以上の常磁性金属キレート剤と結合することができる。好ましい常磁性金属イオンは原子番号21~29、42、44、または57~83を有する。これには、1、およびより好ましくは5以上の不対電子および少なくとも1.7 Bohr磁子の磁気モーメントを有する遷移金属またはランタン系が挙げられる。好ましい常磁性金属にはクロム(III)、マンガン(II)、マンガン(III)、鉄(II)、鉄(III)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、プラセオジウム(III)、ネオジウム(III)、サマリウム(III)、ガドリニウム(III)、テルビウム(III)、ジスポジウム(III)、ホルミウム(III)、エルビウム(III)、ユーロピウム(III)およびイッテルビウム(III)、クロム(III)、鉄(III)、およびガドリニウム(III)が挙げられる。3価カチオン、 $Gd^{3+}$ は高い緩和性および低い毒性、さらに患者による金属の望ましくない代謝を最小にするただ1つの生物学的に好都合な酸化状態で存在するという利点のために、MRI造影剤にはとりわけ好ましい。別の有用な金属は比較的安価な $Cr^{3+}$ である。 $Gd(III)$ キレート剤は1988年以来臨床および放射線MR適用に使用され、現在およそ30%のMR試験がガドリニウムを基礎にした造影剤を使用する。あるいは、本発明のヘテロ多量体も1以上の超常磁性粒子と結合することができる。

#### 【0137】

当業者は、血管新生を検出するために必要な量に従い、そして対象に対する金属の毒性のような他の因子を考慮して金属を選択するであろう(Tweedle et al., Magnetic Resonance Imaging (2版)、1巻、Partain et al., 編(W. B. Saunders Co. 1988), pp. 796-797)。一般に、個々の金属の望ましい量はその緩和性に比例し、金属の生体内分布、薬物動態学および代謝により改変されることになる。

#### 【0138】

常磁性金属キレート剤(複数のキレート剤)は、常磁性金属のリガンドとして作用し、それと複合体を形成する1以上の極性基を有する分子である。適切なキレート剤は当該技術分野で公知であり、メチレンホスホン酸基、メチレンカルボヒドロキサミン酸基、カルボキシエチリデン基、またはカルボキシメチレン基を持つ酸が挙げられる。キレート剤の例としては以下のものが挙げられるが、それらに限定されない: ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロ-テトラデカン-1, 4, 7, 10-テトラ酢酸(DOTA)、1-置換1, 4, 7-トリカルボキシメチル-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン(DO3A)、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、および1, 4, 8, 11-テトラ-アザシクロテトラデカン-1, 4, 8,

11 - テトラ酢酸 (TETA)。付加的なキレートリガンドには以下のものが挙げられる：エチレンビス - (2 - ヒドロキシ - フェニルグリシン) (EHPG)、およびその誘導体、たとえば 5 - Cl - EHPG、5 Br - EHPG、5 - Me - EHPG、5 t - Bu - EHPG、および 5 sec - Bu - EHPG；ベンゾジエチレントリアミンペンタ酢酸 (ベンゾ - DTPA) およびその誘導体、たとえばジベンゾ - DTPA、フェニル - DTPA、ジフェニル - DTPA、ベンジル - DTPA、およびジベンジル DTPA；ビス - 2 (ヒドロキシベンジル) - エチレン - ジアミン二酢酸 (HBED) およびその誘導体；少なくとも 3 炭素原子、より好ましくは少なくとも 6、および少なくとも 2 つのヘテロ原子 (O および / または N) を含む大環状化合物のクラス (その大環状化合物はヘテロ環成分において一緒になった 1 環、または 2 もしくは 3 環から構成されてよい)、たとえばベンゾ - DOTA、ジベンゾ - DOTA、およびベンゾ - NOTA (ここで NOTA は 1, 4, 7 - トリアザシクロノナン N, N', N - 三酢酸である)、ベンゾ - TETA、ベンゾ - DOTMA (ここで DOTMA は 1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロテトラデカン - 1, 4, 7, 10 - テトラ (メチルテトラ酢酸) である)、およびベンゾ - TETMA (ここで TETMA は 1, 4, 8, 11 - テトラアザシクロテトラデカン - 1, 4, 8, 11 - (メチルテトラ酢酸) である)；1, 3 - プロピレン - ジアミンテトラ酢酸 (PDTA) およびトリエチレントトラアミンヘキサ酢酸 (THHA) の誘導体；1, 5, 10 - N, N', N - トリス (2, 3 - ジヒドロキシベンゾイル) - トリカテコレート (LICAM) の誘導体；および 1, 3, 5 - N, N', N - トリス (2, 3 - ジヒドロキシベンゾイル) アミノメチルベンゼン (MECAM)。本発明で使用するための好ましいキレート剤は、DTPA であり、そして DO3A の使用がとりわけ好ましい。本発明により企図する代表的なキレート剤およびキレート基は WO 98 / 18496、WO 86 / 06605、WO 91 / 03200、WO 95 / 28179、WO 96 / 23526、WO 97 / 36619、PCT / US 98 / 01473、PCT / US 98 / 28179、および米国特許第 4, 899, 755 号、米国特許第 5, 474, 756 号、米国特許第 5, 846, 519 号、および米国特許第 6, 143, 274 号に記載され、それらのすべてを本明細書に援用する。

#### 【0139】

本発明に従って、MRI 造影剤のキレート剤は、KDR 複合体結合ポリペプチドに結合する。キレート剤 (複数のキレート剤) の位置決定は、KDR または VEGF / KDR 複合体結合ポリペプチドの結合親和性または特異性を妨害しないように選択されるべきである。好ましくは、キレート剤 (複数のキレート剤) は N 末端または C 末端のいずれかに付加されるが、キレート剤 (複数のキレート剤) は配列のどこに結合してもよい。好ましい態様において、遊離中心カルボン酸基 (たとえば、DTPA - Asp ( - COOH ) - OtBu) を有するキレート剤 (複数のキレート剤) は、アミド結合の形成により、ペプチドの N 末端に容易に結合する。キレート剤 (複数のキレート剤) はまた、リンカーの補助により C 末端に結合することができる。あるいは、ペプチド配列のどこかの遊離アミノ基に、DTPA を生じる適切なイソチオシアネート基を結合する方法として、イソチオシアネート結合化学を使用することができる。

#### 【0140】

一般に、KDR または VEGF / KDR 複合体結合部分は金属キレート剤 (または他の検出可能な標識) に直接または共有結合的に結合してもよく、またはリンカーを使用して金属キレート剤にカップリング、または結合してもよく、そのようなリンカーは以下のものであってよいが、それらに限定されない：アミド、尿素、アセタール、ケタール、二重エステル、カルボニル、カルバメート、チオウレア、スルホン、チオエステル、エステル、エーテル、ジスルフィド、ラクトン、イミン、ホスホリル、またはホスホジエステル結合；置換または非置換飽和または非飽和アルキル鎖；線状、分枝、もしくは環状アミノ酸鎖、または単一アミノ酸もしくは異なる複数のアミノ酸 (たとえば、KDR または VEGF / KDR 複合体結合部分の N 末端または C 末端の伸長)；誘導体化もしくは非誘導体化ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン、またはポリビニルピリジン鎖；置換また

は非置換ポリアミド鎖；誘導体化もしくは非誘導体化ポリアミン、ポリエステル、ポリエチレンイミン、ポリアクリレート、ポリ（ビニルアルコール）、ポリグリセロール、またはオリゴサッカライド（たとえばデキストラン）鎖；交互ブロック共重合体；マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸およびピメリン酸；カプロン酸；簡単なジアミンおよびジアルコール；本明細書に開示された他のリンカーのいずれか；または当該技術分野で公知のいずれか他の簡単な高分子リンカー（たとえば、WO 98 / 18497、WO 98 / 8496を参照されたい）。好ましくはリンカーの分子量は厳密に制御されてよい。分子量は、100未満から1000以上までのサイズの範囲であってよい。好ましくはリンカーの分子量は100未満である。さらに、*in vivo*で生体内分解性であるリンカーを使用して、本発明のイメージング試薬の効率的な排出経路を提供することが好都合であってよい。リンカー内の位置に依存して、そのような生体内分解性官能基には、エステル、二重エステル、アミド、ホスホエステル、エーテル、アセタール、およびケタール官能基を挙げることができる。

10

#### 【0141】

一般に、公知の方法でそのようなリンカーを使用してキレート剤（複数のキレート剤）とKDRまたはVEGF / KDR複合体結合部分をカップリングさせることができる。たとえば、WO 95 / 28967、WO 98 / 18496、WO 98 / 18497、およびそれらの説明を参照されたい。KDRまたはVEGF / KDR複合体結合部分は、N末端またはC末端を通じて、アミド結合を介し、たとえば金属キレート剤の金属配位結合骨格窒素、または金属キレート剤自体の酢酸アームに結合することができる。金属キレート剤が毒性を最少化するために金属に強固に結合する能力を保持するならば、本発明はどのような位置へのキレート剤の結合も企図する。同様に、KDRまたはVEGF / KDR複合体結合部分の改変または伸長が、KDRまたはVEGF / KDR複合体への金属キレート剤の結合能力を損なわないならば、そのような金属キレート剤への結合のための部位を生み出すために改変または伸長してもよい。

20

#### 【0142】

本明細書の開示に従って作製されたMRI造影剤は、慣用のMRI造影剤と同じ様式で使用することができる。血管新生部位を画像化する場合、バックグラウンドの血液および組織に対する該部位のコントラストを高めるためにある種のMR技術およびパルス配列が好ましくてよい。これらの技術には、たとえば、急速スピニング配列（たとえば、Alexander et al., *Magnetic Resonance in Medicine*, 40(2): 298-310 (1998)を参照されたい）のような血液を暗くするblack blood血管造影法配列およびフロー-スプイールドグラジエントエコー配列（たとえばEdelman et al., *Radiology*, 177(1): 45-50 (1990)を参照されたい）が挙げられるがそれらに限定されない。また、これらの方法としては血管新生性腫瘍およびバックグラウンド組織間のコントラストを増す、反転-回復法により調製されるか、または飽和-回復法により調製される配列のような、コントラストの差を大きくする、流量に依存しない技術が挙げられる。結局、磁化移動調製法もこれらの物質によりコントラストを改善することができる（たとえばGoodrich et al., *Investigative Radiology*, 31(6): 323-32 (1996)）。

30

40

#### 【0143】

標識試薬は注射可能な組成物の形状で患者に投与される。MRI造影剤を投与する方法は、好ましくは静脈内、動脈内、硬膜内、間質内、または体腔内を意味する、非経口的投与が好ましい。活発な血管新生を画像化するためには、静脈内、または動脈内投与が好ましい。MRIでは、血管新生部位で少なくとも10% MRシグナルを増大させるために十分な造影剤の量を対象に投与することが企図される。KDRまたはVEGF / KDR複合体結合部分-含有MRI試薬の注射後、患者は、MRI装置でスキャンニングされ、血管新生部位のいずれかの位置が確認される。治療においては、血管新生（たとえば腫瘍）位置確認時に、必要な場合、殺腫瘍剤または抗血管新生剤（たとえばVEGFの阻害剤）が

50

速やかに投与され、その後腫瘍退縮または血管新生阻止を視覚化するために患者をスキヤニングすることができる。

【0144】

B. 超音波画像法

超音波が物質を通して伝達される場合、物質の音響特性は伝達速度および物質の密度に依存することになる。音響特性の変化は異なる物質（固体、液体、気体）の界面において最も著しい。超音波造影剤は物質と周囲の組織間の音響の差のために、きわめて強い音波反射体である。液体（たとえば血液）と気体含有または気体発生超音波造影剤間の音響の差のために、気体含有または気体発生超音波造影剤がとりわけ有用である。マイクロバブル、超音波造影剤などを含む超音波造影剤は、そのサイズのために注射後、他の検出可能な部分よりも血流に長く留まることが可能である；標的のKDRまたはVEGF/KDR複合体に特異的な超音波剤はしたがって、血管新生部位の優れた画像化を行うことができる。

10

【0145】

本発明のこの側面において、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分は超音波画像法に有用な物質に結合することができる。たとえば、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、小胞（たとえばマイクロバブル、超音波造影剤ミクロスフェアなど）、または検出可能な標識として機能する液体または気体を含むエマルジョン（たとえば、エコー発生気体またはエコー発生気体を生成することができる物質）を形成するために使用される物質に結合することができる。そのような小胞作製物質には、界面活性剤、脂質、スフィンゴ脂質、オリゴ脂質、リン脂質、タンパク質、ポリペプチド、炭水化物、および合成または天然の高分子物質が挙げられる。たとえば、WO98/53857、WO98/18498、WO98/18495、WO98/18497、WO98/18496、およびWO98/18501を参照されたい。それらはそのまま本明細書に援用される。

20

【0146】

安定化マイクロバブルの懸濁液を含む造影剤（好ましい態様）としては、リン脂質、およびとりわけ飽和リン脂質が好ましい。本発明の好ましい気体封入マイクロバブルは、たとえば以下の特許：EP554213、米国特許第5,413,774号、米国特許第5,578,292号、EP744962、EP682530、米国特許第5,556,610号、米国特許第5,846,518号、米国特許第6,183,725号、EP474833、米国特許第5,271,928号、米国特許第5,380,519号、米国特許第5,531,980号、米国特許第5,567,414号、米国特許第5,658,551号、米国特許第5,643,553号、米国特許第5,911,972号、米国特許第6,110,443号、米国特許第6,136,293号、EP619743、米国特許第5,445,813号、米国特許第5,597,549号、米国特許第5,686,060号、米国特許第6,187,288号および米国特許第5,908,610号のいずれか1つに記載の方法により、当該技術分野で公知の手段により作製可能であり、それらはそのまま本明細書に援用される。好ましい態様において、リン脂質部分の少なくとも1つは構造18または19（図33）を有し、米国特許第5,686,030号に記載され、これは本明細書に援用される。

30

40

【0147】

適切なリン脂質の例としては、1または2分子の脂肪酸（同じか、または異なる）およびリン酸グリセロールのエステルが挙げられ、ここでリン酸残基は次にコリン、セリン、イノシトール、グリセロール、エタノールアミンなどの基に結合する。リン脂質に存在する脂肪酸は一般に長鎖脂肪酸であり、典型的には12~24、好ましくは14~22の炭素原子を含み、それらは飽和されているか、または1以上の不飽和を含んでよい。適切な脂肪酸の例としては、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、オレイン酸、リノレン酸、およびリノール酸が挙げられる。リン脂質のモノエステルもリン脂質の「リソ」型として当該技術分野で公知である。

50

## 【0148】

リン脂質の別の例としては、ホスファチジン酸、すなわち脂肪酸を持つグリセロール - リン酸のジエステル、スフィンゴミエリン、すなわち脂肪酸を持つグリセロールジエステル残基がセラミド鎖により置換される、ホスファチジルコリン類似体、カルジオリピン、すなわち脂肪酸を持つ1, 3 - ジホスファチジルグリセロールのエステル、セレブロシドなどが挙げられる。本明細書で使用するように、リン脂質という用語は単独、または混合物としてのいずれかで使用することができる、天然に存在するか、半合成または合成産物のいずれかを含む。

## 【0149】

天然に存在するリン脂質の例としては、代表的には、ダイズまたは卵黄のような天然のレシチン（ホスファチジルコリン（PC）誘導体）が挙げられる。 10

半合成リン脂質の例としては、天然に存在するレシチンの部分的または完全な水素化誘導体が挙げられる。

## 【0150】

合成リン脂質の例としては、たとえば、ジラウリロイル - ホスファチジルコリン（「DLPC」）、ジミリストイルホスファチジルコリン（「DMPC」）、ジパルミトイル - ホスファチジルコリン（「DPPC」）、ジアラキドイルホスファチジルコリン（「DAPC」）、ジステアロイル - ホスファチジルコリン（「DSPC」）、1 - ミリストイル - 2 - パルミトイルホスファチジルコリン（「MPPC」）、1 - パルミトイル - 2 - ミリストイルホスファチジルコリン（「PMP C」）、1 - パルミトイル - 2 - ステアロイルホスファチジルコリン（「SPPC」）、1 - ステアロイル - 2 - パルミトイル - ホスファチジルコリン（「SPPC」）、ジオレイルホスファチジルコリン（「DOPC」）、1, 2ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン（エチル - DSPC）、ジラウリロイル - ホスファチジルグリセロール（「DLPG」）およびそのアルカリ金属塩、ジアラキドイルホスファチジルグリセロール（「DAPG」）およびそのアルカリ金属塩、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）およびそのアルカリ金属塩、ジパルミトイル - ホスファチジルグリセロール（「DPPG」）およびそのアルカリ金属塩、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（「DSPG」）およびそのアルカリ金属塩、ジオレイルホスファチジルグリセロール（「DOPG」）およびそのアルカリ金属塩、ジミリストイルホスファチジン酸（「DMPA」）およびそのアルカリ金属塩、ジパルミトイルホスファチジン酸（「DPPA」）およびそのアルカリ金属塩、ジステアロイルホスファチジン酸（「DSPA」）、ジアラキドイルホスファチジン酸（「DAPA」）およびそのアルカリ金属塩、ジミリストイルホスファチジル - エタノールアミン（「DMPE」）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（「DPPPE」）、ジステアロイルホスファチジル - エタノールアミン（「DSPE」）、ジミリストイルホスファチジルセリン（「DMPS」）、ジアラキドイルホスファチジルセリン（「DAPPS」）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（「DPPPS」）、ジステアロイルホスファチジルセリン（「DSPS」）、ジオレイルホスファチジルセリン（「DOPPS」）、ジパルミトイルスフィンゴミエリン（「DPS P」）、およびジステアロイルスフィンゴミエリン（「DSSP」）が挙げられる。 20 30 40

## 【0151】

他の好ましいリン脂質には、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジン酸、およびジパルミトイルホスファチジルセリンが挙げられる。また、組成物はPEG - 4000および/またはパルミチン酸を含んでよい。本明細書に開示されるか、または当業者に公知の任意の気体を使用することができる；しかし、不活性ガス、たとえばSF<sub>6</sub>またはCF<sub>4</sub>、C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>およびC<sub>4</sub>F<sub>10</sub>のようなフルオロカーボンが好ましい。

## 【0152】

本発明の好ましいマイクロバブル懸濁液は、適切な溶媒中で粗リン脂質の溶液をフリーズドライもしくはスプレードライするような公知の工程を使用するか、またはEP554 50

213 ; 米国特許第 5 , 413 , 774 号 ; 米国特許第 5 , 578 , 292 号 ; EP 744962 ; EP 682530 ; 米国特許第 5 , 556 , 610 号 ; 米国特許第 5 , 846 , 518 号 ; 米国特許第 6 , 183 , 725 号 ; EP 474833 ; 米国特許第 5 , 271 , 928 号 ; 米国特許第 5 , 380 , 519 号 ; 米国特許第 5 , 531 , 980 号 ; 米国特許第 5 , 567 , 414 号 ; 米国特許第 5 , 658 , 551 号 ; 米国特許第 5 , 643 , 553 号 ; 米国特許第 5 , 911 , 972 号 ; 米国特許第 6 , 110 , 443 号 ; 米国特許第 6 , 136 , 293 号 ; EP 619743 ; 米国特許第 5 , 445 , 813 号 ; 米国特許第 5 , 597 , 549 号 ; 米国特許第 5 , 686 , 060 号 ; 米国特許第 6 , 187 , 288 号 ; および米国特許第 5 , 908 , 610 号 (これらはそのまま本明細書に援用される) に示された工程を使用して、リン脂質から調製することができる。最も好ましくは、リン脂質を有機溶媒に溶かし、その溶液をリポソーム形成段階を経ずに乾燥させる。これは、適切な有機溶媒中で、親水性安定化物質または、有機溶媒および水の両方に可溶性の化合物と一緒に適切な溶媒中にリン脂質を溶かし、そして溶液をフリーズドライもしくはスプレードライすることにより行うことができる。この態様において、親水性安定化物質の選択のために使用される基準は、好みの有機溶媒におけるその溶解度である。水および有機溶媒に可溶性の親水性安定化物質の例としては、たとえばポリビニルピロリドン (PVP)、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリエチレングリコール (PEG) などのようなポリマー、リンゴ酸、グリコール酸、マルトールなどが挙げられる。また、そのような親水性化合物はマイクロバブルホモゲナイズにおけるサイズ分布を助け、貯蔵中の安定性を高める。任意の適切な有機溶媒の沸点が十分に高く、そしてその融点が十分に低く、その後の乾燥を促進する限り、その有機溶媒は使用可能である。代表的な有機溶媒には、たとえば、ジオキササン、シクロヘキサノール、3級ブタノール、テトラクロロジフルオロエチレン ( $C_2Cl_4F_2$ ) または 2-メチル-2-ブタノールが挙げられる。2-メチル-2-ブタノールおよび  $C_2Cl_4F_2$  が好ましい。

#### 【0153】

水性担体中での分散によるマイクロバブル懸濁液の形成に先だって、フリーズドライもしくはスプレードライリン脂質粉末は空気または別の気体と接触する。水性担体に接触する場合、構造が粉碎されている粉末化リン脂質はラメラ化またはラミナ化部分を形成し、それらはその中に分散した気体のマイクロバブルを安定化するのであろう。この方法は長期間貯蔵する場合でさえ安定であり、振とうまたはどのような激しい攪拌もせずに、乾燥したラミナ化リン脂質 (それらは所望する気体下で貯蔵されている) の簡単な溶解により得られるマイクロバブル懸濁液の産生を可能にする。

#### 【0154】

あるいは、WO 97/29783 に開示されたように、高い振とう速度において気体を水性溶液に懸濁することにより、マイクロバブルを作製することができる。マイクロバブル作製のための別の工程は、本明細書に援用される同時係属中の欧州特許出願第 03002373 号に開示され、そしてそれは任意の洗浄および/またはる過工程後、リン脂質存在下で水性培地中において有機溶媒のエマルジョンを作製し、その後上記エマルジョンを凍結乾燥することを含む。

#### 【0155】

当業者に公知の添加剤は、安定化されたマイクロバブルの懸濁液中に包含されてよい。たとえば、ポリオキシプロピレングリコールおよびポリオキシエチレングリコールならびに類似した化合物、それに加え、その各種コポリマー ; ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸またはそれらの誘導体のような脂肪酸、エルゴステロール、フィトステロール、シトステロール、ラノステロール、トコフェロール、プロピルガレート、アスコルビルパルミテートおよびブチル化ヒドロキシトルエンを含む、非フィルム形成界面活性剤を添加することができる。これらの非フィルム形成界面活性剤の量は通常界面活性剤の総重量の 50% までであるが、好ましくは 0 ~ 30% の間である。

#### 【0156】

他の気体含有懸濁液は、たとえば、米国特許第 5 , 798 , 091 号、WO 97/29 50

873、さらにEP881915に開示され、そられはそのまま本明細書に援用する。これらの物質は米国特許第5,798,091号またはWO97/29783に記載のように作製することができる。

【0157】

別の好ましい超音波造影剤は、複数の超音波造影剤を含む。「マイクロバルーン」という用語は境界または外被を持つ気体封入体を表す。マイクロバルーン製剤および作製の方法に関する詳細は、EP324938(米国特許第4,844,882号);米国特許第5,711,933号;米国特許第5,840,275号;米国特許第5,863,520号;米国特許第6,123,922号;米国特許第6,200,548号;米国特許第4,900,540号;米国特許第5,123,414号;米国特許第5,230,882号;米国特許第5,469,854号;米国特許第5,585,112号;米国特許第4,718,433号;米国特許第4,774,958号;WO95/01187;米国特許第5,529,766号;米国特許第5,536,490号;および米国特許第5,990,263号に見出すことができ、それらの内容は本明細書に援用される。

【0158】

好ましいマイクロバルーンは生体内分解性で生理的に適合するポリマーまたは、生体内分解性固体脂質を含む外被を有する。本発明のマイクロバルーンの作製に有用なポリマーは、たとえば以下の特許:EP458745、米国特許第5,711,933号、米国特許第5,840,275号、EP554213、米国特許第5,413,774号および米国特許第5,578,292号のいずれかに記載の生体内分解性で生理的に適合するポリマーのいずれかから選択することができる。とりわけ、ポリマーは以下のような生体内分解性で生理的に適合したポリマーから選択することができる:たとえば水溶性の低い多糖類、ポリラクチドおよびポリグリコリドならびにそれらのコポリマー、ラクチドおよび

- カプロラクトン、
- バレロラクTONのようなラクTONおよびポリペプチド。他の適切なポリマーには以下のものが挙げられる:ポリ(オルト)エステル(たとえば米国特許第4,093,709号;米国特許第4,131,648号;米国特許第4,138,344号;米国特許第4,180,646号を参照されたい);ポリ乳酸およびポリグリコール酸ならびにそれらのコポリマー、たとえばDEXON(J. Heller, Biomaterials 1(1980), 51を参照されたい);ポリ(DL-ラクチド-co- -カプロラクTON)、ポリ(DL-ラクチド-co- -バレロラクTON)、ポリ(DL-ラクチド-co- -ブチロラクTON)ポリアルキルシアノアクリレート;ポリアミド、ポリヒドロキシブチレート;ポリジオキササン;ポリ- -アミノケトン(A. S. Angelloni, P. Ferruti, M. Tramontini and M. Casolaro, The Mannich bases in polymer synthesis: 3. Reduction of poly(beta-amino ketone)s to poly(gamma-aminoalcohols) and their N-alkylation to poly(gamma-hydroxyquaternary ammonium salts), Polymer 23, pp1693-1697, 1982.);ポリホスファゼン(Allcock, Harry R. Polyphosphazenes: new polymers with inorganic backbone atoms (Science 193(4259), 1214-19(1976))およびポリ無水物。また、本発明のマイクロバルーンはWO-A-96/15815(本明細書に援用する)の方法に従って作製可能であり、ここでマイクロバルーンは、好ましくはモノ-、ジ-もしくはトリ-グリセリド、脂肪酸、ステロール、ワックスおよびそれらの混合物から選択される生体内分解性脂質を含む、生体内分解性膜から作られる。好ましい脂質は、ジ-もしくはトリ-グリセリド、たとえばジ-、もしくはトリ-ミリスチン、-パルミチンもしくは-ステアリン、とりわけトリパルミチンまたはトリステアリンである。マイクロバルーンは当業者に公知の、本明細書に開示された気体のいずれを使用してよい;しかし不活性気体、たとえばフッ素化ガスが好ましい。マイクロバルーンは、当業者に公知の任意の添加剤および安定化剤と共に薬剤

10

20

30

40

50

的に受容できる液体担体中に懸濁することができる。

【0159】

他の気体含有造影剤の製剤は、微小粒子中に含有するか、またはそうでなければそれに会合（たとえばその表面に吸着する、および/またはその中の空隙、空洞または小孔に含まれる）した気体を有する該微小粒子（とりわけ微小粒子の凝集物）を含む。これらの物質の作製方法は、EP0122624；EP0123235；EP0365467；米国特許第5,558,857号；米国特許第5,607,661号；米国特許第5,637,289号；米国特許第5,558,856号；米国特許第5,137,928号；WO95/21631またはWO93/13809に記載され、それらをそのまま本明細書に援用する。

10

【0160】

また、これらの超音波組成物はいずれもできる限り血液と等張性であるべきである。したがって、注射の前に少量の等張性物質を上記の超音波造影剤懸濁液のいずれかに添加することができる。等張性物質は薬物に一般的に使用される生理的溶液であり、そしてそれらは水性生理食塩水（0.9% NaCl）、2.6% グルセロール溶液、5% デキストロス溶液などを含む。さらに、超音波組成物は、たとえば、乳化剤、粘性調節剤、凍結保護物質、溶解保護物質、増量剤などを含む、標準的な薬剂的に受容できる添加剤を挙げることができる。

【0161】

任意の生体適合性気体を本発明に有用な超音波造影剤に使用することができる。本明細書で使用する「気体」という用語には、通常ヒトの体温で実質的に気体の形状のいずれかの物質（混合物を含む）が挙げられる。したがって、気体にはたとえば、空気、窒素、酸素、CO<sub>2</sub>、アルゴン、キセノンまたはクリプトン、フッ素化ガス（たとえば、過フッ化炭素、SF<sub>6</sub>、SeF<sub>6</sub>が挙げられる）、低分子量炭化水素（たとえば1～7炭素原子を含む）、たとえばメタン、エタン、プロパン、ブタンもしくはペンタンのようなアルカン、シクロプロパン、シクロブタンもしくはシクロペンタンのようなシクロアルカン、エチレン、プロペン、プロパジエンもしくはブテンのようなアルケン、またはアセチレンもしくはプロピンおよび/またはその混合物のようなアルキンを挙げることができる。しかし、フッ素化ガスが好ましい。フッ素化ガスには、SF<sub>6</sub>のような少なくとも1フッ素原子を含む物質、フレオン（1以上の炭素およびフッ素を含む有機化合物、すなわちCF<sub>4</sub>、C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>、C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>、CBrF<sub>3</sub>、CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>ClF<sub>5</sub>、およびCBrClF<sub>2</sub>）およびペルフルオロカーボンが挙げられる。ペルフルオロカーボンという用語は、ただ1つの炭素および複数のフッ素原子を含む化合物を表し、とりわけ、飽和、不飽和、および環状ペルフルオロカーボンが挙げられる。通常好ましい飽和ペルフルオロカーボンは式C<sub>n</sub>F<sub>n+2</sub>を有し、ここでnは1～12であり、好ましくは2～10であり、最も好ましくは3～8であり、そしてさらにより好ましくは3～6である。適切なペルフルオロカーボンには、たとえばCF<sub>4</sub>、C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>、C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>、C<sub>5</sub>F<sub>12</sub>、C<sub>6</sub>F<sub>12</sub>、C<sub>7</sub>F<sub>14</sub>、C<sub>8</sub>F<sub>18</sub>およびC<sub>9</sub>F<sub>20</sub>が挙げられる。最も好ましくは気体または気体混合物は、SF<sub>6</sub>を含むか、またはC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>、C<sub>5</sub>F<sub>12</sub>、C<sub>6</sub>F<sub>12</sub>、C<sub>7</sub>F<sub>14</sub>、C<sub>8</sub>F<sub>18</sub>から成る群より選択されるペルフルオロカーボンを含むが、C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>が最も好ましい。たとえばWO97/29783、WO98/53857、WO98/18498、WO98/18495、WO98/18496、WO98/18497、WO98/18501、WO98/05364、WO98/17324も参照されたい。

20

30

40

【0162】

ある種の状況では、気体状物質への前駆体（たとえば、しばしば「気体前駆体」と呼ばれる、in vivoで気体に変換できる物質）を含有することが好ましい。好ましくは気体前駆体およびそれが生み出す気体は生理的に受容可能である。気体前駆体はpHにより活性化、光により活性化、温度により活性化をうけるなどされてよい。たとえば、ある種のペルフルオロカーボンは温度活性化気体前駆体として使用することができる。過フルオ

50

ロペンタンのようなこれらのペルフルオロカーボンは、室温（または物質が産生される、および/または貯蔵される温度）以上であるが、体温以下の液体/気体相転移温度を有する；したがってそれらは相転移を受けてヒトの体内で気体に変換する。

【0163】

説明したように、気体は気体混合物を含んでいてもよい。以下の組み合わせはとりわけ好ましい気体混合物である：気体（A）および（B）の混合物、ここで気体（B）の少なくとも1種は容量で0.5～41%の間で存在し、80ダルトンより大きい分子量を有し、そしてフッ素化ガスであり、そして（A）は酸素、窒素、二酸化炭素およびその混合物から成る群より選択され、混合物の優位は気体Aである。

【0164】

超音波小胞は、本明細書に記載の他の検出可能な標識より大きくてよい。それらは物質の標的化効率を高めるために、複数のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドに連結または結合してよい。上記（または当業者に公知）の超音波造影剤への結合は、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドと小胞を作製するために使用される物質間の直接共有結合を介するか、上記のリンカーを介してよい。たとえば、二官能PEGリンカー（その後リポソーム組成物と反応する）へのペプチドの結合の説明には一般にWO98/53857を参照されたい。Lanza et al., *Ultrasound in Med. & Bio.*, 23(6): 863-870 (1997)も参照されたい。

【0165】

多数の方法を使用してKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドに結合するマイクロバブルの懸濁液を作製することができる。たとえば、リン脂質形成において5% (w/w) N-MPB-PE(1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-4-(p-マレイミド-フェニルブチラミド)、(Avanti Polar-Lipids, Inc)の取込により、マレイミド-由来マイクロバブルを作製することができる。次に、脱アセチル溶液(50mM リン酸ナトリウム、25mM EDTA、0.5M ヒドロキシルアミン・HCl、pH7.5)中でインキュベートされているメルカプトアセチル化KDR結合ペプチド溶液(DMF中、10mg/ml)がマレイミド-活性化マイクロバブル懸濁液に添加される。穏やかに攪拌しながら暗所でインキュベーション後、マイクロバブルに結合したペプチドは、遠心分離により精製することができる。

【0166】

マイクロバブルの誘導体化に使用される化合物は一般に以下の成分を含む(a)小胞の外被において化合物を効率的に取り込ませるためのマイクロバブル、またはマイクロバルーンの外被を形成する物質と適合する疎水性部分；上記の部分は一般に脂質部分(ジパルミチン、ジステアロイル)により示される；および(b)スペーサー(一般に異なる分子量のPEG)、それはある種の場合(たとえば、スペーサーがあまりに長い場合、マイクロバブルの凍結乾燥がたとえば困難を呈するかもしれない)は任意であってよく、または他の場合(たとえば短いスペーサーを持つマイクロバルーンに結合する場合、ペプチドは活性が低い可能性がある)には好ましくてよい；および(c)結合することになるペプチド上の対応する反応部分と反応が可能な反応基。

【0167】

あるいは、マイクロバブルに結合したKDR結合ポリペプチドは、ビオチン/アビジンを使用して作製することができる。たとえば、アビジン-結合マイクロバブルは、メルカプトアセチル化-アビジン(脱アセチル溶液と共にインキュベートされている)に添加される上記のように作製されたマレイミド-活性化リン脂質マイクロバブル懸濁液を使用して作製することができる。次に、ビオチン化KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチド(本明細書に記載のように作製される)をアビジン-結合マイクロバブルの懸濁液に添加し、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチドに結合したマイクロバブル懸濁液を得る。

10

20

30

40

50

## 【0168】

特殊な貯蔵条件を必要とすることが公知の過分極気体を含まない限り、凍結乾燥残留物は周囲の温度管理を必要とせずに貯蔵および輸送可能であり、そしてとりわけそれは特殊な貯蔵設備を有することを使用者に要求せずに、調製済みの投与可能な懸濁液に現場で製剤されて、病院や医師に供給することができる。好ましくは、そのような場合、それは2 - 成分キット製品の形状で供給可能であり、それには2つの別々の容器または2 - チャンバー容器を含むことができる。前述の場合では、好ましくは容器は慣用の隔壁 - 密封バイアルであり、ここで工程b)の凍結乾燥残留物を含むバイアルは、隔壁で密封され、担体液は任意に前もって充填したシリンジを使用して、それを通して注射する。そのような場合、2番目の成分の容器として使用されるシリンジは次に造影剤を注射するためにも使用される。後者の場合、好ましくは2 - チャンバー容器は2 - チャンバーシリンジであり、いったん凍結乾燥品を溶解し、適切に混合するか、または穏やかに振とうしていれば、その容器は直接造影剤を注射するために使用することができる。両方の場合、容器の内容物への十分なバブル形成エネルギーの適用に関するか、またはそれを可能にする手段が提供される。しかし、先に示したように、本発明に記載の安定化された造影剤では、気体マイクロバブルのサイズは溶かした乾燥産物に適用された攪拌エネルギーの量に実質的に依存しない。したがって、一定のマイクロバブルサイズを有する、再現可能な産物を得るためには、一般に穏やかな手動の攪拌だけを必要とする。

10

## 【0169】

無菌的に水溶液と乾燥粉末を合わせることができる別の2 - チャンバー溶解系も本発明の範囲内であることを当業者は、理解するであろう。そのような系では、非水溶性気体と環境の間に水相が介在する場合、産物の貯蔵期間を延長させることがとりわけ好都合である。造影剤を形成するために必要な物質（たとえば、溶解中にリン脂質に結合することになるターゲティングリガンド）が予め容器に存在していない場合、好ましくはキット製品の別の成分との容易な組み合わせを促進するために適用される形状または容器中で、キット製品の別の成分と一緒にそれを包装することができる。

20

## 【0170】

特定の容器、バイアルまたは連結系は必要とせず；本発明は慣用の容器、バイアルおよびアダプターを使用することができる。唯一の要件は、ストッパーと容器間の十分な密封である。したがって、密封の質が主要な関心事であり；密封の完全性のどのような劣化も、所望しない物質のバイアルへの侵入を可能にする。周囲圧または減圧で栓をした産物の安全で適切な溶解を保証するためには、無菌性であることに加え、真空の保持が必須である。栓としては、ポリ（イソブチレン）またはブチルゴムのよう、エラストマーに基づいた化合物または多成分製剤であってよい。

30

## 【0171】

本発明に従って使用することができる超音波画像法技術としては、カラードップラー、パワードップラー、ドップラー振幅、刺激された音響画像法、および2次元または3次元画像化のような公知の技術が挙げられる。画像化は調和（共鳴頻度）または基礎モードで行ってよく、第2調和が好ましい。

## 【0172】

超音波適用において、リン脂質安定化マイクロバブルにより形成された造影剤は、たとえば、注射されるリン脂質の量が0.1 ~ 200  $\mu\text{g} / \text{kg}$  体重の範囲、好ましくは約0.1 ~ 30  $\mu\text{g} / \text{kg}$  までであるような量で投与することができる。マイクロバブル含有造影剤は一般に壁形成ポリマーまたは脂質の量が約10  $\mu\text{g} / \text{kg}$  ~ 約20  $\text{mg} / \text{kg}$  体重であるような量で投与される。

40

## 【0173】

C. 光学画像法、音ルミネセンスまたは光音響画像法

本発明にしたがい、多数の光学的パラメータを使用して、光学標識KDRまたはVEGF / KDR複合体結合ポリペプチド注射後の対象の *in vivo* 光学画像法によりKDRまたはVEGF / KDR複合体の位置を決定することができる。画像作製中に検出され

50

る光学的パラメータとしては、伝搬放射、吸収、蛍光またはリン光放出、光反射、吸光度振幅または最大値の変化、および弾性的に散乱した放射を挙げることができる。たとえば、生物組織は650~1000nmの近赤外(NIR)波長範囲の光を比較的に通す。NIR放射は数センチメートルまで組織に浸透し、*in vivo*でのKDRまたはVEGF/KDR複合体の光学画像法のための本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの使用を可能にする。

【0174】

KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、広範な脱局在環系を有し、そして400~1500nmの範囲の吸収または放射最大値を有する有機発色団または蛍光団を含む、光学色素のような光標識と結合してもよい。KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドはかわりに生物ルミネセンス分子で誘導体化されてもよい。光標識の吸収最大値の好ましい範囲は、ヘモグロビンからのシグナルによる妨害を最小にするために、600~1000nmの間である。好ましくは、光吸収標識はたとえば $> 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ の大きなモル吸光係数を有し、一方蛍光光学色素は高い量子収率を有する。光学色素の例としては、WO98/18497、WO98/18496、WO98/18495、WO98/18498、WO98/53857、WO96/17628、WO97/18841、WO96/23534、WO98/47538、およびここに引用された参考文献に記載のものが挙げられるが、それらに限定されない。光標識は先に記載のように直接KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチドに共有結合するか、またはリンカーを介して、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチドに結合する。

10

20

【0175】

光学的に標識したKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分の注射後、患者は、取扱者が使用する光標識に適切な波長で、1以上の光源(たとえばレーザー)によりスキャンニングされる。使用する光は単色または多色、および連続またはパルスであってよい。透過、散乱、または反射光は光検出器により1種または複数の波長に変換されて検出され、対象におけるKDRまたはVEGF/KDR複合体の位置を決定する。光学パラメータの変化は一定の期間モニターし、血管新生部位における光標識試薬の蓄積を検出することができる。標準画像処理および検出装置は本発明の光学画像化試薬と一緒に使用することができる。

【0176】

上記の光学画像化試薬はまた、光標識造影剤により行われる光音響画像法または音ルミネセンス画像法のために使用することができる(米国特許第5,171,298号、WO98/57666、およびそこに引用された参考文献を参照されたい)。光音響画像法では、超音波照射が対象に適用され、透過、散乱、または反射光の光学パラメータに影響を与える。音ルミネセンス画像法では、適用された超音波は実際に検出される光を発生する。そのような技術を使用する適切な画像法はWO98/57666に記載される。

30

【0177】

D. 核画像法(放射性核種画像法)および放射線療法

KDRまたはVEGF/KDR複合体部分はシンチグラフィ、SPECT、またはPET画像法に適合した放射性核種レポーター、および/または放射線療法に適合した放射性核種と結合することができる。KDRまたはVEGF/KDR複合体部分が診断画像法に有用な放射性核種に対するキレート剤および放射線療法に有用なキレート剤の両方に結合する構築物は本発明の範囲内である。

40

【0178】

PET物質として使用するために、ペプチドは各種ポジトロン放射金属イオン、たとえば $^{51}\text{Mn}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{60}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、または $^{110}\text{In}$ の1種と錯体を形成する。本発明の結合部分はまた、放射性核種、たとえば $^{18}\text{F}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{77}\text{Br}$ および $^{76}\text{Br}$ を使用したハロゲン化により標識することができる。シンチグラフィまたは放射線療法のための好ましい金属放射性核種には、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{16}$

50

$^{77}\text{Tm}$ 、 $^{141}\text{Ce}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{168}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{88}\text{Y}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{165}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{203}\text{Pb}$ 、 $^{211}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{214}\text{Bi}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{109}\text{Pb}$ 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{61}\text{Tb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{198}\text{Au}$ および $^{199}\text{Au}$ が挙げられる。金属の選択は、希望する治療または診断適用に基づいて決定されるであろう。たとえば、診断のために好ましい放射性核種には、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、および $^{111}\text{In}$ が挙げられる。治療のために好ましい放射性核種には、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}/^{188}\text{Re}$ 、および $^{199}\text{Au}$ が挙げられる。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は低価格、有用性、画像化特性、および高比放射能のために診断適用にはとりわけ好ましい。 $\text{Tc} - 99\text{m}$ の核および放射能特性はこの同位体を理想的なシンチグラフィイメージング剤にする。この同位体は、 $140\text{keV}$ の単一光子エネルギーおよび約6時間の放射能半減期を有し、 $^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$ 発生器から容易に得ることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0179】

金属放射性核種はたとえば、線状、大環状、テルピリジン、および $\text{N}_3\text{S}$ 、 $\text{N}_2\text{S}_2$ 、または $\text{N}_4$ キレート剤（米国特許第5,367,080号、米国特許第5,364,613号、米国特許第5,021,556号、米国特許第5,075,099号、米国特許第5,886,142号も参照されたい）、ならびにたとえば $\text{HYNIC}$ 、 $\text{DTPA}$ 、 $\text{EDTA}$ 、 $\text{DOTA}$ 、 $\text{DO3A}$ 、 $\text{TETA}$ 、およびビスアミノビスチオール（ $\text{BAT}$ ）キレート剤を含むが、それらに限定されない、当該技術分野で公知の他のキレート剤によりキレート化されてよい（米国特許第5,720,934号も参照されたい）。たとえば、 $\text{N}_4$ キレート剤は米国特許第6,143,274号；米国特許第6,093,382号；米国特許第5,608,110号；米国特許第5,665,329号；米国特許第5,656,254号；および米国特許第5,688,487号に記載される。ある種の $\text{N}_3\text{S}$ キレート剤は $\text{PCT/CA94/00395}$ 、 $\text{PCT/CA94/00479}$ 、 $\text{PCT/CA95/00249}$ ならびに米国特許第5,662,885号；米国特許第5,976,495号；および米国特許第5,780,006号に記載される。キレート剤はまた $\text{N}_3\text{S}$ および $\text{MAMA}$ （モノアミドモノアミンジチオール）、 $\text{DADS}$ （ $\text{N}_2\text{S}$ ジアミンジチオール）、 $\text{CODADS}$ などのような $\text{N}_2\text{S}_2$ 系を含むキレート化リガンド、メルカプトアセチル-アセチル-グリシル-グリシン（ $\text{MAG3}$ ）の誘導体を含んでいてよい。これらのリガンド系および多様な他のリガンド系は $\text{Liu and Edwards, Chem Rev.}, 99:2235-2268(1999)$ およびその中の参考文献に記載される。

#### 【0180】

キレート剤はまた、四配座アレイにおいて金属に付加しないリガンド原子を含む錯体を含んでいてもよい。これらには、米国特許第5,183,653号；米国特許第5,387,409号；および第5,118,797号に記載のような、テクニウムおよびレニウムジオキシムのボロン酸付加物が挙げられ、それらの開示はそのまま本明細書に援用される。

#### 【0181】

別の態様において、 $\text{KDR}$ または $\text{VEGF/KDR}$ 複合体結合ポリペプチドのジスルフィド結合は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ のような放射性核種のキレート形成のための2種のリガンドとして使用される。このようにして、ペプチドループは $\text{Tc}$ の導入により拡張される（ペプチド-S-S-ペプチドがペプチド-S-Tc-S-ペプチドに変化する）。これは生理活性を維持しながら、文献（ $\text{Chen et al.}, \text{J. Nucl. Med.}, 42:1847-1855(2001)$ ）において他のジスルフィド含有ペプチドに使用されている。 $\text{Tc}$ に対する他のキレート基は、骨格のアミド窒素、別のシスチンアミノ酸またはアミノ酸の別の改変により供給することができる。

#### 【0182】

とりわけ好ましい金属キレート剤には、式20、21、22、23a、23b、24a、24b、および25のそれらが挙げられる(図34A~F)。式20~22(図34A~C)は、常磁性 $Ga^{3+}$ のようなランタニドおよび $^{177}Lu$ 、 $^{90}Y$ 、 $^{153}Sm$ 、 $^{111}In$ 、または $^{166}Ho$ のような放射性ランタニドにとりわけ有用である。式23a~24b(図34DおよびF)は放射性核種 $^{99m}Tc$ 、 $^{186}Re$ または $^{188}Re$ にとりわけ有用である。式25(図34F)は $^{99m}Tc$ にとりわけ有用である。これらおよび他の金属キレート基は米国特許第6,093,382号および米国特許第5,608,110号に記載され、それらはそのまま本明細書に援用される。さらに、式22(図34C)のキレート基は、たとえば米国特許第6,143,274号に記載され；式24のキレート基は、たとえば米国特許第5,627,286号および米国特許第6,093,382号に記載され；そして式25のキレート基は、たとえば米国特許第5,662,885号；米国特許第5,780,006号；および米国特許第5,976,495号に記載される。

#### 【0183】

先の式24aおよび24b(図34E)において、Xは $CH_2$ またはOのいずれかであり、Yは $C_1 \sim C_{10}$ 分枝または非分枝アルキル、アリール、アリーロキシ、アリールアミノ、アリールアミノアシル、または $C_1 \sim C_{10}$ 分枝もしくは非分枝アルキル基、ヒドロキシまたは $C_1 \sim C_{10}$ 分枝もしくは非分枝ポリヒドロキシルアルキル基、 $C_1 \sim C_{10}$ 分枝もしくは非分枝ヒドロキシまたはポリアルコキシルアルキルもしくはポリヒドロキシ-ポリアルコキシルアルキル基を含むアリールアルキルであり；Jは $C(=O)-$ 、 $OC(=O)-$ 、 $SO_2-$ 、 $NC(=O)-$ 、 $NC(=S)-$ 、 $N(Y)-$ 、 $NC(=NCH_3)-$ 、 $NC(=NH)-$ 、 $N=N-$ 、ホモポリアミドまたは合成もしくは本来存在するアミノ酸に由来するヘテロアミンであり；そしてnは1~100である。これらの構造の別の変種はたとえば米国特許第6,093,382号に記載される。上記の特許、特許出願および参考文献のそれぞれの開示はそのまま本明細書に援用される。

#### 【0184】

キレート剤は先に記載のように、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分に共有結合により直接結合するか、またはリンカーを介してKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドに結合してよく、その後選択した放射性金属により直接標識される(WO98/52618、米国特許第5,879,658号、および第5,849,261号を参照されたい)。

#### 【0185】

放射性テクネチウムの複合体は診断画像法にとりわけ有用であり、放射性レニウムの複合体は放射線療法にとりわけ有用である。本発明の試薬と放射性テクネチウムの複合体形成において、テクネチウム複合体、好ましくは $Tc-99m$ 過テクネテートの塩は、還元剤の存在下で試薬と反応する。好ましい還元剤は、ジチオナイト、スズおよび鉄イオンであり；最も好ましい還元剤は塩化第一スズである。そのような複合体を作製する手段は好都合にはキットの形状で提供され、標識されることになる本発明の前もって計量された量の試薬および $Tc-99m$ で試薬を標識するための十分な量の還元剤を含む密封バイアルを含む。あるいは、複合体は、テクネチウムおよび転移リガンドとして公知の別の化合物の前もって形成された不安定な複合体と適切なキレート剤に結合した本発明のペプチドを反応させることにより形成することができる。この工程はリガンド交換として公知であり、当業者によく知られている。不安定な複合体はたとえばタートレート、シトレート、グルコネートまたはマンニトールのような転移リガンドを使用して形成することができる。本発明に有用な $Tc-99m$ 過テクネテート塩の中には、ナトリウム塩、またはアンモニウム塩もしくは低級アルキルアンモニウム塩のようなアルカリ金属塩が包含される。

#### 【0186】

金属が放射性レニウムである本発明の複合体作製は、+5または+7酸化状態のレニウム出発物質を使用して行うことができる。レニウムが $Re(VII)$ 状態にある化合物の例としては、 $NH_4ReO_4$ または $KReO_4$ が挙げられる。 $Re(V)$ は、たとえば[

$\text{ReOCl}_4$ ] ( $\text{NBu}_4$ )、 $[\text{ReOCl}_4]$  ( $\text{AsPh}_4$ )、 $\text{ReOCl}_3$  ( $\text{PPh}_3$ )<sub>2</sub>として、および $\text{ReO}_2$  (ピリジン)<sub>4</sub><sup>+</sup>として利用可能であり、ここでPhはフェニルであり、そしてBuはn-ブチルである。レニウム複合体を形成することができる。他のレニウム試薬も使用することができる。

【0187】

適切な量の放射能を有する、本発明に提供される放射性標識シンチグラフィイメージング剤が提供される。Tc-99m放射性複合体の形成には、一般に約0.01mCi~100mCi/mLの濃度で放射能を含む溶液中で放射性複合体を形成することが好ましい。

【0188】

一般に、投与される単位量は、約0.01mCi~100mCi、好ましくは、1mCi~20mCiの放射能を有する。単位用量において注射されることになる溶液は、約0.01mL~約10mLである。

【0189】

本発明に記載のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合造影剤の代表的な量は10~20mCiを提供する。患者にKDRまたはVEGF/KDR複合体-特異的放射性核種造影剤を注射後、造影剤に取り込まれた核種の線エネルギーに対して校正したカメラを使用してイメージング剤が取り込まれた領域を映し、その部位に存在する放射能の量を定量するin vivoでの該部位の画像化は、およそ数分のうちに行われてよい。しかし、画像化は、所望する場合、放射標識ペプチドが患者に注射された後、数時間またはさらに長い間行われてよい。多くの場合、十分な量の投与量が約0.1時間以内に画像化される部位に蓄積し、シンチフォトを撮ることを可能にする。

【0190】

本発明の放射線療法用の化合物の適切な投与スケジュールは当業者に公知である。化合物は、単回もしくは複数回のIVまたはIP注射を含むが、それらに限定されない多くの方法を使用し、標的とするKDR発現組織の損傷または消耗を引き起こすために十分であるが、非標的(正常組織)に実質的な損傷を引き起こさない量の放射能を使用し投与することができる。異なる構築物に対して必要な投与してよい線量は、使用する同位体のエネルギーおよび半減期、物質の身体および腫瘍塊からの取込およびクリアランスの程度に依存して異なる。一般に、線量は約30~50mCiの単回量から約3キュリーまでの蓄積量までの範囲であってよい。

【0191】

本発明の放射線療法用組成物は生理的に受容できるバッファーを含んでいてよく、注射前に化合物の放射線分解性損傷を予防するための放射安定化剤を必要としてよい。放射安定化剤は当業者には公知であり、そしてたとえばパラ-アミノ安息香酸、アスコルピン酸、ゲンチスチン酸(gentistic acid)などを含んでいてよい。

【0192】

放射性核種以外の本発明の複合体の作製に必要な成分をすべて含む単一、または複数バイアルのキット製品は本発明の不可欠な部分である。

単一バイアルキット製品は、好ましくはキレート化リガンド、第一スズ塩源、または薬剤的に受容できる還元剤を含み、薬剤的に受容できる酸または塩基で適切に処理してpHを約3~約9に調節する。還元剤の量および型は形成されることになる交換複合体の性質に高度に依存するであろう。適切な条件は、当業者には公知である。キット内容物は凍結乾燥型であることが好ましい。そのような単一バイアルキット製品は、所望により不安定、または交換リガンド、たとえばグルコペプトネート、グルコネート、マンニトール、マレート、クエン酸もしくは酒石酸を含んでいてよく、そして最終産物の放射化学的純度および安定性の改善に役立つ反応調節剤、たとえばジエチレントリアミン五酢酸(DPTA)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、または、もしくはシクロデキストリンを含んでいてもよい。キット製品はさらに、安定化剤、凍結乾燥工程の補助を意図したマンニトールのような増量剤、および当業者に公知の他の添加剤を含んでいてよい。

10

20

30

40

50

## 【0193】

複数バイアルキット製品は好ましくは同じ一般的成分を含むが、放射線医薬品の溶解において1以上のバイアルを使用する。たとえば、過テクネテートの添加時に不安定なTc(V)複合体を形成するために必要とするすべての成分(たとえば第一スズ源または他の還元剤)を1バイアルが含んでいてよい。過テクネテートはこのバイアルに添加され、適当な期間放置後、バイアル内容物はリガンドおよび最適値にpHを調節するために適切なバッファーを含む第2バイアルに添加される。約5~60分反応後、本発明の複合体が形成される。この複数バイアルキット製品の両バイアル内容物は凍結乾燥されることが好都合である。上記のように、反応調節剤、交換リガンド、安定化剤、増量剤などはいずれか、または両方のバイアルに存在してよい。

10

## 【0194】

## 他の治療的適用

本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを使用して、血管新生が行われる内皮上でKDRまたはVEGF/KDR複合体に対する親和性およびKDRまたはVEGF/KDR複合体におけるそれらの滞留時間を提供するかまたは改善することにより、新生物性腫瘍において起こるような望ましくない血管新生に対する血管新生阻害剤または殺腫瘍剤のような治療薬の活性を改善することができる。本発明のこの側面において、治療薬と本発明に記載のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを結合することによりハイブリッド剤が提供される。治療薬は上記の放射線治療薬、薬物、化学療法もしくは殺腫瘍剤、遺伝物質または遺伝子送達ビヒクルなどであってよい。結合物のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチド部分は治療薬をKDRまたはVEGF/KDR複合体(すなわち活性化内皮)部位へ「接近」させ、内皮に対する結合物の親和性を改善し、その結果結合物の活性はより血管新生部位に局在化され、濃縮される。そのような結合物は、ヒトを含む哺乳動物において血管新生に関連した疾患、とりわけ新生物性腫瘍の増殖および転移の治療に有用であり、そしてその方法は治療薬に結合した本発明に記載のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの効果的な量をそれが必要な哺乳動物に投与することを含む。本発明はまた、ヒトを含む哺乳動物において血管新生に関連した疾患の治療のための薬物製造におけるそのような結合物の使用を提供する。

20

## 【0195】

本発明のこの側面における用途に適切な治療薬には以下のものが含まれるが、それらに限定されない:抗新生物薬、たとえばプラチナ化合物(たとえば、スピロプラチン、シスプラチン、およびカルボプラチン)、メトトレキセート、アドリアマイシン、マイトマイシン、アンサミトシン、プレオマイシン、サイトシン、アラビノシド、アラビノシルアデニン、メルカプトポリリジン、ピンクリスチン、プスルファン、クロラムブシル、メルファラン(たとえば、PAM、L-PAM、またはフェニルアラニンマスタード)、メルカプトプリン、ミトタン、塩酸プロカルバジン、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、塩酸ダウロルピシン、塩酸ドキシソルピシン、タキソール、マイトマイシン、プリカマイシン(ミスラマイシン)、アミノグルテチミド、エストラムスチンリン酸ナトリウム、フルタミド、酢酸ロイプロリド、酢酸メゲストロール、クエン酸タモキシフェン、テストイ  
 アクトン、トリロスタン、アムサクリン(m-AMSA)、アパラギナーゼ(L-アパラギナーゼ)、Erwinaアパラギナーゼ、エトポシド(VP-16)、インターフェロンcx-2a、インターフェロンcx-2b、テニポシド(VM-26、硫酸ピンブラスチン(VLB)、硫酸ピンクリスチン、硫酸プレオマイシン、アドリアマイシン、およびアラビノシル;血管新生阻害剤、たとえばSU5416およびSU6668(Sugen/Pharmacia&Upjohn)のような血管新生および/または腫瘍増殖に重要なシグナリング分子に対する活性を有するチロシンキナーゼ阻害剤、エンドスタチン(EntreMed)、アンジオスタチン(EntreMed)、コンプレスタチン(Oxigene)、シクロスポリン、5-フルオロウラシル、ピンブラスチン、ドキシソルピシン、バクリタキセル、ダウロルピシン、イムノトキシン;凝固因子;抗ウイルス剤、たとえ

30

40

50

ばアシクロビル、アマンタジンアジドチミジン（AZTまたはジドブジン（Zidovudine））、リバビリンおよびピダラビーン水和物（アデニンアラヒノシド、ara-A）；抗生物質、抗マラリア剤、クロロキンのような抗原虫剤、ヒドロキシクロロキン、メトロイダゾール、キニーネおよびアンチモン酸メグルミン；抗炎症剤、たとえばジフルニサル、イブプロフェン、インドメタシン、メクロフェナメート、メフェナム酸、ナプロキセン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダック、トルメチン、アスピリンおよびサリシレート。

#### 【0196】

また、本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを使用して、遺伝物質をKDR発現細胞に導くことができる。したがって、それらは遺伝子治療、とりわけ血管新生に関連した疾患の治療に有用であってよい。この態様において、遺伝物質または血管新生に関連した疾患の治療に有用な遺伝物質を含む1以上の送達ビヒクルを1以上の本発明のKDR結合部分に結合させ、患者に投与することができる。遺伝物質には核酸、たとえば、組換えRNAおよびDNAならびにアンチセンスRNAおよびDNAを含む、天然または合成起源のいずれかのRNAまたはDNAを挙げることができる。使用してよい遺伝物質の型としては、たとえば、プラスミド、ファージミド、コスミド、イースト人工クロモソーム（YAC's）および欠陥または「ヘルパー」ウイルスのような発現ベクター上で運ばれる遺伝子、抗遺伝子核酸、1本鎖および2本鎖RNAおよびDNAの両方、ならびにホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートオリゴヌクレオチドのようなその類似体が挙げられる。さらに、遺伝物質はたとえば、脂質、タンパク質または他のポリマーと結合することができる。遺伝物質の送達ビヒクルとしては、たとえばウイルス粒子、レトロウイルスまたは他の遺伝子療法ベクター、リポソーム、脂質（とりわけカチオン性脂質）と遺伝物質の複合体、デキストラン誘導体と遺伝物質の複合体などを挙げることができる。

10

20

#### 【0197】

好ましい態様において、本発明の構築物は血管新生に関連した疾患の治療のための遺伝子治療に使用される。この態様において、たとえば血管新生に関連した疾患の治療に有用な遺伝物質または遺伝物質を含む1以上の送達ビヒクルを本発明の1以上のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドまたはヘテロ多量体に結合し、患者に投与することができる。

30

#### 【0198】

遺伝物質および本発明のKDR結合ポリペプチドを含む構築物は、とりわけ血管新生内皮細胞に遺伝子を選択的に導入するために使用してよく、そしてそれらは癌を治療するだけでなく、血管新生の阻害が再狭窄を阻害できる、血管形成術後にも有用であってよい。

#### 【0199】

治療薬および本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分は、本出願の他の部分で説明した同じ型のリンカーを使用し、公知の方法で結合または融合することができる。好ましいリンカーは置換または非置換アルキル鎖、アミノ酸鎖、ポリエチレングリコール鎖、および当該技術分野で公知の他の簡単な高分子リンカーであろう。より好ましくは、治療薬がそれ自体タンパク質であり、そしてそのコーディングDNA配列が公知の場合、治療薬およびKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、先に記載の組換えDNA技術を使用して作製された、同じ合成遺伝子から共発現されてよい。KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドのコーディング配列は治療薬のそれと骨格で融合してよく、治療タンパク質またはKDRもしくはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドのいずれかの要求される生物学的機能をそのような配置が破壊しないことが確認される場合、ペプチドは治療タンパク質のアミノ末端もしくはカルボキシ末端、または末端間のある部分で発現される。この一般的な方法の具体的な利点は、複数の直列に並んだKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドのコンカテマー化が可能で、それによってそれぞれの治療タンパク質に関連したKDRまたはVEGF/KDR複合体の結合部位数および濃度を増やすことである。この方法において、組換え治療融合タンパク質

40

50

の効力を改善すると予想されるKDRまたはVEGF/KDR複合体結合活性が増大する。

【0200】

KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの1以上のコーディング配列を含む類似した組換えタンパク質は画像化または治療的適用に有用であってよい。たとえば、以下に説明した多様なプレターゲティング適用において、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドのコーディング配列は抗体（または抗体フラグメントもしくは抗体を含む組換えDNA構築物など）をコードする配列に骨格で融合してもよく、そしてそれはたとえば、放射性核種（または別の検出可能な標識）に対するキレート剤に結合する。KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを発現する抗体は次に患者に投与され、KDR発現組織に局在し、そして結合する。非結合抗体が除去された後、抗体が認識するキレート剤-放射性核種複合体（または他の検出可能な標識）が投与され、KDR発現組織の画像化またはそれへの放射線療法を可能にする。さらに、KDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドのコーディング配列は、たとえば、生物学的作用（たとえばアポトーシス、凝固、内在化、分化、細胞静止、免疫系刺激もしくは抑制、またはそれらの組み合わせ）を生じる血清タンパク質または他のタンパク質をコードする配列に骨格で融合してよい。得られた組換えタンパク質は、癌、および血管新生または本明細書で説明した病原体に関連する疾患を含む他の疾患に関する画像化、放射線療法、ならびに複数の療法に有用である。

10

【0201】

さらに、本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドを含む構築物はそれ自体治療薬として使用され、多数の疾患を治療することができる。たとえば、タンパク質または他の分子（たとえば成長因子、ホルモンなど）の結合が疾患過程に必要であるか、またはその一因となり、そして結合部分がそのような結合を阻害する場合、そのような結合部分を含む構築物は治療薬として有用であってよい。同様に、結合部分自体の結合が疾患過程を阻害する場合、そのような結合部分を含む構築物も治療薬として有用であってよい。

20

【0202】

VEGFの結合およびKDRの活性化は血管新生活性に必須であるため、一態様では、KDRへのVEGFの結合を阻害する（またはさもなければ、KDRの活性化を阻害する）KDR複合体結合ポリペプチドを含む構築物は血管新生阻害剤として使用することができる。KDRの活性化を阻害する本発明のいくつかのペプチドは以下の実施例9において説明する。KDRの活性化を阻害する多量体およびヘテロ多量体を含む、本発明のある種の構築物も実施例で説明する。とりわけ好ましいヘテロ多量体はヘテロ二量体含有構築物D1（実施例により提供される構造）である。他の好ましいヘテロ二量体構築物には、D4、D5、およびD6（以下の実施例12および18に提供される構造）が挙げられる。本発明の結合ポリペプチドおよびその構築物は内皮細胞を含む状態を治療するための治療薬として有用である。内皮細胞の重要な機能が血管新生、または血管形成であるため、ポリペプチドおよびその構築物は血管新生を含む状態の治療にとりわけ有用である。血管新生を含む状態としては、たとえば、固形腫瘍、腫瘍転移および良性腫瘍が挙げられる。そのような腫瘍および関連する疾患は当該技術分野で十分に公知であり、たとえばメラノーマ、中枢神経系腫瘍、内分泌腫瘍、肉腫、多発性骨髄腫、ならびに乳腺、肺、前立腺、結腸、頭部&頸部、および卵巣の癌が挙げられる。付加的な腫瘍および関連する疾患は、Moses, et al. の2000年2月15日に発行された米国特許第6,025,331号の表1に記載され、その教示は本明細書に援用される。良性腫瘍には、たとえば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫が挙げられる。血管新生を含む他の関連する疾患には、たとえば慢性関節リウマチ、乾癬、および糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植後拒絶反応、新生血管緑内障、水晶体線維増殖症のような眼球疾患、レベオシス(rebeosis)、Osler-Weber症候群、心筋血管新生、ブランク血管新生、毛細血管拡張症、血友病患者関節、血管線維症お

30

40

50

よび創傷肉芽形成が挙げられる。血管増殖を含む、他の関連する疾患または状態には、腸管癒着症、アテローム性動脈硬化症、強皮症、および肥厚性癬痕、および潰瘍が挙げられる。さらに、本発明の結合ポリペプチドおよびその構築物は、卵子着床に必要な子宮血管新生を減少させるか、または阻害するために、たとえば経口避妊薬として使用することができる。本発明のヘテロ多量体はまた、VEGFがKDRに結合する場合、結果として生じてよい血管透過性事象の治療に有用であってよい。腎不全では、たとえば抗VEGF抗体が障害を抑制できることが示されている。同様に、本発明の化合物は、たとえば糖尿病における腎透過性発症を抑えることができる。

#### 【0203】

さらに、本発明のKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドは、たとえばマラリア、HIV、SIV、サル出血熱ウイルスなどを含むある種の病原体に関連した疾患の治療に有用であってよい。NCBIのBLASTプログラムを使用したファージディスプレイにより同定されたKDR結合ペプチドの配列相同性検索は、病原性生物の表面に存在することが公知であるか、または推測される多数の相同性タンパク質を同定している。本発明のポリペプチドと各種マラリア系統、HIV、SIV、サル出血熱ウイルス、および腸管出血性大腸菌株由来のタンパク質間に相同性が認められた。PfEMP1およびEBL-1のような相同性タンパク質のいくつかは、病原性において役割を果たすことが公知の過可変接着タンパク質である。これらのタンパク質は、宿主表面上の1以上の標的分子に結合可能な複数の結合部位を有する。それらの高い変異および組換え速度が、それらに新規結合部位を速やかに発生させ、生存および/または侵入を促進する。同様に、HIVのgp120（それも本明細書に開示されたKDR結合ペプチドのいくつかに相同性を有する）のようなタンパク質はそれらの宿主への病原体の結合に重要な役割を果たす。今まで報告されていないが、本明細書に開示されたKDR結合ペプチドに相同性を有する多くの病原体タンパク質もKDRに結合することが可能である。病原体タンパク質配列と対応するペプチド配列の比較は、ペプチドの結合特性を促進することになるその配列の変化または他の改変を暗示できる。さらに、本明細書に開示されたKDR結合ペプチド配列は、相同性を有する病原体種による感染の阻害に有用性であってよい。実際、CD4のようなそれらの公知の細胞表面標的へのウイルスエンベロープタンパク質の結合を妨げるのを試みることによる類似した方法がHIV感染阻害に使用されている。Howie et al., "Synthetic peptides representing discontinuous CD4 binding epitops of HIV-1 gp120 that induce T cell apoptosis and block cell death induced by gp120", FASEB J, 12(11):991-998(1998)を参照されたい。したがって、KDRは多数の病原体に対し事前に未知の標的を提示し、そして本発明のKDR結合ペプチドはそれらの病原体に関連する疾患の治療に有用であってよい。

#### 【0204】

結合ポリペプチドおよびその構築物は状態の性質および所望する予後に依存して適切な時間経過で個体に投与することができる。結合ポリペプチドおよびその構築物は予防的に、たとえば状態が診断される前か、またはある状態にかかりやすい個体に投与することができる。結合ポリペプチドおよびその構築物は、個体が状態の症状を示す間、または症状が治まるか、さもなければ緩和された後（たとえば腫瘍の除去後）に投与してもよい。さらに、本発明の結合ポリペプチドおよびその構築物は維持処方の一部として、たとえば再発、または症状もしくは状態を妨げるか、または緩和させるために投与することができる。以下に記載のように、本発明の結合ポリペプチドおよびその構築物は全身的、または局所的に投与することができる。

#### 【0205】

投与される物質の量は状態の重症度に依存することになる。たとえば、血管新生状態の治療に対して、たとえば新生物性腫瘍増殖の場合、腫瘍の位置およびサイズは投与される物質の量に影響を及ぼすであろう。使用される正確な量および投与様式は病気の性質の観

点から必然的に処置を指図する医師によって状況にあわせて決定されなければならない。一般に、本発明の薬物結合体の投与量は治療薬単独に対して慣例である投与量に従うことになるが、本発明の結合ポリペプチドまたはヘテロ多量体の標的に対する改善された親和性は標準投与量を減らすことができる。

**【0206】**

そのような結合した医薬組成物は好ましくは非経口投与のために、そして最も好ましくは静脈内、または動脈内投与のために製剤される。一般に、そしてとりわけ投与が静脈内または動脈内である場合、医薬組成物はポラスとして、時間の離れた2回以上の投与量として、または一定もしくは非線形流量注入物として投与してよい。

**【0207】**

本明細書で使用する「治療的」という用語は、一定の状態の少なくとも部分的な症状の緩和を含む。本発明の結合ポリペプチドおよびその構築物は、有用であるために完全に症状を緩和させる必要はない。たとえば、個体の治療が腫瘍もしくは疾患部位のサイズの縮小、または腫瘍もしくは疾患部位のサイズ増大の予防になってよい。治療は関心のある部位において血管数を減らしてよいが、または関心のある部位において血管数の増加を妨げてよい。また、治療は主要な腫瘍（複数の腫瘍）の転移性増殖物の数またはサイズの増大を妨げるか、または減らすことができる。

**【0208】**

緩和することができる症状としては、VEGF受容体活性および内皮細胞遊走能のような生理的特性が挙げられる。本発明の結合ポリペプチドおよびその構築物は、VEGF-2/KDR、VEGF-1/Flt-1およびVEGF-3/Flt-4を含むVEGF受容体活性を阻害することができる。そのような阻害は、たとえば結合ポリペプチドおよびその構築物の存在下、またはそれらによる処置後の受容体のリン酸化状態を測定することにより検出できる。また、そのような阻害は、結合ポリペプチドおよびその構築物の存在下、またはそれらによる処置後の内皮細胞の遊走能を測定することにより検出することができる。本明細書に提供される教示に基づいて、当業者は本明細書に提供される結合ポリペプチドおよびその構築物の適切な量の投与法を知り、関心のあるパラメータに対する処置の効果を測定することができる。たとえば、関心のある部位（たとえば腫瘍または病巣）のサイズは、処置前および後で測定することができる。別の態様では、個体から採取した試料において、相当する受容体のリン酸化状態、または関心のある部位における内皮細胞の遊走能を測定することができる。VEGF受容体または内皮細胞は試料から単離し、本明細書に記載のアッセイに使用することができる。

**【0209】**

ポリペプチドおよびその構築物の投与量は個体の年齢、性、健康状態、および体重、ならびに状態の性質および全体的な治療計画に依存してよい。ポリペプチドおよびその構築物の生物学的効果は本明細書に記載される。したがって、本明細書に提供される結合ポリペプチドおよび構築物の生物学的効果および処置の所望する予後に基づき、慣例の最適化法により、当業者は好ましい投与量を決定することができる。一般に、1日投与量は約0.1 μg/kg ~ 約1 mg/kgの範囲である。

**【0210】**

本明細書に提供される結合ポリペプチドおよびその構築物は薬剂的に受容できる添加剤と一緒に単独の活性成分として投与するか、または他の結合ポリペプチドおよびその構築物、他の治療薬、もしくはそれらの組み合わせと一緒に投与してよい。さらに、結合ポリペプチドおよびその構築物は、たとえば特性、体内の滞留時間、または治療効果を改善するために治療薬に結合してもよい。そのような他の治療薬としては、たとえば他の血管新生阻害化合物、および殺腫瘍化合物が挙げられる。治療薬はまた、抗体を含んでいてよい。

**【0211】**

さらに、本発明の結合ポリペプチドまたはその構築物は内皮細胞誘導手段として使用することができる。したがって、結合ポリペプチドまたはその構築物は、核酸が内皮細胞を

10

20

30

40

50

標的にするように、たとえば治療ポリペプチドをコードする核酸に結合してよい。いったん核酸に結合した結合ポリペプチドに曝されると、内皮細胞は結合した核酸を内在化し、発現して、標的細胞に治療ペプチドを送達することができる。

#### 【0212】

本発明の別の態様において、治療薬は超音波造影剤組成物と結合してよく、上記の超音波造影剤は、先に記載のように、造影剤に含まれる小胞（とりわけマイクロバブルまたはマイクロバルーン）を形成するために使用される物質に結合した、本発明のKDRまたはVEGF複合体結合ペプチドを含む。たとえば、上記造影剤/治療薬結合は、米国特許第6,258,378号に記載のように行うことが可能であり、これを本明細書に援用する。したがって、たとえば先に引用した米国特許第6,258,378号に開示されたように、超音波造影剤の投与、およびKDRまたはVEGF/KDR複合体を発現する病原性部位に結合した造影剤の所望する画像化後に、病原性部位はエネルギー光線（好ましくはたとえば0.3~3MHzの周波数の超音波）によって照射され、微小小胞の破裂を引き起こすことができる。治療薬の治療効果はこうして好都合には微小小胞の破裂によって放出されたエネルギーによって促進され、とりわけ標的とされる病原性部位への治療薬の効果的な送達を行うことができる。

10

#### 【0213】

結合ポリペプチドおよびその構築物は任意の適切な経路によって投与することができる。適切な投与経路には、局所適用、経皮、非経口、消化管、腔内、および経歯槽が挙げられるがそれらに限定されない。所望する投与経路のための組成物は、たとえばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 20版, Lippincott, Williams and Wilkins, 2000に記載のように、薬剤的技術分野で公知のいずれかの方法により作成することができる。

20

#### 【0214】

局所適用には、結合ポリペプチドはたとえば、クリーム剤、ゲル剤またはリンス剤に懸濁し、全身送達のためにポリペプチドおよびその構築物が皮膚に浸透して血流に入るか、または局所送達のために関心のある部位と接触することを可能にする。局所適用に適した組成物は、少なくともポリペプチドが最小限に可溶性の、薬剤的に受容できる基剤を含む。

30

#### 【0215】

経皮適用には、ポリペプチドは適切な経皮手段または「パッチ」と一緒に薬剤的に受容できる懸濁液で適用することができる。本発明のポリペプチドを投与するための適切な経皮手段の例は、たとえばFoldvari, et al. の2000年12月26日に発行された米国特許第6,165,458号およびSintov, et al. の2001年8月4日に発行された米国特許第6,274,166号B1に記載され、それらの教示は本明細書に援用する。

#### 【0216】

非経口適用には、ポリペプチドは静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下に注入することができる。一般に、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張性水性バッファ中の溶液である。他の薬剤的に受容できる担体には滅菌水、生理食塩水、および緩衝食塩水（リン酸または酢酸のようなバッファを含む）、アルコール、植物油、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、パラフィンなどを含むが、それらに限定されない。必要な場合、組成物は可溶化剤、および注射部位の疼痛を緩和するためのリドカインのような局所麻酔剤、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、塩類、潤滑剤などを、それらが活性化化合物と反応して悪影響を及ぼさない限り、含むことができる。同様に、組成物は慣用の添加剤、すなわち、非経口的、経腸または鼻腔内適用に適した薬剤的に受容できる有機または無機担体物質を、それらが活性化化合物と反応して悪影響を及ぼさない限り含むことができる。一般に、成分は、たとえばアンプルまたはプラスチック製小容器のような気密シール容器中の乾燥した凍結乾燥粉末ま

40

50

たは無水濃縮物として、活性剤の量を活性単位で示す単位剤形中に、別々、または一緒に混合して供給されることになる。組成物が注入により投与されることになっている場合、滅菌薬剤等級「注射用水」または生理食塩水を含む注入容器により投薬することができる。組成物が注射により投与されることになっている場合、滅菌注射用水または生理食塩水のアンプルが提供され、成分は投与前に混合することができる。

【0217】

消化管および腔内投与には、ポリペプチドは経口摂取には薬剤的に受容できる粉末剤、丸剤または液剤に、そして直腸または腔内投与には坐剤に取り込まれてよい。

経歯槽、舌下または肺投与には、ポリペプチドはエアゾール化および吸入のために、またはマウスウォッシュとして適切な薬剤的に受容できる添加剤に懸濁することができる。噴霧器および吸入器のような経歯槽投与に適切な装置も本発明の範囲内である。舌下または肺経路を使用したポリペプチドのエアゾール送達に適した製剤は、たとえば2001年11月6日に発行されたPankaj Modiの米国特許第6,312,665号B1に見出すことができる。

【0218】

さらに、本発明のポリペプチドは点滴状投与に適切な、液状の薬剤的に受容できる物質に懸濁される場合、経鼻または眼球投与することができる。

本発明のポリペプチドは個体において持続的に放出されるように（徐放または制御放出）投与することができる。たとえば、ポリペプチドは、1回の投与が少なくとも1週間、または1年間以上にわたりポリペプチドを送達するような組成物に製剤することができる。徐放系には、一体型または容器型マイクロカプセル、デポ製剤埋め込み物、浸透圧ポンプ、小胞、ミセル、リポソーム、経皮パッチおよびイオン泳動装置が挙げられる。一態様において、本発明のポリペプチドは分解の遅い、非毒性ポリマー中に封入されるか、または混合される。本明細書に提供されるポリペプチドの徐放に適した付加的な製剤は、1983年7月5日に発行されたFolkman, et al.の米国特許第4,391,797号に記載され、その教示は本明細書に援用される。

【0219】

本発明のポリペプチドを個体に送達するための別の適切な方法は、ポリペプチドのin vivo産生を介する。ポリペプチドをコードする遺伝子は、コードされるポリペプチドが発現されるように個体に投与することができる。遺伝子は一過性に発現することができる。具体的な態様において、ポリペプチドをコードする遺伝子は患者から得ている細胞に形質移入され、その方法はex vivo遺伝子治療と呼ばれる。ポリペプチドを発現する細胞はその後患者の体内に戻される。ex vivo遺伝子治療法は当該技術分野で公知であり、1998年3月21日に発行されたAnderson, et al.の米国特許第4,391,797号に記載され、その教示は本明細書に援用される。

【0220】

本発明に従ったKDRまたはVEGF/KDR複合体結合部分は以下の実施例においてさらに説明されるであろう。以下の実施例に含まれる具体的なパラメータは本発明の実施を説明することを意図し、そしてそれらはどのような方法によっても本発明の範囲を限定するように提示されない。

【実施例1】

【0221】

KDRおよびKDR/VEGF複合体標的に対するライブラリースクリーニング  
ヒトKDR (#357-KD-050)、マウスKDR (#443-KD-050)、ヒトVEGFR-1 (#321-FL-050)、ヒトVEGFR-3 (#349-F4-050)、およびヒトTrail R4 (#633-TR-100)とIgFc領域のキメラ融合体は担体なしの形(BSAなし)でR&D Systems(ミネアポリス、MN)から購入した。Trail R4 Fcは、標的Fc融合体(KDR Fc)と同じFc融合体領域を有する不適切なFc融合タンパク質であり、Fc結合剤のライブラリーを枯渇させるために使用する。VEGF<sub>165</sub> (#100-20)は担体なしの形で

10

20

30

40

50

Peprotech (ロッキーヒル、NJ) から購入した。プロテインA磁気ビーズ (#100.02) はDyna1 (オスロ、ノルウェー) から購入した。ヘパリン (#H-3393) はSigma Chemical Company (セントルイス、MO) から購入した。A2-成分テトラメチルベンチジン (TMB) システムはKPL (ゲイサーブルグ、MD) から購入した。

#### 【0222】

以下の方法において、マイクロタイタープレートはBio-Tek 404プレート洗浄機 (ウィヌースキー、VT) で洗浄した。ELISA信号はBio-Tekプレートリーダー (ウィヌースキー、VT) で読み取った。96ウェルプレートの攪拌はLabquake振とう機 (Labindustries, ベーカーリー、CA) 上で行った。

10

#### 【0223】

8つのM13ファージディスプレイライブラリーを、固定化KDRおよびVEGF/KDR標的に対するスクリーニングのために調製した：環状ペプチドディスプレイライブラリーTN6/VI、TN7/IV、TN8/IX、TN9/IV、TN10/IX、TN12/IおよびMTN13/I、および直鎖状ディスプレイライブラリーLIN20。これらのライブラリーの設計は前に説明されている。

#### 【0224】

ライブラリーをコードするDNAは、DNAがTaq DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer, ウェレスレイ、MA) を使用してPCR増幅できるように、両方の末端に一定のDNAを有するように合成し、NcoIおよびPstIで切断し、そして同様に切断されたファージディスプレイベクターへ連結した。XLL-Blue MFR'大腸菌細胞を連結したDNAで形質転換した。ライブラリーのすべてを同一の様式で構築した。

20

#### 【0225】

ヘパリン存在下でのKDR選択プロトコール

プロテインA磁気ビーズを1回、1xPBS (pH7.5)、0.01% Tween-20、0.1% HSA (ブロック緩衝液) を用いて室温で30分ブロックし、1xPBS (pH7.5)、0.01% Tween-20、5 µg/mlヘパリン (PBSTH緩衝液) で5回洗浄した。

#### 【0226】

環状ペプチド、または「強要された (constrained) ループ」、ライブラリーは、最初のスクリーニングのために2つのプールに分けてプールした。TN6/VI、TN7/IVおよびTN8/IXが1つのプールであり；TN9/IV、TN10/IXおよびTN12/Iが第2のプールであった。2つのプールしたライブラリーおよび直鎖状ライブラリー (Lin20) は、Trail R4 Fc融合体 (不適切なFc融合体) に対して枯渇させ、そして次にKDR Fc融合体に対して選択した。100 µl PBSTH当たり、各々のライブラリーから10<sup>11</sup> プラーク形成単位 (pfu) を一緒にプールした、例えば、3つのプールされたライブラリーは、総容量で~350 µl PBSTHを生じるであろう。

30

#### 【0227】

不適切なFc融合体ビーズを調製するため、500 µlのTrail R4-Fc融合体 (0.1 µl/µl PBST保存液 (ヘパリンなし)) を、1000 µlの洗浄し、ブロックしたプロテインA磁気ビーズへ加えた。融合体は、4で攪拌しながら、一夜ビーズへ結合させた。次の日、磁気ビーズを5回、PBSTHで洗浄した。各々のファージプールは50 µlのTrail R4 Fc融合体ビーズと、Labquake振とう機上、室温 (RT) で1時間インキュベートした。インキュベーション後、ファージ上清を除去し、そして別の50 µlのTrail R4ビーズとインキュベートした。非特異的Fc融合およびライブラリーからビーズ結合ファージを除去するため、総計で5ラウンドの枯渇を繰り返した。

40

#### 【0228】

50

KDR 標的ビーズを調製するため、500  $\mu$ l の KDR - Fc 融合体 (0.1  $\mu$ l /  $\mu$ l PBST 保存液 (ヘパリンなし)) を、500  $\mu$ l の洗浄し、ブロックしたビーズへ加えた。KDR - Fc 融合体は、4 で攪拌しながら、一夜ビーズへ結合させた。次の日、ビーズを5回、PBSTHで洗浄した。各々の枯渇ライブラリープールを100  $\mu$ l の KDR - Fc 融合体ビーズへ加え、Lab Quake 振とう機上、室温で1時間インキュベートした。ビーズは次に、磁気スタンド (Promega) を使用してできるだけ迅速に5  $\times$  1 ml PBSTHで洗浄して、ビーズを洗浄緩衝液から分離した。洗浄後にビーズにまだ結合しているファージは、250  $\mu$ l の VEGF (50  $\mu$ g / ml、 $\sim$ 1  $\mu$ M) の PBSTH 溶液で、Lab Quake 振とう機上、室温で1時間、1度溶出させた。1時間溶出液を除去し、保存した。最初の溶出後、ビーズを再び250  $\mu$ l の VEGF (50  $\mu$ g / ml、 $\sim$ 1  $\mu$ M) で、Lab Quake 振とう機上、室温で一夜インキュベートした。2つの VEGF 溶出液は別々に保ち、力価決定のために各々から一部を少量採取した。各々の溶出液を、中間対数期まで増殖させた後、氷で冷やしておいた XL1 - Blue MRF' (または他の F' 細胞株) 大腸菌細胞の一部と混合した。VEGF 溶出後の残りのビーズもまた、ビーズにまだ結合されているファージ、即ち、2回の VEGF インキュベーション (1時間および一夜溶出) によっても競合により取り除かれなかった KDR 結合ファージ、を増幅させるために細胞と混合した。室温で約15分後、ファージ/細胞混合物を、50  $\mu$ g / ml アンピシリン含有 NZCYM 寒天を含んでいる Bio - Assay Dishes (243  $\times$  243  $\times$  18 mm, Nalge Nunc) 上に広げた。プレートは37 で一夜インキュベートした。次の日、各々の増幅されたファージ培養物を、そのそれぞれのプレートから採取した。次の日の終わりまでに、インプット、アウトプットおよび増幅ファージ培養物の FOI (即ち、インプット率 = ファージアウトプット  $\div$  ファージインプット) を測定した。

#### 【0229】

第一のラウンドにおいて、各々のプールで3つの増幅溶出液を得た。これらの溶出液は、上記と同一のプロトコールに従い、 $\sim$ 10<sup>10</sup> インプットファージ/ラウンドを使用する選択のさらなる2~3の追加ラウンドで選り分けた。各々の追加ラウンドのため、KDR - Fc ビーズは、ラウンドが開始される前夜に調製した。続いてのラウンドにおける溶出工程に対し、KDR - Fc ビーズ上の増幅された溶出液再スクリーンは、いつも同一の様式で溶出し、すべての他の溶出は洗液として処理した。例えば、大腸菌を感染させるため、まだ結合されているビーズを使用して回収された増幅溶出液に対しては、1時間および一夜 VEGF 溶出を実施し、そして洗液として廃棄した。次に、ビーズを再び大腸菌を感染させるために使用し、次のラウンドの増幅溶出液を産生した。この手順を使用すると、各々のライブラリープールから、選択の終わりには3つの最終溶出液のみしか得られない。それ故、2つのプールおよび1つの直鎖状ライブラリーから、選択の終わりには9つの最終溶出液が得られた。

#### 【0230】

この選択手順を、ヘパリン非存在下のすべての結合緩衝液中で、すべてのライブラリーに対して繰り返した、即ち、すべての工程において、PBSTHをPBST (PBS (pH 7.5)、0.01% Tween - 20) に置き換えた。

#### 【0231】

ヘパリン存在下での KDR : VEGF 複合体選択プロトコール  
 プロテインA磁気ビーズを、ブロッキング緩衝液で30分、室温で1回ブロックした後、5回PBSTHで洗浄した。

#### 【0232】

強要されたループライブラリーの2つのプールおよび直鎖状ライブラリー (Lin 20) は前のように調製し、結合 VEGF なしでのレセプターへの結合剤を除去するため Trail - R4 Fc 融合体の代わりに、KDR Fc 融合体のみに対して枯渇させた。枯渇させたら、ライブラリーを KDR : VEGF<sub>165</sub> 複合体に対して選択した。

#### 【0233】

KDR - FC 融合体枯湯ビーズを調製するため、1 mL の KDR - FC 融合体 ( 0 . 1  $\mu$ g /  $\mu$ l PBST 保存液 (ヘパリンなし) ) を、1 mL の洗浄しブロックしたビーズに加えた。融合体は 4 で攪拌しながら、一夜結合させた。次の日、ビーズを PBSTH で 5 回洗浄した。各々のファージプールは、Lab Quake 振とう機上、室温で 1 時間、50  $\mu$ l の KDR - FC 融合体ビーズとインキュベートした。インキュベーション後、ファージ上清を除去し、別の 50  $\mu$ l の KDR - FC 融合体ビーズとインキュベートした。これを総計で 5 ラウンドの枯湯のために繰り返した。

#### 【0234】

KDR : VEGF 複合体ビーズを調製するため、300  $\mu$ l の上記からの KDR - FC 融合体ビーズを 15  $\mu$ l の VEGF ( 1 mg / ml ) とインキュベートした。VEGF は 10 室温で 1 時間結合させた。ビーズを 5 回、PBSTH で洗浄した。各々の枯湯ライブラリープールを 100  $\mu$ l の KDR : VEGF 複合体ビーズへ加え、Lab Quake 振とう機上、室温で 1 時間インキュベートした。ビーズは次に、磁気スタンド ( Promega ) を使用してできるだけ迅速に 5 x 1 ml PBSTH で洗浄して、ビーズを洗浄緩衝液から分離した。洗浄後にビーズにまだ結合しているファージを溶出するため、ビーズを細胞と混合し、ビーズにまだ結合されているファージを増幅した。室温で約 15 分後、ファージ / 細胞混合物を、50  $\mu$ g / ml アンピシリン含有 NZCYM 寒天を含んでいる Bio - Assay Dishes ( 243 x 243 x 18 mm , Nalge Nunc ) 上に広げた。プレートは 37 で一夜インキュベートした。次の日、各々の増幅されたファージ培養物を、そのそれぞれのプレートから採取した。次の日の終わりまでに、インプット、アウトプットおよび増幅ファージ培養物の FOI を測定した。この選択プロトコールを、各々の増幅溶出液からの  $10^{10}$  のインプットファージを使用して、さらに 2 ラウンド繰り返した。 20

#### 【0235】

KDR および KDR / VEGF スクリーニングアッセイ

100  $\mu$ l の KDR - FC 融合体または Trail R4 - Fc 融合体 ( 1  $\mu$ g / ml ) を二重の Immunon II プレートのあらゆるウェルへ加え、4 で一夜インキュベートした。各々のプレートを 2 回、PBST ( PBS、0.05% Tween - 20 ) で洗浄した。ウェルを 1 x PBS、1% BSA で上まで満たし、室温で 2 時間インキュベートした。各々のプレートを 1 回、PBST ( PBS、0.05% Tween - 20 ) で 30 洗浄した。

#### 【0236】

KDR : VEGF 複合体への結合を評価するため、別の組の KDR を上記の様に準備し、各々の KDR ウェルへ 100  $\mu$ l の VEGF ( 1  $\mu$ g / ml ) の PBST 溶液を加え、室温で 30 分インキュベートした。各々のプレートは次に、PBST ( PBS、0.05% Tween - 20 ) で洗浄した。

#### 【0237】

プレートを準備したら、各々の一夜ファージ培養物を PBS、0.05% Tween - 20、1% BSA で 1 : 1 に希釈した ( または、精製ファージ保存液を使用して  $10^{10}$  pfu へ ) 。100  $\mu$ l の各々の希釈培養液を加え、室温で 2 ~ 3 時間インキュベートした。各々のプレートを 5 回、PBST で洗浄した。結合ファージは、PBST に 1 : 10 , 000 希釈で希釈した、HRP - 抗 M13 抗体コンジュゲート ( Pharmacia ) を各々のプレートへ加えることにより可視化し、室温で 1 時間インキュベートした。各々のプレートを 7 回、PBST ( PBS、0.05% Tween - 20 ) で洗浄し、次にプレートを HPR 基質で発色させ ( ~ 10 分 ) 、そして吸光度信号 ( 630 nm ) をプレートリーダーで検出した。 40

#### 【0238】

KDR および KDR / VEGF 複合体結合ファージを回収し、増幅し、そして結合に関与しているディスプレイペプチドの配列を、標準 DNA 配列決定法により決定した。単離されたファージの結合ペプチドは、下記の表 1 ~ 7 に示されている。 50

## 【0239】

最初の選択ラウンドでのKDRおよびKDR/VEGF複合体単離物の単離後、ある種の単離物を二次ライブラリー構築のためのテンプレートとして働くように選択し、それからさらに高親和性結合ポリペプチドを単離した。二次TN8ライブラリーにおいて、ファージ単離物配列PKWCEEDWYYCMIT(配列番号21)を、各々の可変コドンで親配列に対して1-、2-および3-塩基突然変異を許容するライブラリーの構築するためのテンプレートとして使用した。二次TN12ライブラリーにおいて、ファージ単離物配列SRVCWEDSWGGEVCFRY(配列番号88)を、各々の可変コドンで親配列に対して1-、2-および3-塩基突然変異を許容するライブラリーの構築するためのテンプレートとして使用した。別の二次TN12ライブラリーにおいては、最初のTN8配列からの反復性モチーフは一定に保ち(WVEC---TG-C---;配列番号260)、そして他のコドン位置のすべて(即ち、「-」での)はNNKコドン置換を使用して変更することを許容した、ここでNは任意のヌクレオチドを表し、およびKは任意のケトヌクレオチド(GまたはT)を表している。

10

## 【0240】

Fairbrothers, Biochemistry, 37(51):17754-17764(1998)、により記載されているようなソフト無作為化によるペプチド最適化法を使用し、2つのライブラリーを配列番号21および配列番号88の配列に基づいて調製した。各々の残基位置において、特定コドン内の各々のヌクレオチドは、親コドンのヌクレオチドには対応しない、別の3つのヌクレオチドの固定量を加えることにより発展させることを許容した。このヌクレオチド混合は、ライブラリーを作製するために使用したテンプレートDNAの合成において達成した。これらのライブラリーについて、各々のコドン内の親ヌクレオチドは、配列番号21で64%、および配列番号88で67%維持されており、ところが他のヌクレオチドは3で割った残りの頻度で付加されていた。親ヌクレオチドが多数であるので、全ライブラリーの総合的な共通配列は、まだ親配列を含んでいるのは当然である。しかしながら、個々の配列を点検すると、多数の突然変異が可能であることを示しており、それ故、親配列と比較して改良された結合能力を有するペプチドの選択を可能にしている。

20

## 【0241】

第三のライブラリーのためには、上記TN8モチーフは一定に保ち、そして他の位置のすべてが、テンプレートオリゴヌクレオチド中のNNK置換で変化するのを許容されていた。置換を広げるため、NNK多様性がまた2つのフランキングアミノ酸位置で許容され、従って、ディスプレイペプチドのN末端およびC末端に多様なアミノ酸位を加えている。それ故、二次ライブラリーテンプレートは以下の配列のディスプレイペプチドをコードしていた: Xaa-Xaa-Trp-Val-Glu-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Thr-Gly-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa(配列番号261)、式中、Xaaは任意のアミノ酸でありうる。共通配列には親配列が残っている、前の2つのライブラリーと異なり、このライブラリーはすべての許容された位置で全く異なっており、一定に保たれた残基中の親モチーフのみが似ていた。

30

## 【0242】

各々のライブラリーから、総計で $2 \times 10^{11}$  pfuが前のように使用され、ただし溶出戦略は変更された。結合されたファージの競合溶出は、特定の二次ライブラリーを作製するために使用された親ペプチド(50 μM)を使用して実施した(即ち、各々の配列番号21、88および40のペプチド)。結合ファージは3工程で溶出した:(1)室温で1時間の溶出、溶出されたファージは、増幅のため、細胞に感染させるのに使用されている、(2)一夜溶出、ここで、新鮮な競合溶出ペプチドを結合されたファージへ加え、そして攪拌しながら4で一夜インキュベートした、溶出されたファージは次に、増幅のため、細胞に感染させるのに使用されている、および(3)残存するビーズ(溶出されなかった結合ファージを有している)は、直接的に細胞に感染させるのに使用された。3ラウンドの選択を実施した。ラウンド2および3からプラークを拾い、ELISAで分析し、

40

50

そして配列決定した。KDR陽性単離物は、50 $\mu$ M遊離親ペプチドとの競合でさらにアッセイした。親ペプチドと最小競合を示したペプチドがより高い親和性結合剤と考え、合成した。これらの配列は、TN8二次ライブラリーに対しては配列番号22~23、TN12二次ライブラリーに対しては配列番号89~95として、以下の表に掲げられている。

【0243】

【表1-1】

TN8/I Xライブラリー単離物

配列	配列番号	溶出	クラス
DSWCSTEYTYCEMI	20	1HR	NA
PKWCEEDWYYCMIT	21	1HR	(III)
SDWCRVDWYYCWLM	22	O/N	III
ANWCEEDWYYCFIT	23	O/N	III
ANWCEEDWYYCWIT	24	O/N	III
PDWCEEDWYYCWIT	25	O/N	III
SNWCEEDWYYCYIT	26	O/N	III
PDWCAADWYYCYIT	27	O/N	III
PEWCEVDWYYCWLL	28	CELL	III
PTWCEDDWYYCWLF	29	O/N	III
SKWCEQDWYYCWLL	30	CELL	III
RNWCEEDWYYCFIT	31	O/N	III
VNWCEEDWYYCWIT	32	O/N	III
ANWCEEDWYYCYIT	33	O/N	III
VWCAKTFPFCHWF	34	1HR	I
VTVCYEGTRICEWH	35	1HR	NA
WVECRYSTGLCINY	36	O/N	NA
WYWCDDYYGIGCKWT	37	1HR	NA
WVECWWKSGQCYEF	38	1HR, CELL	(II)
WIQCDMETGLCTHG	39	1HR, CELL	II
WVECFMDTGACYTF	40	CELL, O/N	II
WLECYAEFGHCYNF	41	CELL, O/N	II
WIECDMLTGMCKHG	42	CELL	NA
SVECFMDTGACYTF	43	CELL	I
WIQCNSITGHCTSG	44	CELL	II
WIECYHPDGICYHF	45	CELL	(III)
QAWVECYAETGYCWPRSW	46	NA	NA
VGWVECYQSTGFCYHSRD	47	NA	NA
FTWVECHQATGRCVEWTT	48	NA	NA
DWWVECRVGTGLCYRYDT	49	NA	NA
DSWVECDAQTFGCYSFLY	50	NA	NA
GGWVECYWATGRCIEFAG	51	NA	NA
ERWVECRAETGFCYTWVS	52	NA	NA
GGWVECRAETGHCQEYRL	53	NA	NA
VAWVECYQTTGKCYTFRG	54	NA	NA
EGWVECFANTGACFTYPR	55	NA	NA
GVECYKHSGMCRSW	56	O/N	II
GVWCDMVTGWCYHG	57	CELL	II
WIECHYKTGHCIHS	58	CELL	II
DFNCKMIDGFCLLK	59	1HR	II
WIQCDRKAGRCSR	60	CELL	II

10

20

30

40

50

【 0 2 4 4 】

【 表 1 - 2 】

表 1 続き

TITCWMDTGHCME	61	CELL	II
GINCYPATGKCQMG	62	CELL	II
WTECHYATGKCHSF	63	CELL	II
LNICKEDWYYCFLL	64	1HR	I/II
GITCYSATGKCQMW	65	CELL	II
WVQCASDTGKCIMG	66	CELL	II
TGNCQEDWYYCWYF	67	CELL	II
KELCEDDWYYCYLM	68	1HR	I/III
HWECYSDTGKCWFF	69	O/N	II
GITCYSDTGKCFSF	70	CELL	II
AVTCWALTGHCVVEE	71	O/N	II
YVDCYYDTGRCYHQ	72	CELL	II
WYWCQYHGVCPS*	73	1HR	I/III
LVMCISPEGYCYEI	74	O/N	II
LIECYAHTGLCFDF	75	O/N	II
HWCAFQPECEYW	76	1HR	III
HYECWYPEGKCYFY	77	CELL	II
WYWCHHIGMYCDGF	78	1HR	III
WEWCPIDAWECIML	79	1HR	II
WLECYTEFGHCYNF	80	1HR	II
WVECWWKYGQCYEF	81	1HR	II
PNTCETFDLYCWWI	82	1HR	II
WIICDGNLGCWEG	83	O/N	II
GEQCSNLAVACCST	84	O/N	II
WVECYDPWGCWEW	85	CELL	NA
WYWCMHYGLGCPYR	86	CELL	NA

10

20

【 0 2 4 5 】

30

【表 2】

## TN12/Iライブラリー単離物\*

配列	配列番号	溶出	クラス
YPWCHELSDSVTRFCVPW	87	1HR	(III)
SRVCWEDSWGGEVCFRY	88	1HR	(III)
SRVCWEYSWGGEVCYRV	89	0/N	III
FGECWEYEWGGEFLRV	90	CELL	III
WRICWESSWGGEVCIGH	91	CELL	III
YGVCEYSWGGEVCLRF	92	CELL	III
SSVCFEYSWGGEVCFRY	93	CELL	III
SRVCWEYSWGGQICLGY	94	CELL	III
FSVCWEYSWGGEVCLRQ	95	CELL	III
DHMCSPDYQDHVFCMYW	96	CELL	II
PPLCYFVGTQEWHHCNPF	97	CELL	(II)
WWECKREBYRNTTCAWA	98	CELL	II
DSYCMNEKGWNCYLY	99	CELL	NA
PAQCWESNYQGIFCDNP	100	CELL	II?
GSWCEMRQDVGKWNCFSD	101	CELL	II
GWACAKWPWGGEICQPS	102	CELL	(II)
ASTCVFHDHPYFPMQDN	103	CELL	I/III
PDTCTMWGDSGRWYCFPA	104	CELL	II
NWKCEYTQGYDYTECVYL	105	0/N	II
NWECGWSNMFQKEFCARP	106	1HR	(III)
SGYCEFESDTGRWFSSW	107	0/N	II
GGWCQLVDHSWWCGDS	108	0/N	II
DNWCEIVVEKGGWFCYGS	109	0/N	II
YPGCYETSLSGVWFCADG	110	CELL	II
GWCQMDAQGIWSCWAD	111	1HR	II
DRWCMLDQEKGWLGGPP	112	CELL	II
NSECGCPNMLHKEFCARH	113	1HR	I/III
PFWCKFQQSKAMFPCSWF	114	1HR	II
YPWCHEHSDSVTRFCVPW	115	1HR	III
SDLCYNQSGWELCYFD	116	0/N	I/II?
LGYCMYDYENRGWTCYPP	117	0/N	II
YYQCQRYWDGKTWWCEYN	118	1HR	I/III
DSWCELEHQSGIWRCDFW	119	CELL	II
DWACDEYWSAYSLCKHP	120	CELL	II
LSLCYNDMHGWWEHCQWY	121	CELL	II
YSHCIETSMENIWFCDFD	122	CELL	II
PPFCIYQEPSGQWWCYDH	123	CELL	II
PGWCDFSPQLGQWMCDFW	124	CELL	II
LDNCIWNVWKGVDCEYS	125	0/N	II
AGWCEYVAPQGAWRCFHN	126	CELL	II
WDDCIWHMWLKKKDCNSG	127	0/N	II
PGHCEYIWIIDEQPWCVRL	128	CELL	III
YSDCLFQLWKGVCPPS	129	CELL	II
YFFCSFADVAYESCHPL	130	CELL	NA
NYMCESEDHTYMFPCWY	131	CELL	NA
DAVCYNPWFKYWETCEYN	132	CELL	NA
NYMCEYEDHTYMLTCECN	133	CELL	NA
WDDCIYSMMVHTVCDR	134	CELL	NA
NWKCDAHQEGRIHICWGY	135	CELL	NA
NGSCWYDFGWETEICFHN	136	CELL	II

10

20

30

40

【表3】

## Lin20ライブラリー単離物\*

配列	配列番号	溶出	クラス
QVQYQFFLGTTPRYEQWDL	137	CELL	II
EPEGYAYWEVITLYHEEDGD	138	CELL	II
WYYDFHNRKPPSDWIDNL	139	1HR	III
AFPRFGDDYWIQQYLRYTD	140	1HR	(III)
GDYVYWEI IELTGATDHTPP	141	O/N	(III)
RGDYQEYWHQQLVEQLKLL	142	1HR	(III)
RSWYLGPPYYEWDPIPN	143	CELL	II
PSNSWAAYWEDDMQRLMRQH	144	CELL	II
PRLGDDFEEAPPLEWWAHF	145	CELL	II
MPPGFSYWEQLHDDAQVL	146	CELL	II
KKEDAQQWYWTDYVPSYLRY	147	1HR	III?
WVTQQFIDTYGRKEWTILF	148	CELL	II
WLYDYWRQKSEEFKFSWSQ	149	1HR	III
PVTDWTPHHPKAPDVWLFYT	150	1HR	III?
EWYWEHVGMKHGFFV	151	1HR	I/III
DALEAPKRDWYDWFNLHSP	152	1HR	III
PDNWKEFYESGWKYPSPYKPL	153	1HR	NA
EWDAQYWHDLRQQYMLDYIQ	154	1HR	I/III
AFEIEYWDSVRNKIQWHFPD	155	1HR	I/III
AFPRFGDDYWIQQYLRYTF	156	1HR	I/III
AHMPPWRPVAVDALFDWVE	157	CELL	NA
AHMPPWWPLAVDAQEDWFE	158	CELL	NA
AQMPPWWPLAVDALFDWFE	159	CELL	II
ARMGDDWEEAPHEWGWADG	160	CELL	II
DWYWQRERDKLREHYDDAFW	161	1HR	I/III
DWYWREWMPMHAQFLADDW	162	1HR	I/III
DWYYDEILSMADQLRHAFSL	163	1HR	III
EEQQALYPCCEPAEHVYAG	164	1HR	III
FDVVNWGDGIWYAYPS	165	CELL	II
FPSQMWQKQVSHHFFQHKGY	166	CELL	II
GSDHVRVDNYWWNGMAWEIF	167	1HR	II
ISPWREMSGWMPWITAVPH	168	1HR	I/III
LEEVEFDFQDFWYTHEIIVDR	169	1HR	II
MPPGFSYWEQAALHDDAQDL	170	CELL	II
PEDSEAWYWLNYRPTMFHQ	171	1HR	I/III?
QIEYVNDKWWYTGYYWNVPF	172	1HR	II
QVQYQFILGTTPRYEQWDPDK	173	CELL	II
RDEWGTGVPYEGEMGYQIS	174	1HR	II
STNGDSFVYWEVELVDHPY	175	O/N	II
SYEQWLPQYWAQYSNYFL	176	1HR	I/III?
TKWGPNEHWQYWYSHYASS	177	1HR	I/III?
VSKGSIDVGEGISYWEI IEL	178	1HR	III
WESDYWDQMRQQLKTA YMKV	179	1HR	I/III
WYHDGLHNERKPPSHWIDNV	180	1HR	III
APAWTFGTNWRSLQRVDSL	181	CELL	NA
EGWFRNPQEIIMGFDSWDKP	182	CELL	NA
GDLSVNRDKRWFWPWSSRE	183	CELL	NA
KSGVDAVGWHIPVWLKKYWF	184	CELL	NA
GMDLYQYWASDDYWGRHQEL	185	CELL	NA
GVDIWHYWKSSSTRYFHQ	186	CELL	NA

10

20

30

40

【0247】

【表 4】

## TN 7 / IVライブラリー単離物

配列	配列番号	溶出	クラス
GVECNHMGLCVSW	187	CELL	II
GITCDELGRCVHW	188	CELL	II
WIQCNHQGQCFHG	189	CELL	II
WIECNKDGKCVHY	190	CELL	II
WVECNHKGLCREY	191	CELL	II
WYWCEFYGVCSEE	192	1HR	I/III

10

【 0 2 4 8 】

【表 5】

## TN 9 / IVライブラリー単離物

配列	配列番号	溶出	クラス
IDFCKGMAPWLCADM	193	1HR	(III)
PWTCWLEDHLACAML	194	CELL	II
DWGCSLGNWYWCSTE	185	CELL	NA
MPWCSEVTGWCKLN	196	CELL	II
RGPCSGQPWHLCCYYQ	197	O/N	II
PWGCDHFGAWACKGM	198	O/N	NA
MPWCVEKDHWDCCWW	199	CELL	NA
PGPCKGYMPHQCWYM	200	CELL	NA
YGPCAEMSPWLCWYP	201	CELL	NA
YGPCKNMPPWMCWHE	202	CELL	NA
GHPCKGMLPHTCWYE	203	CELL	NA

20

【 0 2 4 9 】

【表 6】

## TN 10 / IXライブラリー単離物

配列	配列番号	溶出	クラス
NNSCWLSTTLGSCFFD	204	O/N	NA
DHHCYLHNGQWICYPF	205	CELL	(III)
NSHCYIWDGMWLCFPD	206	CELL	(II)

30

【 0 2 5 0 】

【表 7】

## MTN13 / I ライブラリー単離物

配列	配列番号	溶出	クラス
SNKCDHYQSGPHGKICVNY	207	CELL	NA
SNKCDHYQSGPYGEVCFNY	208	CELL	NA
RLDCDKVFSGPYGVKCVSY	209	CELL	NA
RLDCDKVFSGPDTSVCSQ	210	CELL	NA
RLDCDKVFSGPHGKICVRY	211	CELL	NA
RLDCDKVFSGPHGKICVNY	212	CELL	NA
RVDCDKVISGPHGKICVNY	213	CELL	NA
RTTCHHQISGPHGKICVNY	214	CELL	NA
EFHCHHIMSGPHGKICVNY	215	CELL	NA
HNRCDFKMSGPHGKICVNY	216	CELL	NA
WQECTKVLSPGTFECSYE	217	CELL	NA
WQECTKVLSPGQFSCVYG	218	CELL	NA
WQECTKVLSPGQFECEYM	219	CELL	NA
WQECTKVLSPNSFECKYD	220	CELL	NA
WDR CERQISGPGQFSCVYG	221	CELL	NA
WQECTKVLSPGQFLCSYG	222	CELL	NA
RLDCDMVFSGPHGKICVNY	223	CELL	NA
KRCDTTHSGPHGIVCVVY	224	CELL	NA
SNKCDHYQSGPYGAVCLHY	225	CELL	NA
SPHCQYKISGPFPGVPCVNY	226	CELL	NA
AHQCHHWTSGPYGEVCFNY	227	CELL	NA
YDKCSSRFSGPFGEICVNY	228	CELL	NA
MGGCDFSFSGPFQICGRY	229	CELL	NA
RTTCHHQISGPFQDVCVSY	230	CELL	NA
WYRCDFNMSGPDTFTECLYP	231	CELL	NA
WMQCNMSASGPKDMYCEYD	232	CELL	NA
GISCKWISGPDWRWKCHHF	233	CELL	NA
WQVCKPYVSGPAAFSCKYE	234	CELL	NA
GWWCYRNDSGPKPFHCRK	235	CELL	NA
EGWCWFIDSGPWKTWCEKQ	236	CELL	NA
FPKCKFDVSGPPWYQCNK	237	CELL	NA
RLDCDKVFSGPYGRVVCVY	238	CELL	NA
RLDCDKVFSGPYGNVCVNY	239	CELL	NA
RLDCDKVFSGSPMGTKLQ	240	CELL	NA
RTTCHHHISGPHGKICVNY	241	CELL	NA
QFGCEHIMSGPHGKICVNY	242	CELL	NA
PVHCSHTISGPHGKICVNY	243	CELL	NA
SVTCHFQMSGPHGKICVNY	244	CELL	NA
PRGCQHMISSGPHGKICVNY	245	CELL	NA
RTTCHHQISGPHGQICVNY	246	CELL	NA
WTICHMELSGPHGKICVNY	247	CELL	NA
FITCALWLSGPHGKICVNY	248	CELL	NA
MGGCDFSFSGPHGKICVNY	249	CELL	NA
KDWCHTTFSGPHGKICVNY	250	CELL	NA
AWGCDNMSGPHGKICVNY	251	CELL	NA
SNKCDHIMSGPHGKICVNY	252	CELL	NA
SNKCDHYQSGPFGDICVNY	253	CELL	NA
SNKCDHYQSGPFGDVCVSY	254	CELL	NA
SNKCDHYQSGPFGDICVSY	255	CELL	NA
RTTCHHQISGPFPGVPCVNY	256	CELL	NA
RTTCHHQISGPYGDICVYK	257	CELL	NA
PHGKICVNYGSEADPSYIE	258	CELL	NA
RYKCPRLSGPPYGPCSPQ	259	CELL	NA

10

20

30

40

\* DNA合成の間、低いパーセンテージの不完全カップリングが各々のサイクルでいつも存在する。これらの実験に使用されたライブラリーは、ヌクレオチドの代わりに、トリヌクレオチド(コドン)をカップリングするTRIM技術を使用して構築されたので、ライブラリーテンプレートDNAはしばしば低いパーセンテージの欠失されたコドンを有している。例えば、TN12ライブラリーの場合、全ライブラリーの約5.3%は、12量体どころか環状11量体であり、そして本当にいくつかのファージ発現11量体が、上記選択過程で単離された(表12参照)。

#### 【0252】

前記の表において、クラスIペプチドはヘパリン不在下でのみKDRを結合し、それ故、たぶんKDRのヘパリン結合ドメインを標的としている;クラスIIペプチドはヘパリンまたはVEGFの存在下または不在下で結合し、それ故、たぶんKDR上の関係しない部位で結合する;クラスIIIペプチドは、ヘパリンには影響されないが、VEGFの存在下では乱される結合特性を示し、それ故、たぶんこれらはVEGFまたはKDRのVEGF結合ドメインを結合する。溶出欄において、1HR、O/N、およびCellは各々、1時間VEGF、一夜VEGF、およびビーズ感染溶出液を表している。ある場合には、特定の単離物配列が2つの異なる溶出液で観察された。二次世代ライブラリーにより同定された単離物では、VEGF溶出がペプチド溶出に置換されている(下記参照)。

#### 【実施例2】

#### 【0253】

ペプチド合成およびフルオレセイン標識

陽性ファージ単離物に相当する、選択されたKDRまたはVEGF/KDR複合体結合ペプチドを、9-フルオレニルメトキシカルボニルプロトコールを使用する固相上で合成し、逆相クロマトグラフィーにより精製した。ペプチド質量はエレクトロスプレー質量分光法により確認し、そしてペプチドは289nmでの吸光度により定量した。合成のため、ペプチドが切り出されたファージベクター配列からの2つのN末端および2つのC末端アミノ酸、は保持され、そして各々のペプチドのC末端へ-Gly-Gly-Gly-Lys-NH<sub>2</sub>リンカー(配列番号262)を付加した。各々のペプチドは、N末端をアセチル化した。選択されたリジン残基を有するペプチドに対しては、C末端リジンへの選択的カップリングを可能にする、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)-3-メチルブチル(ivdde)で保護し、ペプチド切断の間は除去せず、カップリング後、2%ヒドラジンのDMF溶液または0.5Mヒドロキシルアミンの水溶液(pH8)で除去できる。

#### 【0254】

各々のペプチドは、フルオレセイン(N-ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体)またはフルオレセインイソチオシアネート(FITC)の2%ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)含有DMF溶液を使用して、C末端リジンをフルオレセインで標識した。もし、ペプチドがivdde保護リジンを含んでいたら、すべての遊離NH<sub>2</sub>-フルオレセインと反応し、そして内部保護基を除去する、2%ヒドラジンの添加により反応を停止させた。すべての他のペプチドに対しては、等容量の0.5Mヒドロキシルアミン、pH8、の添加により反応を停止させた。停止された反応液は、次にDMFが10%より少なくなるまで水で希釈し、そしてC18逆相クロマトグラフィーを使用して精製した。ペプチドは、LC-MSシステム(ライン内にSCIEX AP150単四重極質量分析計を備えたHP1100 HPLC)で純度および正しい質量を確認した。

#### 【実施例3】

#### 【0255】

蛍光異方性測定およびBiaCoreアッセイ

蛍光異方性測定は、384ウェルマイクロプレート中、10μlの結合緩衝液(PBS、0.01%Tween-20、pH7.5)で、Tecan Polarion蛍光偏光プレートリーダーを使用して実施した。ある場合には、ヘパリン(0.5μg/ml)または10%ヒト血清を結合緩衝液へ加えた(データは示されていない)。蛍光標識ペプ

チドの濃度は一定に保ち(20 nM)、そしてKDR - Fc(または類似の標的)の濃度を変化させた。結合混合液は、測定前に30 で10分間、マイクロプレート中で平衡化した。観察された偏光の変化を、見掛けの $K_D$ を得るため、非線形回帰を経て下記の式に当てはめた。この式(1)は、合成ペプチドおよびKDRが1:1の化学量論で、溶液中で可逆的複合体を形成することを仮定している。

【式1】

【0256】

$$r_{obs} = r_{free} + (r_{bound} - r_{free}) \frac{(K_D + KDR + P) - \sqrt{(K_D + KDR + P)^2 - 4 \cdot KDR \cdot P}}{2 \cdot P}$$

10

【0257】

式中、 $r_{obs}$ は観察された異方性であり、 $r_{free}$ は遊離ペプチドの異方性であり、 $r_{bound}$ は結合されたペプチドの異方性であり、 $K_D$ は見掛けの解離定数であり、 $KDR$ は全KDR濃度であり、および $P$ は全蛍光標識ペプチド濃度である。 $K_D$ は直接結合アッセイで計算し( $K_{D,B}$ )(表8参照)、それ故、これらの値は蛍光標識ペプチドへのKDR結合を表している。

【0258】

KDのBiaCore決定には、KDR - Fc(または他のタンパク質標的)を標準アミンカップリング法により、CM5センサーチップのデキストラン表面へ架橋した(0.5 mg/ml 溶液を50 mM 酢酸塩、pH 6.0、で1:20に希釈、RLKDR - Fc = 12859)。実験はHBS - P緩衝液(0.01 M HEPES、pH 7.4、0.15 M NaCl、0.005%ポリソルベート20(v/v))中で実行した。吸光係数により定量したペプチド溶液を、HBS - Pで400 nMに希釈した。200、100、50および25 nM 溶液を生じるように一連の希釈を行った。会合のためには、kinjectプログラムを使用して、ペプチドを20 µl/分で1分間注入した。1分間の解離に続いて、1 M NaClを50 µl/分で25秒間急速に注入して、残存するペプチドを標的表面から除去した。すべての試料は2重に注入した。各々のペプチド系列の間で、緩衝液および非標的結合ペプチド注入が追加の対照として働いた。センサーグラムは、BIAevaluationソフトウェア3.1の同時 $k_a/k_d$ フィッティングプログラムを使用して分析した。この方法による見掛けの $K_D$ は、表8にBia $K_D$ として示されている。上記蛍光異方性実験と異なり、非標識ペプチドがすべての試験で使用されており、それ故、このアッセイを使用すると、これらの値は非標識ペプチドへのKDR結合を表している。合成されたポリペプチドについて決定された結合親和性は、下記表8に示されている。ポリペプチドの推定されるジスルフィド強要環状ペプチド部分は、下線が引かれている。

20

30

【0259】

【表 8 - 1】

## 合成されたペプチドの結合親和性

配列	$K_{DB}(\mu M)$	$BiaK_D(\mu M)$	配列番号
TN8			
AGDSWCSTEYTYCEMIGTGGGK	>2		263
AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK	0.28	0.027	264
AGVWECAKTFPFCHWFGTGGGK	2.60		265
AGWVECWWKSGQCYEFGTGGGK	1.3		266
AGWLECYAEFGHCYNFGTGGGK	>10		267
AGWIQCNSITGHCTSGGTGGGK	0.24		268
AGWIECYHPDGICYHFGTGGGK	0.32	0.32	269
AGSDWCRVDWYYCWLMGTGGGK	0.064		270
AGANWCEEDWYYCFITGTGGGK	0.310		271
AGANWCEEDWYYCWITGTGGGK	0.097		272
AGPDWCEEDWYYCWITGTGGGK	0.075		273
AGSNWCEEDWYYCYITGTGGGK	0.046		274
AGPDWCAADWYYCYITGTGGGK	0.05		275
AGPEWCEVDWYYCWLLGTGGGK	0.075		276
AGPTWCEEDWYYCWLFGTGGGK	0.0032	0.079	277
AGSKWCEQDWYYCWLLGTGGGK	0.400		278
AGRNWCEEDWYYCFITGTGGGK	0.190		279
AGVNWCEEDWYYCWITGTGGGK	0.260		280
AGANWCEEDWYYCYITGTGGGK	0.180		281
AGQAWVECYAETGYCWPRSWGTTGGGK	0.71		282
AGQAWIECYAEDGYCWPRSWGTTGGGK	1.40		283
AGVGWVECYQSTGFCYHSRDGTGGGK	1.30		284
AGFTWVECHqATGRCVEWTTGTGGGK	2.00		285
AGDWWVECRVGTGLCYRYDTGTGGGK	0.93		286
AGDSWVECDAAQTGFCYSFLYGTGGGK	2.30		287
AGGGWVECYWATGRCIEFAGGTGGGK	NB		288
AGERWVECRAETGFCYTWVSGTGGGK	2.10		289
AGGGWVECRAETGHCQYRLGTGGGK	1.60		290
AGVAWVECYQTTGKCYTFRGGTGGGK	~2		291
AGEGWVECFANTGACFTYPRGTGGGK	2.10		292

10

20

30

【 0 2 6 0 】

【表 8 - 2】

表 8 - 続き

TN12			
GDYPWCHELSDSVTRFCVPWDPGGGK	0.98	0.18	293
GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK	0.069	0.12	294
GDDHMCSPDYQDHVFCMYWDPGGGK	0.48	0.14	295
GDPPLCYFVGTQEWHHCNPFDPGGGK	0.60		296
GDDSYCMNEKGWNCYLDPGGGK	1.3		297
GDPAQCWESNYQGIFFCNDPDPGGGK	2.3		298
GDGSWCEMRQDVGKWCNCFSDDPGGGK	0.62	0.18	299
GDGWACAKWPWGGEICQSPDPGGGK	1.0	1.5	300
GDPDTCTMWGDSGRWYCFPADPGGGK	0.49	0.26	301
GDNWKCEYTQGYDYTECVYLDPPGGGK	0.82		302
GDNWECGWSNMFQKEFCARPDPPGGGK	0.21	0.99	303
GDWWECKREEYRNTTWCWADPPGGGK			486
GDSSVCFEYSWGGEVCFRYDPGGGK	0.058		487
GDSRVCWEYSWGGQICLGYDPGGGK	0.32		488
Lin20			
AQQVQYQFFLGTPRYEQWDLKGGK	1.7		304
AQEPEGYAYWEVITLYHEEDGDDGGK	0.27	0.73	305
AQAFPRFGDDYWIQQYLRYTDGGK	0.53	0.25	306
AQGDYVYWEIIELTGATDHTPPGGK	0.18		307
QRGDYQEYWHQQLVEQLKLLGGK	0.31	5.3	308
AQRSWYLGPPYEEWDPINPGGK	1.8		309
AQDWYDEILSMADQLRHAFLSGGGK		0.05	310
TN9			
AGIDFCCKMAPWLCADMGTGGGK	0.73	0.18	311
AGPWCWLEDHLACAMLGTGGGK	3.9		312
AGDWGCSLGNWYWCSTEGTGGGK	2.0		313
TN10			
GSDHHCYLHNGQWICYFPAPGGGK	0.26	0.15	314
GSNSHCYIWDGMWLCFDPAPGGGK	0.74		315
MTN13			
SGRLDCDKVFSGPYGVKCVSYGSGGGK	1.05		316
SGRLDCDKVFSGPHGKICVNYGSGGGK	~2		317
SGRTTCHHQISGPHGKICVNYGSGGGK	0.65		318
SGAHQCHHWTSGPYGEVCFNYGSGGGK	~2		319

## 【 0 2 6 1 】

KDR / VEGF 複合体へ特異的に結合するペプチドの分析のため、各々のペプチドを上記のような両方のアッセイ（蛍光異方性 / Biacore）で、複合体への結合を試験した。異方性アッセイにおいて、KDR - VEGF 複合体は、2倍モル過剰のVEGFとKDR - Fcと一緒に混合することにより形成させた。この混合物は次に、前に行ったように蛍光標識ペプチドを使用する直接結合滴定で使用した。対照として、各々のペプチドはまたKDRおよびVEGF単独との結合を試験することにより、それらの複合体に対する特異性を試験した。どのペプチドも少しもVEGFと結合しなかったため、アッセイにおける過剰のVEGFの存在は、 $K_D$  決定に影響を与えるはずがない。下記表 9 に示した

10

20

30

40

50

ように、ペプチドすべてが劇的な結合優先性を示した (VEGFよりもKDR/VEGFに対する結合)。しかしながら、それらのいくつかは、いくらかの遊離KDRへの残存性結合を示した。異方性結果を確認するため、非標識ペプチドを前のようにBiacoreで試験した、ただし、ペプチドの注入に先立って、KDR/VEGF複合体を形成させるためにチップをVEGFで飽和した。試験されたペプチドにおいて、BiaK<sub>D</sub>は、異方性測定のおおむね2倍以内であった。

【0262】

【表9】

KDR/VEGF複合体特異的ペプチド

配列番号	配列	K <sub>D</sub> , B (KDR)	K <sub>D</sub> , B (VEGF)	K <sub>D</sub> , B (KDR/VEGF)	BiaK <sub>D</sub> (KDR/VEGF)
320	AGMPWCVEKDHWCWWWGTGGGK	NB	10	0.14	
321	AGPGPCKGYMPHQCWYMGTTGGGK	0.4	NB	0.06	0.08
322	AGYGPCAEMSPWLCWYPTGGGK	3.7	NB	0.13	
323	AGYGPKCNMPPMCMWHEGTGGGK	1.8	NB	0.18	0.42
324	AGGHPCKGMLPHTCWYEGTGGGK	>10	NB	3.3	
325	AQAPAWTFGTNWRSIQRVDSLTTGGGGGK	NB	NB	0.84	
326	AQEGWFRNPQELMGFGDSWDKPGGGGGK	NB	NB	1.4	

推定ジスルフィド-強要環状ペプチド部分は下線が引かれている。

【0263】

(実施例4~10のための方法)

以下の方法を実施例4~10で用いた。以下の共通の略語を使用する：9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC)、N-メチルピロリジノン (NMP)、無水酢酸 (Ac<sub>2</sub>O)、(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)-3-メチルブチル (ivDde)、トリフルオロ酢酸 (TFA)、試薬B (TFA:H<sub>2</sub>O:フェノール:トリイソプロピルシラン 88:5:5:2)、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU)、O-(7-アザ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ェート (HATU)、N-ヒドロキスクシンイミド (NHS)、固相ペプチド合成 (SPPS)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジクロロメタン (DCM)、ジメチルホルムアミド (DMF)、ヒト血清アルブミン (HSA) および放射化学的純度 (RCP)。

【0264】

ACT 357 MPS および ACT 496 MOS 合成機のための方法1

ペプチドは、Fmocペプチド合成プロトコール、特にカップリング剤としてHOBt/DICおよび溶媒としてNMPを用い、Advanced ChemTech ACT 357またはACT 496合成機を使用し、NovaSyn TGR (Rinkアミド)樹脂(0.2ミリモル/g)上で合成した。Fmocは、Nova-Syn TGR (Rinkアミド-NovaBiochem, サンディエゴ CA、から入手可能)樹脂結合ペプチドを25%ピペリジンのDMF溶液で2回(4分および10分)処理することにより除去した。すべてのアミノ酸をNMPに溶解した(アミノ酸が純粋なNMPに溶解しない場合にはDMFを添加した)。アミノ酸の濃度は0.25Mであり、HOBtおよびDICの濃度は各々0.5Mであった。

0.04ミリモル規模の合成のためには：

10

20

30

40

50

典型的アミノ酸カップリングサイクル（洗浄工程を含まない）では、ピペリジン溶液（2.4 mL）を各々のウェルに分配し、そして4分間混合し、次にすべてのウェルを空にした。NMP（320  $\mu$ L）、HOBt溶液（320  $\mu$ L、4当量）、アミノ酸（640  $\mu$ L、4当量）およびDIC（320  $\mu$ L、4当量）溶液を各々のウェルに分配した。カップリング時間は3時間であり；次に樹脂を洗浄した。各々のアミノ酸に対してサイクルを繰り返した。最後のアミノ酸カップリング後、樹脂結合ペプチドを、25%ピペリジンで処理してFmoc保護基を除去した。洗浄後、樹脂結合ペプチドを、1.0M Ac<sub>2</sub>O（ウェル当たり1.2 mL）およびジイソプロピルエチルアミンのDMF溶液（任意にさまざまな量のHOBtを混合物に含んで）で30分キャップ（cap）した。樹脂をメタノールそして次にジクロロメタンで洗浄して乾燥させた。樹脂からのペプチドの切断および側鎖の脱保護は、試薬Bを4.5時間使用して達成した。切断溶液を集め、そして樹脂を追加の試薬Bで洗浄した。合併した溶液は濃縮して乾固した。回旋させながら、または攪拌しながらエーテルを加え、ペプチドを沈殿させた。エーテルをデカントし、固形物を集めた。不純物を除去するため、この操作を2~3回繰り返した。粗直鎖状ペプチドをDMSOおよび水の混合物に溶解し、HPLCで精製した（カラム：Waters Associates Xterra C18, 19x50 mm；溶媒：0.1% TFA含有H<sub>2</sub>Oおよび0.1% TFA含有CH<sub>3</sub>CN；UV 220  $\mu$ m；流速：50~60 mL/分）。ペプチドを含んでいる溶液を凍結乾燥すると、所望のペプチドを白色でふわふわした凍結乾燥物として得た（純度>90%）。精製された直鎖状ジ-システイン含有ペプチドを水、水-アセトニトリル混合物、または水-DMSO混合物に、0.1 mg/mLから2.0 mg/mLの濃度で溶解した。溶媒の選択は、粗ペプチドの溶媒への溶解度に依存した。溶液のpHを、アンモニア水、炭酸アンモニウム水溶液または炭酸水素アンモニウム水溶液でpH 7.5~8.5に調節した。混合物は空气中で24~48時間激しく攪拌した。非DMSO含有溶媒系の場合、溶液のpHをトリフルオロ酢酸水溶液でpH 2へ調節した。混合物を凍結乾燥すると、粗環状ジスルフィド含有ペプチドを与えた。環状ジスルフィドは次に、最少量のアセトニトリル（0.1% TFA）を含んでいる1~2 mL容量の水溶液（0.1% TFA）に溶解した。C18またはC8逆相セミ分取または分取HPLCカラムを使用し、得られた溶液を逆相カラムに加え、そして所望の化合物はアセトニトリル-水の濃度勾配溶離により得られた。DMSO含有溶液の場合、ペプチドが沈殿しない最少のDMSO濃度まで希釈した。得られた混合物は、希トリフルオロ酢酸で迅速にpH 2の酸性とし、そして逆相HPLCシステムへ加え、説明したように精製した。所望の物質を含んでいる分画をプールし、そしてペプチドを凍結乾燥により単離した。

#### 【0265】

ACT 357 MPSおよびACT 496 MOS合成機のための方法2

以下の変更を加え、方法1のようにペプチドを合成した。HBTU/HOBt/DIEAをカップリング試薬として使用し、およびNMPを溶媒として使用した。上記Nova-Syn TGR樹脂から調製された、低負荷（~0.2ミリモル/g）Fmoc-GG GK（Boc）-NovaSyn-TGR-樹脂が0.01ミリモル規模のペプチド合成に用いられた。

0.01ミリモル規模合成に対して：

Fmoc基を除去した後、標準カップリング法は、HOBt（720  $\mu$ L、6当量）、アミノ酸（804  $\mu$ L、6.6当量）、HBTU（720  $\mu$ L、6当量）およびDIEA（798  $\mu$ L、13.3当量）の溶液を使用した。混合物を15分攪拌し、空にし、そして樹脂を洗浄した。すべてのカップリング後、そして上記のようなすべての切断および精製後、所望の直鎖状ペプチドを含んでいる溶液を凍結乾燥すると、ペプチド（純度>90%）を白色でふわふわした固形物として得た。粗エーテル沈殿直鎖状ジ-システイン含有ペプチドは、水、水性アセトニトリル混合液（0.1% TFA）、または水性DMSOに溶解し、アンモニア水、炭酸アンモニウム水溶液または炭酸水素アンモニウム水溶液の添加による溶液pHのpH 7.5~8.5への調整により環化した。ペプチド濃度は0.1

から 2.0 mg/ml であった。混合物を空气中で 24 ~ 48 時間攪拌し、トリフルオロ酢酸水溶液で pH 2 の酸性とし、そして次にアセトニトリル - 水の濃度勾配を用いる分取逆相 HPLC により精製した。所望の物質を含んでいる分画をプールし、そしてペプチドを凍結乾燥により単離した。

【0266】

ACT 496 MOS 合成機のための方法 3

ペプチドは、方法 1 に記載したように、Advanced ChemTech ACT 496 MOS 合成機を使用して合成した。ペプチド合成のために、低負荷 (~ 0.2 ミリモル/g) Fmoc-GGGK(Boc)-NovaSyn-TGR-樹脂を用いた。カップリング溶媒は NMP/DMSO 8:2 であった。合成は 0.02 ミリモル規模で実行し、3 時間のカップリング時間を使用した。粗直鎖状ペプチドは方法 1 で記載したようにさらに処理した。

10

【0267】

ACT 496 MOS 合成機のための方法 4

ペプチドは、カップリング試薬として HBTU/DIEA、および溶媒として NMP を用いる ACT 496 により、方法 3 を使用して合成した。1 M 溶液としての 2, 4, 6 - コリジンを塩基として使用した。ペプチド合成のために、低負荷 Fmoc-GGGK(Boc)-NovaSyn-TGR-樹脂 (~ 0.2 ミリモル/g) を用いた。カップリング時間は 30 分であった。粗直鎖状ペプチドは方法 1 で記載したようにさらに処理した。

20

【0268】

ABI 433A 合成機のための方法 5

ペプチドの合成を、0.25 ミリモル規模で、FastMoc プロトコール (Applied Biosystems Inc) を使用して実施した。このプロトコールの各々のサイクルにおいて、カートリッジ中の 1 ミリモルの乾燥保護アミノ酸は 0.9 ミリモルの HBTU、2 ミリモルの DIEA、および 0.9 ミリモルの HOBt の DMF 溶液に溶解し、追加の NMP を加えた。ペプチドは 0.1 ミリモルの NovaSyn TGR (Link アミド) 樹脂 (樹脂置換 0.2 ミリモル/g) を使用して作製した。このプロトコールにおけるカップリング時間は 21 分であった。Fmoc 脱保護は、20% ピペリジン NMP 溶液で実施した。最後のサイクルの終わりに、合成されたペプチドを、無水酢酸/DIEA/HOBt/NMP を使用してアセチル化した。ペプチド樹脂を洗浄し、さらなる操作または樹脂からの切断 (試薬 B を使用する) のために乾燥した。一般に、切断されたペプチドは、精製前に方法 1 のように環化した。

30

【0269】

方法 6: 樹脂結合ペプチドのピオチニル化

ペプチドは方法 5 を使用して調製した。C 末端リジン上の ivDde 保護基は、10% ヒドラジンの DMF 溶液による処理により選択的に除去した。樹脂は次に、DIEA 存在下、ピオチン-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルの DMF 溶液で処理した。洗浄後、樹脂を乾燥し、そして試薬 B を使用して切断を実施した。樹脂を濾過して除き、濾液を濃縮乾固した。ピオチニル化ペプチドをニート DMSO に溶解し、DIEA で処理し、そしてジスルフィド環化を達成するために 4 ~ 6 時間攪拌した。粗混合物は分取 HPLC により精製した。

40

【0270】

典型的な実験においては、200 mg の樹脂結合ペプチドを 10% ヒドラジンの DMF 溶液で処理し (2 x 20 mL)、そして DMF (2 x 20 mL)、次にジクロロメタン (1 x 20 mL) で洗浄した。樹脂を DMF (10 mL) に再懸濁し、そしてピオチン-NHS エステル溶液 (0.2 ミリモル、5 当量) および DIEA (0.2 ミリモル) で処理し、次に、樹脂を試薬と 4 時間混合した。反応の完了はニンヒドリン試験により検査した。ペプチドは次に、試薬 B (10 mL) による 4 時間の処理により樹脂から放出させた。樹脂を濾過して除き、試薬 B を真空下で除去し、そして無水エーテルの添加によりペプチ

50

ドを沈殿させた。形成された固形物を集め、エーテルで洗浄して乾燥した。固形物は無水DMSOに溶解し、混合物をDIEAでpH7.5に調整し、ジスルフィド環化を達成するために4~6時間攪拌した。ジスルフィド環化反応は、分析用HPLCでモニターした。環化完了後、混合物溶液を25%アセトニトリル含有水溶液で希釈し、そして、アセトニトリル-水(両方とも0.1%TFAを含んでいる)の濃度勾配を使用し、逆相C18カラムでのHPLCにより直接精製した。分画を分析用HPLCで分析し、純粋な生成物を含んでいる分画を集め、凍結乾燥すると必要なビオチニル化ペプチドを得た。

#### 【0271】

##### 方法7: 精製ペプチドのビオチニル化

遊離アミノ基を含んでいる精製ペプチド(10mg、方法1~5により製造)を無水DMFまたはDMSO(1ml)に溶解し、ビオチン-NHSエステル(5当量)およびDIEA(5当量)を加えた。反応をHPLCでモニターし、反応完了後(1~2時間)、粗反応混合物を分取用HPLCで直接精製した。分画を分析用HPLCで分析し、純粋な生成物を含んでいる分画を集め、凍結乾燥すると必要なビオチニル化ペプチドを得た。

10

#### 【0272】

##### 方法8: リンカーを含んでいる樹脂結合ペプチドのビオチニル化

典型的な実験において、400mgの樹脂含有ペプチド(ABI 433A合成機を使用して作製、ivdde-保護リジンを含む)を10%ヒドラジンDMF溶液(2x20ml)で処理した。樹脂をDMF(2x20ml)およびDCM(1x20ml)で洗浄した。樹脂をDMF(10ml)に再懸濁し、Fmoc-アミノジオキサオクタン酸(0.4ミリモル)、HOBT(0.4ミリモル)、DIC(0.4ミリモル)、DIEA(0.8ミリモル)で、4時間混合しながら処理した。反応後、樹脂をDMF(2x10ml)およびDCM(1x10ml)で洗浄した。樹脂は次に、20%ピペリジン含有DMF(2x15ml)で各々、10分間処理した。樹脂を洗浄し、Fmoc-ジアミノジオキサオクタン酸とカップリングさせ、Fmoc保護基の除去をもう一度繰り返した。遊離アミノ基を含んでいる、得られた樹脂は、ビオチン-NHSエステル(0.4ミリモル、5当量)およびDIEA(0.4ミリモル、5当量)のDMF溶液中、2時間処理した。ペプチド-樹脂は、前に記載したように洗浄し、そして乾燥した後、試薬B(20ml)で4時間処理した。混合物を濾過し、濾液を濃縮乾固した。残渣をエーテルと攪拌すると固形物を生じ、それを集め、エーテルで洗浄し、そして乾燥した。固形物を無水DMSOに溶解し、DIEAでpHを7.5に調整した。混合物を4~6時間攪拌してジスルフィド環化を達成し、それは分析用HPLCでモニターした。環化完了後、DMSO溶液を25%アセトニトリル含有水溶液で希釈し、逆相C18カラムへ直接応用した。精製はアセトニトリル-水(両方とも0.1%TFAを含んでいる)の濃度勾配を使用して達成した。分画を分析用HPLCで分析し、純粋な生成物を含んでいる分画を集め、凍結乾燥すると必要なビオチニル化ペプチドを得た。

20

30

#### 【0273】

##### 方法9: 5-カルボキシフルオレセイン標識ペプチドの形成

リジンのイプシロン窒素上にivdde保護基を含んでいる、方法5により得られたペプチド-樹脂を、ivdde基を除去するために、ヒドラジンのDMF溶液と混合した(10%ヒドラジン/DMF、2x10ml、10分)。リジンのイプシロン窒素は、フルオレセイン-5-イソチオシアネート(0.12ミリモル)およびジイソプロピルエチルアミン(0.12ミリモル)のDMF溶液で標識した。混合物は12時間、激しく攪拌した(フルオレセイン含有化合物は光から保護した)。樹脂は次にDMF((3x1ml)および2回、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10ml)で洗浄し、窒素下で1時間乾燥した。試薬Bを4時間使用して、ペプチドを樹脂から切断し、溶液を濾過して集めた。揮発分を減圧下で除去し、残渣を真空下で乾燥した。ペプチドをエーテルで沈殿させ、集め、そして沈殿を窒素気流下で乾燥した。沈殿を水に加え(1mg/ml)、混合物のpHを、10%メグルミン水溶液で8に調整した。ペプチドの環化を48時間実施し、溶液を凍結乾燥した。粗環状ペプチドを水に溶解し、水からアセトニトリル(両方の相とも0.1%TFAを含む

40

50

)への直線濃度勾配を用いた、C18カラムでのRP-HPLCにより精製した。純粋な生成物を含んでいる分画を集め、凍結乾燥した。ペプチドはES-MSで確認し、および純度はRP-HPLC(水からアセトリトリルへの直線濃度勾配/0.1%TFA)により決定した。

#### 【0274】

方法10:単一アミノ酸のカップリングによる、Tcへの結合のためのペプチド性キレート製造

ペプチドは0.1ミリモルのNovaSyn-TGR樹脂(0.2ミリモル/g置換)から出発して合成した。脱保護(ivdde)樹脂は次にFmoc-Gly-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OHおよびFmoc-Ser(tBu)-OHの取り込みのためのプロトコールAに従って処理した。

単一アミノ酸のマニュアルカップリングのためのプロトコールA:

1. 4当量の相当するFmocアミノ酸および4.1当量のHOBTおよび4.1当量のDICで5時間処理
2. DMFで洗浄(3×10ml)
3. 20%ピペリジンのDMF溶液で処理(2×10mL、10分)
4. DMFで洗浄(3×10mL)

Fmoc保護ペプチド添加樹脂は次に、20%ピペリジンのDMF溶液(2×10mL、10分)で処理し、DMFで洗浄した(3×10mL)。N,N-ジメチルグリシン(0.11ミリモル)、HATU(1ミリモル)およびDIEA(0.11ミリモル)のDMF溶液(10mL)をFmoc保護ペプチド添加樹脂に加え、マニュアルカップリングを5時間続けた。反応後、樹脂をDMF(3×10mL)およびCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3×10mL)で洗浄し、真空下で乾燥した。

#### 【0275】

方法11:S-アセチルチオグリコール酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを使用するメルカプトアセチル化ペプチドの形成

S-アセチルチオグリコール酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SATA)(0.0055ミリモル)をペプチド(0.005ミリモル、遊離アミンを有し、方法1~5で得られた)のDMF溶液(0.25mL)へ加え、反応混合物は室温で6時間撹拌した。真空下で揮発分を除去し、残渣は0.1%TFA含有アセトリトリル-水を使用する分取HPLCにより精製した。純粋な生成物を含んでいる分画を集め、凍結乾燥するとメルカプトアセチル化ペプチドを得た。メルカプトアセチル化ペプチドはESI-MSで確認し、および純度は水からアセトリトリル(両方とも0.1%TFAを含んでいる)への直線濃度勾配を用いる逆相HPLC分析により決定した。

#### 【0276】

方法12:S-アセチルチオグリコール酸を使用するメルカプトアセチル化ペプチドの形成

ジスルフィド環化後、方法5からの精製ペプチドを、NMP中で、S-アセチルチオグリコール酸(1.5~10当量)/HOBT(1.5~10当量)/DIC(1.5~10当量)と、室温で2~16時間結合させた。混合物は次に、分取HPLCにより精製した;純粋なペプチドを含んでいる分画を合併し、凍結乾燥した。ivdde基により保護された別のリジンを含む化合物の場合、脱保護反応は、2%ヒドラジンDMF溶液との、室温で3時間の反応を用いた。反応混合物の精製により純粋なペプチドを得た。

#### 【0277】

S-アセチルチオグリコール酸が2つのアミノジオキサオクタン酸基およびペプチドへ結合した化合物を製造する場合、方法5からの精製ペプチド(遊離アミノ基を有する)は、NMP中で、AcSCH<sub>2</sub>CO-(NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CO)<sub>2</sub>-OH(30当量)/HOBT(30当量)/DIC(30当量)と、室温で40時間結合させた。混合物を精製し、そしてivdde基を除去した。第二の精製後、最終生成物を白色凍結乾燥物として得た。

10

20

30

40

50

## 【0278】

もしくは、Fmocアミノジオキサオクタン酸を2度連続してペプチド(方法5により製造)へ結合させ、続いてFmoc除去およびS-アセチルチオグリコール酸へのカップリングを行った。

## 【0279】

方法13: ホモおよびヘテロ二量体の製造

必要とされる精製ペプチドは、方法5を使用してSPPSにより製造した。ホモ二量体を製造するには、二量体の製造に必要とされるペプチドの半分をDMFに溶解し、10当量のグルタル酸ビスN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルで処理した。反応の進行はHPLC分析および質量分析法によりモニターした。反応完了時、揮発分を真空下で除去し、未反応のビス-NHSエステルを除去するため、残渣を酢酸エチルで洗浄した。残渣を乾燥し、無水DMFに再溶解して、2当量のDIEA存在下、ペプチドの残りの半分で処理した。反応を24時間進行させた。この混合物は直接、Waters Associates C-18 XTerra逆相HPLCカラムへ応用し、水からアセトリトリル(両方とも0.1% TFAを含んでいる)への直線濃度勾配での溶出により精製した。

10

## 【0280】

ヘテロ二量体の場合、単量体の一つをグルタル酸のビスNHSエステルと反応させ、過剰のビスNHSエステルを洗い流した後、DIEA存在下、第二のペプチドを加えた。反応後、混合物は分取HPLCにより精製した。

## 【実施例4】

20

## 【0281】

KDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドの製造

上に示した方法を利用し、表10に示したKDRおよびVEGF/KDR複合体結合ポリペプチドのビオチニル化体を製造した。ペプチド配列中の文字「J」はスペーサーまたはリンカー基、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタノイル、を指示している。

## 【0282】

KDRへ結合するビオチニル化ポリペプチド(JJスペーサーを有する)の能力は、実施例5に示したアッセイを使用して評価した。数個のビオチニル化ペプチドは、KDR発現細胞へよく結合した: 配列番号356( $K_D = 1.81 \text{ nM} \pm 0.27$ )、配列番号264( $K_D = 14.87 \pm 5.0 \text{ nM}$ 、4回の実験の平均)、配列番号294+スペーサー( $K_D = 10.00 \pm 2.36 \text{ nM}$ 、4回の実験の平均)、配列番号301( $K_D = 4.03 \pm 0.86 \text{ nM}$ 、3回の実験の平均)、配列番号337( $K_D = 6.94 \pm 1.94 \text{ nM}$ 、1回の実験)、および配列番号338( $K_D = 3.02 \pm 0.75 \text{ nM}$ 、1回の実験)。

30

## 【0283】

【表 10 - 1】

## KDR、VEGF/KDR複合体結合ポリペプチド

配列番号	構造 (または) 配列	Mol. Wt	MS
294	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	28.01.98	1399.6[M-H] <sup>-</sup>
329	Ac-AGMPWCVEKDHWCWWGTGGGK-NH <sub>2</sub>	2730.14	—
311	Ac-AGIDFCCKGMAPWLCADMTGGGK-NH <sub>2</sub>	2324.02	—
264	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK-NH <sub>2</sub>	2361	—
266	Ac-AGWVECWKSGQCCEYFETGGGK-NH <sub>2</sub>	2474.06	—
330	Ac-AQEGWFRNPQIEIMFGDSDWKPGGGK-NH <sub>2</sub>	2934.35	—
299	Ac-GDGSWCEMRQDVGK (iv-Dde) WNCFSDDP-GGGK-NH <sub>2</sub>	3075.29	1537.5[M <sup>2-</sup> ]
299	Ac-GDGSWCEMRQDVGKWNCFSDDPGGGK-NH <sub>2</sub>	2869.16	—
303	Ac-GDNWECGWSNMFQK (iv-Dde) EFCARPDP-GGGK-NH <sub>2</sub>	3160.36	1579.6[M <sup>2-</sup> ]
303	Ac-GDNWECGWSNMFQKEFCARPDPGGGK-NH <sub>2</sub>	2954.23	—
294	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (t <sup>+</sup> オチン)-NH <sub>2</sub>	3030.29	1512.4[M <sup>2-</sup> ]
331	Ac-AQRGDYQEYWHQQLVEQLK (iv-Dde) LLGGGK-NH <sub>2</sub>	3318.71	1659.1[M <sup>2-</sup> ]
331	Ac-AQRGDYQEYWHQQLVEQLKLLGGGK-NH <sub>2</sub>	3112.58	—
332	Ac-AGWYWCYYGIGCK (iv-Dde) WTGGGK-NH <sub>2</sub>	2673.18	—
333	Ac-AGWYWCYYGIGCKWTGGGK-NH <sub>2</sub>	2467.05	—
334	Ac-AQWYDWFHNQRKPPSDWIDNLGGGK-NH <sub>2</sub>	3218.51	—
323	Ac-AGYGPCKNMPWMCWHEGTGGGK-NH <sub>2</sub>	2502.05	—
335	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (N, N-Dimethyl-Gly-Ser-Cys (Acm)-Gly)-NH <sub>2</sub>	2836.204	2833.4[M-H] <sup>-</sup>
264	Ac-AGPK (iv-Dde) WCEEDWYYCMITGTGGGK-NH <sub>2</sub>	2698.11	2695.7 [M-H] <sup>-</sup> ; 1347.8 [M-2H] <sup>2-/2</sup>
336	Ac-WQPCPWESWTFCWDPGGGK (AcSCH <sub>2</sub> C(=O)-)-NH <sub>2</sub>	2422.71	2420.7[M-H] <sup>-</sup> ; 1209.9 [M-2H] <sup>2-/2</sup>
264	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (t <sup>+</sup> オチン)-NH <sub>2</sub>	2718.13	2833.4 (M-H) <sup>-</sup>
264	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (t <sup>+</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3008.44	1502.6.4 (M-2H) <sup>2-/2</sup>
264	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (AcSCH <sub>2</sub> C(=O)-)-NH <sub>2</sub>	2608.96	1304, [M-2H] <sup>2-/2</sup>
294	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (t <sup>+</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3316.4	1657.8, [M-2H] <sup>2-/2</sup>
294	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (AcSCH <sub>2</sub> C(=O)-)-NH <sub>2</sub>	2917.15	1457.4, [M-2H] <sup>2-/2</sup>
294	t <sup>+</sup> オチン-JJGDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	3272.34	1636.7, [M-2H] <sup>2-/2</sup>
264	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (AcSCH <sub>2</sub> C(=O)-JJ)-NH <sub>2</sub>	2899.28	1449.2, [M-2H] <sup>2-/2</sup>

【 0 2 8 4 】

【表 10 - 2】

表 10 続き

277	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3066.27	1532.8, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
337	Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	2903.24	1449.3, [M-2H] <sup>2-</sup> /2; 965.8, [M-3H] <sup>3-</sup> /3	
338	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3042.44	1519.7, [M-2H] <sup>2-</sup> /2-; 1012.8[M-3H] <sup>3-</sup> /3	
294	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (AcSCH <sub>2</sub> C=O)-JJ)-NH <sub>2</sub>	3208.48	1602.6, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
339	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(N, N- -Gly-Ser-Cys(Acm)-Gly-JJ)-NH <sub>2</sub>	3242.33	1621.5[M-2H] <sup>2-</sup> /2	10
277	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (AcSCH <sub>2</sub> C=O)-JJ)-NH <sub>2</sub>	2907.29	1453.1, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
340	Ac-AQAHPWPWPVAVDALFDWVEGG- GGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3404.64	1701.6, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
341	Ac-AQAHPWPWPVAVDALFDWVEGG- GGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3493.59	1746.2, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
342	Ac-AQAHPWPWPVAVDALFDWVEGG- GGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3487.64	1743.2, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
343	Ac-AQDWYREWMPMHAQFLADDWGG- GGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3751.64	1874.3, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	20
344	Ac-AQK(ivDde)K(iv-Dde)EDAQQWYWDYVPSY- LYRGGGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	4220.06	2108.9, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
345	Ac-AQPVDWTPHHPK(iv-Dde)APDVWLFYT- GGGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3781.86	1890.4, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
346	Ac-AQDALEAPK(iv-Dde)RDWYDWFNLHSP- GGGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3897.85	1948.0, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
347	Ac-KWCEEDWYYCMITGTGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	2781.2	1390.0, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
348	Ac-AGPKWCEEDWYYCMIGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	2747.15	1373.5, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
349	Ac-KWCEEDWYYCMIGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	2522.04	1260.8, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
350	Ac-AQPDNWK(iv-Dde)EFYESGWK(iv-Dde)- YPSLYK(iv-Dde)PLGGGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	4377.2	2188.4, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	30
351	Ac-AQMPPGFSYWEQVVLHDDAQLVGG- GGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3499.7	1749.2, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
352	Ac-AQARMGDDWEEAPPHEWGWADGG- GGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3480.5	1740.2, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
353	Ac-AQPEDSEAWYWLNYRPTMFHQLGG- GGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3751.7	1875.8, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
354	Ac-AQSTNGDSFVYWELEVELVDHPGG- GGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	3554.6	1776.4, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	
355	Ac-AQWESDYWDQMRQLK(iv-Dde)TAYMK(iv- Dde)VGGGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	4187.02	2093.0, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	40
356	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK(ヒ <sup>*</sup> オチン- JJ)-NH <sub>2</sub>	3641.69	1820.9, [M-2H] <sup>2-</sup> /2	

推定ジスルフィド強要環状ペプチドは下線により示されている。

## 【実施例 5】

## 【0285】

KDRトランスフェクト293H細胞へのKDR結合ペプチド/アビジンHRP複合体の結合

ファージディスプレイにより同定されたペプチドの、一過性にトランスフェクトされた293H細胞で発現されたKDRへの結合を決定するため、トランスフェクトされた細胞

表面上のKDRへの、ニュートラアビジンHRPと複合体形成したビオチニル化ペプチドの結合を測定する、新規アッセイを開発した。このアッセイは、実施例4で示したビオチニル化ペプチドをスクリーニングするために使用した。ニュートラアビジンHRPは、レクチン結合炭化水素部分が存在しないため、およびまた、ニュートラアビジン中に細胞接着レセプター-結合RYDドメインが存在しないため、ビオチン以外の分子への非特異的結合がより低いので、ストレプトアビジンまたはアビジンの代わりに使用した。

#### 【0286】

本明細書に記載した実験において、KDR結合ペプチド配列番号294、配列番号264、配列番号277および配列番号356、およびKDRへ結合しない対照ペプチドの四量複合体を合成し、KDRで一過性にトランスフェクトされた293H細胞へ結合するそれらの能力を試験した。KDR結合ペプチドの四量複合体4つすべてがビオチニル化されており、JJスペーサーを含んでおり、KDR発現細胞へ結合した；しかしながら、配列番号356が最もよい $K_D$  ( $1.81\text{ nM}$ )を示した。KDR結合ペプチド配列番号294、配列番号264の四量複合体は、同じペプチドの単量体よりも改良された結合を示した。さらに、KDR結合ペプチドとビオチン間のスペーサーの包含は、実験Bにおいて改良された結合が示された。

10

#### 【0287】

実験Cにおいて、このアッセイは、KDRおよびVEGF/KDR複合体への本発明のペプチドの結合における血清の影響を評価するために、使用することができることが示された。配列番号264、配列番号294および配列番号356の結合は、血清存在下でも有意に影響されなかったが、一方、配列番号277の結合は、血清存在下で50%より多く減少した。

20

#### 【0288】

実験Dにおいて、1つより多いKDRおよびVEGF/KDR複合体結合ペプチドを含む多量体標的指向化構築物における使用のため、異なった組合わせのKDRおよびVEGF/KDR複合体結合ペプチドを評価する際に、このアッセイが有用であることが示されている。さらに、実験DおよびEは、異なったエピトープへ結合する、2つまたはそれより多くのKDR結合ペプチドを含んでいる四量体構築物は、標的指向化ペプチド単独の「純粋な」四量体構築物より優れた結合を示したことを確認した。

30

#### 【0289】

##### 実験A

m-RNA & 5' RACEの準備ができたcDNAライブラリーの調製

HUVEC細胞を、175cm<sup>2</sup>組織培養フラスコ(Becton Dickinson, Biocoat, カタログ番号6478)中でほとんど80%コンフルエントまで増殖し、KDRの発現を誘導するため、10ng/mlのbFGF(Oncogene, カタログ番号PF003)を24時間加えた。mRNAはInvitrogenからのマイクロ-ファーストトラック2.0キット(カタログ番号K1520-02)を使用して単離した。キット使用説明書に従って、2つのフラスコ(約3000万細胞)から12μgのmRNA(260nmの吸光度で測定)を得た。cDNAを発生させるための逆転写を、モロニー Maus 白血病ウイルス(NMLV)逆転写酵素を使用し、2μgのmRNA、オリゴdTプライマー(5'(T)<sub>25</sub>GC-3')および/またはスマートIIオリゴ(5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3')で実施した。反応は、20μlの総容量で実施し、反応混合物は2μlのRNA、1μlのオリゴdTプライマー、4μlの5×第一鎖緩衝液(250mMトリスHCl pH8.3、375mM KCl、30mM MgCl<sub>2</sub>)、1μlのDTT(20mM、逆転写酵素とともに供給される)、1μlのdNTP混合物(10mM、dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPの各々をddH<sub>2</sub>Oに、Stratagene, カタログ番号200415)、9μlのddH<sub>2</sub>Oおよび1μlのMMLV逆転写酵素(Clontech, カタログ番号8460-1)を含んでいた。逆転写反応は、42°Cで90分実施し、250μlのトリシン-EDTA緩衝液(10mMトリシン、1.0mM EDTA

40

50

)の添加により反応を停止させた。逆転写生成物、5' RACEの準備ができたcDNAライブラリー、は-20℃で3ヶ月保存することができる。DNAおよびRNA処理に使用したすべての水は、USB(カタログ番号70783)からのDNAaseおよびRNAaseを含まない水であったことに注意されたい。

#### 【0290】

TOPOIIベクター内へのs-KDRのクローニング

s-KDRをクローン化するため、5'オリゴ(G A T G G A G A G C A A G G T G C T G C T G G)(配列番号358)および3'オリゴ(C C A A G T T C G T C T T T T C C T G G G C A)(配列番号359)を使用した。これらは、pfuポリメラーゼ(Stratagene,カタログ番号600135)によるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用する、5' RACEの準備ができたcDNAライブラリー(上記)からKDR完全細胞外ドメイン(~2.2kbp)を増幅するために設計した。PCR反応は50μlの総容量であり、反応混合物は、2μlの5' RACEの準備ができたcDNAライブラリー、1μlの5'オリゴ(10μM)、1μlの3'オリゴ(10μM)、pfu酵素に加えて1% DMSOおよび8%グリセロールを補給した5μlの10×PCR緩衝液(200mM トリス-HCl pH8.8、20mM MgSO<sub>4</sub>、100mM KCl、100mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、1μlのdNTP混合物(10mM)および40μlのddH<sub>2</sub>Oを含んでいた。PCR反応は94℃で1分、68℃で1分および72℃で4分の40サイクルにセットされたプログラムを使用することにより実行した。PCR生成物は、1容量のフェノールでの抽出、続いての1容量のクロロホルムでの抽出、そして3容量のエタノールおよび1/10容量の3M酢酸ナトリウムでの沈殿により精製した。PCR生成物は17μlのddH<sub>2</sub>Oに再懸濁し、生成物の各々の末端にAオーバーハングを発生させるため、2μlの10×Taqポリメラーゼ緩衝液(100mM トリス-HCl pH8.8、500mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>、0.01%ゼラチン)および1μlのTaqポリメラーゼ(Stratagene,カタログ番号600131)を加えた。72℃で1時間インキュベート後、修飾された生成物を、製造業者のプロトコールに従って、TOPOIIベクター(In Vitrogen, カールスバット, CA)内へ直接クローン化すると、TOPO-sKDRを得た。Taq(PCR酵素)処理PCR生成物のA-オーバーハングのため、TOPOベクターはPCR生成物の容易なクローニングを可能にしている。

#### 【0291】

TOPOIIベクター内へのKDRの膜貫通および細胞質ドメインのクローニング

KDRの膜貫通および細胞質ドメインをクローン化するため、5'オリゴ(T C C C C C G G G A T C A T T A T T C T A G T A G G C A C G G C G G G T G)(配列番号360)および3'オリゴ(C A G G A G G A G A G C T C A G T G T G G T C)(配列番号361)を使用した。これらは、pfuポリメラーゼによるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用する、5' RACEの準備ができたcDNAライブラリー(上記)からKDRの完全膜貫通および細胞質ドメイン(~1.8kbp)を増幅するために設計した。PCR反応条件およびプログラムは上記s-KDRで記載したものと全く同一であった。s-KDR配列と全く同じように、PCR生成物はフェノールクロロホルム抽出を使用して精製し、Taqポリメラーゼで処理し、そしてIn VitrogenからのTOPOIIベクター内へクローン化すると、TOPO-CYT Oを得た。

#### 【0292】

pcDNA6ベクター内への完全長KDRのクローニング

完全長レセプターを作製するため、細胞外および細胞質ドメイン(膜貫通ドメインを含んで)を別々に、各々のTOPO-sKDRおよびTOPO-CYT Oから、PCRにより増幅し、後でライゲートして完全長レセプターを作製した。細胞外ドメインの5'末端にNotI部位を有するオリゴ(A T A A G A A T G C G G C C G C A G G A T G G A G A G C A A G G T G C T G C T G G)(配列番号362)

および細胞外ドメインの3'末端に相補的なオリゴ(TTC CAA GTT CGT CTT TTC CTG GGC ACC)(配列番号363)を、TOPO-sKDRからの細胞外ドメインのPCRによる増幅に使用した。同様に、5'オリゴ(ATC ATT ATT CTA GTA GGC ACG GCG GTG)(配列番号364)および、NotI部位を有する3'オリゴ(A TAA GAA TGC GGC CGC AAC AGG AGG AGA GCT CAG TGT GGT C)(配列番号365)を、TOPO-CYTOからの細胞質ドメイン(膜貫通ドメインを有する)のPCRによる増幅に使用した。両方のPCR生成物をNotIで消化し、一緒にライゲートして完全長レセプターを作製した。完全長レセプターをコードするcDNAをアガロースゲルで精製し、pcDNA6/V5-HisCベクターのNotI部位へライゲートした。DNAの精製およびライゲーションは、前にpSKDRのために記載したように行った。ライゲーション反応液はDH5 細菌培養物を形質転換するために使用し、そして多数の個々のクローンは、各々のクローンから精製されたプラスミドのEcoRI酵素による制限分析により、挿入物の存在および配向を分析した。

10

## 【0293】

## 細胞培養

293H細胞はInvitrogen(カタログ番号11631)から得られ、推薦されている培地に1ml/Lのペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen, カタログ番号15140-148)を加えて、単層培養として増殖させた。すべての細胞は、毎日の培養では抗生物質存在下で増殖させたが、トランスフェクション前の16~20時間は、抗生物質を含まない培地に分割した。

20

## 【0294】

## トランスフェクションのためのDNA調製

グリセリン保存物からの、pf-KDRを含んでいる大腸菌DH5 を、50μg/mlアンピシリンを含むLB(LB寒天はUS biologicalsから、カタログ番号75851およびアンピシリンはSigmaから、カタログ番号A2804)プレートに画線し、一夜増殖させるためプレートを37のインキュベーター中に放置した。次の朝、単一コロニーをプレートから突き取り、3mlのLB/アンピシリン培地(US biologicalsからのLB、カタログ番号US75852)中、37で増殖させた。8時間後、3mlチューブから100μlの細菌培地を、250mlのLB/アンピシリン培地へ移し、37で一夜インキュベートした。細菌を、500mlボトル(Beckman, カタログ番号355605)中、220rpmの円を描く攪拌により、Lab-Lineインキュベーター振盪機で増殖させた。次の日、細菌培養物をmaxi-prepキット(QIAGEN, カタログ番号12163)を使用して処理した。一般に、250mlの細菌培養物から、約1mgのプラスミドDNA(260nmでの吸光度により定量した)が得られた。

30

## 【0295】

## 96ウェル中での293H細胞のトランスフェクション

トランスフェクションは、ポリ-D-リジン被覆96ウェルプレートを使用して、リポフェクタミン2000プロトコール(Invitrogen, カタログ番号11668-019)で推薦されているように行った。320ngのKDR DNA(pc-DNA6-fKDR)/ウェル、0.1ml中、を96ウェルトランスフェクションに使用した。トランスフェクションは血清含有培地中で行い、トランスフェクション試薬混合物を6~8時間後に細胞から除去し、通常の血清含有培地に取り替えた。トランスフェクションは、黒/透明96ウェルプレート(Beckton Dickinson, カタログ番号354640)で行った。プレートの左半分をMockトランスフェクトし(DNAなしで)、プレートの右半分をKDR cDNAでトランスフェクトした。細胞は、トランスフェクション時には80~90%コンフルエントであり、アッセイする時間である次の日には完全にコンフルエントであり、さもなければ、アッセイを中止した。

40

## 【0296】

50

## M 1 9 9 培地の調製

アッセイのためのM 1 9 9 培地を調製するため、1つのM 1 9 9 培地小包 ( G I B C O , カタログ番号 3 1 1 0 0 - 0 3 5 )、20 ml の 1 m M H E P E S ( G I B C O , カタログ番号 1 5 6 3 0 - 0 8 0 ) および 2 m g の D I F C O ゼラチン ( D I F C O , カタログ番号 0 1 4 3 - 1 5 - 1 ) を 9 5 0 m l の d d H <sub>2</sub> O に加え、約 4 m l の 1 N N a O H を加えることにより溶液のpHを7.4に調整した。pH調整後、ゼラチンを溶解させるため、M 1 9 9 培地を水浴中、37 で2時間暖め、次に0.2 μ m フィルター ( C o r n i n g , カタログ番号 4 3 1 0 9 ) を使用して濾過滅菌し、後でアッセイに使用するよう4 で保存した。

## 【0297】

Soft Linkソフトリリース ( s o f t r e l e a s e ) アビジン - セファロースの調製

Soft Linkソフトリリースアビジン - セファロースは、Promega ( カタログ番号 V 2 0 1 1 ) から得られたセファロースを、12,000 rpmで2分間遠心分離し、氷冷水で2回洗浄し ( 洗浄の間には遠心分離を行う )、ペレットを冷水に再懸濁してd d H <sub>2</sub> O 中での50%スラリーを作製することにより調製した。新鮮なアビジンの50%スラリーを、各々の実験のたびに調製した。

## 【0298】

ペプチド/ニュートラアビジンHRP溶液の調製

ビオチニル化ペプチド配列番号294、264、277、356および非結合ビオチニル化対照ペプチドを、250 μ M の 5 0 % D M S O 保存溶液を調製するために使用し、およびニュートラアビジン - H R P の 3 3 μ M 保存溶液は、2 m g のニュートラアビジン - H R P ( P i e r c e , カタログ番号 3 1 0 0 1 ) を 1 m l の d d H <sub>2</sub> O に溶解することにより調製した ( すべてのポリペプチドはJ J スペースを含んでいた )。ペプチド保存溶液は - 2 0 で保存し、一方、ニュートラアビジン - H R P 保存溶液は - 8 0 で保存した。ペプチド/ニュートラアビジン - H R P 複合体を調製するため、10 μ l の 2 5 0 μ M ビオチニル化ペプチド保存溶液および10 μ l の 3 3 μ M ニュートラアビジン - H R P を 1 m l の M 1 9 9 培地に加えた。この混合物は4 にて60分、回転板上でインキュベートし、続いて、過剰のペプチドを除去するために50 μ l のソフトリリースアビジン - セファロース ( d d H <sub>2</sub> O 中での50%スラリー ) を加え、さらに4 にて30分、回転板上でインキュベートした。最後に、12,000 rpmで5分間、室温で遠心分離することにより、ソフトリリースアビジン - セファロースをペレット化し、得られた上清をアッセイに使用した。新鮮なペプチド/ニュートラアビジン - H R P 複合体を、各々の実験のたびに調製した。

## 【0299】

アッセイのためのペプチド/ニュートラアビジン - H R P 希釈液の調製

飽和結合実験のため、120 μ l、60 μ l、20 μ l、10 μ l、8 μ l、6 μ l、4 μ l、および1 μ l のペプチド/ニュートラアビジン - H R P 複合体を1.2 ml の M 1 9 9 培地に加えて、各々 3 3 . 3 3 n M、16.65 n M、5.55 n M、2.78 n M、1.67 n M、1.11 n M および 0.28 n M 複体の最終濃度を有する希釈液を作製した。

## 【0300】

トランスフェクトされた293H細胞のためのブロッキング溶液の調製

ブロッキング溶液は、20 ml の M 1 9 9 培地を 1 0 m g の凍結乾燥非標識ニュートラアビジン ( P i e r c e , カタログ番号 3 1 0 0 0 ) に加えることにより調製した。新鮮なブロッキング溶液を、各々の実験のたびに調製した。

## 【0301】

ペプチド/ニュートラアビジン - H R P の結合を検出するためのアッセイ

トランスフェクション24時間後、293H細胞の各々のウェルを1回100 μ l の M 1 9 9 培地で洗浄し、80 μ l のブロッキング溶液と37 でインキュベートした。1時

10

20

30

40

50

間後、細胞を100  $\mu$ lのM199培地で2回洗浄し、70  $\mu$ lの対照ペプチド、配列番号294、配列番号264、配列番号277および配列番号356のペプチド/ニュートラアビジン-HRP希釈液と、室温で2.5時間インキュベートした。各々の希釈液は、偽ならびにKDRトランスフェクト293H細胞(各々の飽和結合実験に2つのプレートを使用した)を含む3つの別々のウェルへ加えた。室温でインキュベーション後、さらに半時間のインキュベーションのため、プレートを4へ移した。続いて、細胞を氷冷M199培地で5回、氷冷PBSで1回洗浄した(この順序で)。最終洗浄後、100  $\mu$ lの氷冷TMB溶液(KPL, カタログ番号50-76-00)を各々のウェルへ加え、各々のプレートを、空気インキュベーター中、37でインキュベートした。最後に、HRP酵素反応を、50  $\mu$ lの1Nリン酸を各々のウェルへ加えることにより停止させ、マイクロプレートリーダー(BioRad モデル3550)を使用して450nmでの吸光度を測定することにより、結合を定量した。

10

### 【0302】

KDR-トランスフェクト細胞へのペプチド/ニュートラアビジン-HRPの結合

このアッセイにおいて、対照ペプチド、配列番号294、配列番号264、配列番号277および配列番号356ペプチド(各々がビオチニル化され、JJスペーサーを有し、およびニュートラアビジン-HRPとコンジュゲートされている)は上記のように調製し、KDRで一過性にトランスフェクトされた293H細胞へ結合するそれらの能力を試験した。ペプチド/ニュートラアビジン複合体調製の間、ニュートラアビジンの4つのビオチン結合部位すべてが占有されることを確実にするため、ニュートラアビジン-HRPに対して7.5倍過剰のビオチニル化ペプチドを使用した。複合体形成後、遊離ビオチニル化ペプチドとニュートラアビジン-HRP-複合体形成ビオチニル化ペプチド間のどんな競合も避けるため、過剰の遊離ビオチニル化ペプチドはソフトリリースアビジン-セファロースを使用して除去した。配列番号264および配列番号294の飽和結合曲線(図1A)を作成するため0.28 nMから33.33 nM、配列番号277および配列番号356の飽和結合曲線(図1B)を作成するため0.28 nMから5.55 nM、のいくつかの異なったペプチド/ニュートラアビジン-HRP濃度で実験を実施した。飽和結合曲線を描くため、試験された各々の濃度での、各々の異なったペプチド/ニュートラアビジン-HRP複合体のKDRトランスフェクト細胞への結合から、Mockトランスフェクト細胞へのバックグラウンド結合を差し引いた。それ故、図1(下記)Y軸の吸光度は、差吸光度(KDRから偽を差し引いた)であり、絶対吸光度ではない。Graph Pad Prismソフトウェア(バージョン3.0)を使用する、図1の飽和結合データの分析から、四量体配列番号294ペプチド複合体に対して10.00 nM( $\pm$ 2.36)、四量体配列番号264に対して14.87 nM( $\pm$ 5.066)、四量体配列番号277に対して4.031 nM( $\pm$ 0.86)、および四量体配列番号356に対して1.814 nM( $\pm$ 0.27)の $K_D$ を得た。予想されるように、これらの結合定数は、関連する単座ペプチド配列番号294(69 nM)、配列番号264(280 nM)、配列番号310(51 nM)のKDRFcに対して、FPにより測定されたものよりも低かったが、単座ペプチド配列番号277(3 nM)に類似していた。予想されるように、対照(結合剤なし)ペプチド/ニュートラアビジン-HRP複合体に対しては、結合の飽和は観察されなかった。単一濃度実験が、非結合ペプチドからKDR結合ペプチド(配列番号264、295および277)を区別するために使用できることを示すため、単一濃度(5.55 nM)でのペプチド/ニュートラアビジン-HRP複合体の結合(図2)をプロットした。

20

30

40

### 【0303】

#### 実験B

実験Bは、KDR結合配列(配列番号294および264)およびビオチン間のスペーサー(JJ、表10)の必要性を調べるために計画された。この実験においては、スペーサーJJを有するまたは有しないビオチニル化ペプチドを試験し(例えば、JJスペーサーを有するビオチニル化配列番号264、JJスペーサーを有しないビオチニル化配列番

50

号264、スパーサーを有するビオチニル化配列番号294、およびスパーサーを有しないビオチニル化配列番号294)、非KDR結合、ビオチニル化対照ペプチド(スパーサーを有するまたは有しない、前に示したように調製)を対照として使用した。この実験で試験されたすべてのKDR結合配列のペプチド構造は、図3に示されている。

#### 【0304】

この実験は、上記実験Aで示されたように実施したが、ただ、2.78 nMの単一濃度でのみ行われた。

結果：図4に示された結果から、スパーサーが配列番号294および配列番号264の結合を促進したことは明らかである。結合配列およびビオチン間のスパーサーは、複数の機構により、標的分子への結合の促進を助けることができる。第一に、それは、単一アビジン分子への結合後、4つのビオチニル化ペプチド間の立体障害軽減を助けることができる。第二に、それは、単一細胞上の利用可能な複数の結合部位へ到達するために必要とされる、特別な長さを提供できる。

10

#### 【0305】

##### 実験C

実験Cは、配列番号294、264、277および356の結合に対する血清効果を調べるために計画した。この方法において、配列番号294、264、277および356のビオチニル化ペプチド/アビジンHRP複合体を、40%ラット血清存在下または不在下、M199培地中で試験した(実験Aで前に記載したように)。この実験は実験Aで記載したように実施したが、ただ、配列番号294および264に対しては6.66 nM、および配列番号277に対しては3.33 nM、および配列番号356に対しては2.22 nMの単一濃度でのみ行った。ポリペプチドの各々はビオチニル化されており、およびJJスパーサーを有していた。

20

#### 【0306】

結果：図5は、配列番号264、配列番号294および配列番号356の結合は40%ラット血清により有意に影響されなかったのに対して、配列番号277の結合は、40%ラット血清存在下で50%以上低下したことを示している。Tc-キレートを有する、Tc-標識配列番号277の結合においては、40%ラット血清存在下、80%以上の低下が観察された(図27)。Tc-標識配列番号277の結合に対する血清効果は、本明細書に開示されたアビジンHRPアッセイによく似ているので、このアッセイは、KDRへのペプチド(類)の結合に対する血清効果を、迅速に評価するために使用することができる。

30

#### 【0307】

##### 実験D

実験Dは、KDRおよびVEGF/KDR複合体-結合ポリペプチド配列番号294および配列番号264の四量複合体、特に少なくとも2つのKDR結合ポリペプチドを含む構築物の結合を評価するために計画した。KDR結合ペプチドおよび対照結合ペプチドは上記のように調製した。この実験は、実験Aで示したプロトコールを使用して実施したが、以下に示した手順はこの実験に独特のものであった。

#### 【0308】

ペプチド/ニュートラアビジン溶液の調製：ビオチニル化ペプチド配列番号264、294および対照ペプチドの250 μM保存溶液は50%DMSOで調製し、およびニュートラアビジンHRPの33 μM保存溶液は、2 mgのニュートラアビジンHRP(Pierce, カタログ番号31001)を1 mLのddH<sub>2</sub>Oに溶解することにより調製した。ペプチド保存溶液は-20 で保存し、一方、ニュートラアビジン-HRP保存溶液は-80 で保存した。ビオチニル化ペプチドの配列は前に示されている。ペプチド/ニュートラアビジン-HRP複合体を調製するため、5.36 μLの250 μMビオチニル化ペプチド保存溶液(またはペプチド混合物の溶液、アビジンHRP分子数の4倍のペプチド分子を与えるため)および10 μLの33 μMニュートラアビジン-HRPを1 mLのM199培地に加えた。この混合物は4 にて60分、回転板上でインキュベート

40

50

し、続いて、過剰のペプチドを除去するために50  $\mu$ lのソフトリリースアビジン - セファロース (ddH<sub>2</sub>O中での50%スラリー)を加え、さらに4にて30分、回転板上でインキュベートした。最後に、12,000 rpmで5分間、室温で遠心分離することにより、ソフトリリースアビジン - セファロースをペレット化し、得られた上清をアッセイに使用した。新鮮なペプチド/ニュートラアビジン - HRP複合体を、各々の実験のたびに調製した。

#### 【0309】

ペプチド/ニュートラアビジン - HRPの結合を検出するためのアッセイ：トランスフェクション24時間後、293H細胞の各々のウェルを1回100  $\mu$ lのM199培地で洗浄し、80  $\mu$ lのブロッキング溶液と37にてインキュベートした。1時間後、細胞を100  $\mu$ lのM199培地で2回洗浄し、70  $\mu$ lの3.33 nMペプチド(またはペプチド混合物)・ニュートラアビジン HRP溶液(前に調製した保存溶液の10  $\mu$ lを1 mLのM199培地に加えることにより調製)と、室温で2.5時間インキュベートした。各々の希釈液は、偽ならびにKDRトランスフェクト293H細胞を含む3つの別々のウェルへ加えた。室温でインキュベーション後、さらに半時間のインキュベーションのため、プレートを4へ移した。続いて、細胞を氷冷M199培地で5回、氷冷PBSで1回洗浄した(この順序で)。最終洗浄後、100  $\mu$ lの氷冷TMB溶液(KPL, ゲイサーブルグ, MD)を各々のウェルへ加え、各々のプレートを、空気インキュベーター中、37にてインキュベートした。最後に、HRP酵素反応を、50  $\mu$ lの1Nリン酸を各々のウェルへ加えることにより停止させ、マイクロプレートリーダー(BioRad モデル3550)を使用して450 nmでの吸光度を測定することにより、結合を定量した。

#### 【0310】

結果：この実験は、配列番号294および配列番号264はKDRに多量体様式で結合し、および293Hトランスフェクト細胞におけるKDRへの結合のためお互いが協力していることを確認した。KDRに結合しないピオチニル化対照ペプチドを使用した。予想されるように、アビジン - HRPと対照ペプチドの四量複合体はKDR - トランスフェクト細胞への促進された結合を示さなかった。配列番号294および配列番号264の四量複合体は、Mockトランスフェクト細胞よりも、KDR - トランスフェクト細胞へ著しくより良好に結合した(図6参照)。しかしながら、配列番号294四量体は、配列番号264四量体よりもより良好に結合した。もし、四量複合体を形成させるため、使用されたペプチド混合物に対照ペプチドを加えたら、KDR - トランスフェクト細胞への結合は減少した。単量体、二量体および三量体に対する、四量体の特異的結合の比は、四量体、三量体および二量体の特異的結合(KDR - トランスフェクト細胞からMockトランスフェクト細胞への結合を差し引くことにより得られた)を単量体の特異的結合で割ることにより計算した。結果は、KDR - トランスフェクト細胞への結合に対して、配列番号264、294および356の多量体化の協力効果が存在することを示している。

#### 【0311】

##### 【表11】

	四量体	三量体	二量体
配列番号264	45.4	5	4.3
配列番号294*	38.6	7.1	2.7
配列番号277	1	1.1	1.1
配列番号356	16	5.7	2.3

\* 2. 22 nMでの単量体ペプチド結合はゼロであった、それ故、比は5.55 nMでの結合を使用して計算した。

#### 【0312】

25%非結合対照ペプチドと75%配列番号264の混合物は、KDR - トランスフェクト細胞に対して、バックグラウンドと比較して有意には結合せず、アッセイを通してK

D R に結合されたままであるには、配列番号 2 6 4 / アビジン - H R P 複合体にとって多価結合が決定的であることを示している。この現象はまた、配列番号 2 9 4 に対しても当てはまり、四量複合体において、5 0 % のペプチドを対照ペプチドで置換すると、トランスフェクト細胞上の K D R へのほとんどすべての結合が消滅した。

#### 【 0 3 1 3 】

驚くべきことに、5 0 % 対照ペプチドと 2 5 % 配列番号 2 9 4 および 2 5 % 配列番号 2 6 4 から構成されたペプチド混合物は、M o c k トランスフェクト細胞と比較して、K D R - トランスフェクト細胞へきわめてうまく結合し、同一標的分子上の 2 つの部位またはエピトープを標的化することは大きな利点があることを示している。さらに、配列番号 2 9 4 および配列番号 2 6 4 を異なった比 ( 3 : 1、2 : 2 および 1 : 3 ) で含んでいる四量複合体はすべて、両方のペプチドの純粋な四量体よりも、K D R - トランスフェクト細胞へより良好に結合し、単一標的分子上の 2 つの異なった部位の標的化は、単一部位への多量体結合よりも優れているという考えと一致している。これは、多量体が同時に結合するには、十分にお互いが近接している 2 つまたはそれより多くの別々の標的分子に、多量体結合実体が広がっていることを必要とするが、一方、単一標的分子上の 2 つまたはそれより多い異なった部位に結合できる多価結合剤は、多価結合を達成するため、その手の届くところに別の標的分子を発見することには依存しないためであろう。

10

#### 【 0 3 1 4 】

##### 実験 E

実験 E は、配列番号 2 9 4 および配列番号 2 6 4 が K D R 上の異なった部位 ( エピトープ ) へ結合することを確認するために計画した。もし、これらのペプチドが K D R 上の同一の部位へ結合するとしたら、これらはお互いに競合することが可能でなければならない ; しかしながら、もし、これらが異なった部位へ結合するとしたら、これらは競合すべきではない。この実験は、各々のウェルに単一濃度の配列番号 2 6 4 / アビジン H R P 溶液 ( 3 . 3 3 n M ) を加え、スパーサーを有するビオチニル化対照ペプチド、配列番号 2 6 4、および配列番号 2 9 4 ( これらはいずれもアビジンと複合体形成されていない ) の濃度を変化させて ( 0 ~ 2 . 5 μ M ) 加えることにより実施した。

20

#### 【 0 3 1 5 】

結果 : 図 7 から、配列番号 2 6 4 は K D R - トランスフェクト細胞への結合について、配列番号 2 6 4 / アビジン H R P 溶液と競合したのに対し、対照および配列番号 2 9 4 は K D R - トランスフェクト細胞への結合について、配列番号 2 6 4 / アビジン H R P 溶液と競合しなかった。それ故、配列番号 2 6 4 および配列番号 2 9 4 は、K D R 上の異なったおよび相補的な部位へ結合する。

30

#### 【 実施例 6 】

#### 【 0 3 1 6 】

K D R 発現細胞への K D R 結合ペプチド類似物の結合

K D R 結合ポリペプチドの N 末端および C 末端切り詰め物を作製し、切り詰めポリペプチドの K D R 発現細胞への結合について試験した。合成されたポリペプチドは図 8 に示されている。K D R 発現細胞へのポリペプチドの結合は、実施例 3 の手順に従って決定した。

40

#### 【 0 3 1 7 】

すべてのペプチドは前に記載した方法に従って見掛けの K D を決定するため、N 末端をアセチル化およびフルオレセイン化した ( 実施例 3 ) 。結果は、配列番号 2 9 4 ポリペプチドにおいて、ジスルフィド強要ループ外側の C 末端残基が K D R 結合に寄与していることを示している ( 図 8 ) 。

#### 【 実施例 7 】

#### 【 0 3 1 8 】

K D R 発現細胞へ結合する、ファージディスプレイにより同定されたペプチドの能力を確認するためのビーズ結合アッセイ

以下の手順を、K D R 発現細胞へ結合する、K D R 結合ペプチドの能力を評価するため

50

に実施した。この手順においては、配列番号264、337、36および373を含んでいるKDR結合ペプチドを、蛍光ビーズへコンジュゲートし、KDR発現293H細胞へ結合する能力を評価した。実験は、KDR発現部位へ、ビーズのごとき粒子を結合させるため、これらのペプチドが使用できることを示している。結果は、両方のKDR結合配列の結合が、スパーサーの付加により改良されたことを示している。

#### 【0319】

##### プロトコール

抗KDR抗体のビオチニル化：腹水液としての、Sigma (V-9134)からの抗KDRを、Molecular Probes (F-6347)からのキットを使用し、製造業者の説明書に従ってビオチニル化した。

10

#### 【0320】

ペプチド-コンジュゲート蛍光ビーズの調製：各々のビオチニル化ペプチド(上に示したように調製した、50% DMSO)の0.2 mM保存溶液からの0.1 mLを、0.1 mLのニュートラアビジン被覆赤色蛍光微小球(直径2ミクロン、Molecular Probesから注文生産品として)および0.2 mLの50 mM MES (Sigma M-8250)緩衝液、pH 6.0、と、回転板上、室温で1時間インキュベートした。陽性対照として、ビオチニル化抗KDR抗体を、ニュートラアビジン被覆ビーズと上記のようにインキュベートしたが、ペプチド溶液に代わりに0.03 mgのビオチニル化抗体調製物のPBS溶液(Gibco、カタログ番号14190-136)を使用した。ビーズは必要になるまで、1週間までは4 で保存できる。

20

#### 【0321】

結合アッセイ：上記ビーズ調製物から、0.12 mLを、微量遠心管中、2000 rpmで10分、室温で遠心分離した。上清を除去し、0.06 mLのMES、pH 6.0、を加えた。各々のビーズ溶液は次にボルテックスし、水浴中で15分、超音波処理した。1.47 mLのDMEM、1x MEM非必須アミノ酸溶液(NEAA)(GIBCO 11140-050)および40% FBS (Hyclone SH30070.02)を含む高グルコース(GIBCO #11965-084)、へ0.03 mLの超音波処理ビーズ調製液を加えた。Mockトランスフェクトされている293H細胞を列1から6に、そしてKDRトランスフェクト細胞を列7から12に蒔いた96ウェルプレート(実施例5のように)の水気を切り、そして1回DMEM、1x NEAAおよび40% FBSを含む高グルコース、で洗浄した。ビーズ調製液当たり6つのウェルで、各々のウェルに0.1 mLのビーズ溶液を加えた。室温で30分インキュベートした後、プレートを逆にするによりウェルの水気を切り、0.1 mLのCa<sup>++</sup> Mg<sup>++</sup>含有PBS (GIBCO カタログ番号14040-117)で、室温にて5分振盪しながら4回洗浄した。水気を切った後、ウェル当たり0.1 mLのPBSを加えた。プレートは次に、Packard FluoroCount 蛍光計を使用し、励起550 nm / 発光620 nmで読み取った。コンジュゲートされていないニュートラアビジンを陰性対照として使用すると同時に、ビオチニル化抗KDR抗体でコンジュゲートしたビーズをアッセイの陽性対照として使用した。

30

#### 【0322】

ウェル当たりに結合されたビーズの数を計算するため、同一の蛍光ビーズ数を増加させた標準曲線が各々のアッセイプレートに含まれている。標準曲線は、各々のウェルの蛍光強度に基づき、ウェル当たりに結合されたビーズ数を計算するために使用した。

40

#### 【0323】

結果：抗TDPが付着した陽性対照ビーズは、明らかにKDR発現細胞へ優先的に結合されたが、一方、何も付着していないアビジンビーズは両方の細胞型へ結合されなかった(図9)。ビオチニル化配列番号264ビーズは、Mockトランスフェクト細胞よりも有意にはKDRトランスフェクト細胞へ結合されなかったが、ペプチド部分およびビオチン基の間に親水性スパーサーを加えることにより(JJスパーサーを有するビオチニル化配列番号264ビーズ)、Mockトランスフェクト細胞への結合を増加させることなく

50

、KDR細胞への結合が促進された。ビオチニル化配列番号294ビーズは、KDRトランスフェクト細胞へのより強い結合を示し、そして、ペプチド部分およびビオチン分子の間に親水性スペーサーを加えることにより（JJスペーサーを有するビオチニル化配列番号264）、トランスフェクト細胞中のKDRへの特異的結合が著しく改良された。それ故、配列番号264および配列番号294両方のペプチド配列は、ビーズのような粒子をKDR発現部位へ結合するために使用できる。ペプチドおよび粒子への付着に使用された基の間への親水性スペーサーの付加は、ここに評価したペプチド両方の結合を改良するので、新規標的指向化分子でルーチンのように試験されるべきである。

#### 【実施例8】

##### 【0324】

KDRトランスフェクト293H細胞への結合におけるKDR結合ペプチドおよび<sup>125</sup>I-標識VEGFの競合

KDR-結合ポリペプチドは次に、トランスフェクトされた293H細胞により発現されたKDRへの結合において、<sup>125</sup>I-標識VEGFと競合する能力を評価した。結果は、KDR結合ポリペプチド配列番号263（Ac-AGDSWCSTEYTYCEMIGTGK-NH<sub>2</sub>）は<sup>125</sup>I-標識VEGFと有意に競合しなかったが、配列番号294、264および配列番号277は<sup>125</sup>I-標識VEGFと非常によく競合する、<sup>125</sup>I-標識VEGF結合の96.29±2.97%および104.48±2.074%を阻害する、ことを示した。

##### 【0325】

293H細胞のトランスフェクション：293H細胞を、実施例5に記載したプロトコールを使用してトランスフェクトした。トランスフェクションは、黒ノ透明96ウェルプレート（Becton Dickinson, カタログ番号354640）で行った。プレートの左半分をMockトランスフェクトし（DNAなしで）、プレートの右半分をKDR cDNAでトランスフェクトした。細胞は、トランスフェクション時には80~90%コンフルエントであり、アッセイする時間である次の日には完全にコンフルエントであり、さもなければ、アッセイを中止した。

##### 【0326】

M199培地の調製：M199培地は、実施例5に記載したごとく調製した。

ペプチド溶液の調製：ペプチド配列番号294、配列番号263、配列番号264および配列番号277の3mM保存溶液は、上に記載したように、50%DMSOで調製した。

##### 【0327】

アッセイのための<sup>125</sup>I-標識VEGF溶液の調製：凍結乾燥<sup>125</sup>I-標識VEGFの25μCi（Amersham, カタログ番号IM274）を250μlのddH<sub>2</sub>Oで再構築して保存溶液を作製し、それは後に使用するまで-80で保存した。各々のアッセイに対して、上記保存溶液をM199培地に希釈することにより、<sup>125</sup>I-標識VEGFの300pM溶液を新しく作製した。<sup>125</sup>I-標識VEGFの濃度は、その日の材料の比活性に基づいて毎日計算した。

##### 【0328】

300pM<sup>125</sup>I-標識VEGFにおける30μMおよび0.3μMペプチド溶液の調製：各々の96ウェルプレートのため、300pM<sup>125</sup>I-標識VEGFを含む10mlのM199培地を4で調製した。各々のペプチド溶液（3mM、上に記載したように調製した）を、300pM<sup>125</sup>I-標識VEGFを含む300μlのM199培地に1:100および1:10000で希釈して、300pM<sup>125</sup>I-標識VEGFを含んでいる、30μMおよび0.3μMペプチド溶液を調製した。調製したら、この溶液はすぐ使用できるように氷上に保った。300pM<sup>125</sup>I-標識VEGFを含んでいるM199培地でのペプチドの希釈は、各々の実験で新たに行った。

##### 【0329】

293H細胞における<sup>125</sup>I-標識VEGFとの競合を検出するためのアッセイ：細

10

20

30

40

50

胞は、トランスフェクション24時間後に使用し、アッセイのための細胞を調製するため、それらを3回、室温のM199培地で洗浄し、冷蔵庫に入れた。15分後、M199培地をプレートから除き、ポリペプチドを含む75 $\mu$ lの300pM<sup>125</sup>I-標識VEGFのM199培地(上のように調製された)で置き換えた。各々の希釈液は偽およびKDRトランスフェクト細胞を含む3つの別々のウェルへ加えた。4で2時間インキュベートした後、プレートを冷結合緩衝液で5回洗浄し、優しく吸い取って乾燥し、細胞損失を顕微鏡下で検査した。100 $\mu$ lの可溶化溶液(2%トリトンX-100、10%グリセロール、0.1%BSA)を各々のウェルへ加え、プレートを室温で30分インキュベートした。各々のウェル中の可溶化溶液をピペットで吸い上げたり吐き出したりすることにより混合し、そして1.2mlチューブへ移した。各々のウェルを100 $\mu$ lの可溶化溶液で2回洗浄し、洗液を対応する1.2mlチューブへ加えた。各々の1.2mlチューブは、プログラム54(<sup>125</sup>Iウィンドウで1分)を使用するLKBガンマカウンターで計数されるべき15.7 $\times$ 100cmチューブへ移した。

10

20

30

40

50

#### 【0330】

293H細胞におけるペプチドと<sup>125</sup>I-標識VEGFの競合:KDRへの<sup>125</sup>I-標識VEGFを特異的に阻止する、KDR結合ペプチド配列番号294、配列番号263、配列番号264および配列番号277の能力を、MockトランスフェクトおよびKDR-トランスフェクト細胞で評価した。配列番号263は、本明細書で説明したFPアッセイにおいてKDRへの乏しい結合を示し、および、それ故にVEGFと置き換わるまたは競合するとは予想されないの、このアッセイにおいて陰性対照として使用した。KDRへの特異的結合を計算するため、Mockトランスフェクト細胞への<sup>125</sup>I-標識VEGFの結合を、KDR-トランスフェクト細胞から差し引いた。それ故、KDR結合ペプチドによる293H細胞への<sup>125</sup>I-標識VEGF結合の阻害を計算する場合、KDR以外の部位への<sup>125</sup>I-標識VEGFの結合(293H細胞に存在してもよいし、または存在しなくてもよい)は含まれていない。阻害率は、式[(Y1-Y2) $\times$ 100/Y1]、式中、Y1はペプチド不在下でのKDR-トランスフェクト293細胞への特異的結合であり、およびY2はペプチドまたはDMSO存在下でのKDR-トランスフェクト293細胞への特異的結合である、を使用して計算した。KDR-トランスフェクト293細胞への特異的結合は、KDR-トランスフェクト293細胞への結合からMockトランスフェクト細胞への結合を差し引くことにより計算した。

#### 【0331】

図10に示した様に、293細胞において、その比較的高いK<sub>d</sub>(>2 $\mu$ M)のために陰性対照として使用された配列番号263は、<sup>125</sup>I-標識VEGFと有意には競合しなかった、30 $\mu$ Mで12.69 $\pm$ 2.97%および0.3 $\mu$ Mで-5.45 $\pm$ 9.37%(図10)。同時に、配列番号294および277は<sup>125</sup>I-標識VEGFと非常によく競合し、各々、30 $\mu$ Mで<sup>125</sup>I-標識VEGF結合を96.29 $\pm$ 2.97%および104.4 $\pm$ 2.074%、0.3 $\mu$ Mで52.27 $\pm$ 3.78%および80.96 $\pm$ 3.8%阻害した(図10)。配列番号264の阻害率は、30 $\mu$ Mで<sup>125</sup>I-標識VEGF結合の47.95 $\pm$ 5.09%、および0.3 $\mu$ Mで24.41 $\pm$ 8.43%であった(図10)。従って、3つの強力KDR結合ポリペプチドはVEGFと競合せず、それらの有効性はそれらの結合親和性ととも増加した。このアッセイは、KDRへ強固に結合するが、VEGFとは競合しないペプチドを同定するために有用であろうし、それはさもなければKDR-標的化分子の結合を阻止するであろう、VEGFの高い局所濃度がしばしば存在する、腫瘍におけるKDR画像化に有用であることが特色である。

#### 【実施例9】

#### 【0332】

ファージディスプレイにより同定されたペプチドによるVEGF-誘導KDRレセプターの阻害

KDRのVEGF誘導活性化(リン酸化)を阻害する、ファージディスプレイにより同定されたKDR結合ペプチドの能力を、以下のアッセイを使用して評価した。本発明のペ

プチドの多数が、単量体および/または四量体構築物でKDRの活性化を阻害することが示された。上に議論したように、KDRの活性化を阻害するペプチドは、抗血管新生剤として有用である。

### 【0333】

#### プロトコール

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) (B i o w h i t t a k e r カタログ番号 C C - 2 5 1 9) はドライアイスで凍結されて得られ、融解するまで液体窒素中で保存した。これらの細胞は、製造業者により説明されているように、融解し、継代し、そして E G M - M V 培地 (B i o w h i t t a k e r カタログ番号 C C - 3 1 2 5) 中で維持した。細胞を 1 0 0 m m ディッシュに蒔きコンフルエントになるまで放置し、次に血清を欠く基本 E B M 培地 (B i o w h i t t a k e r カタログ番号 C C - 3 1 2 1) で一夜培養した。次の朝、ディッシュ中の培地を、37 °C で、添加物を含まない (陰性対照)、5 n g / m l V E G F (C a l b i o c h e m カタログ番号 6 7 6 4 7 2 または P e p r o t e c h カタログ番号 1 0 0 - 2 0) (陽性対照)、または 5 n g / m l V E G F に指定された濃度の K D R 結合ペプチド (上に説明したように調製した) を加えたもの、を含んでいる 1 0 m l の新鮮な E B M 培地で置き換えた。いくつかの場合、中和抗 K D R 抗体 (カタログ番号 A F 3 5 7, R & D S y s t e m s) を、活性化の陽性対照阻害剤として使用した。そのような場合、V E G F および抗体の両方を含んでいる新鮮培地の添加に先立ち、37 °C で 3 0 分、抗体を試験細胞と前もってインキュベートした。ディッシュを、37 °C の組織培養インキュベーター中で 5 分インキュベートした後、カルシウムおよびマグネシウムを含んでいる氷冷 D - P B S で 3 回洗浄し、最後の 1 0 m l のダルベッコリン酸緩衝化塩溶液 (D - P B S) を除去することなく、氷の上に置いた。第一のディッシュの組を排水し、0 . 5 m l のトリトン溶解緩衝液 (2 0 m M トリス塩基 p H 8 . 0、1 3 7 m M N A C l、1 0 % グリセロール、1 % トリトン X - 1 0 0、2 m M E D T A (エチレンジアミン四酢酸)、1 m M P M S F (フェニルメチルスルホニルフルオリド)、1 m M オルトパナジン酸ナトリウム、1 0 0 m M N a F、5 0 m M ピロリン酸ナトリウム、1 0 μ g / m l ロイペプチン、1 0 μ g / m l アプロチニン) を加えた。細胞スクレーパー (F a l c o n, カタログ番号 3 5 3 0 8 7) を使用して細胞を溶解緩衝液内へ迅速にかきとり、簡単にピペットで吸い上げたり吐き出したりすることにより分散し、得られた溶解物を対となる第二の排水したディッシュに移した。別の 0 . 5 m l の溶解緩衝液を第一のディッシュを洗い流すために使用して第二のディッシュへ移し、それは次にまたかきとりおよび分散させた。2 つのディッシュからプールした溶解物を 1 . 5 m l のエッペンドルフチューブへ移した。上記の手順を各々の対照および試験試料 (K D R 結合ペプチド) に対し同じ時に繰り返した。溶解物は、すべての試料が処理されるまで氷上に保存した。この時点で、試料を - 7 0 °C で保存するか、または中断することなくアッセイの最後まで処理した。

### 【0334】

新しく調製された、または凍結した後に融解した溶解物は、2 0 μ l のプロテイン A - セファロースビーズ (S i g m a 3 3 9 1、D - P B S で前膨潤させ、大過剰の D - P B S で 3 回洗浄し、そして 5 0 % スラリーにするために 6 m l の D - P B S で再構築されている) を加え、4 °C で 3 0 分揺り動かすことにより、前もってきれいにした。ビーズは、P i c o f u g e (S t r a t g e n e, カタログ番号 4 0 0 5 5 0) 中、2 0 0 0 × g で 2 分遠心分離することによりペレット化し、上清を新しい 1 . 5 m l チューブへ移した。2 0 μ g の抗 F l k - 1 抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y, カタログ番号 s c - 5 0 4) を各々のチューブへ加え、K D R を免疫沈降させるため、回転板上、4 °C で一夜 (1 6 ~ 1 8 時間) チューブをインキュベートした。次の日、4 0 μ l のプロテイン A - セファロースビーズをチューブへ加え、それは回転板上、4 °C で 1 時間インキュベートした。各々のチューブ内のビーズは続いて P i c o f u g e 中、2 分遠心分離することにより 3 回洗浄し、上清を捨て、ビーズを新しく加えた 1 m l の T B S T 緩衝液 (2 0 m M トリス塩基 p H 7 . 5、1 3 7 m M N A C l、および 0 . 1 % T

w e e n 2 0 ) に分散させた。遠心分離後、最後の洗浄での液体を除去し、40  $\mu$  l の L a e m m l i S D S - P A G E 試料緩衝液 ( B i o - R a d , カタログ番号 1 6 1 - 0 7 3 7 ) を各々のチューブへ加え、チューブにキャップをかぶせ、5 分間煮沸した。冷却後、各々のチューブ中のビーズは遠心分離することによりペレット化し、免疫沈降した K D R を含んでいる上清を新しいチューブへ移し、直ちに使用するか、または後での分析のため凍結させて - 7 0 で保存した。

**【 0 3 3 5 】**

免疫沈降物中のリン酸化 K D R ならびに総 K D R の検出は、免疫ブロット分析により実施した。各々の免疫沈降物の半分 ( 2 0  $\mu$  L ) を、7 . 5 % プレキャスト R e a d y G e l ( B i o - R a d , カタログ番号 1 6 1 - 1 1 5 4 ) 上、L a e m m l i ( N a t u r e , 2 2 7 : 6 8 0 - 6 8 5 ( 1 9 7 0 ) ) の方法に従って、S D S - P A G E により分離した。

10

**【 0 3 3 6 】**

B i o - R a d m i n i - P r o t e a n 3 装置 ( カタログ番号 1 6 5 - 3 3 0 2 ) を使用し、各々のゲル中の分離されたタンパク質は、M a t s u d a i r a の方法 ( J . B i o l . C h e m . , 2 6 2 : 1 0 0 3 5 - 1 0 0 3 8 ( 1 9 8 7 ) ) に従って、1 4 0 m A で 2 時間、C A P S 緩衝液 ( 1 0 m M C A P S , S i g m a カタログ番号 C - 6 0 7 0 , 1 % A C S グレードメタノール , p H 1 1 . 0 ) 中、B i o - R a d m i n i T r a n s - B l o t c e l l ( カタログ番号 1 7 0 - 3 9 3 0 ) 中の P V D F 膜 ( B i o - R a d , カタログ番号 1 6 2 - 0 1 7 4 ) へエレクトロブロットした。ブロットを、前もって 3 7 に暖めた 5 % B l o t t o - T B S ( P i e r c e カタログ番号 3 7 5 3 0 ) 中、室温で 2 時間ブロックした。ブロットは最初に、0 . 1 % T w e e n 2 0 を加えた 5 % B l o t t o - T B S で 1 : 2 0 0 に希釈した、抗ホスホチロシン抗体 ( T r a n s d u c t i o n L a b s , カタログ番号 P 1 1 1 2 0 ) を用い、室温で 2 時間探索した。非結合抗体を、0 . 1 % T w e e n 2 0 を含んでいる D - P B S ( D - P B S T ) で、1 洗浄当たり 5 分で 4 回、ブロットを洗浄することにより除去した。続いて、ブロットを、0 . 1 % T w e e n 2 0 を加えた 5 % B l o t t o - T B S で 1 : 2 5 , 0 0 0 に希釈した、H R P - コンジュゲートヒツジ抗マウス抗体 ( A m e r s h a m B i o s c i e n c e s カタログ番号 N A 9 3 1 ) を用い、室温で 1 時間探索し、D - P B S T で 4 回洗浄した。最後に、ブロットを 2 m l の化学発光基質 ( E C L P l u s , A m e r s h a m カタログ番号 R P N 2 1 3 2 ) を上に広げて 2 分間インキュベートし、ウェルを水切り排水し、プラスチック - トプロテクター ( C - L i n e P r o d u c t s , カタログ番号 6 2 0 3 8 ) に置き、最適なコントラストを達成するために時間を変えて、X 線フィルム ( K o d a k B i o M a x M L , カタログ番号 1 1 3 9 4 3 5 ) へ暴露した。

20

30

**【 0 3 3 7 】**

同じ量の K D R がアッセイで比較されたことを確認するため、H C l でその p H を 2 . 4 に調整した T B S T 中、3 7 で 3 0 分インキュベートすることによりブロットを剥がし、0 . 1 % T w e e n 2 0 を加えた 5 % B l o t t o - T B S ( B l o t t o - T B S T ) を用いて室温で 1 時間ブロックし、1 % 正常ヤギ血清 ( L i f e T e c h カタログ番号 1 6 2 1 0 0 6 4 ) を含む 5 % B l o t t o - T B S T で 1 : 2 0 0 に希釈した抗 F l k - 1 ポリクローナル抗体 ( S a n t a C r u z B i o t e c h , カタログ番号 S C - 3 1 5 ) を用い、室温で 2 時間、再探索した。非結合抗体を、D - P B S T で、1 洗浄当たり 5 分で 4 回、ブロットを洗浄することにより除去した。続いて、ブロットを、5 % B l o t t o - T B S T で 1 : 1 0 , 0 0 0 に希釈した、H R P - コンジュゲートロバ抗ウサギ二次抗体 ( A m e r s h a m B i o s c i e n c e s カタログ番号 N A 9 3 4 ) を用い、室温で 1 時間探索し、D - P B S T で 4 回洗浄した。最後に、ブロットを 2 m l の化学発光基質とインキュベートし、上記のように X 線フィルムへ暴露した。

40

**【 0 3 3 8 】**

結果：前 V E G F 刺激あり、またはなしの H U V E C から調製された K D R 免疫沈降物

50

の免疫プロットは、H U V E C が V E G F で刺激された場合に、活性化（リン酸化）K D R を検出できたことを示した。抗ホスホチロシン抗体（P Y - 2 0）は、非刺激 H U V E C から、K D R の移動位置に近接するリン酸化タンパク質をプロット上に検出しなかったが、5分のV E G F 刺激後、予想される位置に強いバンドが矛盾なく観察された（図11、上のパネル）。酸性溶液中でのインキュベーションにより、プロットから結合抗体を剥がし、次に抗K D R 抗体（s c - 3 1 5）で再探索した場合、リン酸化バンドの同一性は、K D R であることで確認された。さらに、非刺激 H U V E C からの免疫沈降物は、V E G F - 刺激 H U V E C からの免疫沈降物とほぼ同じの総K D R を含んでいることが確認された（図11、下のパネル）。

【0339】

以上の結果は、検出されたリン酸化K D R は、V E G F 結合により生じたK D R 二量体の自己リン酸化を経て既存のK D R から形成され、K D R のような大きなグリコシル化細胞表面レセプターを合成および加工するには、5分は十分な時間ではないことを示している。

【0340】

K D R の V E G F 活性化を阻止できる試薬を検出するためのこのアッセイの能力は、V E G F と組み合わせて一連の化合物をH U V E C へ加え、上記免疫プロットアッセイでK D R リン酸化を測定することにより評価した。陰性および陽性対照として、試験化合物不在下で、非刺激H U V E C およびV E G F 刺激H U V E C からの免疫沈降物もまたアッセイごとに試験した。中和抗K D R 抗体（R & D S y s t e m s、カタログ番号A F - 3 5 7）をV E G F と併用した場合、K D R リン酸化の程度は非常に減少し（図12、上のパネル）、抗体は、K D R へ結合しおよび活性化するV E G F の能力を妨害できることを示している。V E G F - 誘導D N A 合成を阻止するこの抗体の能力が、抗体の製造業者による品質管理試験の一部であることから、この結果は予想された。抗K D R 抗体でのプロットの再探索は（図12、下のパネル）、V E G F のみで処理したレーンと比較し、V E G F + 抗体 - 処理レーン（+ V + - K D R）中にはわずかに少ない総K D R が存在することを示しているが、この相違は、抗体 - 処理レーン中のリン酸化K D R のより少ない発生量を説明するには十分に大きくない。

【0341】

ファージディスプレイにより同定された直鎖状K D R 結合ペプチド（A F P R F G G D D Y W I Q Q Y L R Y T D、配列番号140）の有効性を評価するため、V E G F 存在下、K D R 結合配列A c - A Q A F P R F G G D D Y W I Q Q Y L R Y T D G G K - N H<sub>2</sub>（配列番号306）を含んでいる合成ペプチドでアッセイを繰り返した。配列番号306はK D R のV E G F - 誘導リン酸化を阻害できた。総K D R のためのプロットの再探索は、V E G F + 配列番号306 - 処理細胞（+ V + 配列番号306）中には、V E G F のみで処理した細胞（+ V）中よりも多くの総K D R が存在することを示した（図13、下のパネル）。それ故、配列番号306存在下でのK D R リン酸化の減少は、試料添加の差によるものではなく、むしろ、K D R のV E G F - 活性化を阻害する、ポリペプチドの能力によるものであることは明らかである。

【0342】

上記アッセイを繰り返すと、下記のポリペプチドは、10 μ M でV E G F - 誘導K D R リン酸化の少なくとも50%の阻害を示した：

A c - A G W I E C Y H P D G I C Y H F G T G G G K - N H<sub>2</sub>（配列番号269）

A c - A G W L E C Y A E F G H C Y N F G T G G G K - N H<sub>2</sub>（配列番号267）

A c - G D S R V C W E D S W G G E V C F R Y D P G G G K - N H<sub>2</sub>（配列番号294）

A c - G D W W E C K ( i v D d e ) R E E Y R N T T W C A W A D P G G G K - N H<sub>2</sub>（ブロックされたKを有する配列番号366）

A c - G D P D T C T M W G D S G R W Y C F P A D P G G G K - N H<sub>2</sub>（配列番号301）

10

20

30

40

50

A c - A Q E P E G Y A Y W E V I T L Y H E E D G D G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 0 5 )

A c - A Q A F P R F G G D D Y W I Q Q Y L R Y T D G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 0 6 )

A c - A Q G D Y V Y W E I I E L T G A T D H T P P G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 0 7 )

配列番号 2 6 9 および 2 9 4 はこのアッセイにおいて最も強力な化合物であり、1 μM で V E G F - 誘導 K D R リン酸化の少なくとも 5 0 % の阻害を生じた。

【 0 3 4 3 】

以下のペプチドが本アッセイで試験されたが、1 0 μM でも K D R 活性化の有意な阻害を生じなかった： 10

A c - A G P K ( i v D d e ) W C E E D W Y Y C M I T G T G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 2 6 4 )

A c - G S D H H C Y L H N G Q W I C Y P F A P G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 1 4 )

A c - G D Y P W C H E L S D S V T R F C V P W D P G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 2 9 3 )

A c - G D D H M C R S P D Y Q D H V F C M Y W D P G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 2 9 5 )

A c - G D P P L C Y F V G T O E W H H C N P F D P G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 2 9 6 ) 20

A c - G D G S W C E M R Q D V G K ( i v D d e ) W N C F S D D P G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 2 9 9 )

A c - A Q R G D Y Q E Q Y W H Q Q L V E Q L K ( i v D d e ) L L G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 3 1 )

A c - G D N W E C G W S N M F O K ( i v D d e ) E F C A R P D P G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 0 3 )

A c - A G P G P C K ( i v D d e ) G Y M P H Q C W Y M G T G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 6 7 )

A c - A G Y G P C A E M S P W L C W Y P G T G G G K - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 2 2 ) 30

加えて、配列番号 2 9 4 および 2 7 7 のビオチニル化誘導体の四量体複合体 ( 前に記載したように調製 ) は、1 0 μM で V E G F - 誘導 K D R リン酸化の少なくとも 5 0 % の阻害を生じた。

【 実施例 1 0 】

【 0 3 4 4 】

K D R - トランスフェクト 2 9 3 H 細胞への T c - 標識配列番号 3 3 9 の結合

K D R へ結合する T c - 標識配列番号 3 3 9 の能力を、K D R - トランスフェクト 2 9 3 H 細胞を使用して評価した。T c - 標識配列番号 2 7 7 ( 即ち、A c - A G P T W C E D D W Y Y C W L F G T - G G G K ( N , N - ジメチル - G l y - S e r - C y s - G l y - ジ ( アミノジオキサオクタ - ) ) - N H <sub>2</sub> ) は、M o c k トランスフェクト 2 9 3 H に対するよりも K D R トランスフェクト細胞へ有意によく結合し、および T c - 標識配列番号 3 3 9 の濃度とともに直線的様式で結合が増加した。 40

【 0 3 4 5 】

S P P S ( 図 3 5 ) による T c への結合のためのペプチドキレートの製造

2 5 0 m L の S P P S 反応容器へ、6 . 6 4 ミリモルの H - G l y - 2 - C l - トリチル樹脂 ( 0 . 8 4 ミリモル / g 、 N o v a b i o c h e m ) を加えた。6 0 m L の D M F で 1 時間膨潤させた。各々のカップリングサイクルに対し、2 6 . 6 ミリモルの D I E A 、2 6 . 6 ミリモルの F m o c - アミノ酸 D M F 溶液 ( E M S c i e n c e ) 、2 6 . 6 ミリモルの H O B T ( N o v a b i o c h e m ) の D M F 溶液、および 2 6 . 6 ミリモルの D I C を樹脂に加えた。反応混合物を 4 時間振盪した。次に樹脂を濾過し、D M F で 50

洗浄した (3 × 80 ml)。20% ピペリジン DMF 溶液 (80 mL) を樹脂へ加え、10分振盪した。樹脂を濾過し、このピペリジン処理を繰り返した。樹脂を最終的に DMF で洗浄 (3 × 80 ml) すると、次のカップリングサイクルの準備が完了する。最後のカップリングサイクルで、HATU/DIEA 活性化を使用して N, N - ジメチルグリシン (Aldrich) を結合させた。それ故、N, N - ジメチルグリシン (26.6 ミリモル) の DMF 懸濁液を、26.6 ミリモルの HATU (Perseptive Biosystems) DMF 溶液および 53.1 ミリモルの DIEA へ加えた。透明な溶液を樹脂へ加え、16 時間振盪した。合成後、樹脂を濾過し、DMF (3 × 80 ml)、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 80 ml) で洗浄して乾燥した。樹脂を 80 mL の AcOH / CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH / DCM (1 / 1 / 8、v / v / v) と混合し、45 分振盪した。樹脂を濾過し、濾液を蒸発させてペーストにした。25% MeOH / DCM を使用するシリカゲルクロマトグラフィーにより粗物質の精製で 2.0 g の最終生成物を得た。

#### 【0346】

ペプチドへのペプチドキレートのカップリング (断片カップリング)

ジソプロピルカルボジイミド (0.0055 ミリモル) を、精製 Me<sub>2</sub>N - Gly - Cys - (Trt) - Ser (tBu) - Gly - OH および ヒドロキシベンゾトリアゾール (0.0055 ミリモル) を DMF (0.25 L) に溶解した混合物へ加え、混合物を室温で 6 時間攪拌した。ペプチド (0.005 ミリモル) の DMF (0.25 mL) 溶液を次に反応混合物へ加え、さらに 6 時間攪拌を続けた。真空下で DMF を除去し、樹脂を試薬 B で処理して 3 時間攪拌した。減圧下で TFA を除去し、0.1% TFA を含んでいるアセトニトリル - 水を使用する分取 HPLC により残渣を精製した。純粋な生成物を含んでいる分画を集め、凍結乾燥するとペプチドを得た。ペプチドは ES - MS で確認し、その純度は RP - HPLC (アセトニトリル - 水 / 0.1% TFA、濃度勾配) により決定した。

#### 【0347】

<sup>99m</sup>Tc 標識配列番号 339 の合成

グルコン酸第一スズ溶液は、2 ml の 20 μg / ml SnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O の窒素置換 1 N HCl 溶液を、13 mg のグルコヘプト酸ナトリウムを含む 1.0 ml の窒素置換水へ加えることにより調製した。4 ml のオートサンプラーバイアルに、50 / 50 エタノール / H<sub>2</sub>O に溶解した 20 ~ 40 μl (20 ~ 40 μg) の配列番号 339 リガンド、6 ~ 12 mCi の <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> の食塩水および 100 μl のグルコヘプト酸第一スズ溶液を加えた。混合物を 100 °C に 22 分加熱した。得られた放射化学的純度 (RCP) は、Vydac C18 ペプチドおよびタンパク質カラムを使用し、66% H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) / 34% ACN (0.085% TFA) で 1 ml / 分の流速で溶出して分析した場合、10 ~ 47% であった。反応混合物は、0.1% TFA 含有水溶液を水相として、および 0.085% TFA 含有アセトニトリル溶液を有機相として使用し、1 ml / 分の流速での Vydac C18 カラム (4.6 mm × 250 mm) を用いる HPLC により精製した。以下の濃度勾配を使用した: 29.5% 有機相で 35 分、5 分以上かけて 85% への勾配をつけ、10 分保つ。<sup>99m</sup>Tc 配列番号 339 は、5 mg / ml アスコルビン酸および 16 mg / ml のヒドロキシプロピル - β - シクロデキストリンを 50 mM リン酸緩衝液に含んでいる 500 μl の安定化緩衝液に集めた。アセトニトリルを除去するため、混合物はスピードバキューム装置を使用して濃縮し、そして 200 μl の 0.1% HSA 含有 50 mM pH 5 のクエン酸緩衝液を加えた。得られた生成物は 100% の RCP を有していた。動物への注射に先立ち、化合物は通常の生理食塩水で所望の放射濃度に希釈した。

#### 【0348】

293H 細胞のトランスフェクション

293H 細胞は前記のプロトコールを使用してトランスフェクトした。トランスフェクションは、黒 / 透明 96 ウェルプレート (Becton Dickinson, カタログ番号 354640) で行った。プレートの左半分を Mock トランスフェクトし (DNA

なしで)、プレートの右半分をKDR cDNAでトランスフェクトした。細胞は、トランスフェクション時には80~90%コンフルエントであり、アッセイする時間である次の日には完全にコンフルエントであり、さもなければ、アッセイを中止した。

#### 【0349】

0.1% HSAを含むopti-MEM I培地の調製

opti-MEM IはInvitrogen(カタログ番号11058-021)から得られ、およびヒト血清アルブミン(HSA)はSigma(カタログ番号A-3782)から得られた。0.1% HSAを含むopti-MEM I培地を調製するため、0.1% w/v HSAをopti-MEM Iに加え、室温で20分攪拌し、次に0.2 μmフィルターを使用して濾過滅菌した。

10

#### 【0350】

アッセイのためのTc-標識配列番号339希釈液の調製

Tc-標識配列番号339の保存溶液(117 μCi/ml)を0.1% HSA含有opti-MEM Iで1:100、1:50、1:25および1:10で希釈すると、1.17、2.34、4.68および11.7 μCi/mlの最終濃度を有するTc-標識配列番号339の溶液が得られた。

#### 【0351】

Tc-標識配列番号339の結合を検出するためのアッセイ

細胞は、トランスフェクション24時間後に使用し、アッセイのための細胞を調製するため、それらを100 μlの室温の0.1% HSA含有opti-MEM Iで1回洗浄した。洗浄後、0.1% HSA含有opti-MEM Iをプレートから除き、70 μlの1.17、2.34、4.68および11.7 μCi/mlのTc-標識配列番号339(上のように調製された)で置き換えた。各々の希釈液は偽およびKDRトランスフェクト細胞を含む3つの別々のウェルへ加えた。室温で1時間インキュベートした後、プレートを4に15分間冷却し、100 μlの冷結合緩衝液(0.1% HSA含有opti-MEM I)で5回洗浄し、優しく吸い取って乾燥し、細胞損失を顕微鏡下で検査した。100 μlの可溶化溶液(2%トリトンX-100、10%グリセロール、0.1% BSA)を各々のウェルへ加え、プレートを37で10分インキュベートした。各々のウェル中の可溶化溶液をピペットで吸い上げたり吐き出したりすることにより混合し、そして1.2 mlチューブへ移した。各々のウェルを100 μlの可溶化溶液で1回洗浄し、洗液を

20

30

#### 【0352】

KDRトランスフェクト細胞へのTc-標識配列番号339の結合

KDRへ特異的に結合するTc-標識配列番号339の能力を、一過性トランスフェクト293H細胞を使用して評価した。

#### 【0353】

図14に示したように、Tc-標識配列番号339はMockトランスフェクト293H細胞に比較してKDRトランスフェクト細胞へ著しくよく結合した。KDRへの特異的結合を計算するため、Tc-標識配列番号339ポリペプチドのKDRトランスフェクト細胞への結合から、Mockトランスフェクト細胞への結合を差し引いた。Tc-標識配列番号339の濃度を増加させるにつれて、KDRに対するTc-標識配列番号339の特異的結合における直線的増加が観察された(図26)。Tc-標識配列番号339の濃度は~100 pMのみであったので(アッセイにおいて試験された最も高い濃度でさえ、11.7 μCi/ml)、直線的結合は驚くことではなく、それは配列番号277のK<sub>D</sub>値である~3-4 nM(アビジンHRPアッセイを使用して計算されたように)のはるか下であり、そのため結合の飽和は予想されないであろう。

40

#### 【実施例11】

#### 【0354】

50

## ペプチドおよび二量体ペプチド構築物の製造

以下の方法を、下記実施例(11~15)に記載されている個々のペプチドおよび二量体ペプチド製造のために使用した。

## 【0355】

## 自動化ペプチド合成

ペプチド合成を、FastMocプロトコルを使用し、0.25ミリモル規模でABI-433A合成機(Applied Biosystems Inc., フォスターシティー, CA)で実施した。このプロトコル前活性化の各々のサイクルは、カートリッジ中の1ミリモルの必要な乾燥N-Fmoc側鎖保護アミノ酸を、0.9ミリモルのHBTU、2ミリモルのDIEA、および0.9ミリモルのHOBtのDMF-NMP溶液に溶解することにより達成した。ペプチドはNovaSyn TGR(Rinkアミド)樹脂(樹脂置換0.2ミリモル/g)上で組み立てた。カップリングは21分実施した。Fmoc脱保護は、20%ピペリジンNMP溶液で実施した。最後のサイクルの終わりに、N末端Fmoc基を除去し、完全保護樹脂結合ペプチドを無水酢酸/DIEA/HOBt/NMPを使用してアセチル化した。

10

## 【0356】

## 粗ペプチドの切断、側鎖保護および単離

樹脂からのペプチドの切断および側鎖の脱保護は、試薬Bを4.5時間使用して達成した。切断溶液を集め、そして樹脂を追加の試薬Bで洗浄した。合併した溶液は濃縮して乾固した。回旋させながら、または攪拌しながらエーテルを加え、ペプチドを沈殿させた。エーテルをデカントし、固形物を集めた。不純物および残った切断カクテル成分を除去するため、この操作を2~3回繰り返した。

20

## 【0357】

## ジ-システインペプチドの環化

粗エーテル沈殿直鎖状ジ-システイン含有ペプチドは、水、水性アセトニトリル混合液(0.1%TFA)、水性DMSOまたは100%DMSOに溶解し、アンモニア水、炭酸アンモニウム水溶液、炭酸水素アンモニウム水溶液またはDIEAの添加による溶液pHのpH7.5~8.5への調整により環化した。混合物を空气中で16~48時間攪拌し、トリフルオロ酢酸水溶液でpH2の酸性とし、そして次に水へのアセトニトリルの濃度勾配を用いる分取逆相HPLCにより精製した。所望の物質を含んでいる分画をプールし、精製ペプチドを凍結乾燥により単離した。

30

## 【0358】

## リンカーを含んでいるペプチドの製造

典型的な実験において、400mgのivDde-保護リジンを有する樹脂含有ペプチドを10%ヒドラジンDMF溶液(2x20ml)で処理した。樹脂をDMF(2x20ml)およびDCM(1x20ml)で洗浄した。樹脂をDMF(10ml)に再懸濁し、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(0.4ミリモル)、HOBt(0.4ミリモル)、DIC(0.4ミリモル)およびDIEA(0.8ミリモル)で、4時間混合しながら処理した。反応後、樹脂をDMF(2x10ml)およびDCM(1x10ml)で洗浄した。樹脂は次に、20%ピペリジン含有DMF(2x15ml)で各々、10分間処理した。樹脂を洗浄し、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸とカップリングさせ、Fmoc保護基の除去をもう一度繰り返した。

40

## 【0359】

遊離アミノ基を含んでいる、得られた樹脂結合ペプチドは洗浄および乾燥し、試薬B(20ml)で4時間処理した。混合物を濾過し、濾液を濃縮乾固した。残渣をエーテルと攪拌すると固形物を生じ、それを集め、エーテルで洗浄し、そして乾燥した。固形物を無水DMSOに溶解し、DIEAでpHを7.5に調整した。混合物を16時間攪拌してジスルフィド環化を達成し、反応は分析用HPLCでモニターした。環化完了後、反応混合物を25%アセトニトリル含有水溶液で希釈し、逆相C18カラムへ直接応用した。精製は水へのアセトニトリルの(両方とも0.1%TFAを含んでいる)濃度勾配を使用して

50

達成した。分画を分析用HPLCで分析し、純粋な生成物を含んでいる分画を集め、凍結乾燥すると必要なペプチドを得た。

#### 【0360】

リンカーを含んでいるビオチニル化ペプチドの製造

典型的な実験において、400mgのivDde-保護リジンを有する樹脂含有ペプチドを10%ヒドラジンDMF溶液(2×20ml)で処理した。樹脂をDMF(2×20ml)およびDCM(1×20ml)で洗浄した。樹脂をDMF(10ml)に再懸濁し、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(0.4ミリモル)、HOBT(0.4ミリモル)、DIC(0.4ミリモル)およびDIEA(0.8ミリモル)で、4時間混合しながら処理した。反応後、樹脂をDMF(2×10ml)およびDCM(1×10ml)で洗浄した。樹脂は次に、20%ピペリジン含有DMF(2×15ml)で各々、10分間処理した。樹脂を洗浄し、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸とカップリングさせ、Fmoc保護基の除去をもう一度繰り返した。

10

#### 【0361】

遊離アミノ基を含んでいる、得られた樹脂結合ペプチドは、ビオチン-NHSエステル(0.4ミリモル、5当量)およびDIEA(0.4ミリモル、5当量)のDMF溶液中、2時間処理した。樹脂は、前に記載したように洗浄し、そして乾燥した後、試薬B(20ml)で4時間処理した。混合物を濾過し、濾液を濃縮乾固した。残渣をエーテルと攪拌すると固形物を生じ、それを集め、エーテルで洗浄し、そして乾燥した。固形物を無水DMSOに溶解し、DIEAでpHを7.5に調整した。混合物を4~6時間攪拌してジスルフィド環化を達成し、それはHPLCでモニターした。環化完了後、反応混合物を25%アセトニトリル含有水溶液で希釈し、逆相C18カラムへ直接応用した。精製は水へのアセトニトリルの(両方とも0.1%TFAを含んでいる)濃度勾配を使用して達成した。分画を分析用HPLCで分析し、純粋な生成物を含んでいる分画を集め、凍結乾燥すると必要なビオチニル化ペプチドを得た。

20

#### 【0362】

選択されたガドリニウムまたはインジウム同位元素で標識するためのDOTA-コンジュゲートペプチドの製造

典型的な実験において、400mgのN-ivDde-保護リジン部分を有する樹脂含有ペプチドを10%ヒドラジンDMF溶液(2×20ml)で処理した。樹脂をDMF(2×20ml)およびDCM(1×20ml)で洗浄した。樹脂をDMF(10ml)に再懸濁し、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(0.4ミリモル)、HOBT(0.4ミリモル)、DIC(0.4ミリモル)およびDIEA(0.8ミリモル)で、4時間混合しながら処理した。反応後、樹脂をDMF(2×10ml)およびDCM(1×10ml)で洗浄した。樹脂は次に、20%ピペリジン含有DMF(2×15ml)で各々、10分間処理した。樹脂を洗浄し、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸とカップリングさせ、Fmoc保護基の除去をもう一度繰り返した。遊離アミノ基を含んでいる、得られた樹脂結合ペプチドをDMF(10ml)に再懸濁し、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸1,4,7-トリス-t-ブチルエステル(DOTA-トリス-t-ブチルエステル、0.4ミリモル、5当量)、HOBT(0.4ミリモル)、DIC(0.4ミリモル)およびDIEA(0.8ミリモル)のDMF(10ml)溶液で、混合しながら4時間処理した。反応が完了したら、樹脂をDMF(2×10ml)およびDCM(1×10ml)で洗浄し、試薬B(20ml)で4時間処理した。混合物を濾過し、濾液を濃縮乾固した。残渣をエーテルと攪拌すると固形物を生じ、それを集め、エーテルで洗浄し、そして乾燥した。固形物を無水DMSOに溶解し、DIEAでpHを7.5に調整した。混合物を16時間攪拌してジスルフィド環化を達成し、それはHPLCでモニターした。環化完了後、反応混合物を25%アセトニトリル含有水溶液で希釈し、逆相C-18カラムへ直接応用した。精製は水へのアセトニトリルの(両方とも0.1%TFAを含んでいる)濃度勾配を使用して達成した。分画を分析用HPLCで分析し、純粋な生成物を含んでいる分画を集め

30

40

50

、凍結乾燥すると必要なビオチニル化ペプチドを得た。

【0363】

下記の表11の単量体ペプチドは上の方法により製造され、本明細書で使用する場合、「PnAO6」とは、3-(2-アミノ-3-(2-ヒドロキシミノ-1,1-ジメチル-プロピルアミノ)-プロピルアミノ)-3-メチル-ブタン-2-オン オキシムを表している。

【0364】

## 【表 1 2】

表 1 1 単量体ペプチドおよびペプチド誘導体の配列または構造

構造または配列	配列番号または二量体
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (ヒ <sup>+</sup> オチン-JJ-K)-NH <sub>2</sub>	277
(Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGILK (ヒ <sup>+</sup> オチン-JJ-)-NH <sub>2</sub> )	373
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK (DOTAJJ-K)-NH <sub>2</sub>	493
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK (JJ)-NH <sub>2</sub>	493
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [K (ivDde)]-NH <sub>2</sub>	373
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (ヒ <sup>+</sup> オチン-JJK)-NH <sub>2</sub>	337
(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (ヒ <sup>+</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub> )	494
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ)-NH <sub>2</sub>	337
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK (J)-NH <sub>2</sub>	356
配列 12 誘導体	
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK (ivDde)	495
応用配列 12 誘導体	
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ)-NH <sub>2</sub>	294
配列 5 誘導体	
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ)-NH <sub>2</sub> 配列 5 誘導体	294/D10
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [ (PnA06-C(=O) (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K)-NH <sub>2</sub> ]	277/D10
配列 11 誘導体	
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [ (DOTA-JJK (iv-Dde))-NH <sub>2</sub> ] 配列 11 誘導体	277/D11
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [ (PnA06-C(=O) (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O))K ]-NH <sub>2</sub> 配列 11 誘導体	476/D12
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub> 配列 5 誘導体	337/D12
特に: 配列 5 残基 5-25	
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [K (BOA)]-NH <sub>2</sub> 配列 11 誘導体	277/D13
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK [PnA06-C(=O) (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K (iv-Dde)]-NH <sub>2</sub>	356/D14
応用配列 12 誘導体	
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ)-NH <sub>2</sub> 配列 5 誘導体	294/D15
リンカー=Glut	
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-[PnA06-C(=O) (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K]-NH <sub>2</sub>	277/D16
配列 11 誘導体、新規配列	
Ac-AQDWYYEILJGRGGRGGGK [K (ivDde)]-NH <sub>2</sub>	496/D17
配列 12 (1-9) 誘導体	
Ac-APGTWCDYDWEYCWLGTGGGK [ (6PnA0-C(=O) (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K)-NH <sub>2</sub> ]	497/D18
対照として使用されたスクランブル化配列 11 誘導体、新規配列	
Ac-GVDFRCEWSDWGEVGRSPDYGGGK (JJ)-NH <sub>2</sub>	489/D18
スクランブル化配列 5 誘導体、新規配列	
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (ヒ <sup>+</sup> オチン-K)-NH <sub>2</sub>	294/D19
配列 11 誘導体	
JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (iv-Dde)-NH <sub>2</sub> (配列番号 277)	277/D20
JJVCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH <sub>2</sub>	370/D20
JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (iv-Dde)-NH <sub>2</sub>	277/D21
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [K (SATA)]-NH <sub>2</sub>	373/D22
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [SATA-JJ-K]-NH <sub>2</sub>	339/D23
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ)-NH <sub>2</sub>	294/D24
H <sub>2</sub> N-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [K (iv-Dde)]-NH <sub>2</sub>	373/D25
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK [ヒ <sup>+</sup> オチン-JJK [NH <sub>2</sub> -Ser (GalNAc (Ac) <sub>3</sub> -アルファー-D)-Gly-Ser (GalNAc (Ac) <sub>3</sub> -アルファー-D)]-NH <sub>2</sub>	339/D26
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (NH <sub>2</sub> -Ser (GalNAc (Ac) <sub>3</sub> -アルファー-D)-Gly-Ser (GalNAc (Ac) <sub>3</sub> -アルファー-D)-NH <sub>2</sub>	337/D26
Ac-GSPMEMMFPFLYPCNHHAPGGGK [ (PnA06-C(=O) (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K)]-NH <sub>2</sub>	482/D27
修飾 cMet 結合配列	

10

20

30

40

## 【実施例 1 2】

## 【0 3 6 5】

ホモ二量体およびヘテロ構築物の製造

50

上記実施例 8 で述べた精製ペプチド単量体を種々のホモ二量体およびヘテロ構築物の製造に使用した。

**【0366】**

## ホモ二量体 - 含有構築物の製造

ホモ二量体化合物を製造するため、二量体の製造に必要とされるペプチドの半分を DMF に溶解し、10 当量のグルタル酸ビス N - ヒドロキシスクシンイミジルエステルで処理した。反応の進行は HPLC 分析および質量分析法によりモニターした。反応完了時、揮発分を真空下で除去し、未反応のビス - NHS エステルを除去するため、残渣を酢酸エチルで洗浄した。残渣を乾燥し、無水 DMF に再溶解して、2 当量の DIEA 存在下、ペプチドの残りの半分で処理した。反応を 24 時間進行させた。この混合物は直接 YMC 逆相 HPLC カラムへ応用し、水からアセトリトリル（両方とも 0.1% TFA を含んでいる）への直線濃度勾配での溶出により精製した。

10

**【0367】**

## ヘテロ二量体 - 含有構築物の製造

ヘテロ二量体の場合、単量体の一つ（「A」）をグルタル酸のビス NHS エステル（ホモ二量体化合物で説明したような）と反応させ、過剰のビス NHS エステルを洗い流した後、DIEA 存在下、第二の単量体（「B」）を加えた。反応後、混合物は分取 HPLC により精製した。典型的には、グルタル酸ビス N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル（0.02 ミリモル、10 当量）の DMF（0.5 mL）溶液に、ペプチド「A」および DIEA（2 当量）の DMF（0.5 mL）溶液を加え、混合物を 2 時間攪拌した。反応の進行は HPLC 分析および質量分析法によりモニターした。反応完了時、揮発分を真空下で除去し、未反応のビス - NHS エステルを除去するため、残渣を酢酸エチル（3 × 1.0 mL）で洗浄した。残渣を乾燥し、無水 DMF（0.5 mL）に再溶解し、ペプチド「B」および DIEA（2 当量）の DMF（0.5 mL）溶液で 24 時間処理した。この混合物を水で希釈し（1 : 1、v / v）、直接 YMC 逆相 HPLC カラムへ応用し、水からアセトリトリル（両方とも 0.1% TFA を含んでいる）への直線濃度勾配での溶出により精製した。分画を分析用 HPLC で分析し、純粋な生成物を含んでいる分画を合わせ、凍結乾燥すると必要な二量体を得た。図 36 ~ 63 に示されている二量体がこの方法で製造された（構造、名前、化合物参照番号は「図の簡単な説明」に記載されている）。

20

30

**【0368】**

二量体 D5 の製造のためには、個々のペプチドのカップリング反応後、50  $\mu$ L のヒドラジンを反応混合物に加え（リジン N - アミノ基を露出するため）、溶液を 2 分攪拌した。反応混合物を水（1 mL）で希釈し、TFA で pH を 2 に調整した。次にこれを上記の方法により精製した。

**【0369】**

二量体ペプチドの HPLC 分析データおよび質量スペクトルデータは、下記表 12 に与えられている。

**【0370】**

## 【表 1 3】

表 1 2 ホモ二量体およびヘテロ二量体ペプチド構築物HPLC分析システムの分析データ

	保持時間 (システム)	質量スペクトルデータ(API-ES, -イオン)
D1	8.98(A)	1987.7(M-3H)/3, 1490.6(M-4H)/4, 1192.3(M-5H)/5
D2	16.17分(B)	2035.3(M-3H)/3, 1526.1(M-4H)/4, 1220.7(M-5H)/5
D3	8.74分(C)	1933.6(M-3H)/3, 1449.9(M-4H)/4, 1159.4(M-5H)/5
D4	10.96分(D)	2032.8(M-3H)/3
D5	6.57分(E)	1816.2(M-3H)/3, 1361.8(M-4H)/4, 1089.4(M-5H)/5, 907.7(M-6H)/6
D8	4.96分;(F)	2379.3[M-3H]/3
D9	5.49分;(G)	2146.4[M-3H]/3
D10	5.44分;(H)	2082.7[M-3H]/3, 1561.7[M-4H]/4, 1249.1[M-5H]/5, 1040.7[M-6H]/6
D11	7.23分;(E)	2041.8[M-3H]/3, 1531.1[M-4H]/4, 1224.6[M-5H]/5
D12	5.84分;(H)	1877.1[M-3H]/3, 1407.6[M-4H]/4, 1125.9[M-5H]/5, 938.1[M-6H]/6
D13	5.367分;(E)	1965.3[M-3H]/3, 1473.8[M-4H]/4, 1178.8[M-5H]/5, 982.2[M-6H]/6
D14	4.78分;(I)	2275.0[M-3H]/3, 1362.8[M-5H]/5
D15	5.41分;(H)	1561.3[M-4H]/4, 1249.1[M-5H]/5, 1040.8[M-6H]/6, 891.8[M-7H]/7
D16	5.44分;(J)	2150.8[M-3H]/3, 1613.1[M-4H]/4, 1289.9[M-5H]/5, 1074.8[M-6H]/6, 920.9[M-7H]/7
D17	4.78分;(K)	1789.4[M-3H]/3, 1347.7[M-4H]/4
D18	4.74分;(L)	2083.1[M-3H]/3, 1562.7[M-4H]/4, 1249.5[M-5H]/5
S19	7.13分;(O)	1891.9[M-3H]/3, 1418.4[M-4H]/4, 1134.8[M-5H]/5, 945.5[M-6H]/6
D20	9.7分;(P)	2700.4[M-2H]/2, 1799.3[M-3H]/3
D21	6.1分;(P)	2891.3[M-2H]/2, 1927.2[M-3H]/3, 1445.1[M-4H]/4, 1155.8[M-5H]/5
D22	6.23分;(Q)	1994.4[M-3H]/3, 1495.7[M-4H]/4, 1196.3[M-5H]/5
D23	7.58分;(J)	1854.4[M-3H]/3, 1390.8[M-4H]/4, 1112.7[M-5H]/5, 927[M-6H]/6
D24	8.913分;(R)	1952.1[M-3H]/3, 1463.4[M-4H]/4, 1171.1[M-5H]/5, 975.3[M-6H]/6
D25	5.95分;(E)	1954.9[M-3H]/3, 1466.1[M-4H]/4, 1172.4[M-5H]/5, 976.8[M-6H]/6
D26	6.957分;(S)	1759.1[M-3H]/3, 1319.6[M-4H]/4, 1055.1[M-5H]/5
D27	5.5分;(M)	2317.6[M-3H]/3, 1737.2[M-4H]/4, 1389.3[M-5H]/5, 1157.7[M-6H]/6

10

20

30

【 0 3 7 1 】

## 【表 1 4】

表 1 3 二量体配列およびリンカー

二量体番号	配列	
D8	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK {Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK (J-Glut)-NH <sub>2</sub> } K (t <sup>+</sup> オチン-JJ)-NH <sub>2</sub>	
D9	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK { [Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ-Glut)-NH <sub>2</sub> ] K-NH <sub>2</sub>	
D10	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK { [Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ-Glut-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(PnA06-Glut-NH)(C=O)-)-NH <sub>2</sub> ]-NH <sub>2</sub>	10
D11	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK [JJ-Glut-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(DOTA-JJ-NH-)(C=O)-]-NH <sub>2</sub> ]-NH <sub>2</sub>	
D12	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK { [PnA06-Glut-K(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (-C(=O)CH <sub>2</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(=O)-)-NH <sub>2</sub> )]-NH <sub>2</sub>	
D13	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK [JJ-Glut-K(BOA)]-NH <sub>2</sub> ]-NH <sub>2</sub> ; 二量体 13 (D13)	
D14	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK {PnA06-Glut-K[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ-Glut)-NH <sub>2</sub> ]}-NH <sub>2</sub>	20
D15	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK { [ [Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK JJ-Glut]-NH <sub>2</sub> ]-K (PnA06-Glut) }-NH <sub>2</sub>	
D16	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {PnA06-Glut-K[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK [-C(=O)CH <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(=O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHC(=O)CH <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(=O)-]-NH <sub>2</sub> ]}-NH <sub>2</sub>	
D17	Ac-AQDWYYDEILJGRGGRGGGK {K[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ-Glut)-NH <sub>2</sub> ]}-NH <sub>2</sub>	
D18	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {PnA06-Glut-K[Ac-GVDFRCEWSDWGEVGCSPDYGGGK (JJ-Glut)-NH <sub>2</sub> ]}-NH <sub>2</sub>	
D19	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {t <sup>+</sup> オチン-K[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ-Glut)-NH <sub>2</sub> ]}-NH <sub>2</sub>	30
D20	(-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> )-Glut-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH <sub>2</sub>	
D21	[-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (PnA06-Glut)-NH <sub>2</sub> ]-Glut-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH <sub>2</sub>	
D22	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK {JJ-Glut-JJ-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> }-NH <sub>2</sub>	
D23	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK [JJ-Glut-K(SATA)]-NH <sub>2</sub> ]-NH <sub>2</sub>	
D24	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {SATA-JJK[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ-Glut)-NH <sub>2</sub> ]}-NH <sub>2</sub>	40
D25	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK [JJ-Glut-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(NH <sub>2</sub> )C(=O)-]-NH <sub>2</sub> ]-NH <sub>2</sub>	
D26	AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {(-Glut-JJ-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH <sub>2</sub> )-K}-NH <sub>2</sub>	
D27	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK [S(GalNAc(Ac) <sub>3</sub> -アルファー-D)-G-S(GalNAc(Ac) <sub>3</sub> -アルファー-D)-Glut-S(GalNAc(Ac) <sub>3</sub> -アルファー-D)-G-S(GalNAc(Ac) <sub>3</sub> -アルファー-D)-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(t <sup>+</sup> オチン-JJNH-)-C(=O)-]-NH <sub>2</sub> ]-NH <sub>2</sub>	

## 【 0 3 7 2】

HPLC分析システム

システムA：カラム：YMC C-4 (4.6 × 250 mm)；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、25% B、直線濃度勾配 25 ~ 60% B 10分で；流速：2.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

【0373】

システムB：カラム：YMC C-4 (4.6 × 250 mm)；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、25% B、直線濃度勾配 25 ~ 60% B 20分で；流速：2.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

【0374】

システムC：カラム：YMC C-4 (4.6 × 250 mm)；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、30% B、直線濃度勾配 30 ~ 60% B 10分で；流速：2.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

10

【0375】

システムD：カラム：YMC C-4 (4.6 × 250 mm)；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、20% B、直線濃度勾配 20 ~ 60% B 10分で；流速：2.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

【0376】

システムE：カラム：Waters XTerra、4.6 × 50 mm；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、10% B、直線濃度勾配 10 ~ 60% B 10分で；流速：3.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

20

【0377】

システムF：カラム：Waters XTerra、4.6 × 50 mm；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、30% B、直線濃度勾配 30 ~ 70% B 10分で；流速：3.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

【0378】

システムG：カラム：Waters XTerra、4.6 × 50 mm；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、30% B、直線濃度勾配 30 ~ 75% B 10分で；流速：3.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

30

【0379】

システムH：カラム：Waters XTerra、4.6 × 50 mm；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、20% B、直線濃度勾配 20 ~ 52% B 10分で；流速：3.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

【0380】

システムI：カラム：Waters XTerra、4.6 × 50 mm；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、10% B、直線濃度勾配 10 ~ 65% B 10分で；流速：3.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

40

【0381】

システムJ：カラム：Waters XTerra、4.6 × 50 mm；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、20% B、直線濃度勾配 20 ~ 60% B 10分で；流速：3.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

【0382】

システムK：カラム：Waters XTerra、4.6 × 50 mm；溶出液：A：水 (0.1% TFA)、B：ACN (0.1% TFA)；溶出：初期条件、5% B、直線濃度勾配 5 ~ 60% B 10分で；流速：3.0 ml / 分；検出：UV @ 220 nm。

【0383】

50

システムL：カラム：Waters XTerra、4.6×50mm；溶出液：A：水（0.1% TFA）、B：ACN（0.1% TFA）；溶出：初期条件、5% B、直線濃度勾配5～65% B 10分で；流速：3.0 mL / 分；検出：UV@220nm。

## 【0384】

システムM：カラム：Waters XTerra、4.6×50mm；溶出液：A：水（0.1% TFA）、B：ACN（0.1% TFA）；溶出：初期条件、15% B、直線濃度勾配15～50% B 10分で；流速：3.0 mL / 分；検出：UV@220nm。

## 【0385】

システムN：カラム：Waters XTerra、4.6×50mm；溶出液：A：水（0.1% TFA）、B：ACN（0.1% TFA）；溶出：初期条件、20% B、直線濃度勾配20～80% B 10分で；流速：3.0 mL / 分；検出：UV@220nm。

## 【0386】

システムO：カラム：YMC C-18、4.6×250mm；溶出液：A：水（0.1% TFA）、B：ACN（0.1% TFA）；溶出：初期条件、30% B、直線濃度勾配30～60% B 10分で；流速：2.0 mL / 分；検出：UV@220nm。

## 【0387】

システムP：カラム：YMC C-18、4.6×250mm；溶出液：A：水（0.1% TFA）、B：ACN（0.1% TFA）；溶出：初期条件、20% B、直線濃度勾配20～80% B 20分で；流速：2.0 mL / 分；検出：UV@220nm。

## 【0388】

システムQ：カラム：YMC C-18、4.6×250mm；溶出液：A：水（0.1% TFA）、B：ACN（0.1% TFA）；溶出：初期条件、20% B、直線濃度勾配20～60% B 6分で；流速：2.0 mL / 分；検出：UV@220nm。

## 【0389】

システムR：カラム：YMC C-18、4.6×250mm；溶出液：A：水（0.1% TFA）、B：ACN（0.1% TFA）；溶出：初期条件、25% B、直線濃度勾配25～60% B 10分で；流速：2.0 mL / 分；検出：UV@220nm。

## 【0390】

システムS：カラム：YMC C-18、4.6×250mm；溶出液：A：水（0.1% TFA）、B：ACN（0.1% TFA）；溶出：初期条件、10% B、直線濃度勾配10～60% B 10分で；流速：3.0 mL / 分；検出：UV@220nm。

## 【実施例13】

## 【0391】

HUVECおよびKDR-トランスフェクト細胞上のKDRへの結合に対する<sup>125</sup>I-VEGFとの競合

以下の実験で、トランスフェクトされた293H細胞により発現されるKDRへの結合に対する、<sup>125</sup>I-標識VEGFと競合するKDR結合ペプチドの能力を評価した。

## 【0392】

## プロトコール

293H細胞を、標準技術によりKDR cDNAでトランスフェクトするか、またはMockトランスフェクトした。細胞は、競合化合物存在下（10 μM、0.3 μMおよび0.03 μM）または不在下で、<sup>125</sup>I-VEGFとインキュベートした。細胞を洗浄後、結合された放射活性をガンマカウンターで定量した。VEGF結合の阻害率は、式 $[(Y1 - Y2) \times 100 / Y1]$ 、式中、Y1はペプチド不在下でのKDR-トランスフェクト293細胞への特異的結合であり、およびY2はペプチド競合剤存在下でのKDR-トランスフェクト293細胞への特異的結合である、を使用して計算した。KDR-トランスフェクト293細胞への特異的結合は、KDR-トランスフェクト293細胞への結合からMockトランスフェクト細胞への結合を差し引くことにより計算した。

10

20

30

40

50

## 【0393】

## 結果

図15に示したように、アッセイしたすべてのKDR結合ペプチドが、KDR-トランスフェクト細胞に対する結合において、<sup>125</sup>I-VEGFと競合した。ヘテロ二量体(D1)が、2つのホモ二量体を超えて、<sup>125</sup>I-VEGFとの競合で明らかに最も有効であり、D1の優れた結合性が確認された。

## 【実施例14】

## 【0394】

## レセプター活性化アッセイ

KDRのVEGF誘導活性化(リン酸化)を阻害するKDR結合ペプチドの能力を、以下のアッセイを使用して評価した。 10

## 【0395】

## プロトコール

ほとんどコンフルエントなHUVECのディッシュを、血清または増殖因子を欠いた基本培地に一夜おいた。下記群(c)のディッシュは、KDR結合ペプチドを含む基本培地中で15分前処理し、次に、群(a)、(b)および(c)のディッシュの細胞を：

- (a) 添加物なし(陰性対照)、
- (b) 5 ng/mL VEGF(陽性対照)、または
- (c) 5 ng/mL VEGFに推定競合/阻害ペプチド

含んでいる新鮮な基本培地においた。5分の処理後、各々のディッシュの組から溶解物を調製した。溶解物から免疫沈降されたKDRは、抗ホスホチロシン抗体でリン酸化を、および抗KDR抗体で総KDRを(試料添加を調節するため)、免疫プロットングにより連続的に分析した。 20

## 【0396】

## 結果

図16に示したように、D1は10 nMで、HUVECにおけるKDRのVEGF-誘導リン酸化を完全に阻止できた。1 nMでは、リン酸化の半分以上がこの化合物により阻害された。D1に含まれている2つの個々の結合部分から作製されている、ホモ二量体D2およびD3は、100 nMまでではリン酸化に何の影響も与えず、レセプター-リガンド相互作用の阻止におけるヘテロ二量体構築物の利点を示している。複数の実験において、このアッセイにおけるD1のIC<sub>50</sub>は、0.5から1 nMの間で変化した。非関連結合配列を含んでいる、異なったヘテロ二量体、配列番号305および配列番号306のポリペプチドから成っている尾部-尾部ヘテロ二量体(図64)は、その高い親和性(SPRによりKDRに対して11 nM)にもかかわらず、100 nMでもリン酸化に効果がなく、KDRへの結合に対してVEGFと競合するための多量体を構築する場合には、KDR結合部分の選択が重要であることを示唆している。当業者は、本明細書に提供された結合ポリペプチドおよびルーチンのスクリーニングアッセイを使用して、適したヘテロ多量体を構築することができるであろう。 30

## 【0397】

KDRに対するD1の親和性はD2の親和性よりも10倍高いけれども(SPR分析により)、活性化アッセイにおけるD1のIC<sub>50</sub>は大きくても100分の1以下である。理論に縛られるのを望むわけではないが、このことは、1つの結合分子でKDR上の2つの独特なエピトープを標的化することは、KDR上の1つのエピトープへのみ結合する、類似の親和性を有する分子よりも大きな立体障害を発生できることを示唆しており、それ故、VEGF誘導KDR活性を阻害する能力を改良する。同様に、レセプター活性化アッセイにおいて単量体遊離ペプチド(配列番号277および配列番号337)として試験された場合、D1内の2つのKDR結合部分は、各々0.1および1マイクロモルのIC<sub>50</sub>を有していたことを指摘するべきである。単量体遊離ペプチドのIC<sub>50</sub>は本アッセイにおいてD1に対するIC<sub>50</sub>よりも100から1000倍高く、および単量体ペプチドのフルオレセイン化誘導体に対するK<sub>D</sub>よりも14から30倍高かった。従って、弱いV 50

VEGF - 阻止活性を有する2つのペプチドを含んでいる二量体を作製することにより、D1の増加した結合親和性をはるかに超えた、非常に強力なVEGF - 阻止活性を有する分子が生じた。

【実施例15】

【0398】

遊走アッセイ

以下の実験は、培養におけるHUVECのVEGF誘導遊走を阻止するD1の能力を評価した。

【0399】

プロトコール

血清 - 飢餓HUVECを、ウェル当たり100,000細胞で、BD マトリゲル - 被覆 FluoroBlok 24ウェル挿入プレート(カタログ番号354141)の上部チャンバー内に置いた。VEGF - 阻止/阻害の可能性を有する化合物の存在下または不在下、VEGF(10ng/mL)または血清(5%FBS)のような異なった誘因物質を含む、または何も含まない基本培地をウェルの下部チャンバーへ加えた。22時間後、蛍光色素で挿入プレート内の細胞を後標識し、浸潤/遊走細胞の蛍光を蛍光プレートリーダーで測定することにより細胞遊走/浸潤の定量を達成した。VEGF - 誘導遊走は、ウェルの下部チャンバーに基本培地のみを置いた場合に起こった遊走を差し引くことにより計算した。

10

【0400】

結果:

VEGFは、本アッセイにおいて内皮細胞遊走を大きく増加させ、それはD1により強く阻止された。5nM D1で、VEGF - 刺激内皮細胞遊走は84%阻止された(図17参照)。25nM D1では、この遊走はほとんど完全に阻止された。別の実験で、既知のKDR阻害剤、SU-1498(Strawn, L.ら、1996, Cancer Res., 56:3540-3545)を本アッセイで試験した。3ミリモルのSU-1498は、D1のようにVEGF - 誘導遊走を阻止しなかった(3ミリモルで47%阻止された)。D6(構造は下記実施例18に示されている)ではまた、50nMで、VEGFにより刺激された遊走の本質的に完全な阻害を生じた。血清は、VEGFの代わりに使用した場合、本アッセイで非常に強力な誘因物質であったが、その効果は有意にD1により減らされず、D1はVEGFにより誘導された内皮細胞遊走を特異的に阻害することを示している。

20

30

【実施例16】

【0401】

標識化合物の製造

以下の実験は、Tc、InおよびI - 標識化合物を製造するために使用した方法を説明している。

【0402】

$^{99m}\text{Tc} - 378 (\text{Ac} - \text{AGPTWC}^* \text{EDDWYYC}^* \text{WLFGTGGGK} (\text{PnAO}_6 - \text{NH} - (\text{O} = ) \text{C} (\text{CH}_2)_3 \text{C} (= \text{O}) - \text{JJ}) - \text{NH}_2$ ; 配列番号378)の製造

40

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20mg)を1mLのHClに溶解し、この溶液の10 $\mu\text{L}$ を、10mgの $\text{CaNa}_2\text{DTPA} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  (Fluka)を1mLの水に溶解することにより調製したDTPA溶液1mLへ加えた。スズDTPA溶液のpHを、1N NaOHを使用してpH6~8に調整した。配列番号378(50 $\mu\text{g}$ を50 $\mu\text{L}$ のDMFに溶解)を20 $\mu\text{L}$ の $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (2.4から4mCi, Syncor)、続いて、100 $\mu\text{L}$ のSn-DTPA溶液と混合した。室温で30分後、放射化学純度(RCP)は93%であった。生成物は、1g/L酢酸アンモニウム含有水(A)およびアセトニトリル(B)の水性/有機濃度勾配を使用し、0.5mL/分の流速で溶出した、Supelco Discovery C16アミドカラム(4x250mm, 5 $\mu\text{m}$ 孔径)で

50

精製した。以下の濃度勾配を使用した：30.5% Bから35% B、30分で、傾斜をつけて10分で70% Bへ。21.2分の保持時間で溶出された化合物を、1%アスコルビン酸および0.1% HSAを含んでいる50 mMクエン酸緩衝液 (pH 5.2) 500  $\mu$ Lに集め、Speed Vacuum (Savant) を使用してアセトニトリルを除去した。精製後、化合物は>98%のRCPを有していた。

【0403】

<sup>111</sup>In - Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK (JJ - DOTA) - NH<sub>2</sub> (配列番号338) の製造

配列番号338 (50  $\mu$ gを50  $\mu$ Lの10% DMFに溶解) を<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (50  $\mu$ L、400  $\mu$ Ci、Mallinckrodt) および100  $\mu$ Lの0.2 M酢酸アンモニウムまたはpH 5.3のクエン酸緩衝液と混合した。85  $^{\circ}$ Cで45分加熱した後、HPLCを使用して決定した放射化学純度(RCP)は44%から52.2%の範囲であった。以下の条件下：水相、1 g/L酢酸アンモニウム (pH 6.8)；有機相、アセトニトリル、濃度勾配：30分で23%有機から25%有機、2分で30%有機に上昇させ、10分保持、Vydac C18カラム (4.6  $\times$  25 cm、5  $\mu$ m孔径) を使用して非標識リガンドから<sup>111</sup>In - 標識化合物を分離した。20.8分の保持時間で溶出された化合物を、1%アスコルビン酸および0.1% HSAを含んでいる50 mMクエン酸緩衝液 (pH 5.2) 200  $\mu$ Lに集め、Speed Vacuum (Savant) を使用してアセトニトリルを除去した。精製後、化合物は>93%のRCPを有していた。

10

20

【0404】

<sup>111</sup>In - D4 の製造

ヒスチジン緩衝液は、0.1 Mヒスチジン (Sigma) 溶液を濃水酸化アンモニウムでpH 6.25に調整することにより準備した。酢酸アンモニウム緩衝液は、0.2 M酢酸アンモニウム (99.99%, Aldrich) 溶液に濃HCl (J.T. Baker, Ultra Pure) を加えてpH 5.5に調整することにより準備した。高純度<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (100  $\mu$ L、1.2 mCi、Mallinckrodt、ヘーゼルウッド、MO) をD4 (200  $\mu$ gを200  $\mu$ Lの50% DMF、10% DMSO、20% アセトニトリルおよび20% 水に溶解)、続いて300  $\mu$ Lのヒスチジン緩衝液を加えた。最終pHは5.5であった。85  $^{\circ}$ Cで45分の反応混合物のインキュベーション後、RCPは20%であった。

30

【0405】

もしくは、商業的に入手可能なOcteoscan<sup>T M</sup> キット (134  $\mu$ L、0.6 mCi、Mallinckrodt) として提供された<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> を162  $\mu$ Lの0.2 M酢酸アンモニウム緩衝液に溶解したD4 (135  $\mu$ g) へ加えた。最終pHは5.5であった。85  $^{\circ}$ Cで45分の反応混合物のインキュベーション後、RCPは20%であった。

【0406】

<sup>125</sup>I - D5 の製造

前もってジイソプロピルアミンを使用してpH 8.5 ~ 9.0へ調整されているDMF溶液30  $\mu$ Lへ溶解させたD5 (200  $\mu$ g) を、蒸発乾固させた1 mCiの一ヨウ化<sup>125</sup>I Bolton - Hunter 試薬 (NEX - 120, Perkin - Elmer) へ加えた。バイアルを振盪し、次に時々振盪しながら、氷上で30分インキュベートした。この時間後、RCPは23%であった。<sup>125</sup>I - D5は、下記の条件下でVydac C18カラム (4.6  $\times$  25 cm、5  $\mu$ m孔径) を使用し、1 mL / 分の流速でのHPLCにより精製した。水相：0.1% TFA含有水；有機相：0.085% TFA含有アセトニトリル。濃度勾配：30分で30%有機から36%有機へ、5分で60%有機まで上昇、5分間保持。化合物を、1%アスコルビン酸および0.1% HSAを含んでいる50 mMクエン酸緩衝液 (pH 5.2) 200  $\mu$ Lに集めた。アセトニトリルはSpeed Vacuum (Savant) を使用して除去した。得られた化合物は>97%

40

50

の R C P を有していた ( 図 6 5 ) 。

【実施例 17】

【0407】

K D R - トランスフェクト細胞への結合

K D R - トランスフェクト 293H 細胞へ結合する  $^{125}$ I - 標識 D 5 の能力を試験する実験を実施した。この実験においては、異なった量の  $^{125}$ I - 標識 D 5 ( 1 ~ 4  $\mu$  C l / m l 、  $^{125}$ I B o l t o n - H u n t e r 試薬で標識し、H P L C で精製 ) を、偽および K D R - トランスフェクト 293H 細胞と、96 ウェルプレート中、室温で 1 時間インキュベートした。K D R - トランスフェクト細胞への結合に対する血清効果を評価するため、結合は 40 % マウス血清と、または無しで実施した。非結合化合物を洗い流した後、各々のウェル中の細胞を 0.5 N N a O H で溶解し、溶解物をガンマカウンターで計数した。

10

【0408】

この実験の結果が図 18 および図 19 に要約されている。 $^{125}$ I - 標識 D 5 は K D R - トランスフェクト細胞へ特異的に結合でき、その結合は 40 % マウス血清存在下でも影響されない。K D R - トランスフェクト細胞への幾分より強い結合が、40 % マウス血清存在下での結合に比較して、血清不在下で観察された。しかしながら、M o c k トランスフェクト細胞への  $^{125}$ I - 標識 D 5 の結合も、アッセイ間に血清を削除した場合に同じ程度増加しており、血清不在下での結合の増加は非特異的であることを示している ( 図 18 ) 。K D R - トランスフェクト細胞への特異的結合 ( M o c k トランスフェクト細胞への結合を差し引いた後 ) は、マウス血清の有無に関係なくほとんど同一に見える ( 図 19 に示したように ) 。この実験において、総 C P M の 10 ~ 14 % が K D R - トランスフェクト細胞へ特異的に結合された ( データは示されていない ) 。

20

【実施例 18】

【0409】

K D R - F c へのヘテロ二量体結合の B i a c o r e 分析および親和定数

配列番号 277 および配列番号 294 から構成されたヘテロ二量体 ( 図 6 6 ) は、グルタル酸ビス N - ヒドロキシスクシンイミジルエステルを使用して、実施例 12 に記載したように製造した。以下のように、このヘテロ二量体について、B i a c o r e を使用して K D R - F c への結合を試験し、および親和定数を決定した。

30

【0410】

3 つの密度の K D R - F c を、標準アミンカップリング法により、C M 5 センサーチップのデキストラン表面に架橋した ( 0.5 m g / m l 溶液を、50 m M 酢酸塩、p H 6.0、で 1 : 100 または 1 : 50 に希釈 ) 。対照減算として働かせるため、フローセル 1 を活性化し、次にブロックした。達成された最終固定化レベル：

$$R_L F c 2 K D R - F c = 1607$$

$$R_L F c 3 K D R - F c = 3001$$

$$R_L F c 4 K D R - F c = 6319。$$

【0411】

実験は P B S ( 5.5 m M リン酸塩、p H 7.65、0.15 M N a C l + 0.005 % P - 20 ( v / v ) ) 中で実施した。D 6 は P B S で 250 n M に希釈し、125、62.5、31.3、15.6、7.8 および 3.9 n M 溶液を生じるように一連の希釈を行った。すべての試料を 2 重に注射した。会合のため、ペプチドを、k i n j e c t プログラムを使用して、20  $\mu$  L / 分で 12.5 分注射した。10 分の解離に続いて、残存するペプチドを、75  $\mu$  L / 分で 12 秒の 50 m M N a O H + 1 M N a C l の急速注射により、K D R 表面から剥がした。センサーグラムは、B I A e v a l u a t i o n ソフトウェア 3.1 および S i g m a P l o t 6.0 の双曲線二重矩形回帰方程式を使用して分析した。ヘテロ二量体定常状態結合親和性 ( K D A V ) を、3 つすべての K D R 固定化密度で決定した ( 表 14 ) 。

40

【0412】

50

【表 15】

表 14 パラメーターの要約

		$K_{D1}$ (nM)	$R_{max1}$	$K_{DAV}$ (nM)	$R_{maxAV}$	$R^{2*}$
D6	Vs. 1600RU	46	13.1	1.5	12.6	0.995
	Vs. 3000RU	25.5	21.2	0.665	22.7	0.991
	Vs. 6000RU	17	61.3	0.662	62.2	0.993

10

## 【0413】

このデータから、より高い固定化濃度において、ヘテロ二量体はナノモル以下の親和性 ( $\sim 0.6$  nM) で KDR を結合する。

このペプチドヘテロ二量体のインビボクリアランスを評価するため、少量の物質を、標準プロトコール (Pierce) に従って、ヨードゲン (iodogen) および  $Na^{125}I$  を使用してヨード化した。ヨードゲン試薬で被覆した一つのチューブを、1 mL の 25 mM トリス、0.4 M NaCl、pH 7.5 で前もって湿らせた。この液を廃棄し、100  $\mu$ L の同一の緩衝液を加えた。ハミルトンシリンジを使用し、11  $\mu$ L の  $Na^{125}I$  - NaI を反応チューブへ移した。143.555 mCi/ml である  $Na^{125}I$  濃度の原見積もりに基づくと、11  $\mu$ L は約 1.5 mCi を含んでいなければならない。添加後、試料を回旋させ、6分インキュベートするためにリードピッグにセットし、30秒ごとに回旋させた。6分後、全試料を、エッペンドルフチューブに加えてあるタンパク質へ移した。試料を回旋させ、8分インキュベートするためにセットし、30秒ごとに回旋させた。8分後、チロシン (10 mg/mL、飽和溶液) で反応をクエンチ (停止) させ、5分間そのままにし、次に 2  $\mu$ L を標準物質のために取り除いた。

20

## 【0414】

精製のため、D-塩ポリアクリルアミド 1800 の 10 mL カラムを使用して、標識チロシンから標識ペプチドを分離した。カラムは、非特異的部点をブロックするため、最初に 10 mL の食塩水、次に 2.5% HSA を含む 5 mL の 25 mM トリス、0.4 M NaCl、pH 7.5、で洗浄した。HSA 緩衝液での洗浄後、カラムを 60 mL の 25 mM トリス、0.4 M NaCl 緩衝液で溶出し、そしてカラムを一夜 4 で保存した。標識試料は、線量標準物質により決定したところ、1.355 mCi を含んでいた。標準物質として取り除かれた 2  $\mu$ L の試料は、8.8  $\mu$ Ci を含んでいた。ペプチド試料を D-塩 1800 カラムへ応用し、トリス/NaCl 緩衝液、pH 7.5、で溶出した。分画番号 1 ~ 14 の各々には 0.5 mL、そして分画 25 ~ 43 には 1.0 mL になるように流量を調節した。図 20 は活性に対する分画番号の溶出プロフィールを示している。分画 9、10 および 11 での活性のピークは、ペプチドであると推定された。24 から ~ 40 の放射活性は、標識されたチロシンであるようである。この精製から、分画番号 9 ~ 12 を一緒にプールし、続いてのクリアランス研究に使用した (プール中の  $Na^{125}I$  - D6 濃度は 7.023  $\mu$ g/mL であり、100  $\mu$ L = 0.702  $\mu$ g で 8.6  $\mu$ Ci を有する)。

30

40

## 【0415】

総計で 15 匹のマウスに 100  $\mu$ L の  $Na^{125}I$  - D6 を注射し、マウス (3 匹の組) を以下の時点で殺した: 0、7、15、30、90 分。注射後、2  $\mu$ Ci 以上がシリンジ中に残っていることが観察され、従って、注射された実際の活性は約 6  $\mu$ Ci であった。6  $\mu$ Ci の注射で、投与された対応するタンパク質は動物当たり  $\sim 0.5$   $\mu$ g であった。殺したら、各々の動物からの血漿試料 50  $\mu$ L 中の計数値を決定した。各々の時点での、3 匹の動物の各々の組について、計数値を平均し、% 注射された線量/mL 血漿 (ID% /

50

mL)へ変換し、次に、クリアランス速度を評価するためにプロットした(図20)。このデータは、この分子の二相性半減期を決定するため、4かまたは5パラメーター方程式にフィットさせた。4パラメーターフィットは、2.55分の $T_{1/2}$  および64.66分の $T_{1/2}$ の結果を生じた。5パラメーターフィットは、2.13分の $T_{1/2}$  および23.26分の $T_{1/2}$ の結果を生じた。

#### 【0416】

より多量の血漿も、0、30および90分時点で殺したマウスから採取した。これらの試料は、ペプチドと血清タンパク質との会合を評価するため、放射活性検出器と組み合わせたSuperdexペプチドカラム(Pharmacia)へ注入した(図21)。示されているように、標識ペプチドは実際により高分子量のタンパク質と会合しており、ペプチドの二相性半減期クリアランス挙動を説明できる。 10

#### 【0417】

抗血管新生阻害剤としてのペプチドの有効性評価を助けるため、D6を、HUVECを使用する内皮細胞増殖アッセイおよびBrdU検出で試験した。簡単には、新しく単離されたHUVEC(p3~6の間)をRPMI+10%FCs+1%抗生物質+1%L-グルタミン+0.4%BBE(ウシ脳抽出物)で培養し、ウェル当たり、5000~10000/ウェルで100 $\mu$ L蒔いた。細胞は、使用に先立って24時間回復させた。これらの細胞をPBSで2回洗浄し、RPMI+0.1%BSA+1%L-グルタミンに溶解した抗VEGF抗体(陽性対照)またはペプチドA、BおよびC(0.1および10 $\mu$ g/mL)で、48時間処理した。以下の6つの変化させた条件下、2シリーズ(n=4)で試験した： 20

シリーズI： w/o VEGF

シリーズII： w/ VEGF (30 ng/mL)

1. 標準培地：RPMI+10%FCs+1%抗生物質+1%L-グルタミン+0.4%BBE

2. 陰性対照1：RPMI(真の飢餓)

3. 陰性対照2：RPMI+0.1%BSA+1%L-グルタミン

4. 陽性対照：抗VEGF 10 $\mu$ g/mL含有RPMI+0.1%BSA+1%L-グルタミン

5. 0.1 $\mu$ g/mL KDRペプチド含有RPMI+0.1%BSA+1%L-グルタミン 30

6. 10 $\mu$ g/mL KDRペプチド含有RPMI+0.1%BSA+1%L-グルタミン。

#### 【0418】

プロトコール：

- 1) 種々の条件下で48時間細胞をインキュベート
- 2) 24時間目に10 $\mu$ LのBrdU希釈液(EBMで1:100に)を加える
- 3) さらに24時間インキュベート
- 4) 培養培地を吸引
- 5) 各々のウェルに100 $\mu$ LのFixDenat(Roche Applied Science, インディアナポリス, IN)を加え、室温で30分インキュベート 40
- 6) FixDenat溶液を廃棄
- 7) 各々のウェルに100 $\mu$ Lの抗体溶液(PBS 1%BSAおよび抗BrdU PO)を加え
- 8) 室温で90分インキュベート
- 9) PBSで3回洗浄、200 $\mu$ L/ウェル、5分
- 10) 基質溶液(TMB)を加え、10~30分インキュベート
- 11) すべてを可動性プレートへ移す
- 12) 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えることにより反応を停止、25 $\mu$ L/ウェル
- 13) 反応を停止して5分以内に450nmでの吸光度を読み取る。 50

バックグラウンド結合は、対照細胞（完全培地で培養；EBM+BulletKit（Clonetics, BioWhittaker, Inc., MD）を含む4つのウェルで抗BrdUを削除することにより、およびBrdUへ暴露されなかった細胞の完全標識化により、決定した。

【0419】

図22に示されているように、試験された2つのKDR結合ペプチド（D6および配列番号277）の内、D6は抗VEGF抗体（陽性対照）と同様に、VEGF存在下、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でHUVEC増殖を完全に阻害した。一方、配列番号277（ヘテロ二量体を作り上げているペプチドの1つ）は、試験された最も高い濃度（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）においても、このアッセイにおいて増殖を阻害しなかった。結果として、ヘテロ二量体は、配列番号277単独と比較して、VEGFと競合する、増強された能力を示している。

10

【実施例19】

【0420】

Biacore分析 - ペプチド二量体D1およびD7の Maus KDR - Fc 結合

Biacoreを使用し、ペプチド二量体D1（配列番号277および配列番号294のヘテロ二量体）およびD7（配列番号264および配列番号294のヘテロ二量体；図67参照）の Maus KDR - Fc に対する結合定数を決定した。

【0421】

方法

3つの密度の組換え Maus KDR - Fc を、標準アミンカップリング法により、CM5 センサーチップのデキストラン表面に架橋した（ $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 溶液を、 $50\text{mM}$ 酢酸塩、 $\text{pH}6.0$ 、で1:100または1:50に希釈）。対照減算として働かせるため、フローセル1を活性化し、次にブロックした。達成された最終固定化レベル：

20

$$R_L \text{Fc} 2 \text{KDR} - \text{Fc} = 2770$$

$$R_L \text{Fc} 3 \text{KDR} - \text{Fc} = 5085$$

$$R_L \text{Fc} 4 \text{KDR} - \text{Fc} = 9265。$$

【0422】

実験はPBS（ $5.5\text{mM}$ リン酸塩、 $\text{pH}7.65$ 、 $0.15\text{M}$  NaCl +  $0.005\%$  P-20（v/v））中で実施した。対照として行った配列番号277はPBSで $125\text{nM}$ に希釈し、 $62.5$ 、 $31.3$ 、 $15.6$ 、 $7.8$ および $3.9\text{nM}$ 溶液を生じるように一連の希釈を行った。D1およびD6はPBSで $50\text{nM}$ に希釈し、 $25$ 、 $12.5$ 、 $6.25$ 、 $3.13$ 、 $1.56$ 、 $0.78$ および $0.39\text{nM}$ 溶液を生じるように一連の希釈を行った。すべての試料を2重に注射した。会合のため、ペプチドを、kinjectプログラムを使用して、 $30\mu\text{L}/\text{分}$ で3分注射した。10分の解離に続いて、残存するペプチドを、 $75\mu\text{L}/\text{分}$ で12秒の $50\text{mM}$  NaOH +  $1\text{M}$  NaClの急速注射により、KDR表面から剥がした。

30

【0423】

センサーグラムは、BIAevaluationソフトウェア3.1の同時 $k_a/k_d$ フィッティングプログラムを使用して分析した。結果は表15および図23~25に示されている。センサーチップ上のレセプター密度が半分に減少していた場合においてさえも、両方のヘテロ二量体でほとんど同じ $K_D$ 定数が達成されたという事実は、レセプターとの架橋型結合よりもむしろ、個々のレセプターへのヘテロ二量体の多量体型結合と一致している。

40

【0424】

## 【表 16】

表 15 動力学パラメーターの要約

		ka1 (1/Ms)	Kd1 (1/s)	ka2 (1/RUs)	kd2 (1/s)	KD1 <sup>#</sup> (nM)	KD2 <sup>†</sup> (nM)	Chi <sup>2*</sup>
D1	vs. 2700RU	7.94E+05	0.0139	3.31E-04	5.96E-04	17.5	0.751	0.077
	vs. 5000RU	5.54E+05	8.88E-03	1.17E-04	4.57E-04	16.0	0.825	0.323
D7	vs. 2700RU	7.59E+05	0.011	3.36E-04	6.44E-04	14.5	0.848	0.082
	vs. 5000RU	5.21E+05	7.39E-03	1.17E-04	4.68E-04	14.2	0.898	0.278
フルオロ セレン 配列 番号 277	vs. 2700RU	1.02E+06	0.037	-	-	36.4	-	0.073
	vs. 5000RU	5.18E+05	0.0174	-	-	33.6	-	0.167

\*KD1は、 $kd1/ka1$ に基づいて計算されたKdである。

†KD2は、 $kd2/ka1$ に基づいて計算されたKdである（即ち、結合力因子）。

\*chi2値はフィットの近似の標準統計的尺度である。理想のデータに対する良好なフィッティングのためには、chi2は、RU中の機器ノイズと同じ程度の大きさである（典型的には<2）。

## 【実施例 20】

## 【0425】

腫瘍増殖のインビボ阻害

インビボ異種移植片腫瘍モデルを使用して、SW-480ヒト結腸癌に対して抗血管新生活性を有していると疑われた試験物（Test Article）（結合ペプチド、D6）の3つの濃度の有効性を決定するための方法を提供している条件が説明されている。

## 【0426】

無胸腺マウスは、同種および異種細胞の増殖を受容可能な宿主である。ヌードマウスは Points to Consider in the Characterization of Cell Lines used to Produce Biologicals (Points to Consider in the Characterization of Cell Lines used to Produce Biologicals, FDA 1993)、で必要とされている。

## 【0427】

D6は抗血管新生活性を有していると疑われる合成ヘテロ二量体ペプチドである。このペプチドは、高い親和性でヒトVEGFレセプター2（KDR）へ結合し、VEGF結合と競合する。

## 【0428】

SW-480ヒト結腸癌細胞

結腸癌、SW-480細胞（ATCC）は、4mM L-グルタミン、0.1mM非必須アミノ酸、50mg/mLゲンタマイシン、250mg/mLフンギゾンおよび10%熱不活性化ウシ胎児血清を補給した、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）中、95%空気および5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37°Cで培養した。

## 【0429】

指数増殖期の細胞を採取し、トリプシンまたは血清の痕跡を除去するため、リン酸緩衝食塩水（PBS）で2回洗浄した。注射のために、細胞をハックス平衡塩類溶液（HBSS）に懸濁した。

## 【0430】

滅菌リン酸緩衝食塩水（BioWhittaker）を、cGMP規制に従って製造し、適合性を確認するため細胞培養試験を行った；7.3~7.7のpHおよび271~287mOsm/kgの浸透圧モル濃度を有している。PBSは試験物を再構成するための、および媒体調節注射のための媒体であった。

## 【0431】

10

20

30

40

50

シスプラチン ( American Pharmaceutical Partners, Inc. ; ロサンジェルス, CA ) は、製造業者の仕様書に従って製造した。シスプラチンは、BL2 BioChem保護フードを使用して無菌様式で製造した。

#### 【0432】

##### 試験システム

- A . 種 / 株 : ハツカネズミ、Cr1 : NU / NU - nuBRマウス ( ノードマウス )
- B . 性 : メス
- C . 齢 : 処理の開始で6 ~ 8週
- D . 体重範囲 : 体重要求性なし
- E . 供給源 : 動物はCharles River LaboratoriesのGnotobiotic部門、ウィルミントン, MA、から受け取った 10
- F . 数 : 総計で115匹の動物を受け取り、そしてこの研究のために注射し、研究では90匹のマウスが使用された。
- G . 同定の方法 :

マウスは耳タグシステムを使用してただ一つのみの番号付けを行った。さらに、ケージはケージカードを記して、群番号、動物番号、研究番号およびIACUCプロトコール番号を最小限に同定した。

##### H . 無作為化 :

マイクロソフトExcel 97 SR - 1プログラムを使用して、動物を処理群に無作為に帰属させた。 20

##### I . 動物の人道的世話 :

動物の処理および世話は、USDA Animal Welfare Act ( 9 CFR, 1, 2および3巻 ) およびGuide for the Care and Use of Laboratory Animals、を遵守している、Charles River Laboratoriesの標準作業法に従った。

#### 【0433】

この研究プロトコールは、Charles River Laboratories Institutional Animal Care and Use Committee ( IACUCプロトコール番号 : P07182001I ) で保証されている。

#### 【0434】

##### 動物の世話

##### A . 食餌および飲料水 :

マウスにはガンマ線照射齧歯動物用固形飼料をアドリブで給餌した。水道水を滅菌し、ボトルおよびシッパチューブ経由で、アドリブで供給した。

##### B . 動物環境 :

動物は、群分けし、半剛体隔離装置に収容した。マウスは5から10匹の動物を含んでいる平底ケージに収容した。ケージはガンマ線照射した接触床敷きを含んでいた。各々のケージ中のマウス数は、マウスの挙動により変化させてもよく、変更は隔離調査記録に記録した。ハウジングはGuide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, ワシントン, D. C., 1996、およびすべての続いての改訂に示されている勧告に従っている。 40

#### 【0435】

環境調節は、30 ~ 70の相対湿度で、温度を16 ~ 26 ( 70 ± 8 ° F ) を維持するように調節した。12 : 12時間の明 : 暗サイクルを維持した。

##### C . 順化 :

動物を受け取ったら、研究開始に先だって24時間、実験室環境に順化させた。疾患の徴候、異常な食物および / または水の消費、またはその他の不十分な条件の一般的徴候についてマウスを観察した。動物受け取りの時点で、動物を臨床的に観察し、健康であると思われた。

## 【0436】

## 実験設計

## A. 一般的説明：

6～8週齢のメス無胸腺ヌードマウス(Cr1:NU/NU-nuBR)をこの研究で使用した。総計で115匹のマウスに、 $5 \times 10^6$  SW-480ヒト結腸癌細胞を皮下で、右胸側面へ注射した。腫瘍が、約 $150 \pm 75$  mgの標的ウインドサイズに達した時、90匹の腫瘍-所有マウスを無作為に選択し、9つの群の1つへ分配した。試験物および媒体は腹腔内(IP)に投与し、シスプラチンは静脈内(IV)へ投与した。手に持ったカリパスを使用する腫瘍測定を、週に2回記録した。マウスは毒性および病的状態の徴候について毎日モニターした。研究終了時、動物を過剰量の二酸化炭素で安楽死させ、組織収集のために剖検した。

## B. 群帰属：

総計で9群をこの研究で使用した。各々の群は10匹の腫瘍-所有マウスを含んでいた。群1および2は各々、非処置および媒体処置の陰性対照マウスを含んでいた。群3、4および5は、D6抗血管新生ペプチドの3つの異なった濃度の1つを受けたマウスを含んでいた。群9は、陽性対照として、標準化学療法化合物であるシスプラチンを受けたマウスを含んでいた。

## C. 投与量レベルおよび投与計画：

各々の群に対する投与量レベルが表16に提供されている。投与は、動物を無作為に群に選別した日と同じ日に始めた(研究日7)。各々の動物のため、各々の投与量を、無菌技術を使用して投与量バイアルから取り、注射部位を、投与量の投与に先だってアルコール綿棒で拭いた。投与量は、各々のマウスのための1 mL注射器および27ゲージ×1/2"ニードルで投与した。

## 【0437】

試験物処置および媒体処置マウスには、15日の間、毎日腹腔内(IP)注射を行った。シスプラチンは1仕事日おきに、総計で5回、静脈内経路で投与した。

## 【0438】

## 【表17】

表16 研究処置群

群	試験物	濃度 mg/kg	動物数
1	非処置	—	10
2	媒体	0	10
3	D6	0.05	10
4	D6	0.5	10
5	D6	5.0	10
9	シスプラチン	6.0	10

## 【0439】

## D. 動物の臨床観察：

各々の動物の臨床観察は、毒性、病的状態および死亡率について、少なくとも1日1度実施し、記録した。病的状態には、痩せ、脱水、嗜眠、背を曲げた姿勢、ぼさぼさの外観、呼吸困難、および尿または糞着色のごとき病気の徴候を含むが、これらに限定されるわけではない。

## E. 腫瘍測定：

プロトコルに従い、校正されたカリパスで腫瘍の長さおよび幅を測定することにより、研究を通して週に2回腫瘍測定を行った。測定は最低限3～4日離して行ったが、ただし、動物を安楽死させた場合は測定を行った；このことで、時には3日未満の間隔を生じることがあった。腫瘍重量は、以下の式： $mg = (L \times W^2) / 2$ 、を使用して計算した。平均腫瘍重量が、2回連続の測定で群当たり1000 mgであるか、または腫瘍が潰

瘍化し、歩き回るまたは食物および水を摂取する動物の能力を害するような場合、動物を安楽死させた。

F. 臨時の安楽死および予定外の死：

1. 臨時の安楽死：

研究の間、臨時の安楽死を必要とする動物はいなかった。

2. 予定外の死：

研究の間、動物は死亡しなかった。

G. 剖検：

1. 安楽死および剖検注文：

群1、2、3、4および5のすべてのマウス（総計50）は、群内で、2回連続して腫瘍が1000mg以上の群平均標的サイズに達した場合に剖検を寄託した。動物は剖検のためCharles River Laboratories Health Monitoring Laboratory (HM), ウィルミントン, MA、へ寄託した。試験物処置群で平均腫瘍サイズが1000mgであったので、試験物の容認された全28日処置計画より短い、すべての動物は研究日22に安楽死させた。すべての動物は、二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)吸入により、人道にかなって安楽死させた。

2. 組織採集：

腫瘍は、取り巻く組織およびかぶっている皮膚を含まないように切り裂いた。さらに腎臓を採集した。腎表面に何ら異常は認められなかった。

【0440】

各動物について腫瘍および腎臓の凍結ブロックを作製した。組織の代表的切片（腫瘍、腎臓）をとった。腎臓切片は皮質および髄質を含んでいた。組織切片はラベルを付けたプラスチック-凍結用成型物の底に置いた。組織はOCT培地で包埋した。ブロックは、ドライアイスで冷却したイソペンタン内に凍結するまで浸けた。ブロックの質を簡単に検査し、ドライアイス上に保存した。

【0441】

ブロックに、動物番号および組織に対応する文字コード（A = 左腎臓；B = 右腎臓；C = 腫瘍）を記したラベルを付けた。1匹の動物からのブロックを、ラベルを付けた袋に入れた。

【0442】

結果

A. 生存中の測定および観察：

1. 臨床観察、病的状態および死亡率の要約：

すべての動物は健康に思われ、研究を通して正常限界内であった。D6はこの研究で使用された投与量では毒性の徴候を示さなかった。

【0443】

動物は研究日22に安楽死させた。群1～8では平均腫瘍サイズが1000mgであったので、群9のマウスを除いたすべてのマウスを、試験物投与を完了する前に安楽死させた。シスプラチン処置動物は研究日22に安楽死させたが、その時、平均腫瘍重量は996mgであった。研究期間中に死亡した動物はいなかった。

2. 腫瘍触診要約：

研究を通して、触診できる腫瘍がすべてのマウスで検出され、腫瘍は研究の継続期間の間、段々に成長した。予期されるように、非処置および媒体処置陰性対照マウス（群1および2）中の腫瘍は最も速く成長し、研究日20に、またはその前に1000mgの平均腫瘍サイズに到達した。加えて、シスプラチンで処置した動物（群9）も腫瘍を発育させたが、その成長は最も遅く、研究終了時（日22）で996mgの平均腫瘍サイズに達した。

【0444】

一般に、群3のマウスを除き、試験物で処置したすべての動物で、腫瘍成長がより遅かった（図68）。低用量（0.05mg/kg）のD6で処置した、群3の動物は、群1

10

20

30

40

50

および2の非処置および媒体処置動物とほとんど同じ速度で成長した腫瘍を有していた。より高い用量(群4および5)のD6で処置した動物は、より遅く成長した腫瘍を有していた;研究日21に1000mgの平均腫瘍サイズに達する。対照群1および2のマウスと比較した場合、試験物処理は、約1日の腫瘍成長の遅延を生じた。

#### B. 結論:

対照群1および2および陽性対照群9の、腫瘍所有マウスが予期されるように応答したので、この研究のデータから使用したモデルが妥当であることを確認できる。

#### 【0445】

研究を通して、触診できる腫瘍がすべての群で観察された。加えて、すべての動物は研究を通して健康でありおよび正常限界内であった。さらに、D6は動物に悪い影響を与えなかった。それ故、これらのデータは、D6試験物で処置した動物がゆっくりと成長する(22日の試験期間の終わりまでで対照より約1日遅い)腫瘍を有していたことを示唆するであろう。また、試験物は有意の毒性効果を示さなかったため、試験物のより高い濃度も、より良好な腫瘍緩解の可能性を持って使用できる。

#### 【0446】

#### 【表18】

表17

	試験物							腫瘍重量 (mg)
	非処置	媒体	D6			シプラチン		
	対照	対照	0.005mg/kg	0.05mg/kg	0.5mg/kg	6mg/kg		
細胞注射後の日数	4	48	49	43	51	50	34	
	7	164	156	157	163	154	160	
	8	180	164	156	133	168	173	
	11	340	388	333	298	310	407	
	14	684	648	726	596	577	675	
	20	1064	986	973	857	978	635	
	21	1412	1571	1468	983	1056	839	
	22	1967	1863	2026	1474	1526	995	

#### 【実施例21】

#### 【0447】

#### インビトロ細胞増殖アッセイ

微小血管内皮細胞(MVEC, Cascade Biologics, ポートランド, OR)をD6および関連類似体のVEGF-刺激増殖阻害能力を評価するために使用した。MVEC(継代2)を90%コンフルエントまで増殖させ、トリプシン処理し、 $4.8 \times 10^3$ 細胞/ウェルの密度で、ゼラチン被覆96ウェルマイクロタイタープレートに蒔いた。蒔いて16から20時間後、ウシ胎児血清は全くないが、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含んでいる培地で1回洗浄した(200 $\mu$ L/ウェル)。各々のウェルへ新鮮なBSA含有培地を加え、さらに24時間インキュベートした。この24時間の飢餓期間後、D6を含む、または含まない新鮮なBSA含有培地(25ng/mLのVEGFを含んでいる)を加え、細胞をさらに37 $^{\circ}$ Cで48時間インキュベートした。このアッセイにおける用量応答を評価するため、複数のD6濃度を2重のウェルで試験した。培地を除去し、BrdUを含む、または含まない新鮮なBSA含有培地を加え、製造業者により説明されているように取り込みのレベルを正確に決定するのに先立って、さらに24時間インキュベートした。結果は図84に示されている。

#### 【実施例22】

#### 【0448】

以下の実験は、培養におけるHUVECのVEGF-誘導遊走を阻止するD25およびD27の能力を評価し、加えられたグリコシル化および/またはD27で使用された特有のスペーサー構造がその有効性を促進することを示している。

#### 【0449】

プロトコール：血清 - 飢餓 H U V E C を、ウェル当たり 1 0 0 , 0 0 0 細胞で、B D フィブロネクチン - 被覆 F l u o r o B l o k 2 4 ウェル挿入プレートの上部チャンパー内に置いた。D 2 5 または D 2 7 の存在下または不在下、V E G F ( 1 0 n g / m L ) を含む、または含まない基本培地をウェルの下部チャンパーへ加えた。2 2 時間後、蛍光色素で挿入プレート内の細胞を後標識し、浸潤 / 遊走細胞の蛍光を蛍光プレートリーダーで測定することにより細胞遊走 / 浸潤の定量を達成した。ウェルの下部チャンパーに基本培地のみを置いた場合に起こった遊走量を差し引くことにより、各々の実験条件の V E G F - 誘導遊走を計算した。

#### 【 0 4 5 0 】

結果：V E G F は、本アッセイにおいて内皮細胞遊走を大きく増加させ、それは D 2 5 および D 2 7 の両方で強く阻止された ( 図 6 9 ) 。 D 2 7 は D 2 5 より 1 0 倍強力であり ( 各々、 $I C_{50}$  0 . 5 n M および 5 n M ) 、 D 2 7 のグリコシル化および / またはその特有のスペーサー特性が、K D R へ結合するおよび V E G F の効果を阻止する、その能力を促進したことを示している。

10

#### 【 実施例 2 3 】

#### 【 0 4 5 1 】

以下の実験は、D 6 により生じる培養における H U V E C の V E G F - 誘導遊走阻止を促進する、T K P P R ペプチドの「添加物 ( A d j u n c t ) A 」多量体構築物 ( 配列番号 5 0 3 ; K D R により媒介される V E G F の効果を促進する V E G F レセプター、N P - 1 に結合) の能力を評価した。添加物 A = 5 C F - G L Y - N { [ C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C ( = O ) - G l y - N ( C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C ( = O ) - A d o a - T h r - L y s - P r o - P r o - A r g - O H ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> 式中、A d o a = 3 , 6 - ジオキサ - 8 - アミノオクタノイル , 5 C F = 5 - カルボキシフルオレセイニル。

20

#### 【 0 4 5 2 】

プロトコール：血清 - 飢餓 H U V E C を、ウェル当たり 1 0 0 , 0 0 0 細胞で、B D フィブロネクチン - 被覆 F l u o r o B l o k 2 4 ウェル挿入プレートの上部チャンパー内に置いた。濃度を変化させた D 6 、または一定の 1 0 0 n M 添加物 A ( W O 0 1 / 9 1 8 0 5 A 2 に記載されているように合成) と組み合わせた、濃度を変化させた D 6 、の存在下または不在下、V E G F ( 1 0 n g / m L ) を含む、または含まない基本培地をウェルの下部チャンパーへ加えた。2 2 時間後、蛍光色素で挿入プレート内の細胞を後標識し、浸潤 / 遊走細胞の蛍光を蛍光プレートリーダーで測定することにより細胞遊走 / 浸潤の定量を達成した。V E G F 不在下で観察された遊走量を差し引くことにより、各々の実験条件の V E G F - 誘導遊走を計算した。

30

#### 【 0 4 5 3 】

結果：V E G F は、本アッセイにおいて内皮細胞遊走を大きく増加させ、それは D 6 により強く阻止されたが (  $I C_{50}$  約 1 2 . 5 n M ) 、1 0 0 n M 添加物 A 単独では阻止されなかった ( 図 7 0 ) 。しかしながら驚くことに、添加物 A を D 6 と同時にアッセイで使用した場合、D 6 の有効性を約 1 0 倍促進することができた (  $I C_{50}$  約 2 . 5 n M ) 。このことは、添加物 A に見られる T K P P R 配列 ( または類似物 ) を含んでいる化合物は、K D R への結合に対して V E G F と競合する D 6 のごとき特定の化合物の有効性を促進するために使用できることを示している。加えて、1 つまたはそれより多い繰り返しで、添加物 A に見られるペプチド配列 ( または類似物 ) 、並びに T K P P R 配列 ( または類似物 ) を含んでいるヘテロ二量体は、このアッセイにおいて促進された活性を所有するであろう。

40

#### 【 実施例 2 4 】

#### 【 0 4 5 4 】

##### D 2 7 の合成

##### 1 および 3 の合成 ( 図 7 1 および 7 2 参照 )

単量体の合成は、出発樹脂として F m o c - G G G K ( i V - D d e ) N H - P A L - P E G - P S 樹脂を用いる 0 . 2 5 ミリモル規模において方法 5 に記載したように実施し

50

た。ペプチド樹脂を、切断または自動化または人力での方法によるさらなる誘導体化の前に洗浄および乾燥した。

【0455】

方法：ペプチド2およびペプチド4の合成（図71および72参照）

1および3への、ピオチン-JJ、リシル、グルシルおよびセリニル（GalNAc（Ac）<sub>3</sub>-D）部分の付加体は、方法6および方法8に記載したとき手操作SPPSにより実施した。アミノ酸のカップリングは、HOBt/DIC活性化（Ser（GalNAc（Ac）<sub>3</sub>-D）を除いて）を使用し、DMF中で実施した。Fmoc除去は、20%ピペリジンDMF溶液で実施した。すべてのカップリングは5~16時間の持続時間であった。各々のカップリング後、完了をカイザー（Kaiser）試験により確認した。Ser（GalNAc（Ac）<sub>3</sub>-D）の場合、カップリング剤としてHATU/DIEAを用いて、DMF中で実施した。カイザー試験が未反応アミノ基を示した場合、カップリングを繰り返した。N末端Fmoc基の除去、および樹脂からの切断を実行した。粗ペプチドをエーテル中で沈殿し、エーテルで2回洗浄し、真空下で乾燥した。直鎖状粗ペプチドは、ペプチドをDMSOに溶解することにより（40mg/mL）直接環化した。N-メチルグルカミン水溶液の添加により、溶液のpHを8に調整し、溶液を空気雰囲気下、室温で48時間撹拌した。ペプチドは次に、Waters-YMC C-18 ODS分取カラム（250mm×4.6mm内径）を用いる、方法1に記載したような濃度勾配HPLCを用いて精製した。純粋な生成物を含んでいる分画を合わせ、凍結乾燥すると、必要とされるペプチドを得た。

10

20

【0456】

方法：D27-化合物6の合成（図73参照）

グルタル酸ビス-NHSエステル（0.122ミリモル、Pierce Scientific Co.）の無水DMF溶液へ、4のDMF溶液（40mg、0.0122ミリモル、ペプチドに結合しているトリフルオロ酢酸および反応の間に形成されるN-ヒドロキシスクシンイミドを中和するためにDIEAが加えられている）を滴加した。この0.7mL溶液を4時間撹拌した。反応は、HPLCおよび質量分析法によりモニターした。真空下でDMFを除去した。過剰のジエステルは酢酸エチルの添加により除去し、それは、ペプチド-モノエステル5を沈殿させると同時に、グルタル酸ビス-NHSエステルを溶解する。混合物を遠心分離し、液体部分をデカンドした。これを2回繰り返した。残渣は真空下に10分維持した。残渣をDMFに溶解し、2（37mg、0.009ミリモル）のDMF溶液（pH7）と混合した。それは室温で16時間撹拌した。高真空下で揮発物を除去し、残渣を1mLのヒドラジン/MeOH（15/85、v/v）と室温で2.5時間撹拌して処理することにより、アセテート機能を取り除いた。過剰のヒドラジンをクエンチするためにアセトンを加え、真空下で揮発物を除去した。生じた残渣をDMSOに溶解し、前記のように分取HPLCにより精製すると、9mgの純粋な物質を得た。

30

【0457】

【表 19】

ペプチド 2、4 および 6 の配列および分析データ

化合物 識別名	配列	HPLC 保持時間 (システム)	質量スペクトル (ESI、陰イ オン)
ペプチド 2 : 新規配列、 配列 1 1 誘 導体	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{ヒ <sup>+</sup> オチン-JJK[NH <sub>2</sub> - Ser(GalNAc(Ac) <sub>3</sub> -α-D)-Gly-Ser(GalNAc(Ac) <sub>3</sub> - α-D)]-NH <sub>2</sub>	7.4分 (T)	2041.3[M-2H]/2
ペプチド 2 : 配列 5 誘導 体	Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(NH <sub>2</sub> Ser(GalNAc (Ac) <sub>3</sub> -α-D)-Gly-Ser(GalNAc(Ac) <sub>3</sub> -α-D)-NH <sub>2</sub>	8.0分 (T)	1636.3[M-2H]/2
D 2 7	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Ac- VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK[S(GalNAc-α-D)-G- S(GalNAc-α-D)-Glut-S(GalNAc-α-D)-G- S(GalNAc-α-D)-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(ヒ <sup>+</sup> オチン-JNH- )C(=O)-]-NH <sub>2</sub> }-NH <sub>2</sub>	5.50分 (M)	1737.2(M- 4H)/4;1389.3(M- 5H)/5;1157.7(M- 6H)/6

システム T: カラム: Waters XTerra, 4.6 x 50mm; 溶出液: A: 水 (0.1% TFA)、  
B: ACN (0.1% TFA); 溶出: 初期条件、15%B、直線濃度勾配 15-50%B 8分で; 流速: 3  
.0mL/分; 検出: UV@220nm.

## 【実施例 25】

## 【0458】

インビトロアッセイによる結合親和性および生物学的有効性の相違の証明

以下の実験は、ヘテロ多量体ペプチドが、同一の標的に対して類似の結合親和性を有する単量体ペプチドよりも大きな生物学的有効性を示すことができることを明らかにしている。

## 【0459】

プロトコール実験 1: 293H細胞を実施例 5 に記載した標準技術により、KDR cDNA または Mock トランスフェクトした。細胞を配列番号 504 または D1 (300、30、3 および 0.3 nM で) の存在下または不在下で、<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup> I-VEGF とインキュベートした。VEGF 結合の阻害率は、式 [(Y1 - Y2) x 100 / Y1]、式中、Y1 はペプチド不在下での KDR - トランスフェクト 293 細胞への特異的結合であり、および Y2 はペプチド競合剤存在下での KDR - トランスフェクト 293 細胞への特異的結合である、を使用して計算した。KDR - トランスフェクト 293 細胞への特異的結合は、KDR - トランスフェクト 293 細胞への結合から Mock トランスフェクト細胞への結合を差し引くことにより計算した。

## 【0460】

プロトコール実験 2: 血清 - 飢餓 HUVEC を、ウェル当たり 100,000 細胞で、BD フィブロネクチン - 被覆 FluoroBlock 24 ウェル挿入プレートの上部チャンパー内に置いた。濃度を増加させた配列番号 504 または D1 の存在下または不在下、VEGF (10 ng/mL) を含む、または含まない基本培地をウェルの下部チャンパーへ加えた。22 時間後、蛍光色素で挿入プレート内の細胞を後標識し、浸潤 / 遊走細胞の蛍光を蛍光プレートリーダーで測定することにより細胞遊走 / 浸潤の定量を達成した。VEGF - 刺激遊走は、VEGF 不在下で測定された基本遊走量を差し引くことにより誘導した。

## 【0461】

結果 実験 1: 図 74 に示したように、配列番号 504 および D1 は、KDR - トラン

10

20

30

40

50

スフェクト細胞への結合に対して、<sup>1 2 5</sup> I - V E G Fとほとんど等しく競合し、それらは同等の結合親和性、ならびにK D Rへの結合からV E G Fを阻害する同等の能力を有していることを示している。

【0462】

結果 実験2：配列番号504およびD1の両方が、同じ程度にK D R発現細胞への<sup>1 2 5</sup> I - V E G F結合を強く阻止する(図75)という事実にもかかわらず、ヘテロ二量体D1は、内皮細胞遊走アッセイで示されたように、V E G Fの生物学的効果の阻止において、単量体配列番号504より強力であった(図75)。62.5 nMまで、配列番号504はV E G F - 刺激遊走に対して効果を有しなかったのに対し、D1は、50 nMでV E G F - 刺激遊走を完全に阻止した。

10

【実施例26】

【0463】

K D R結合活性を有する配列番号356の断片の同定

以下の実験は、配列番号356の断片が著しいK D R結合活性を維持できることを示している。

【0464】

プロトコール：293H細胞を実施例6に記載した標準技術により、K D R c D N AまたはM o c kトランスフェクトした。細胞へのストレプトアビジン - H R Pの結合は、0から250 nMまたは0から1000 nMの以下の競合ペプチド：配列番号356、462、463および465、の存在下、5.5 nMの複合体濃度で、実施例6のように実施した。各々の実験条件下で特異的結合を決定した後、各々のペプチドのI C<sub>50</sub>を決定した(可能な場合)。

20

【0465】

結果：表18に示したように、A s p - T r p - T y r - T y r(配列番号490)結合モチーフのみから構成され、それはまた、ファージディスプレイデータに基づいて合成されたほとんどの単量体ペプチドに付加されている非標的化G l y - G l y - G l y - L y s(配列番号286)配列とともに配列番号286と共有されている、配列番号462が、1マイクロモル以下のI D<sub>50</sub>でペプチド/ストレプトアビジン - H R P複合体結合を阻止できる最も小さい断片であった。驚くことに、配列番号356から誘導されたより大きな断片は、1マイクロモルで複合体結合を有意に阻止できなかった。しかしながら、可溶化モチーフ、(G l y - A r g - G l y)<sub>3</sub>を後者のペプチドに加えて配列番号465を作製した場合、それは175 nMのI D<sub>50</sub>で、結合に対して複合体と競合でき、A s p - T r p - T y r - T y r(配列番号490)モチーフを含んでいる配列番号356の特定の断片がK D R結合活性を保持していることが確認された。

30

【0466】

【表20】

表18 K D R - 発現細胞への結合に対して、結合ペプチドおよびストレプトアビジン - H R Pから構成された複合体と競合する置換アッセイにおける配列番号356の断片。

40

断片 (配列番号)	I C <sub>50</sub> , nM
356	93
462	850
463	>1000
465	175

【実施例27】

【0467】

K D R / V E G F複合体結合剤結合のための、細胞に基づいたアッセイ

K D R / V E G F複合体へ選択的に結合する、K D R / V E G F複合体結合ペプチドの

50

能力が示された。

【0468】

試薬調製

このアッセイのための試薬は、以下に示す点を除いて、実施例5に記載されたように調製した。

【0469】

ペプチド - <sup>1 2 5</sup> I - ニュートラアビジン溶液の調製

ビオチニル化ペプチド配列番号321、320および323、およびビオチニル化非結合対照ペプチドを、1.25 μM保存50% DMSO溶液を調製するために使用した。<sup>1 2 5</sup> I - ストレプトアビジンの33.33 nM保存溶液は、Amersham (バッキンガムシア、英国)から購入した。13.33 nM <sup>1 2 5</sup> I - ストレプトアビジン / 100 nM VEGF保存溶液は、850 mLの<sup>1 2 5</sup> I - ストレプトアビジンと22 μLの10 μM VEGFおよび1275 μLのM199培地を混合することにより調製した。他の保存溶液も同様の様式で調製したが、しかしVEGFを欠いていた。13.33 nMペプチド - <sup>1 2 5</sup> I - ストレプトアビジン複合体溶液 ± VEGFを調製するため、500 μLの<sup>1 2 5</sup> I - ストレプトアビジン (VEGFを含む、または含まない)保存溶液 (最後の工程で調製された)を、24 μLの配列番号321、320および323、または対照ペプチドの1.25 μMペプチド溶液と混合した。混合物は4にて60分、回転板上でインキュベートし、続いて、過剰のペプチドを除去するために50 μLのソフトリリースアビジン - セファロース (ddH<sub>2</sub>O中での50%スラリー)を加え、さらに4にて30分、回転板上でインキュベートした。最後に、12,000 rpmで5分間、室温で遠心分離することにより、ソフトリリースアビジン - セファロースをペレット化し、得られた上清をアッセイに使用した。

【0470】

KDR - トランスフェクト細胞へのペプチド / ニュートラアビジンHRPの結合

VEGF存在下または不在下、対照ペプチドおよび試験ペプチド (配列番号321、320および323)と<sup>1 2 5</sup> I - ストレプトアビジンの複合体 (上記のように調製)を、KDRで一過性にトランスフェクトした293H細胞に結合する能力について試験した。配列番号321と<sup>1 2 5</sup> I - ストレプトアビジンの複合体は、VEGF存在下、Mockトランスフェクト細胞と比較して、KDR - トランスフェクト293H細胞へ特異的に結合したが (図76)、VEGFが除かれている場合は結合しなかった (図77)。配列番号321はまた、蛍光偏光およびSPR (Biacore)アッセイを使用して試験するペプチドの中で最良のKDR / VEGF複合体結合剤でもあった (表9)。この実施例は、ペプチド (配列番号321)が細胞表面上に存在するKDR / VEGF複合体へ特異的に結合できることを示している。このことは、診断または治療目的のため、インビトロおよびインビボでの、KDR / VEGF複合体標的化のために有用であるアッセイの有用性を確立している。KDR / VEGF結合ペプチドは、機能的および活性なKDRレセプターのみを検出し、細胞表面上に存在するすべてのKDRを検出するわけではないので、腫瘍、転移、糖尿病性網膜症、乾癬および関節症における、活性な血管新生の検出、および / または処置に有用であろう。

【実施例28】

【0471】

単一標的分子上の2つのエピトープを標的とするヘテロ二量体ペプチドが、標的分子上の、2つのエピトープの1つを結合するホモ二量体より優れているであろう、より多くの証拠。

【0472】

以下の実験は、ヘテロ二量体構築物が、ペプチド増殖因子またはサイトカインの生物学的効果を阻止する能力で、ホモ二量体ペプチドより優れている、さらなる証拠を提供する。

【0473】

10

20

30

40

50

プロトコール：血清 - 飢餓 H U V E C を、ウェル当たり 100,000 細胞で、B D フィブロネクチン - 被覆 F l u o r o B l o k 24 ウェル挿入プレートの上部チャンパー内に置いた。濃度を増加させたホモ二量体 D 8 またはヘテロ二量体 D 17 の存在下または不在下、V E G F を含む、または含まない基本培地をウェルの下部チャンパーへ加えた。22 時間後、蛍光色素で挿入プレート内の細胞を後標識し、浸潤 / 遊走細胞の蛍光を蛍光プレートリーダーで測定することにより細胞遊走 / 浸潤の定量を達成した。

## 【0474】

結果：V E G F は、本アッセイにおいて内皮細胞遊走を大きく増加させ、それは D 17 により強く阻止されたが、D 8 では阻止されなかった。D 17 は V E G F - 誘導遊走を約 250 nM の  $I C_{50}$  で阻止したが、一方、D 8 は 800 nM でさえも遊走には何の有意な影響を与えなかった。これは、D 8 が配列番号 356 で観察される完全標的化配列を使用し、一方、D 17 は、K D R に対する低親和性を有する（実施例 26 で示されたように）配列番号 356 配列の切り詰め体を含んでいるという事実にもかかわらずであった。

10

## 【実施例 29】

## 【0475】

6 および 13 位の C y s 残基が、対のアミノ酸に置き換えられた、1 つがカルボキシを運ぶ側鎖 (G l u かまたは A s p) および他がアミノを運ぶ側鎖 [L y s または D p r (2, 3 - ジアミノプロパン酸)]、アミノ基配列番号 301 のジスルフィド結合置換類似体を製造した。配列番号 301 (ジスルフィド結合の形成により作製された) に含まれているものと同一の配列位置を含んでいる環を、側鎖アミノおよび側鎖酸部分の縮合により作製し、配列番号 301 のジスルフィド結合により行われているような、残基 6 ~ 13 を架橋するラクタム環を得た。

20

## 【0476】

下記表 19 は、ラクタム類似体において、配列番号 301 の C y s<sup>6</sup> および C y s<sup>13</sup> に行われた、置換のいくつかの例を示している。

## 【0477】

## 【表 21】

表 19

配列番号 301 のラクタム類似物			
配列	位置 6	位置 13	配列番号 301 に対する環サイズの相違
配列番号 301 (親配列)	C y s	C y s	—
453	G l u	L y s	4
454	L y s	G l u	4
455	D p r	A s p	0
456	A s p	D p r	0
457	A s p	L y s	3

30

## 【0478】

## 樹脂結合ペプチド 1 の合成

1 の合成は 0.25 ミリモル規模での方法 5 を使用して実施した。ペプチド樹脂 1 を洗浄して乾燥し、人力でさらに誘導體化した〔図 78 参照〕。

## 【0479】

## 4 [配列番号 453] の合成

1 (240 mg、0.06 ミリモル) へ N M M (N - メチルモルホリン) / H O A c / D M F 1 / 2 / 10 (v / v / v) (65 mL) を加えた。トリス - トリフェニルホスフィンパラジウム [P d (P P h<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 554.4 mg, 0.48 ミリモル] を加え、樹脂を遮光して 20 時間振とうした。樹脂を濾過し、ジエチルジチオカルバメートナトリ

40

50

ウム ( 0 . 5 g ) / D I E A ( 0 . 5 m L ) / D M F ( 1 0 0 m L ) 溶液で、最後に D M F ( 3 × 7 0 m L ) で洗浄した。この処理は、ラクタム形成反応に必要とされる G l u 6 および L y s 1 3 のカルボキシおよびアミノ基のみを露出するために働いた。2 の樹脂上の環化は、H A T U ( 1 1 4 m g , 0 . 3 ミリモル )、N M M ( 6 6 μ L , 0 . 6 ミリモル ) および D M F ( 1 0 m L ) を使用して 3 時間実施した。環化の完了はカイザー試験によりモニターした。試薬 B を 4 時間使用して、ペプチド樹脂 3 からペプチドを切断した。樹脂を濾過し、濾液を蒸発させてペーストとした。粗ペプチドをエーテル中で沈殿させ、エーテルで 2 回洗浄した。環状ペプチドは、溶出液として H<sub>2</sub>O への C H<sub>3</sub> C N ( 両方とも 0 . 1 % T F A を含んでいる ) を用い、W a t e r s - Y M C C - 1 8 カラム ( 2 5 0 m m × 3 0 m m 内径 ) を使用する分取逆相直線濃度勾配 H P L C により精製した。生成物含有分画の凍結乾燥は、8 m g の配列番号 4 5 3 を与えた。配列番号 4 5 4、4 5 5、4 5 6 および 4 5 7 を同様に製造した。

10

## 【実施例 3 0】

## 【0 4 8 0】

K D R 結合活性を保持しながらのジスルフィド架橋の置換

以下の実験は、ラクタム配列番号 4 5 4 が有意な K D R 活性を維持するように、化学的に反応性のジスルフィド架橋を置き換えたことを示した。

## 【0 4 8 1】

プロトコール：2 9 3 H 細胞を実施例 6 に記載した標準技術により、K D R c D N A または M o c k トランスフェクトした。ストレプトアビジン - H R P 複合体は実施例 6 のように調製した。細胞へのストレプトアビジン - H R P の結合は、0 から 2 5 0 n M の配列番号 4 5 4 存在下、5 . 5 n M の複合体濃度で、実施例 6 のように実施した。各々の実験条件下で特異的結合を決定した後、各々のペプチドの I C<sub>50</sub> を決定した ( 可能な場合 ) 。

20

## 【0 4 8 2】

結果：表 2 0 に示したように、ラクタムジスルフィド架橋置換を含んでいる、配列番号 4 5 4 は、今まで通り K D R への結合に対してペプチド - ストレプトアビジン - H R P 複合体と競合できたが、幾分の親和性は失われていた ( I C<sub>50</sub> 1 0 8 n M 対 1 3 n M ) 。

## 【0 4 8 3】

## 【表 2 2】

表 2 0 K D R - 発現細胞への結合に対し、ストレプトアビジン - H R P / 結合ペプチド複合体と競合する置換アッセイにおける、結合ペプチドおよび配列番号 4 5 4 ( ジスルフィド架橋置換類似物 ) 。

30

断片 (参照番号)	I C <sub>50</sub> , n M
結合ペプチド	1 3
4 5 4	1 0 8

## 【実施例 3 1】

## 【0 4 8 4】

M D A - M B - 2 3 1 細胞に対する c M e t 結合ペプチド / アビジン H R P の結合

この実施例は、最適化されたリンカーおよび / またはスペーサーを有するホモ二量体を作製する利点を示している。

## 【0 4 8 5】

c - M e t 発現 M D A - M B - 2 3 1 細胞に対する c M e t 結合ペプチドのビオチニル化誘導体、配列番号 4 8 2 の、結合のためのスペーサー長を決定した。ペプチドおよびビオチン間に置かれるべきスペーサー長を決定するため、スペーサーがない、1 つの J スペーサーまたは J J スペーサーを有する配列番号 4 8 2 を合成した。ニュートラアビジン H R P と、c M e t 結合ペプチド配列番号 4 8 2 のこれら 3 つの異なった誘導体および c -

40

50

M e t へ結合しない対照ペプチドは四量体複合体として、c - M e t 発現 M D A - M B - 2 3 1 細胞へ結合するそれらの能力について試験した。c M e t 結合ペプチドの3つの四量体複合体すべてが、対照と比較すると M B - 2 3 1 細胞へ結合した；しかしながら、2つのスペーサーを有する誘導体が最もよい  $K_D$  ( 1 2 . 6 2 n M ) を示した。このことは、c M e t 結合ペプチドおよびビオチン間の2つの J J - スペーサーの包含は、1つのスペーサーまたはスペーサー無しよりもよいことを示唆している。

【 0 4 8 6 】

細胞培養：M D A - M B 2 3 1 細胞は A T C C から得られ、それらに推薦されている培地に 1 m L / L ペニシリン / ストレプトマイシン ( I n V i t r o g e n , カールスバット, C A ) を加えて、単層培養で増殖させた。細胞はアッセイの前日に分割し、9 6 ウェルプレート 10  
の各々のウェルへ 3 5 0 0 0 細胞を加えた。実験の残りは、以下に注意したことを除いて実施例 6 のように実施した。

【 0 4 8 7 】

M D A - M B - 2 3 1 細胞へのペプチド / ニュートラアビジン H R P の結合

対照ペプチド、および 0、1 または 2 の J スペーサーを有する配列番号 4 8 2 とニュートラアビジン - H R P の複合体は、上記のように製造し、M D A - M B - 2 3 1 細胞を結合するそれらの能力を試験した。ペプチド / ニュートラアビジン H R P 複合体製造の間、ニュートラアビジン上の4つすべてのビオチン結合部位が占拠されることを確実にするため、ニュートラアビジン - H R P よりも 7 . 5 倍過剰のビオチニル化ペプチドを使用した。複合体形成後、遊離ビオチニル化ペプチドおよびニュートラアビジン H R P - 複合体化 20  
ビオチニル化ペプチド間の競合を避けるため、過剰の遊離ビオチニル化ペプチドはソフトリリースアビジン - セファロースを使用して除去した。スペーサー無し、または1つのスペーサーを有する誘導体の飽和結合曲線を発生させるため、0 . 2 8 n M から 3 3 . 3 3 n M の ( 図 8 0 )、および2つのスペーサーを有する誘導体の飽和結合曲線を発生させるため、0 . 2 8 n M から 1 6 . 6 5 n M の ( 図 8 0 )、いくつかの異なった濃度のペプチド / ニュートラアビジン H R P で実験を実行した。飽和結合曲線を描くため、試験された各々の濃度に対する結合誘導体ペプチド / ニュートラアビジン H R P 複合体の結合から、対照ペプチド / ニュートラアビジン H R P 複合体のバックグラウンド結合を差し引いた。それ故、図 8 0 の Y 軸の吸光度は、差吸光度であり ( c - M e t 結合ペプチドから対照ペ 30  
プチドを差し引いた )、絶対吸光度ではない。G r a p h P a d P r i s m ソフトウェア ( バージョン 3 . 0 ) を使用した飽和結合データの分析により、2つのスペーサーを有する四量体誘導体に対しては 1 2 . 6 2 n M ( ± 3 . 1 6 ) の  $K_D$ 、1つのスペーサーを有する四量体誘導体に対しては 1 5 5 . 4 n M ( ± 8 6 . 5 6 ) の  $K_D$ 、およびスペーサーを有しない四量体誘導体に対しては 1 2 3 . 8 n M ( ± 3 7 . 7 1 ) の  $K_D$  が得られた。予期されるように、これらの結合定数は、関連する単量体ペプチド配列番号 4 8 2 について F P により測定された値 ( 8 8 0 n M ) より低い。

【 0 4 8 8 】

結果：図 8 0 から、J J スペーサーを有する配列番号 4 8 2 誘導体は、バックグラウンド結合として対照ペプチドの結合 ( n = 1 ) を差し引いた後、1 2 . 6 2 n M の  $K_D$  で、J スペーサーを有するまたはスペーサーがない誘導体よりも、M D A - M B - 2 3 1 細胞 40  
上の c - M e t へのより良好な結合を示した。このことは、特定の最小スペーサー長が、細胞上の複数の異なった結合部位へ到達し、そして多重の結合を達成することを可能にするために必要とされることを示唆している。この特定の最小スペーサー長は、細胞上の異なった標的分子間の間隔に依存している。結合標的が K D R であった場合のように、ファージディスプレイで同定されたビオチニル化ペプチドでのニュートラアビジン - H R P アッセイは、E L I S A 型アッセイ ( 結合後の洗浄工程を伴う ) がうまく働くには、単量体結合配列の親和性があまりにも低い場合でさえも、固定化された標的へ結合できるペプチドを同定するために有用であった。

【 実施例 3 2 】

【 0 4 8 9 】

KDR - トランスフェクト293H細胞へのTc - 標識ヘテロ二量体ポリペプチドの結合

KDRへ結合するTc - 標識D10の能力を、KDR - トランスフェクト293H細胞を使用して評価した。結果は、Tc - 標識D10は、Mockトランスフェクト293H細胞よりもKDR - トランスフェクト293H細胞へ有意に良好に結合し、良好な結合は40%マウス血清存在下でも維持されたことを示している。加えて、そのアミノ酸配列がスクランブルされた、Tc - 標識D10の誘導体D18は、KDR発現細胞に対する親和性を有していないことが示され、これらの細胞へのD10の結合特異性を確認している。

【0490】

<sup>99m</sup>Tc - 標識ペプチドの合成

<sup>99m</sup>Tc - D10および<sup>99m</sup>Tc - D18の製造

10

実施例37を参照されたい。

【0491】

293H細胞のトランスフェクション

293H細胞は実施例5に記載したプロトコールを使用してトランスフェクトした。トランスフェクションは、黒/透明96ウェルプレート(Becton Dickinson, カタログ番号354640)で行った。プレートの左半分(48ウェル)をMockトランスフェクトし(DNAなし)、プレートの他の半分にある細胞はKDR cDNAでトランスフェクトした。細胞は、トランスフェクション時には80~90%コンフルエントであり、アッセイする時間である次の日には完全にコンフルエントであった(もしこれらの条件が満たされなければ、アッセイを中止した)。

20

【0492】

0.1% HSAを含むopti-MEM I培地の調製

opti-MEM IはInvitrogen(カタログ番号11058-021)から得られ、およびヒト血清アルブミン(HSA)はSigma(セントルイス、MO)から得られた。0.1% HSA、0.1% HSA w/vをopti-MEM Iに加え、続いて室温で20分攪拌することにより、opti-MEM I培地を調製した。培地は0.2 μmフィルターを使用して濾過滅菌した。

【0493】

アッセイのためのTc - 標識ペプチド希釈液の調製

Tc - 標識D10およびD18を0.1% HSA含有opti-MEM Iで希釈すると、各々のTc - 標識ヘテロ二量体の1.25、2.5、5.0および10 μCi/mlの最終濃度を有する溶液が提供される。第二の組の希釈液もまた、40%マウス血清/60% 0.1% HSA含有opti-MEM Iの混合物を希釈液として使用して調製した。

30

【0494】

Tc - 標識ヘテロ二量体の結合を検出するためのアッセイ

細胞は、トランスフェクション24時間後に使用し、アッセイのための細胞を調製するため、それらを100 μlの室温の0.1% HSA含有opti-MEM Iで1回洗浄した。洗浄後、0.1% HSA含有opti-MEM Iをプレートから除き、70 μlの1.25、2.5、5.0および10 μCi/mlのTc - 標識D10またはD18(両方の希釈液で上のように調製された)で置き換えた。各々の希釈液は偽およびKDRトランスフェクト細胞を含む3つの別々のウェルへ加えた。室温で1時間インキュベートした後、プレートを100 μlの冷結合緩衝液(0.1% HSA含有opti-MEM I)で5回洗浄した。100 μlの可溶化溶液(0.5 N NaOH)を各々のウェルへ加え、プレートを37 °Cで10分インキュベートした。各々のウェル中の可溶化溶液をピペットで吸い上げたり吐き出したりすることにより混合し、そして1.2 mlチューブへ移した。各々のウェルを100 μlの可溶化溶液で1回洗浄し、洗液を対応する1.2 mlチューブへ加えた。各々の1.2 mlチューブは、LKBガンマカウンターで計数されるべき15.7 × 100 cmチューブへ移した。

40

【0495】

50

### KDR - トランスフェクト細胞への Tc - 標識ペプチドの結合

KDRへ特異的に結合するTc - 標識10およびD18の能力を、一過性トランスフェクト293H細胞を使用して示した。図81に示したように、Tc - 標識D10は、血清存在下で幾分の阻害が存在したけれども、40%マウス血清存在下および不在下の両方で、Mockトランスフェクト293H細胞に比較してKDR - トランスフェクト細胞へよく結合した。KDR発現細胞への、このTc - 標識ヘテロ二量体の総特異的結合は、前にTc - 標識単量体ペプチド(実施例19)で観察されたよりも多かった。一方、D18はMockトランスフェクトまたはKDR - トランスフェクト細胞の両方に親和性を示さず、D10結合の特異性を確認している。

#### 【実施例33】

10

#### 【0496】

KDR - トランスフェクト293H細胞へのLu - 標識ヘテロ二量体ポリペプチドの結合

KDRへ結合するLu - 標識D13の能力を、KDR - トランスフェクト293H細胞を使用して評価した。結果は、Lu - 標識D13は、Mockトランスフェクト293H細胞よりもKDR - トランスフェクト293H細胞へ良好に結合し、有意な結合は40%マウス血清存在下でも維持されたことを示している。

#### 【0497】

<sup>125</sup>I Lu - D13の製造

実施例37を参照されたい。

20

293H細胞のトランスフェクション

293H細胞は実施例5に記載したプロトコールを使用してトランスフェクトした。トランスフェクションは、黒/透明96ウェルプレート(Becton Dickinson, サンノゼ, CA)で実施した。プレートの左半分(48ウェル)をMockトランスフェクトし(DNAなしで)、プレートの他の半分にある細胞はKDR cDNAでトランスフェクトした。細胞は、トランスフェクション時には80~90%コンフルエントであり、アッセイする時間である次の日には完全にコンフルエントであった(もしこれらの条件が満たされなければ、アッセイを中止した)。

#### 【0498】

0.1% HSAを含むopti-MEM I培地の調製

opti-MEM Iは実施例32のように調製した。

アッセイのためのLu - 標識ペプチド希釈液の調製

Lu - 標識D13の保存溶液を0.1% HSA含有opti-MEM Iで希釈すると、標識ヘテロ二量体の1.25、2.5、5.0および10 μCi/mlの最終濃度を有する溶液が得られた。第二の組の希釈液もまた、40%マウス血清/60% 0.1% HSA含有opti-MEM Iの混合物を希釈液として使用して調製した。

30

#### 【0499】

Lu - 標識ヘテロ二量体の結合を検出するためのアッセイ

結合の検出は、実施例32に詳細に記載したように測定したが、ただし、Tc - 標識ヘテロ二量体の代わりにLu - 標識D13を使用した。

40

#### 【0500】

KDR - トランスフェクト細胞へのLu - 標識ペプチドの結合

KDRへ特異的に結合するLu - 標識13の能力を、一過性トランスフェクト293H細胞を使用して示した。Lu - 標識13は血清存在下で幾分の阻害が存在したけれども、40%マウス血清存在下および不在下の両方で、Mockトランスフェクト293H細胞に比較してKDR - トランスフェクト細胞へ有意によく結合した。

#### 【実施例34】

#### 【0501】

腫瘍を運んでいるマウスにおけるLu - 標識ヘテロ二量体ペプチドによる放射線療法

この実施例において、ヌードマウスに移植されたPC3細胞腫瘍の増殖を阻害するLu

50

- 標識 D 1 3 の能力を示した。

【 0 5 0 2 】

<sup>1 7 7</sup> Lu - D 1 3 の製造  
実施例 3 7 を参照されたい。  
動物モデル

供給者が推薦するように増殖させた、A C T T から P C 3 細胞を、ヌードマウスの肩胛骨の間に皮下で注射した。それらの腫瘍が 1 0 0 ~ 1 4 0 mm<sup>3</sup> に達した時、1 2 匹のマウスに 5 0 0 マイクロキューリーの Lu - 標識 D 1 3 を i . v . で注射し、それらの増殖をさらに 1 8 日モニターした。マウスがその体重を 2 0 % またはそれ以上失うか、またはそれらの腫瘍が 2 0 0 0 mm<sup>3</sup> を超えたら、マウスを殺した。処理マウスにおける腫瘍増殖を、P C 3 を移植した 3 7 匹の非処置マウスにおける平均腫瘍増殖と比較した。

10

【 0 5 0 3 】

結果：

この研究において、1 2 匹の処置マウスの内 6 匹において、非処置腫瘍マウスと比較して腫瘍の著しいまたは完全な増殖遅延が起こり ( 図 8 3 )、用いられた条件下、D 1 3 は P C 3 腫瘍増殖を遅くすることに効果的であった。

【 実施例 3 5 】

【 0 5 0 4 】

ラット腫瘍モデル

細胞株：1 3 7 6 2 Mat B I I I と称されるラット乳腺癌は、A T C C ( C R L - 1 6 6 6 ) から得られ、マッコイ 5 a 培地 + 1 0 % F C S、1 % グルタミンおよび 1 % ペニシリン / ストレプトマイシン ( I n V i t r o g e n、カールスバット、C A ) 中で増殖させた。懸濁液中の細胞を集め、ただしわずかに付着している細胞は E D T A で引き剥がした。細胞を増殖培地で洗浄し、遠心分離し、m L 当たり  $1 \times 1 0^7$  細胞で P B S または増殖培地に再懸濁した。

20

【 0 5 0 5 】

腫瘍の誘導：0 . 1 m L 当たり  $1 \times 1 0^6$  の細胞を、1 2 0 から 1 6 0 g の体重の麻醉したメス F i s h e r 3 4 4 ラットの乳房脂肪体内へ注射した。腫瘍は通常、8 日以内に 5 ~ 8 m m の直径まで成長する。

【 0 5 0 6 】

ラットおよびマウススポンジモデル

材料：T e x w i p e ( サドルリバー、N J ) から、長い取っ手を持つ、編まれた a l p h a L i t e ポリエステルスワブを得た。

30

【 0 5 0 7 】

スワブ挿入：滅菌小型スポンジ様ポリエステルファイバースワブを、動物の背面脇腹の皮下に移植した。動物 ( ラットおよびマウス ) は日 1 5 ( ラットおよびマウス ) または日 1 8 ( マウス ) に麻醉薬の過剰投与により殺した。スワブを免疫組織化学的試験のために取り除いた。

【 0 5 0 8 】

凍結切片の免疫組織化学

材料：ウサギ抗マウス f l k - 1 抗体 ( S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , I n c . , サンタクルス、C A ) 。ラット抗マウス f l k - 1 モノクローナル抗体 ( C h e m i c o n , テメキュラ、C A ) 。H R P - コンジュゲートヤギ抗ウサギ I g G ( H + L ) 抗体 ( K P L , ガイセルブルグ、M D ) 。H R P - コンジュゲートウサギ抗ラット I g G ( H + L ) 抗体および試薬用ウサギ I g G ( S i g m a , セントルイス、M O ) 。ラット I g G ( S s r o t i c , ローリー、N C ) 。A E C : アミノエチルカルバゾール基質キット：基質緩衝液、色素源溶液、過酸化水素溶液のボトル ( Z y m e d , サンフランシスコ、C A ) 。西洋ワサビペルオキシダーゼの基質、ヘマトキシリン対比染色試薬 ( Z y m e d ) 。グリセロールビニルアルコール水性マウンティング溶液 ( Z y m e d ) 。S u p e r f r o s t P l u s ガラススライド ( メンツェル - グレーシャー、

40

50

ドイツ)。

【0509】

免疫組織化学：スワブおよび腫瘍を切り出し、イソペンタン中で凍結し、そしてクライオスタットを使用して10 $\mu$ m切片へ切断した。切片をSuperfrost Plusガラススライドにマウントし、冷アセトンで20分固定した。PBS中で5分、2回洗浄後、0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>での30分間のインキュベーションにより、内在性ペルオキシダーゼ活性をクエンチし、次に再びPBS中で洗浄した。切片は最初に0.2% BSA含有PBS溶液で1時間処理した後、抗VEGF-R<sub>2</sub>抗体(1/50)またはビオチニル化ペプチド(2 $\mu$ M)または非特異的IgG PBS溶液(1/50)またはPBSのみと一夜インキュベートした。切片を3回、PBS中で5分洗浄し、次に1/200希釈したヤギ抗ウサギHRP抗体、または1/250希釈のストレプトアビジン-HRP(ビオチニル化ペプチドに対して)と室温で1時間インキュベートした。切片を再び3回、PBS中で5分洗浄し、AECで染色し、H<sub>2</sub>Oですすぎ、ヘマトキシリンで3分対比染色した。組織切片を光学顕微鏡法のためにマウントした。

10

【0510】

【表23】

スワブおよび腫瘍	抗体		ペプチド	
	Flk-1 (ウサギ血清)	Flk-1 (ラットmAb)	ビオチニル化 配列番号264	ビオチニル化 配列番号502
スワブ、ラット (15日)	+++	-	++	-
スワブ、マウス (15-18日)	-	++	++ (末梢)	-
腫瘍、ラット (5-8日)	内皮細胞+++ 腫瘍細胞++	nd	内皮細胞+++ (末梢) 腫瘍細胞-	内皮細胞- 腫瘍細胞-
腫瘍、マウス (14日)	nd	内皮細胞+ 腫瘍細胞+++	内皮細胞+++ 腫瘍細胞++	内皮細胞- 腫瘍細胞-

20

【0511】

インビトロ超音波画像法

材料：超音波イメージングシステム：直線アレープローブ(L7-4)を備えたATL HDI 5000。

30

【0512】

画像化：実施例36に記載したペプチド-コンジュゲートマイクロバブルを、移植スワブを有するマウスの静脈内に注射した。断続パルス反転B-モード画像化を、スワブの新生血管中の標的化マイクロバブルをモニターするために使用した。対照実験は非コンジュゲートマイクロバブルまたはマイクロバブルと結合された非特異的ペプチドで実施した。VEGFレセプター2を発現している領域に対応するエコー発生区域が、KDR-特異的マイクロバブルを使用した場合に観察された。

40

【実施例36】

【0513】

本発明のKDR結合ペプチドへコンジュゲートされたリン脂質安定化マイクロバブルの懸濁液を調製した。これらの懸濁液は、超音波対比剤として有用である。前により詳細に説明したように、本発明のKDR結合ペプチドへコンジュゲートされたマイクロバブルは動物(ヒトを含む)に投与でき、そしてKDRを発現している動物領域(腫瘍のような血管新生区域を含んで)の超音波イメージを発生させるために使用できる。

【0514】

KDRペプチド結合剤へコンジュゲートされた、超音波診断法のための組成物の調製  
脂質懸濁液から調製された気体バブル

一連のリン脂質水性懸濁液を以下の組成で調製した：

50

A) 40 mgのDSPC、10 mgのDPPA、2.5 mgのN-MPB-PE(1, 2-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-4-(P-マレイミド-フェニルブチルアミド(Avanti Polar-Lipids, Inc, アラブスター, AL)および3 gのラクトース

B) 50 mgのDPPS、2.5 mgのN-MPB-PEおよび1.5 gのグリセロールおよび5 gのプロピレングリコール。

【0515】

70 で加熱することにより、各々の組成物の化合物を30 mLの食塩水溶液(0.9% NaCl)に分散し、0.2 μmポリカーボネート膜(Nuclepore<sup>®</sup>)を通して押し出した。得られた懸濁液は次に、気体マイクロバブルを発生させるための方法に従って処理した：懸濁液Aは-45 で凍結し、20ミリバールの減圧下で凍結乾燥し；得られた乾燥飼料をバイアル中でC<sub>4</sub>F<sub>10</sub>へ暴露し(100 mgの凍結乾燥物/バイアル)、次に10 mLの水で再構築した；懸濁液BはPolytron<sup>®</sup>を使用し、C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>ガス雰囲気下、高速機械攪拌でホモジナイズした(12,000 rpmおよび2分)。

10

【0516】

再構築または攪拌後に、懸濁液は乳白色および不透明になった。得られた気体マイクロバブルは次に、Coulter Multisizerを使用して計数した。気体マイクロバブルは、懸濁液の型および活性化の方法に依存して、1から15 μmに変化したサイズ、および10<sup>8</sup>から10<sup>9</sup>に変化した数で観察された。

20

【0517】

リン脂質を含んでいる乾燥処方から調製された気体バブル

等量のDSPCおよびDPPGをN-MPB-PE5%(w/w)および1 gのMacrogol-4000(Clarian, ドイツ)へ混合し、次に、tert-ブタノールへ60 で溶解すると透明な液が得られた。溶液をガラスバイアルへ分け、-45 で急速凍結し、そして凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物を、空気を置換することによりC<sub>4</sub>F<sub>10</sub>に暴露し、凍結乾燥器(Christ<sup>®</sup>)内で栓を用いて封をした。凍結乾燥試料は、バイアル当たり10 mLの食塩水(0.9%)で再構築した。再構築後、バブル形成(乳白色懸濁液)、エコー輝度(7 MHzでの後方散乱係数；Schneider, M., 1999. Echocardiography, 16(7 pt 2): 743-746、を参照されたい)、圧力への抵抗性および濃度(Schneiderら、EP 0 554 213 B1、を参照されたい)を決定した。

30

【0518】

マレイミドを使用したコンジュゲートマイクロバブルの調製

10 mg/mLでメルカプトアセチル化ペプチド(配列番号294、264および286、上に示したように製造された)のDMF溶液を調製した。9 mLのPBS-EDTA溶液(10 mM pH 7.5)へ、20 μLのペプチド溶液および1 mLの脱アセチル化溶液(50 mMリン酸ナトリウム、25 mM EDTA、0.5 Mヒドロキシルアミン・HCl、pH 7.5)を加えた。混合物を室温で30分インキュベートした後、マレイミド活性化マイクロバブル懸濁液を加えた。穏やかに攪拌しながら、暗所で2時間のインキュベーション後、コンジュゲートマイクロバブルを遠心分離により精製した。

40

【0519】

アビジンのチオアセチル化：アビジン(Fluka)内に保護スルフヒドリル基を導入するため、架橋剤SATA(Pierce)を製造業者の指示に従って使用し、タンパク質を透析により精製した。

【0520】

アビジン-コンジュゲートマイクロバブル：メルカプトアセチル化-アビジンの溶液に、容量で1/10の脱アセチル化溶液(50 mMリン酸ナトリウム、25 mM EDTA、0.5 Mヒドロキシルアミン・HCl、pH 7.5)を加えた。混合物を室温で30分インキュベートした後、マレイミド活性化マイクロバブル懸濁液を加えた。穏やかに攪拌しながら、暗所で2時間のインキュベーション後、コンジュゲートマイクロバブルを遠心

50

分離により非コンジュゲートタンパク質から分離した。コンジュゲートアビジンの量は、色素HABAを使用することにより分光学的に決定した。

【0521】

ペプチドコンジュゲートマイクロバブル懸濁液の形成

ビオチニル化ペプチド（配列番号294および264，上に示したように製造）をアビジン-コンジュゲートマイクロバブルのPBS懸濁液に、上で決定されたように、アビジン1モル当たり10モルのペプチドの比で加え、穏やかに攪拌しながら、室温で30分インキュベートした。過剰のペプチドは遠心分離により除去した。

【実施例37】

【0522】

【表 2 4】

コード	配列番号 (アイソマー)	配列
P12-C (実施例 5)		Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK (nSbGJJ)-NH <sub>2</sub> ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys (DMG-Ser-Cys (Acm)-Gly-Adoa-Adoa)-NH <sub>2</sub> ; Ne22-DMG-Ser-Cys (Acm)-Gly-Adoa-Adoa
P12-XDT (実施例 13)	In-887	Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTJK (JJ-DOTA)-NH <sub>2</sub> ----化学データベースから
P12-P (実施例 13)	Tc-378	Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Tly-Gys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys (PnAO-NH-(=O)C(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-J-J)-NH <sub>2</sub>
D4 (実施例 13)		Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTJK (CONH <sub>2</sub> )K (JJDOTA-GLUT-[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (CONH <sub>2</sub> )JJ]
下記製造プロト コル	Tc-D10	Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK [(6-PnAO)-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K(-O(=)C(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-JJ-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH)-CONH <sub>2</sub> )]NH <sub>2</sub> ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Tlp-Leu-Phe-Gly-Tlir-Gly-Gly-Lys [(6-PnAO)-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K(-O(=)C(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-ADOA-ADOA-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(Ac-Gly-Asp-Ser-Arg-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-NH)-CONH <sub>2</sub> )]NH <sub>2</sub> ; 血管新生剤/KDR レポーター 6-PnAO----化学データベースから
下記製造プロト コル	Lu-D11	Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK [DOTA-JJK(C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-JJ-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH)-CONH <sub>2</sub> )]NH <sub>2</sub> ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Tlir-Gly-Gly-Gly-Lys [DOTA-ADOA-ADOA-Lys(C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-ADOA-ADOA-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-NH)-CONH <sub>2</sub> )]NH <sub>2</sub> ----化学データベースから
下記製造プロト コル	Lu-D12	Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK [(6-PnAO)-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-K(C(=O)CH <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(=O)-3C(=O)-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH)-CONH <sub>2</sub> )]NH <sub>2</sub> ; Ac-Ala-Gly-Pro-Tlu-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys [(6-PnAO)-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-Lys(-C(=O)CH <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(=O)-3C(=O)-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-NH)-CONH <sub>2</sub> )]NH <sub>2</sub> ----化学データベースから
下記製造プロト コル	Lu-D13	Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK (Ac-(DTPA)VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (Adoa-Adoa-Glut-K(BOA))-NH <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub> ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Tip-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys (Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-Lys-(Adoa-Adoa-Glut-Lys(BOA))-NH <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub> ----化学データベースから
下記製造プロト コル	Tc-D14	Ac-Ala-Gln-Asp-Tip-Tyr-Tyr-Asp-Glu-Ile-Leu-Ser-Met-Ala-Asp-Gln-Leu-Arg-His-Ala-Phe-Leu-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys ((6-PnAO)-C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(=O)-Lys(C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO-ADOA-ADOA-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(Ac-Gly-Asp-Ser-Arg-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-NH)CONH <sub>2</sub> )]NH <sub>2</sub> ----化学データベースから
下記製造プロト コル	Tc-D18	Ac-Ala-Pro-Gly-Thu-Trp-Cys-Asp-Tyr-Asp-Trp-Glu-Tyr-Cys-Tlp-Leu-Gly-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Lys (PnAO6-Glut-K(Glut-ADOA-ADOA-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(S)-CH(Ac-Gly-Val-Asp-Phe-Arg-Cys-Glu-Trp-Ser-Asp-Trp-Gly-Glu-Val-Gly-Cys-Arg-Ser-Pro-Asp-Tyr-Gly-Gly-Gly-NH)CONH <sub>2</sub> ))-NH <sub>2</sub> ----化学データベースから(スクランブル化ペプチド)

10

20

30

40

【0523】

<sup>99m</sup>Tc-D10の製造

SnCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (20mg)を1mLの1N HClに溶解し、10gのCaNa<sub>2</sub>DTPA 2.5H<sub>2</sub>O (Fluka)を1mLの水に溶解することにより調製された1mLのDTPA溶液へ加えた。D10 (100μgを100μLの50%DMFに)を、75μLの0.1M、pH9リン酸緩衝液および50μLの<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (2. 50

4 から 5 mCi, Syncor)、続いて 100  $\mu$ L の第一スズ Sn-DTPA 溶液と混合した。室温で 30 分後、放射化学純度 (RCP) は 72% であった。生成物は、0.1% TFA 水溶液 (A) および 0.085% TFA アセトニトリル溶液 (B; 「ACN」) の水性 / 有機濃度勾配を使用し、0.7 mL / 分の流速で溶出する、Supelco Discovery C16 アミドカラム (4 x 250 mm、5  $\mu$ m 孔径) で精製した。以下の濃度勾配を使用した: 36 分で 30% B から 42% B へ、傾斜をつけて 10 分で 70% B へ。32 分の保持時間で溶出された化合物を、0.2% HSA を含んでいる 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.2) 500  $\mu$ L に集め、Speed Vacuum (Savant) を使用してアセトニトリルを除去した。精製後、化合物は > 90% の RCP を有していた。

10

## 【0524】

<sup>177</sup>Lu-D11 の製造

D11 (~ 1  $\mu$ g /  $\mu$ L 0.05 N NH<sub>4</sub>OH / 10% EtOH 溶液の 5  $\mu$ L) を、80  $\mu$ L の 0.2 M NaOAc 緩衝液、pH 5.6、を含んでいるガラス差し込みマイクロバイアルへ加えた。<sup>177</sup>Lu をリガンド: Lu の比が 2:1 になるように加えた (1 ~ 5 mCi)。バイアルをクランプシールし、100 °C で 15 ~ 20 分加熱し、5 分間冷却し、3  $\mu$ L の 1% Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O の H<sub>2</sub>O 溶解液で処理した。全反応混合物を、Supelco Discovery RP アミド C16 カラム (4 x 250 mm x 5  $\mu$ m) に注入した。以下の HPLC 条件を使用した: カラム温度 = 50 °C、溶媒 A = 0.1% TFA 含有 H<sub>2</sub>O、溶媒 B = 0.085% TFA 含有 ACN、勾配 t = 0 分

20  
で 0.6 / 0.25 mL / 分 A / B から t = 60 分で 0.5 / 0.4 mL / 分 A / B。D11 の保持時間は ~ 40 分であり、<sup>177</sup>Lu-D11 は ~ 42 分であった。放射活性のあるピークを、0.1% ヒト血清アルブミン分画 V および 1% アスコルビン酸を含んでいる 0.7 mL の 0.05 M クエン酸緩衝液、pH 5.2、に集め、有機溶媒を除去するため、混合物を Savant Speed Vac 中で回転沈降させた。80% より高い放射化学純度が得られた。

20

## 【0525】

<sup>99m</sup>Tc-D12 の製造

SnCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (20 mg) を 1 mL の 1 N HCl に溶解し、10 g の CaNa<sub>2</sub>DTPA 2.5H<sub>2</sub>O (Fluka) を 1 mL の水に溶解することにより調製された 1 mL の DTPA 溶液へ加えた。D12 (100  $\mu$ g を 100  $\mu$ L の 50% DMF に) を、75  $\mu$ L の 0.1 M、pH 9 リン酸緩衝液および 60  $\mu$ L の <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (2.4 から 4 mCi, Syncor)、続いて 100  $\mu$ L の第一スズ Sn-DTPA 溶液と混合した。40 °C で 10 分後、放射化学純度 (RCP) は 16% であった。生成物は、0.1% TFA 水溶液 (A) および 0.085% TFA ACN 溶液 (B) の水性 / 有機濃度勾配を使用し、0.7 mL / 分の流速で溶出する、Supelco Discovery C16 アミドカラム (4 x 250 mm、5  $\mu$ m 孔径) で精製した。以下の濃度勾配を使用した: 36 分で 30% B から 42% B へ、傾斜をつけて 10 分で 70% B へ。37.1 分の保持時間で溶出された化合物を、0.2% HSA を含んでいる 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.2) 500  $\mu$ L に集め、Speed Vacuum (Savant) を使用

30  
40  
して ACN を除去した。精製後、化合物は > 90% の RCP を有していた。

30

40

## 【0526】

<sup>177</sup>Lu-D13 の製造

D13 (306  $\mu$ g) を、~ 450  $\mu$ L の円錐形差し込みを持つ 2 mL オートサンプラーバイアルに加え、0.01 N NH<sub>4</sub>OH (50  $\mu$ L) で溶解した。このバイアルに、アスコルビン酸ナトリウム、ゲンチジン酸ナトリウム、L-メチオニンおよび L-トリプトファン、各々の 10 mg / mL、に加えて 2 mg / mL のヒト血清アルブミン分画 V を含み、NaOH で最終 pH = 7.6 に調整した、0.5 M の酢酸アンモニウム (300  $\mu$ L) を加えた。<sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> の 0.05 N HCl 溶液の一部 6.8  $\mu$ L (39.3 mCi) を加え、バイアルをクランプシールし、37 °C で 15 分温め、5 分間冷却し、1

50

0  $\mu$ L の 1%  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  の  $\text{H}_2\text{O}$  溶解液を加えた。反応混合物の 350  $\mu$ L を、Supelco Discovery RP アミド C16 カラム (4  $\times$  250 mm  $\times$  5  $\mu$ m) に注入した。以下の HPLC 条件を使用した：カラム温度 = 37、溶媒 A = 2 g/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  緩衝液含有  $\text{H}_2\text{O}$ 、溶媒 B = 80% ACN / 20%  $\text{H}_2\text{O}$ 、勾配  $t = 0$  分で 0.56 / 0.24 mL / 分 A / B から  $t = 30$  分で 0.47 / 0.33 mL / 分 A / B。D13 の保持時間は ~ 28 分であり、 $^{177}\text{Lu} - \text{D13}$  の保持時間は ~ 29 分であった。放射活性のあるピークを、アスコルビン酸ナトリウム、ゲンチジン酸ナトリウム、L - メチオニンおよび L - トリプトファン、各々の 10 mg / mL、に加えて 2 mg / mL のヒト血清アルブミン分画 V を含み、NaOH で最終 pH = 7.6 に調整した緩衝液 1 mL に集めた。ACN を除くため、Speed Vacuum (Savant) を使用して回転沈降させた。単離された生成物の RCP は 86% であった。

10

## 【0527】

 $^{99\text{m}}\text{Tc} - \text{D14}$  の製造

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20 mg) を 1 mL の 1N HCl に溶解し、10 g の  $\text{CaNa}_2\text{DTPA} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  (Fluka) を 1 mL の水に溶解することにより調製された 1 mL の DTPA 溶液へ加えた。D14 (100  $\mu$ g を 100  $\mu$ L の 50% DMF に) を、50  $\mu$ L の  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (6 mCi, Syncor) および 125  $\mu$ L の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 9)、続いて 100  $\mu$ L の第一スズ Sn - DTPA 溶液と混合した。40 で 15 分後、放射化学純度 (RCP) は 21% であった。生成物は、0.1% TFA 水溶液 (A) および 0.085% TFA アセトニトリル溶液 (B) の水性 / 有機濃度勾配を使用し、1 mL / 分の流速で溶出する、Vydac ペプチド C18 カラム (4.6  $\times$  250 mm) で精製した。以下の濃度勾配を使用した：40 分で 30% B から 45% B へ。34.9 分の保持時間で溶出された化合物を、0.2% HSA を含んでいる 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.3) 500  $\mu$ L に集め、Speed Vacuum (Savant) を使用して ACN を除去した。精製後、化合物は 92.5% の RCP を有していた。

20

## 【0528】

 $^{99\text{m}}\text{Tc} - \text{D18}$  の製造

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20 mg) を 1 mL の 1N HCl に溶解し、10 g の  $\text{CaNa}_2\text{DTPA} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  (Fluka) を 1 mL の水に溶解することにより調製された 1 mL の DTPA 溶液へ加えた。D18 (100  $\mu$ g を 100  $\mu$ L の 50% DMF に) を、50  $\mu$ L の 0.1 M、pH 9 リン酸緩衝液および 90  $\mu$ L の  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (14 mCi, Syncor)、続いて 100  $\mu$ L の第一スズ Sn - DTPA 溶液と混合した。反応液を 37 で 20 分温めた。全生成物を、Vydac 218 TP54 C18 カラム (4.6  $\times$  250 mm、5  $\mu$ m シリカ) に注入し、0.1% TFA 水溶液 (A) および 0.085% TFA ACN (B) の水性 / 有機濃度勾配を使用し、1.5 mL / 分の流速で溶出した。以下の濃度勾配を使用した：30 分で 32% B から 39% B へ、傾斜をつけて 2 分で 80% B へ。遊離リガンドは 19 分の保持時間で溶出された。24 分の保持時間で溶出された化合物を、0.1% HSA および 1% アスコルビン酸を含んでいる 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.2) 500  $\mu$ L に集め、ACN および過剰の TFA を Speed Vacuum (Savant) を 40 分使用して除去した。精製後、化合物は 93% の RCP を有していた。

30

40

## 【実施例 38】

## 【0529】

## ペプチドコンジュゲーションのための誘導体化マイクロバブルの調製

200 mg の DSPC (ジステアロイルホスファチジルコリン)、275 mg の DPPG  $\cdot$  Na (ジステアロイルホスファチジルグリセロール、ナトリウム塩)、25 mg の N - MPB - PE を、50 mL のヘキサン / イソプロパノール (42 / 8) に 60 で可溶化した。真空下で溶媒を蒸発させ、次に PEG - 4000 (35.046 g) を脂質に加え、混合物は水浴中、106.92 g の t - ブチルアルコールに 60 で可溶化した。溶

50

液は1.5 mL溶液でバイアルに充填した。試料を-45 で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヘッドスペースの空気を、 $C_4F_{10}$ /空気(50/50)の混合物に置き換え、バイアルにキャップをかぶせて、そして圧着した。凍結乾燥試料は、バイアル当たり10 mLの食塩水(0.9% NaCl)で再構築した。

#### 【0530】

##### ペプチドコンジュゲーション

例えば、配列番号374および配列番号277のペプチドを、以下の方法論に従って、上に記載したようなマイクロバブル調製試料へコンジュゲートした。

#### 【0531】

チオアセチル化ペプチド(200  $\mu$ g)を20  $\mu$ LのDMSOに溶解し、次に1 mLのリン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈した。この溶液を、18 mLのPBS-EDTA 10 mM、pH 7.5、に分散したN-MPB-機能化マイクロバブルへ加え、そして2 mLの脱アセチル化溶液(50 mMリン酸ナトリウム、25 mM EDTA、0.5 Mヒドロキシルアミン・HCl、pH 7.5)を加えた。ヘッドスペースを $C_4F_{10}$ /空気(35/65)で満たし、混合物を穏やかに攪拌しながら(回転盤)、暗所で2.5時間インキュベートした。コンジュゲートバブルを遠心分離により洗浄した。

10

#### 【実施例39】

#### 【0532】

##### ペプチドコンジュゲーションのための誘導体化マイクロバブルの調製

6 mgのジパルミトイルホスファチジルセリン(DPPS, Genzyme)、24 mgのジステアロイルホスファツジルコリン(DSPC, Genzyme)および3 gのマニトールを含んでいる蒸留水(30 mL)を65 で15分加熱した後、室温まで冷却した。N-MPB-PE(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[4-(P-マレイミド-フェニルブチルアミド)]Na塩-Avantipolar-Lipids)を加えた(5%モル-1.9 mg)。この誘導体化リン脂質を、超音波浴を使用して水性相に分散した(Branson 1210-3分)。

20

#### 【0533】

パーフルオロヘプタン(2.4 mL、Flukaから)を、高速ホモジナイザーを使用して、この水性相に乳化した(Polytron<sup>R</sup>、10000 rpm、1分)。

この乳濁液は、遠心分離により(200 g/10分)1回洗浄し、次に30 mLの10%マニトール蒸留水液に再懸濁した。洗浄乳濁液を凍結し(-45、5分)、次に凍結乾燥した(0.2ミリパール下、24時間)。

30

#### 【0534】

$C_4F_{10}$  および空気の混合物を導入することにより大気圧を回復させた。凍結乾燥物を蒸留水(30 mL)に溶解した。マイクロバブルを遠心分離により1回洗浄し、10 mLのリン酸緩衝食塩水に再分散した。

#### 【0535】

##### ペプチドコンジュゲーション

チオアセチル化ペプチド(200  $\mu$ g)を20  $\mu$ LのDMSOに溶解し、次に1 mLのリン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈した。この溶液を、5 mLのN-MPB-機能化マイクロバブルと混合した。0.6 mLの脱アセチル化溶液(50 mMリン酸ナトリウム、25 mM EDTA、0.5 Mヒドロキシルアミン・HCl、pH 7.5)を加え、懸濁液を反転により2.5時間攪拌した。

40

#### 【0536】

マイクロバブルを、マルトース5%およびPluronic F68 0.05%を含む蒸留水を用い、遠心分離により(200 g/10分)2回洗浄した。最終容量は5 mLに固定した。

#### 【実施例40】

#### 【0537】

##### ペプチドコンジュゲーションのための誘導体化マイクロバブルの調製

50

40 mg のジステアロイルホスファチジルコリン ( DSPC , Genzyme ) を含んでいる蒸留水 ( 30 mL ) を 65 °C で 15 分加熱した後、40 °C まで冷却した。

【0538】

DPPPE - PEG2000 - マレイミド ( 3.5 mg - Avanti Polar Lipids ) およびトリパルミチン ( 60 mg - Fluka ) を、超音波浴中で 2 分、40 °C でシクロヘキサン ( 0.6 mL ) に溶解した。

【0539】

この有機相を、高速ホモジナイザーを使用して、水性相に乳化した ( Polyttron<sup>R</sup>、10000 rpm、1 分 )。

蒸留水 ( 5 mL ) に溶解したポリビニルアルコール ( 200 mg ) を乳濁液に加えた。混合物は 5 °C に冷却し、次に凍結し ( -45 °C、5 分 )、そして最後に凍結乾燥した ( 0.2 ミリバール下、24 時間 )。

【0540】

凍結乾燥物を蒸留水 ( 15 mL ) に分散した。混合物を 30 分攪拌するとマイクロバルーンの均質な懸濁液を得た。

ペプチドコンジュゲーション

チオアセチル化ペプチド ( 200 μg ) を 20 μL の DMSO に溶解し、次に PBS で希釈した ( 1 mL )。

【0541】

上記のようにして得られたマイクロバルーンの懸濁液 7.5 mL を遠心分離した ( 500 rpm で 5 分 )。水溶性の分画 ( infranant ) を捨て、そしてマイクロバルーンをリン酸緩衝食塩水 ( 2 mL ) に再分散した。

【0542】

マイクロカプセル懸濁液をペプチド溶液と混合した。チオールを脱保護するため、300 ミリリットルのヒドロキシルアミン溶液 ( 10.4 mg を含む PBS 50 mM、pH : 7.5 ) を懸濁液に加えた。懸濁液を反転により 2.5 時間攪拌した。

【0543】

マイクロバルーンを、マルトース 5 % および Pluronic F68 0.05 % を含む蒸留水を用い、遠心分離により ( 500 g / 5 分 ) 2 回洗浄し、最終的に 3 mL のこの溶液に再分散した。

【0544】

トランスフェクト細胞でのインビトロアッセイ

本発明のペプチドへコンジュゲートされたマイクロバブルの、KDR 発現細胞への結合についての能力を、KDR を発現するようにトランスフェクトされた 293H 細胞を使用して評価した。

【0545】

Thermanox<sup>R</sup> カバーガラス上での 293H 細胞のトランスフェクション

293H 細胞を KDR DNA でトランスフェクトした。トランスフェクト細胞は、ペプチド - コンジュゲートマイクロバブルの懸濁液と、または対照ペプチド ( KDR への親和性を有しない、コンジュゲートペプチドのスクランブル化体 ) とインキュベートした。

【0546】

トランスフェクト細胞とのインキュベーションのため、小さなプラスチックキャップを 1 から  $3 \times 10^8$  のペプチド - コンジュゲートマイクロバブルを含んでいる懸濁液で満たし、そして、トランスフェクト細胞がコンジュゲートマイクロバブルと接触するように、キャップを反転させた Thermanox<sup>R</sup> カバーガラスで覆った。室温で約 20 分後、カバーガラスをピンセットで持ち上げ、PBS で 3 回洗浄し、コンジュゲートマイクロバブルの結合を評価するため顕微鏡下で試験した。

【0547】

図 85 は、本発明のペプチドへコンジュゲートされたマイクロバルーンが KDR 発現細胞へ特異的に結合することを示している。実際、KDR 結合ペプチドへコンジュゲートさ

10

20

30

40

50

れたマイクロバルーンはKDR発現細胞へ結合したのに対し、それらはMockトランスフェクト細胞へは認めうるほどには結合せず、そしてスクランブル化対照ペプチドを有するマイクロバルーンは、認知できる結合を示さなかった。

【0548】

微小胞により覆われている表面の%の決定

イメージはデジタルカメラDC300F (Leica)で取得し、イメージ化された領域中の結合マイクロバブルまたはマイクロバルーンにより覆われている表面のパーセントは、ソフトウェアQWin (Leica Microsystem AG, ベーゼル、スイス)を使用して決定した。

【0549】

下記の表は、KDRトランスフェクト細胞に対する、本発明の標的化微小胞の、結合親和性の結果(イメージ化された表面の被覆度%として表現されている)を示しており、Mockトランスフェクト細胞に対する、同一標的化微小胞の結合、または(ペプチドの場合のみ)同一のKDRトランスフェクト細胞に対するスクランブル化ペプチドで標的化された微小胞の結合と比較されている。

【0550】

図21に示されているように、標的化微小胞は、促進されたKDRに対する結合親和性を示している。

【0551】

【表25】

表21

	被覆面積 %		
	KDR	偽	スクランブル化ペプチド
実施例1			
結合ペプチド	6.7	0.2	0.1
配列番号374	3.5	0.9	n. a.
配列番号277	16.8	1.0	n. a.
実施例2	14.2	1.4	2.1
実施例3	15.7	0.3	1.0

n. a. : 利用不可能

【0552】

インビボ動物モデル

血管新生の既知のモデル(ラットマトリゲルモデルおよびラットMat B IIIモデル)を、超音波コンジュゲート体へコンジュゲートされたペプチドの血管新生組織へ局在する、および血管新生組織のイメージを提供する能力を試験するために使用した。

【0553】

動物: Mat B III腫瘍移植のため、120から160gの体重のメスFisher 344ラット(Charles River Laboratories, フランス)を使用した。マトリゲル注射のためには、120から160gの体重のオスOFAラット(Charles River Laboratories, フランス)を使用した。

【0554】

麻酔: ラットは、マトリゲルまたはMat B III細胞の移植前に、ケタミノール/キシラジン(Veterinaria AG/Sigma)(50/10mg/mL)混合物の筋肉内注射(1mL/kg)で麻酔した。画像化実験のためには、動物を同一の混合物に50%ウレタン(1g/kg)の皮下注射を加えて麻酔した。

10

20

30

40

50

## 【0555】

ラットMat B I I I腫瘍モデル：13762 Mat B I I Iと称されるラット乳腺癌は、ATCC (CRL - 1666) から得られ、マッコイ5a培地 + 10% FCS、1%グルタミンおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen、カタログ番号15290 - 018) 中で増殖させた。懸濁液中の細胞を集め、細胞を増殖培地で洗浄し、遠心分離し、mL当たり $1 \times 10^7$ 細胞でPBSまたは増殖培地に再懸濁した。腫瘍の誘導のためには：0.1 mL当たり $1 \times 10^6$ の細胞を、麻酔したメスFisher 344ラットの乳房脂肪体内へ注射した。腫瘍は通常、8日以内に5 ~ 8 mmの直径まで成長する。

## 【0556】

ラットマトリゲルモデル：ヒトbFGF (600 ng/mL) (Chemicon: ref: GF003) を含んでいるマトリゲル (400  $\mu$ L) (ECM, Sigma, セントルイス, MO) を各々のラットの背部側面へ皮下で注射した。

## 【0557】

マトリゲル溶液は注射まで4で液体に保った。マトリゲル注射直後、マトリゲルの漏出を避けるため、注射部位を手で数秒閉じたままに保った。体温では、マトリゲルはゼラチン状になる。注射10日後、ラットのマトリゲルプラグで新しい血管新生が観察され、画像化実験を実行した。

## 【0558】

インビボ超音波画像法：Mat B I I I腫瘍またはマトリゲル画像化は、L7 - 4直線状プローブを備えた、超音波イメージングシステムATL HDI 5000装置を使用して実施した。新しい血管の内皮上に発現されたKDRレセプター上の、ペプチドコンジュゲート - マイクロバブルの蓄積を追跡するために、低音響出力のB - モードパルス反転 (み = 0.05) を使用した。対照実験として、非コンジュゲートマイクロバブルまたは非特異的ペプチドとコンジュゲートされたマイクロバブルの静脈内ボラスを注射した。直線状プローブは、移植した腫瘍またはマトリゲルプラグの線上に、直接皮膚に固定し、標的化バブルの蓄積を30分間追跡した。

## 【0559】

両方のモデルにおいて、試験バブル懸濁液を注射する前に、SonoVue<sup>R</sup>の灌流を行った。このことは、血管新生状態の評価を可能にする；SonoVue<sup>R</sup>注射後に得られたビデオ強度を内部標準として採用した。

## 【0560】

ベースラインフレームを記録し、次に超音波照射をバブル注射の間停止した。注射後の色々の時点で (1、2、5、10、15、20、25、30分) 超音波照射を再活性化し、1秒の2フレームをビデオテープに記録した。

## 【0561】

マトリゲルまたはMat B I I I腫瘍画像化実験からのビデオフレームを、ビデオ - キャプチャーおよびImage - Pro Plus 2.0ソフトウェアで、各々キャプチャーおよび分析した。腫瘍またはマトリゲルの全区画を含んでいる、同一方形の問題とする領域 (AOI) を、異なった時点での (1、2、5、10、15、20、25、30分) イメージ上で選択した。各々の時点で、AOI内部のビデオピクセルの合計を、AOIベースラインの差し引き後に計算した。結果は、100%として採用された、SonoVueで得られた信号のパーセンテージとして表現されている。同様に、自由に循環している対比剤を代表している、マトリゲルまたは腫瘍の外側の位置を占めている第二のAOIもまた分析した。

## 【0562】

結果は、本発明のKDR結合部分を有している超音波コントラスト剤が、動物モデル中の血管新生 (および、それゆえKDRを発現している) 組織へ局在化していることを示している。特に、図84は、実施例38に従って調製された、本発明のKDRペプチドへコンジュゲートされた、リン脂質安定化マイクロバブルの懸濁剤の注射30分後までの、腫

10

20

30

40

50

瘍中のバブルコントラスト剤の取り込みおよび保持を示している。対照的に、同一のバブルは、腫瘍部位の外側に位置しているAOIでの、一過性の(10分を超えない)可視化/バブルコントラストのみを示した。同様に、図85および図86は、実施例38に従って調製された、本発明のKDRペプチド(配列番号374)へコンジュゲートされた、リン脂質安定化マイクロバブルの懸濁剤の注射30分後までの、マトリゲル中のバブルコントラスト剤の取り込みおよび保持を示している。対照的に、同一のバブルは、マトリゲル部位の外側に位置しているAOIでの、一過性の(10分を超えない)可視化/バブルコントラストのみを示した。

#### 【実施例41】

##### 【0563】

KDR結合ペプチドの血清抵抗性の促進

マレイミドおよびチオールと反応できるその他の基を含む化合物は、化合物を注射した場合、血清タンパク質、特に血清アルブミン上のチオール基と反応することが当該技術分野で知られている。付加物は、血清アルブミンと同様の、例えば、ヒトにおいて14日を超える血清寿命を持っている。

##### 【0564】

マレイミドへのコンジュゲーション

マレイミド-標識直鎖ペプチドの直接合成を可能にする、利用可能な方法は本発明に包含されている(Holmes, D.ら、2000. *Bioconjug. Chem.*, 11: 439-444)。

##### 【0565】

ジスルフィドを含むペプチドは、いくつかの方法の1つで誘導体化できる。例えば、第三のシステインを、カルボキシ末端に付加できる。付加されたシステインは、ジスルフィドを形成するシステインのために使用された型の基に直交している保護基で保護される。ジスルフィドは、意図されるシステインを選択的に脱保護し、ペプチドを酸化することにより形成される。最後のシステインを次に脱保護し、ペプチドを大過剰モルのビスマレイミドと反応させる。生じる化合物は、血清アルブミンまたは他のチオール-含有血清タンパク質と反応するために解放されたマレイミドの1つを有している。

##### 【0566】

もしくは、本発明の環状ペプチドは、-GGGK(配列番号262)のような、リジン含有C末端伸長で合成される。KDR結合モチーフのリジンをivDdeで保護し、C末端リジンを脱保護する。このリジンを、N-[ -マレイミドカプロイルオキシ]スクシンイミドエステル(Pierce Biotechnology, ロックフォード, IL)またはN-[ -マレイミドアセチキシ]スクシンイミドエステル(Pierce Biotechnology)のようなマレイミド含有化合物と反応させる。

##### 【0567】

非共有結合で血清アルブミンと結合する部分へのコンジュゲーション

50~60kDa未満の分子量を有しているポリペプチドは、急速に排出される。脂肪酸のような、多くの小分子は血清アルブミンへ結合する。10から20の炭素原子を有している脂肪酸は、血清アルブミンに対する実質的な親和性を有する。血清におけるこの結合は、排出速度を減少させることができる。当該技術分野で既知の技術を使用し、血清アルブミン結合部分を、本明細書で開示したペプチドの1つへコンジュゲートできる。血清アルブミン結合部分は、リンカーを通してKDR結合ペプチドへ連結できる。リンカーはペプチド性または、PEGのような他のものであってもよい。ゼロから約30原子のリンカーが好ましい。リンカーは親水性であることが好適である。血清アルブミン結合部分は、末端でまたは付随するアミノ酸の側鎖を通してKDR結合ペプチドへコンジュゲート可能である。適した側鎖には、リジンおよびシステインが含まれる。そのような化合物はまた、本明細書に記載したような、放射性核種のためのキレーターも含むことが可能である。血清アルブミン結合部分へ連結されたKDR結合ペプチドはKDRへ結合するであろう。

10

20

30

40

50

## 【0568】

## PEGへのコンジュゲーション

当該技術分野でよく知られているように、タンパク質およびペプチドへのポリ(エチレングリコール)(PEG)の添加は、これらの分子の血清抵抗性を増強する。KDR結合ペプチドへのPEG(直鎖または分岐鎖)の添加は、血清抵抗時間の実質的な増強を与えることが期待される。PEGの分子量は少なくとも10kDa、より好適には少なくとも20kDa、最も好適には30kDaまたはそれ以上であるべきである。PEGは、N末端またはC末端に添加できる。ペプチドへPEGを結合する方法は、当該技術分野でよく知られている(Roberts M.ら、2002. Adv. Drug. Deliv. Rev., 54: 459-476)。PEGは、リジンまたはシステインのような反応性側鎖へ結合できる。 10

## 【0569】

## 血清タンパク質への融合

血清アルブミン(SA)および他のタンパク質を含むタンパク質は増強された血清抵抗時間を有することは当該技術分野でよく知られている。ヒトSA(hSA)のアミノ酸配列は表22に示されている。表23は  
 AGDWWVECRVGTGLCYRYDTGTGGGK(配列番号286): :  
 PGGSGGEGGSGGEGGRPGGSEGGTGG: :成熟hSA: :  
 GGS GGEGGSGGEGGSGPGE GEGSGGRP: :  
 GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(配列番号294)を含んでいる 20  
 融合タンパク質を示している。KDR結合ペプチドは、グリシンに富むリンカーにより成熟hSAから分離されており、柔軟なスペーシングを可能にしている。増強された血清抵抗時間を有するであろう、注射可能なタンパク質を得るために、hSAのすべてを必要としないことが、当該技術分野で知られている。また、マレイミドおよびアルファプロモカルボキシレートのような化学基は、対をなしていないシステイン(残基34)と反応して、安定な付加物を形成することも当該技術分野で知られている。それ故、付加物が放射性核種を結合するであろうように、hSA融合タンパク質へ1つのキレーターを結合することができる。マレイミドを有するキレーターを製造し、それをhSAまたはhSA誘導体へ結合することができる。もしくは、hSAまたはhSA誘導体をビスマレイミドと反応させることができ、および反応性チオールを有するキレーターをビスマレイミド-誘導体 30  
 化hSAと反応させることができる。

## 【0570】

与えられたアミノ酸配列をコードする遺伝子の構築は、当該技術分野で知られている。サッカロミセス セレピジエにおけるhSA融合体の発現は、当該技術分野で知られている(Sleep, Dら、1991. Biotechnology (NY), 9: 183-187)。

## 【0571】

## KDR発現腫瘍への放射活性または毒素の前標的化

通常放射免疫療法は2つの問題に悩まされている。一般的に、到達可能な標的化比(腫瘍に局在化する投与量対血液を循環している投与量の比、または腫瘍に局在化する投与量対骨髄へ移動している投与量の比)が低い。また、腫瘍へ送達される放射線または治療薬剤の絶対量が、多くの場合で有意な腫瘍応答を惹起するには不十分である。標的化比または腫瘍への絶対量の改良が、癌治療のために非常に重要であろう。 40

## 【0572】

本発明は、哺乳動物受容個体の標的細胞部位での活性薬剤局在化を増加させる方法を提供する。本方法は、例えば、a)受容個体へ、標的化部分およびリガンド-抗リガンド結合剤対の1つのメンバーを含んでいる融合タンパク質を投与し; b)その後、受容個体へ、受容個体の肝細胞レセプターを経て循環融合タンパク質のクリアランスを方向付けできるクリアリング剤を投与し、ここでクリアリング剤はリガンド-抗リガンド結合剤対の1つのメンバーを取り込んでいる; およびc)続いて、リガンド/抗リガンド結合剤対メン 50

バーを含んでいる活性薬剤を受容個体へ投与する。

【0573】

ヘキソース、特にヘキソースガラクトース、グルコース、マンノース、マンノース - 6 - ホスフェート、N - アセチルグルコサミン、ペンタマンノシルホスフェート、N - アセチルガラクトサミン、ガラクトースのチオグリコシド、およびそれらの混合物が肝臓クリアランスを起こすことに効果的であることが、当該技術分野で知られている。しかしながら、肝臓レセプターへの糖の結合は、分子を肝臓へ方向付ける唯一の手段ではない。

【0574】

「循環系からの癌胎児性抗原 (CEA) のクリアランスは、肝臓におけるクッパー細胞への結合によるものである。クッパー細胞への CEA の結合は、CEA 配列のアミノ酸 107 ~ 112 を示すペプチド配列 YPELPK を経て起こることを我々は示した。このペプチド配列は N 末端と第一の免疫グロブリン様ループドメイン間の領域に位置している。天然の CEA およびヘテロ二機能性架橋剤と複合体形成したこの配列を含んでいるペプチド、およびビオチニル化 CEA および NCA でのリガンドプロットティングを使用し、クッパー細胞表面上の 80 kDa タンパク質への結合を、我々は示した。この結合タンパク質は肝臓転移の発生に重要であろう。」(Thomas, P. ら、1992. Biochem. Biophys. Res. Commun., 188: 671 - 677)

クリアランス剤として YPELPK (配列番号 498) を使用するには、この配列を、リンカーを経て、融合タンパク質 (Ab) を結合する部分に融合する。例えば、もし、Ab が DOTA / Re に対する親和性を有するとすれば、DOTA / Re に結合された YPELPK を有する誘導体を作製するであろう；例えば、rvYPELPKpsGGG - DOTA。「rvYPELPKps」は、Thomas らにより同定された YPELPK を含む、CEA の断片である。DOTA 上の、任意の都合のよい点で、結合のために使用できる。RVYPELPKPSGGG - DOTA / coldRe (配列番号 499) を次にクリアリング剤として使用してもよい。融合 Ab に対応する Fab は、 $K_d < 100 \text{ nM}$ 、好適には  $K_d < 10 \text{ nM}$ 、および最も好適には  $K_d < 1 \text{ nM}$  の、クリアリング剤のための親和性を有するであろう。

【0575】

治療薬は DOTA / <sup>185</sup>Re を含むであろう。好適な態様において、腫瘍上に固定化された Ab が高親和性でビス - DOTA 化合物を結合するために、治療薬は 2 つまたはそれより多い DOTA 部分を含んでいるであろう。2 つの DOTA 部分は、望ましくは、10 から 30 単位の PEG の親水性リンカーと連結されるであろう。PEG は分解せず、溶解度を促進するので、PEG は望ましいリンカーである。10 から 30 単位の PEG は、ビス DOTA 化合物に非常に長い血清抵抗時間を与えるには不十分である。30 分から 10 時間の半減期が許容できる。放射線のほとんどが腫瘍または外部環境へ送達されるためには、血清半減期は、使用される放射性核種の放射活性半減期より長くなければならない。

【0576】

1 つの態様において、本発明の「融合タンパク質」は、ヒト抗体の軽鎖 (LC) かまたは重鎖 (HC) のアミノ末端またはカルボキシ末端へ融合された、少なくとも 1 つの KDR 結合ペプチドを含んでいる。任意におよび好適には、2 つまたはそれより多い KDR 結合ペプチドが抗体へ融合される。抗体は、放射活性にできるまたは結合された毒素を持つことができる小分子に対して高い親和性を持つように選ばれる。好適には、Ab に対応している Fab の親和性は、 $100 \text{ nM}$  未満の、より好適には  $10 \text{ nM}$  未満の、最も好適には  $1 \text{ nM}$  未満の  $K_d$  で、小分子に対する親和性を有する。小分子は、有用な放射活性原子 (その多くが本明細書に掲げられている) を結合できるキレーターであることができる。小分子は、ペプチドの結合特性に大きく影響することなく、放射性ヨウ素が結合できる、1 つまたはそれ以上のチロシンを有するペプチドであってもよい。

【0577】

本発明の任意の KDR 結合ペプチド (KDR - BP) は、小さな放射活性化合物を結合

可能な、抗体の末端がまたは鎖へ融合できる。有用な具体例には以下のものが含まれる：

- 1) KDR - BP # 1 : : l i n k : : L C / H C 、
- 2) L C : : l i n k : : K D R - B P # 1 / H C 、
- 3) L C / K D R - B P # 1 : : l i n k : : H C 、
- 4) L C / H C : : l i n k : : K D R - B P # 1 、
- 5) K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : L C : : l i n k 2 : : K D R - B P 2 / H C 、
- 6) L C / K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : H C : : l i n k 2 : : K D R - B P # 2 、
- 7) K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : L C / K D R - B P # 2 : : l i n k 2 : : H C 、 10
- 8) K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : L C / H C : : l i n k 2 : : K D R - B P # 2 、
- 9) L C : : l i n k 1 : : K D R - B P # 1 / K D R - B P # 2 : : l i n k 2 : : H C 、
- 10) L C : : l i n k 1 : : K D R - B P # 1 / H C : l i n k 2 : : K D R - B P # 2 、
- 11) K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : L C : : l i n k 2 : : K D R - B P # 2 / K D R - B P # 3 : : l i n k 3 : : H C 、
- 12) K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : L C : : l i n k 2 : : K D R - B P # 2 / H C : : l i n k 3 : : K D R - B P # 3 、 20
- 13) K D R - B P # 3 : : l i n k 3 : : L C / K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : H C : : l i n k 2 : : K D R - B P # 2 、
- 14) L C : : l i n k 3 : : K D R - B P # 3 / K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : H C : : l i n k 2 : : K D R - B P # 2 、 および
- 15) K D R - B P # 1 : : l i n k 1 : : L C : : l i n k 2 : : K D R - B P # 2 / K D R - B P # 3 : : l i n k 3 : : H C : : l i n k 4 : : K D R - B P # 4 。

#### 【0578】

(5) ~ (15) の場合において、リンカー(「link 1」、「link 2」、「link 3」および「link 4」として示されている)は同じでもまたは異なってもまたは存在しなくてもよい。これらのリンカーは、もし存在するならば、好適には親水性、プロテアーゼ耐性、無毒、非免疫源性、および可動性である。好適には、リンカーはグリコシル化部位または肝臓クリアランスを起こすことが知られている配列を含んでいない。0から15のアミノ酸長が望ましい。KDR結合ペプチド(KDR - BP # 1、# 2、# 3および# 4)は同じでもまたは異なってもよい。もし、コードされているアミノ酸配列が同じであるならば、これらの配列をコードしているDNAが異なっているのが望ましい。 30

#### 【0579】

抗体は二量体であるので、各々の融合タンパク質は、各々の融合ペプチドの2つのコピーを示すであろう。(15)の場合、8つのKDR - BPが存在し、そしてKDR提示細胞への結合は、高度に貪欲であるべきである。腫瘍侵入は、最大の親和性よりも、各々のKDR - BPにおける中程度のKDR親和性により援助されることが可能である。 40

#### 【0580】

好適な態様の1つの群は、KDR - BPの1つとして配列番号294、および他方として配列番号286を有している。例えば、(7)の場合において(KDR - BP # 1 : : l i n k 1 : : L C / K D R - B P # 2 : : l i n k 2 : : H C)、KDR - BP # 1は配列番号294であり、KDR - BP # 2は配列番号284であり、およびlink 1は10から20の間のアミノ酸であり、およびlink 2もまた10から20の間のアミノ酸である。link 1に適した配列はGGS GG EGR PGE GGS G(配列番号491)であり、およびlink 2に適した配列はGSE S GGRPE GGS GE G G(配列番 50

号492)である。Gly、Ser、Glu、Asp、Thr、Gln、ArgおよびLysに富んだ他の配列が適している。タンパク質分解の危険性を避けるため、ArgまたはLysにProが続くのが望ましい。製造の困難さおよび乏しい溶解性を避けるためには、非荷電残基の長い伸長(12を超えた)を避けるのが望ましい。ペプチドはLCおよびHCのアミノ末端に示されるので、結合されたリンカー長は、それらをKDRへ同時に結合させることを可能にする。さらに、(15)の場合(KDR-BP#1::link1::LC::link2::KDR-BP#2/KDR-BP#3::link3::HC::link4::KDR-BP#4)、KDR-BP#1およびKDR-BP#2は配列番号294であり、およびKDR-BP#3およびKDR-BP#4はDX-912である。link1およびlink3は10から20のアミノ酸であり、およびlink2およびlink4は各々、15から30のアミノ酸である。link2およびlink4は、LCのカルボキシ末端上のペプチドをHCのC末端のペプチドへ届かせる必要があるため、それらはより長い。

#### 【0581】

融合タンパク質は、HCの定常部分がグリコシル化されるように真核生物細胞で産生される。好適には、細胞は、CHOのような哺乳動物細胞である。

融合タンパク質は患者に注射し、腫瘍に融合タンパク質が蓄積するように時間が与えられる。腫瘍に固定化されていない融合タンパク質が排除されるように、クリアリング剤が注射される。従来の前標的化法においては、抗体結合部位は腫瘍を標的にするよう使用され、およびビオチン/アビジンまたはビオチン/ストレプトアビジンは放射活性または毒性薬剤を固定化抗体へ付着するように使用されてきた。ビオチン/アビジンまたはストレプトアビジン結合は本質的に不可逆である。ここで、我々は標的結合ペプチドを抗体へ融合し、それは放射活性または毒性薬剤を結合するように選んだ。融合タンパク質は2、4、6または8のKDR-BPを含み、腫瘍への融合タンパク質の結合は非常に貪欲である。腫瘍に固定化されていない融合タンパク質を排除する、クリアリング剤は。融合タンパク質の注射の2から48時間の間に投与できる。クリアリング剤は、抗体と結合する部分は単量体であるので、クリアリング剤および固定化融合タンパク質の複合体は、非常に長い半減期は持たないであろう。クリアリング剤を注射して4から48時間以内に、固定化された抗体は、そこに結合しているクリアリング剤を失っているであろう。好適には、活性薬剤は、融合タンパク質と結合する部分において二量体である。活性薬剤は、クリアリング剤の注射の2から約48時間の間に注射される。

#### 【0582】

#### 【表26】

表22 GenBankエントリーAAN17825からの成熟HSAのアミノ酸配列

DAHKSEVAHR FKDLGEENFK ALVLIAFAQY LQQCPFEDHV KLVNEVTEFA  
 KTCVADESAE NCDKSLHTLF GDKLCTVATL RETYGEMADC CAKQEPERNE  
 CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV DVMCTAFHDN EETFLKKYLY EIARRHPYFY  
 APELLFFAKR YKAAFTECCQ AADKAACLLP KLDELDEGK ASSAKQRLKC  
 ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPKAEFAE VSKLVTDLTK VHTECCHGDL  
 LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLKECCE KPLLEKSHCI AEVENDEMPA  
 DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF LYEYARRHPD YSVVLLRLA  
 KTYKTTLEKC CAAADPHECY AKVFDEFKPL VEEPQNLIKQ NCELFEQLGE  
 YKFNALLVR YTKKVPQVST PTLVEVSRNL GKVGSCKCKH PEAKRMPCAE  
 DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCCTES LVNRRPCFSA LEVDETYVPK  
 EFNAETTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV ELVKHKPKAT KEQLKAVMDD  
 FAAFVEKCK ADDKETCFAE EGKLVAAASR AALGL (配列番号500)

【 0 5 8 3 】

【 表 2 7 】

表 2 3 配列番号 2 8 6 :: リンカー 1 :: H S A :: リンカー 2 :: 配列番号 2 9 4

AGDWWVECRVGTGLCYRYDTGTGGGK  
 PGGSGGEGGSGGEGGRPGGSEGGTGG  
 DAHKSEVAHR FKDLGEENFK ALVLIAFAQY LQQCPFEDHV KLVNEVTEFA  
 KTCVADESAAE NCDKSLHTLF GDKLCTVATL RETYGEMADC CAKQEPERNE  
 CFLQHKDDNP NLPRLVRPEV DVMCTAFHDN EETFLKLY EIARRHPYFY  
 APELLFFAKR YKAAFTECCQ AADKAACLLP KLDELDRDEGK ASSAKQRLKC  
 ASLQKFGERA FKAWAVARLS QRFPKAEFAE VSKLVTDLTK VHTECCHGDL  
 LECADDRADL AKYICENQDS ISSKLKECCE KPLLEKSHCI AEVENDEMPA  
 DLPSLAADFV ESKDVCKNYA EAKDVFLGMF LYEYARRHPD YSVVLLRLA  
 KTYKTTLEKC CAAADPHECY AKVFDEFKPL VEEPQNLIKQ NCELFEQLGE  
 YKFQNALVR YTKKVPQVST PTLVEVSRNL GKVGSKCKKH PEAKRMPCAE  
 DYLSVVLNQL CVLHEKTPVS DRVTKCTES LVNRRPCFSA LEVDETYVPK  
 EFNAETFTFH ADICTLSEKE RQIKKQTALV ELVKHKPKAT KEQLKAVMDD  
 FAAFVEKCK ADDKETCF AE EGKLVAAASR AALGL  
 GGS GGEGGSGGEGGSGPGE GEGSGGRP  
 GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (配列番号 501)

10

20

【 0 5 8 4 】

本発明は、その好適な態様に関して、特に示されおよび説明されてきたが、当業者は、付随する特許請求の範囲に包含されている本発明の範囲を離れることなく、形態および詳細の多様な変更がなされることを理解されたい。本明細書に引用された刊行物、特許および他の参考文献は、その全体が本明細書において援用される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 5 8 5 】

【 図 1 A 】 ( パネル A および B ) は結合ペプチド / ニュートラアビジン - H R P 複合体の飽和結合曲線を示すグラフである。図 1 A は配列番号 2 6 4 および配列番号 2 9 4 の飽和結合曲線を示す。図 1 B は配列番号 2 7 7 および配列番号 3 5 6 の飽和結合曲線を示す。すべてのペプチドは C 末端ピオチンおよび J J スペーサーを有している。

30

【 図 1 B 】 ( パネル A および B ) は結合ペプチド / ニュートラアビジン - H R P 複合体の飽和結合曲線を示すグラフである。図 1 A は配列番号 2 6 4 および配列番号 2 9 4 の飽和結合曲線を示す。図 1 B は配列番号 2 7 7 および配列番号 3 5 6 の飽和結合曲線を示す。すべてのペプチドは C 末端ピオチンおよび J J スペーサーを有している。

【 図 2 】 K D R トランスフェクト 2 9 3 H 細胞および M o c k トランスフェクト 2 9 3 H 細胞への、単一濃度 ( 5 . 5 5 n M ) のペプチド / ニュートラアビジン - H R P 複合体 : 対照 ( スペーサーによりピオチン化、ならびに配列番号 2 6 4 、 2 9 4 、 2 7 7 および 3 5 6 ) の結合を示すグラフである。すべてのペプチドは C 末端ピオチンおよび J J スペーサーを有している。

40

【 図 3 】 実施例 5 で試験したスペーサー ( ジ ( 8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸 ) 「 J J 」 ) およびピオチンの両方を持つペプチド構造および持たない構造 : ( ( a ) J J スペーサーを持つピオチン化配列番号 2 6 4 ; ( b ) N 末端ピオチンを持つ配列番号 2 6 4 ; ( c ) J J スペーサーを持つピオチン化配列番号 2 9 4 ; ( d ) ピオチン化配列番号 2 9 4 ) を示す。

【 図 4 】 K D R トランスフェクト 2 9 3 H 細胞および M o c k トランスフェクト 2 9 3 H 細胞への、単一濃度 ( 2 . 7 8 n M ) のペプチド / ニュートラアビジン H R P 複合体の結

50

合を示す棒グラフである；ペプチドは（a）対照（スパーサーを持つ）；（b）対照；（c）JJスパーサーを持つビオチン化配列番号264；（d）N末端ビオチンを持つ配列番号264；および（e）JJスパーサーを持つビオチン化配列番号294；およびビオチン化配列番号294を含む。

【図5】40%ラット血清存在下および非存在下でのペプチド/ニュートラアビジンHRP複合体の特異的結合（KDRトランスフェクト細胞への結合からMockトランスフェクト細胞への結合を引く）を示す棒グラフである。（a）配列番号294；（b）配列番号264；（c）配列番号277；（d）配列番号356。ペプチド/アビジンHRP溶液の濃度は（a）および（b）は6.66nM、（c）3.33nM、および（d）2.22nMであった。すべてのペプチドはC末端ビオチンおよびJJスパーサーを有している。 10

【図6】450nmの吸光度としてプロットしたmockトランスフェクト細胞およびKDRトランスフェクト細胞へのポリペプチド/アビジン-HRP溶液（配列番号294および/または配列番号264）の結合を示す棒グラフである。それぞれの四量体複合体を形成するために使用される対照およびKDR結合ペプチドの割合はそれぞれの試験多量体の下の説明に示す。

【図7】450nmでの吸光度としてプロットした、KDRトランスフェクト細胞へのJJスパーサー/アビジン-HRP複合体を持つビオチン化配列番号264の特異的結合（mockトランスフェクト細胞へのバックグラウンド結合を引く）を示す棒グラフである。下の説明に示すように、アッセイ系に複合体を形成していないペプチドの濃度（X軸に示す）を増やしながらか追加した。遊離配列番号264だけがKDRトランスフェクト細胞への配列番号264複合体の結合を減少させることが可能であった。 20

【図8】実施例6で試験した結合ポリペプチド配列：配列番号294および368～372の構造を示す。

【図9】KDRトランスフェクト細胞およびMockトランスフェクト細胞への蛍光ビーズの結合を示す棒グラフである。表示されたビオチン化リガンドが結合したニュートラアビジン被覆ビーズによるKDR発現293H細胞および非発現293H細胞への結合を試験した。

【図10】KDR発現293H形質移入体への、2種の濃度（30μMおよび0.3μM）の結合ポリペプチド（a）アセチル化配列番号294（改変したC末端「P6」、GDSRVCWEDSWGGEVCFRYPD；配列番号374を持たない）；（b）配列番号263（改変したC末端「P4」、AGDSWCSTEYTYCEMIGT；配列番号375を持たない）；（c）JJスパーサーを持つビオチン化配列番号264；および（d）配列番号277（JJスパーサーでビオチン化）による<sup>1 2 5</sup>I-標識VEGF結合の阻害割合（%）を示す棒グラフである。 30

【図11】活性化（リン酸化）KDRは非刺激（-V）HUVEC由来の免疫沈降物には検出されず、VEGF-刺激（+V）HUVEC由来の免疫沈降物には豊富にあることを示すフィルム上の化学ルミネセンス検出を示す（上部パネル）。抗KDRによるプロットの再検索は、全KDRに相当する量が両免疫沈降物に存在することを示した（下部パネル）。 40

【図12】VEGF-介在リン酸化を部分的に阻害する抗KDR抗体（1μg/mL）の能力を示す、フィルム上における化学ルミネセンス検出を示す。

【図13】VEGF-介在KDRリン酸化を阻害するKDR結合ポリペプチド配列番号306（10μM）の能力を示す、フィルム上における化学ルミネセンス検出を示す。

【図14】KDRトランスフェクト293H細胞へのTc-標識ポリペプチド（配列番号339）の結合を示す棒グラフである。

【図15】3種の異なる濃度（10μM、0.3μM、および0.03μM）のペプチドP12-XB（配列番号277）D2、D1、D3、およびP13-D（AQDWYYDEILSMADQLRHAF LSGG；配列番号376）による、KDRトランスフェクト293H細胞への<sup>1 2 5</sup>I-標識VEGF結合の阻害割合（%）を示す棒グラフである 50

。結果は、トリプリケートで行われた1回の実験 $\pm$ S.D.に由来する。

【図16】HUVEC中のKDRのVEGF誘発リン酸化を10nMで完全に阻害し、そして1nMで大部分のリン酸化を阻害するD1の能力を示す写真である。全KDR(下部パネル)に対するプロットの再検索は、試験化合物の効果が少ない試料負荷によるものではないことを示した。D1に含まれる2種の結合配列からなるホモ二量体は100nMまでリン酸化を阻害しなかった。

【図17】VEGFにより誘発される内皮細胞の遊走/浸潤をD1が強力に阻害することを示すグラフである。蛍光色素で遊走細胞を染色後、該遊走細胞を蛍光測定により定量した。

【図18】40%マウス血清の非存在下および存在下におけるmock形質移入293H細胞およびKDR形質移入293H細胞への<sup>125</sup>I-標識D5の結合を示すグラフである。 10

【図19】40%マウス血清の非存在下および存在下におけるKDRトランスフェクト293H細胞への<sup>125</sup>I-標識D5の特異的結合(KDR-MOCK)を示すグラフである。

【図20】パーセントで表した注射量/mL対時間としての血漿クリアランスのグラフである。

【図21】Superdexペプチドカラム由来の血漿のSE-HPLC特性を示す。パネルは上から、注入された試料、0分、30分、および90分。それぞれのパネルの挿入物はHPLC解析の測定時間、動物数、および注射容積を示す。 20

【図22】HUVEC増殖アッセイにおけるKDRペプチドの試験の結果を示すグラフである。A: D6; B: 配列番号277; C: 配列番号377(AEGTGDLHCYFPWVCSLDPGPEGGGK陰性対照); F: 配列番号377; 陰性対照。

【図23A】マウスKDR-Fcに結合するD1(図36を参照されたい)の速度論解析を示す。すべてのセンソグラムは2価分析物モデルに適合する。

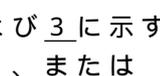
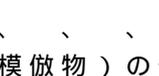
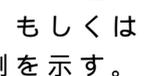
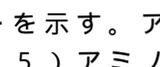
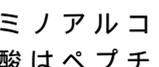
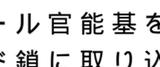
【図23B】マウスKDR-Fcに結合するD1(図36を参照されたい)の速度論解析を示す。すべてのセンソグラムは2価分析物モデルに適合する。

【図24A】配列番号264および配列番号294のヘテロ二量体、D7の速度論解析を示す。すべてのセンソグラムは、2価分析物モデルに適合する。

【図24B】配列番号264および配列番号294のヘテロ二量体、D7の速度論解析を示す。すべてのセンソグラムは、2価分析物モデルに適合する。 30

【図25A】マウスKDR-Fcに結合した蛍光標識配列番号277の速度論解析を示す。すべてのセンソグラムは、1:1ラングミュアモデルに適合する。

【図25B】マウスKDR-Fcに結合した蛍光標識配列番号277の速度論解析を示す。すべてのセンソグラムは、1:1ラングミュアモデルに適合する。

【図26】パネル1、2および3に示す、、、、もしくはジペプチド、または回転模倣物(たとえば、、、、または模倣物)の例を示す。

【図27】オキシムリンカーを示す。アミノアルコール官能基を含む(4)、およびアルコキシアミノ官能基を含む(5)アミノ酸はペプチド鎖に取り込まれるが、必ずしもペプチド鎖の末端ではない。 40

【図28】ペンダントプロモアセトアミド官能基を有するシステインの環化の例を示す。

【図29】システイン部分とペプチドアルデヒドの分子内反応を介したチアゾリジン結合による環状ペプチドの形成を示す図式である。

【図30】LysおよびAspの準直交(quasiorthogonal)脱保護、その後の樹脂上環化および樹脂からの開裂によるジスルフィド結合のラクタム代替物を示す図式である。

【図31】アリルを基礎にした保護基を使用したLysおよびAspの準直交脱保護、その後の樹脂上環化および樹脂からの開裂によるジスルフィド結合のラクタム代替物を示す図式である。

【図32】Grubbsオレフィンメタセシス環化を示す図式である。 50

【図33】リン脂質構造を示す。

【図34】図34A～Fは、キレート剤の好ましい構造を示す。

【図35】キレート剤の構造を示す。

【図36】二量体1 (D1; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (配列番号277) [(ピオチン - JJK - (O=)C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O) - JJ - NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH((Ac - VCWEDSWGGEVCFRYPGGG (配列番号370)) - NH)CONH<sub>2</sub>) - NH<sub>2</sub>])を示す。

【図37】二量体2 (D2; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (配列番号277) [(ピオチン - JJK - (O=)C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O) - JJ - NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH((Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTJ (配列番号338)) - NH)CONH<sub>2</sub>) - NH<sub>2</sub>])を示す。 10

【図38】二量体3 (D3; Ac - VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK (配列番号337) [(ピオチン - JJK - (O=)C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O) - JJ - NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH((Ac - VCWEDSWGGEVCFRYPGGG (配列番号370)) - NH)CONH<sub>2</sub>) - NH<sub>2</sub>])を示す。

【図39】二量体4 (D4; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK (配列番号338) [DOTA - JJK - (O=)C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O) - JJ - NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH((Ac - VCWEDSWGGEVCFRYPGGG (配列番号370)) - NH)CONH<sub>2</sub>]) - NH<sub>2</sub>)を示す。

【図40】二量体5 (D5; Ac - VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK (配列番号337) (JJ - C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(=O) - K - NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH((Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGG (配列番号378)) - NH)CONH<sub>2</sub>) - NH<sub>2</sub>)を示す。 20

【図41】二量体8 (D8; Ac - AQDWYYDEILSMADQLRHAF LSGGGGGK (配列番号356) {Ac - AQDWYYDEILSMADQLRHAF LSGGGGGK (配列番号356) (J - Glut - ) - NH<sub>2</sub>} K (ピオチン - JJ) - NH<sub>2</sub>)を示す。

【図42】二量体9 (D9; Ac - AQDWYYDEILSMADQLRHAF LSGGGGGK (配列番号356) { [Ac - GDSRVCWEDSWGGEVCFRYPGGGGK (配列番号294) (JJ - Glut - )] - NH<sub>2</sub>} K - NH<sub>2</sub>)を示す。 30

【図43】二量体10 (D10; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (配列番号277) { [Ac - GDSRVCWEDSWGGEVCFRYPGGGGK (配列番号294) (JJ - Glut - NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH(PnAO6 - Glut - NH)(C=O - )) - NH<sub>2</sub>] - NH<sub>2</sub>}を示す。

【図44】二量体11 (D11; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (配列番号277) {Ac - VCWEDSWEDSWGGEVCFRYPGGGGK (配列番号475) [JJ - Glut - NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH(DOTA - JJ - NH - ) (C=O) - ] - NH<sub>2</sub>} - NH<sub>2</sub>)を示す。

【図45】二量体12 (D12; Ac - AGPTWCEDDYCWLFGTGGGGK (配列番号476) { [PnAO6 - Glut - K (Ac - VCWEDSWGGEVCFRYPDPGGGGK (配列番号337) (-C(=O)CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O) - ) - NH<sub>2</sub>)] - NH<sub>2</sub>}を示す。 40

【図46】二量体13 (D13; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGGK (配列番号277) {Ac - VCWEDSWGGEVCFRYPGGGGK (配列番号337) [JJ - Glut - K(BOA)] - NH<sub>2</sub>} - NH<sub>2</sub>)を示す。

【図47】二量体14 (D14; Ac - AQDWYYDEILSMADQLRHAF LSGGGGGK (配列番号356) {PnAO6 - Glut - K [Ac - GSDRVCWEDSWGGEVCFRYPDPGGGGK (配列番号477) (JJ - Glut) - NH<sub>2</sub>] - NH<sub>2</sub>)を示す。

【図48】二量体15 (D15; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGGK 50

(配列番号277) {[ [Ac - GDSRVCWEDSWGGGEVCFRYPGGGK  
JJ (配列番号294) - Glut] - NH<sub>2</sub> ] - K (PnAO6 - Glut) } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図49】二量体16 (D16; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK  
K (配列番号277) { PnAO6 - Glut - K [Ac - GDSRVCWEDSWGG  
EVCFRYPGGGK (配列番号294) [ - C (=O) CH<sub>2</sub> O (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> O  
)<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> C (=O) NH (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> O (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> O)<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> NHC (=O)  
CH<sub>2</sub> O (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> O)<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> C (=O) - ] - NH<sub>2</sub> ] } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図50】二量体17 (D17; Ac - AQDWYYDEILJGRGGRGGRGGK 10  
(配列番号478) { K [Ac - VCWEDSWGGGEVCFRYPGGGK (配列番  
号294) (JJ - Glut) - NH<sub>2</sub> ] } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図51】二量体18 (D18; Ac - AGPTWCDDYDWEYCWLGTFFGGGK  
(配列番号479) { PnAO6 - Glut - K [Ac - GVDFRCEWSDWGEV  
GCRSPDYGGGK (配列番号489) (JJ - Glut) - NH<sub>2</sub> ] } - NH<sub>2</sub> )  
を示す。

【図52】二量体19 (D19; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK  
(配列番号294) { ピオチン - K [Ac - VCWEDSWGGGEVCFRYPGGG  
K (JJ - Glut) - NH<sub>2</sub> ] } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図53】二量体20 (D20; (-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGG 20  
GK (配列番号480) - NH<sub>2</sub> ) - Glut - VCWEDSWGGGEVCFRYPGG  
GG (配列番号370) - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図54】二量体21 (D21; [-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGG  
GK (配列番号480) (PnAO6 - Glut) - NH<sub>2</sub> ] - Glut - VCWEDS  
WGGGEVCFRYPGGG (配列番号370) - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図55】二量体22 (D22; Ac - GDSRVCWEDSWGGGEVCFRYPGG  
GGK (配列番号294) { JJ - Glut - JJ - AGPTWCEDDWYYCWL F  
TGGGK (配列番号481) - NH<sub>2</sub> } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図56】二量体23 (D23; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK 30  
(配列番号277) { Ac - VCWEDSWGGGEVCFRYPGGGK (配列番号3  
37) [ JJ - Glut - K (SATA) ] - NH<sub>2</sub> } - NH<sub>2</sub> を示す。また、D23は  
SATA (S - アセチルチオアセチル) 基で官能化されている。

【図57】二量体24 (D24; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK  
(配列番号277) { SATA - JJK [Ac - VCWEDSWGGGEVCFRYPGG  
GGK (配列番号337) (JJ - Glut) - NH<sub>2</sub> ] } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図58】二量体25 (D25; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK  
(配列番号277) { Ac - GDSRVCWEDSWGGGEVCFRYPGGGK (配  
列番号294) [ JJ - Glut - NH (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH (NH<sub>2</sub>) C (=O)  
) - ] - NH<sub>2</sub> } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図59】二量体26 (D26; AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (配 40  
列番号277) { (-Glut - JJ - VCWEDSWGGGEVCFRYPGGG (配  
列番号370) - NH<sub>2</sub> ) - K } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図60】二量体27 (D27; Ac - AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK  
K (配列番号277) { Ac - VCWEDSWGGGEVCFRYPGGGK (配列番号  
337) [ S (GalNAc (Ac)<sub>3</sub> - -D) - G - S (GalNAc (Ac)<sub>3</sub> -  
-D) - Glut - S (GalNAc (Ac)<sub>3</sub> - -D) - G - S (GalNAc (Ac)  
Ac)<sub>3</sub> - -D) - NH (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - (S) - CH (ピオチン - JJNH - ) C (=O)  
) - ] - NH<sub>2</sub> } - NH<sub>2</sub> ) を示す。

【図61】本発明の二量体結合ペプチドを示す。

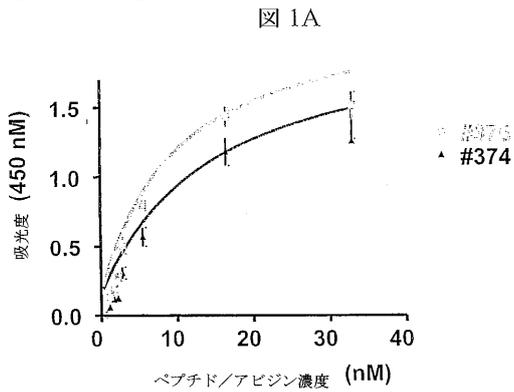
【図62】本発明の二量体結合ペプチドを示す。

- 【図63】本発明の二量体結合ペプチドを示す。
- 【図64】本発明の二量体結合ペプチドを示す。
- 【図65】D6濃度の関数としての腫瘍増殖阻害を示す。
- 【図66】グリコシル化し、改変したスパーサーを持つD26( )が細胞遊走アッセイにおいてVEGFの作用を阻害し、それらの化学的改変を欠如するD24( )より強力にVEGF-刺激細胞遊走を阻害できることを示す。
- 【図67】培養したHUVECによる細胞遊走アッセイにおいて、VEGFの生物学的作用を阻害するD6の効力を付加物Aが促進することを示す。 :示した濃度でのD6単独。 :示した濃度でのD6+100nM 付加物A(一定)。
- 【図68】スキーム1(ペプチド2の合成)を示す図式である。 10
- 【図69】スキーム2(ペプチド4の合成)を示す図式である。
- 【図70】スキーム3(D26の合成)を示す図式である。
- 【図71】配列番号504( )およびD1( )によるKDRトランスフェクト細胞への特異的<sup>1 2 5</sup>I-VEGF結合の%阻害±s.d.を示す。
- 【図72】配列番号504( )およびD1( )の示した濃度の存在下でのHUVEC細胞の%最大VEGF-刺激細胞遊走±s.d.を示す。
- 【図73】<sup>1 2 5</sup>I-ストレプトアビジンと対照ペプチドおよび試験ペプチド(配列番号321、320および323)の複合体のmockトランスフェクト細胞およびKDRトランスフェクト細胞への全結合(VEGF存在下)をグラフで示す。配列番号321を含む複合体だけが特異的結合(KDR-mock)を示した。 20
- 【図74】ペプチド(配列番号321)-<sup>1 2 5</sup>I-ストレプトアビジン複合体の各種濃度(0~13.33nM)での、KDRトランスフェクト細胞へのペプチド-<sup>1 2 5</sup>I-ストレプトアビジン複合体の特異的結合(VEGF非存在下および存在下)を示すグラフである。
- 【図75】ホモ二量体D8( )はヘテロ二量体D17( )とは異なり、実施例28で行われた細胞遊走アッセイにおいてVEGFの作用を阻害しないことを示す。
- 【図76】環状ラクタムペプチドの合成を示す図式である(見本手順)。
- 【図77】異なるスパーサー長とビオチンを持つ配列番号482誘導体の結合を示すグラフである。誘導体は配列番号482標的配列とビオチン間において、それぞれJスパーサーを0、1および2有する。 30
- 【図78】実施例32に記載のKDRトランスフェクト293H細胞へのTc-標識D10の結合を示す。パネルBは実施例32に記載のKDRトランスフェクト293H細胞へのTc-標識D18の結合の欠如を表す。Mock=mockトランスフェクト。Trans=KDRトランスフェクト。MS=マウス血清
- 【図79A】図79A~Gは、本発明の結合ペプチドの誘導体を示す。
- 【図79B】図79A~Gは、本発明の結合ペプチドの誘導体を示す。
- 【図79C】図79A~Gは、本発明の結合ペプチドの誘導体を示す。
- 【図79D】図79A~Gは、本発明の結合ペプチドの誘導体を示す。
- 【図79E】図79A~Gは、本発明の結合ペプチドの誘導体を示す。
- 【図79F】図79A~Gは、本発明の結合ペプチドの誘導体を示す。 40
- 【図79G】図79A~Gは、本発明の結合ペプチドの誘導体を示す。
- 【図80】PC3腫瘍を移植されたヌードマウスで行われたD13による放射線治療研究の結果を要約する。実施例34に記載のように、描かれたそれぞれの線は、1組の非処置マウスにおける平均の腫瘍増殖を表す太い点線以外は、処置されたマウスにおける個々の腫瘍増殖の時間経過を示す。
- 【図83】本発明のKDRペプチドに結合したマイクロバブルの懸濁液注射後30分までのマトリゲルまたは腫瘍におけるバブル造影剤の取込および滞留を示す。対照的に、同じバブルは、マトリゲルまたは腫瘍部位の外側に位置するAOIでは一過性(わずか10分)の可視化/バブル造影剤だけを示した。
- 【図84】本発明のKDRペプチドに結合したマイクロバブルの懸濁液注射後30分まで 50

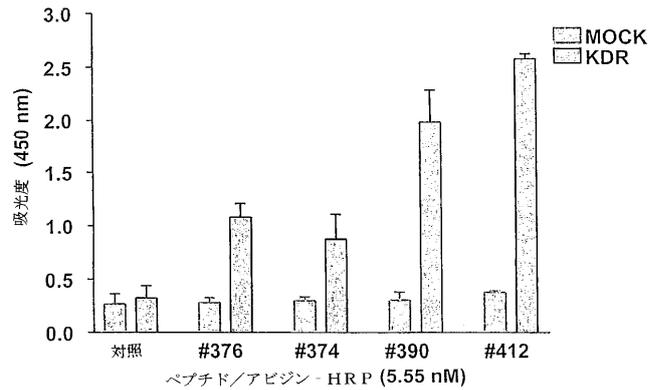
のマトリゲルまたは腫瘍におけるバブル造影剤の取込および滞留を示す。対照的に、同じバブルは、マトリゲルまたは腫瘍部位の外側に位置するA O Iでは一過性（わずか10分）の可視化/バブル造影剤だけを示した。

【図85】10%ヒト血清アルブミン存在下でのKDRトランスフェクト細胞またはm o c kトランスフェクト細胞に結合したペプチド結合超音波造影剤の代表例を示す。（拡大：100x）

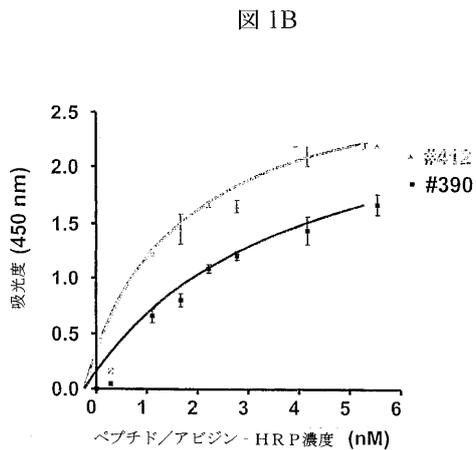
【図1A】



【図2】



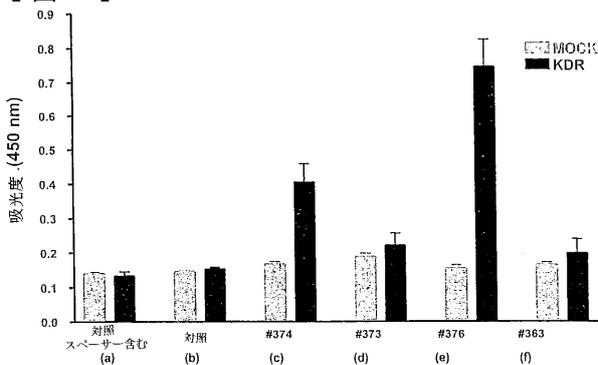
【図1B】



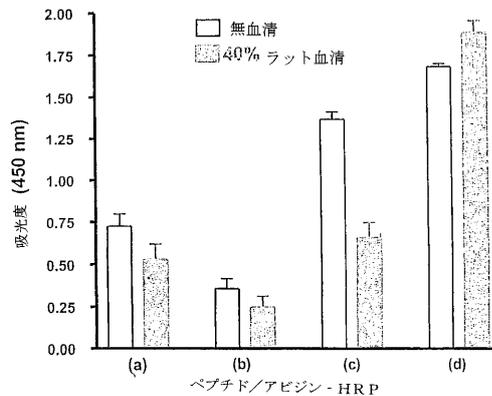
【 図 3 】

- (a) Ac-AGPKWCEEDWYCYCMITGT-GGGK(ヒスチジン)・NH<sub>2</sub> (配列番号 374)
- (b) Ac-AGPKWCEEDWYCYCMITGT-GGGK(ヒスチジン)・NH<sub>2</sub> (配列番号 373)
- (c) Ac-GDSRYCWCWEDSWGGVEYCFRYPD-GGGK(ヒスチジン)・NH<sub>2</sub> (配列番号 376)
- (d) Ac-GDSRYCWCWEDSWGGVEYCFRYPD-GGGK(ヒスチジン)・NH<sub>2</sub> (配列番号 363)

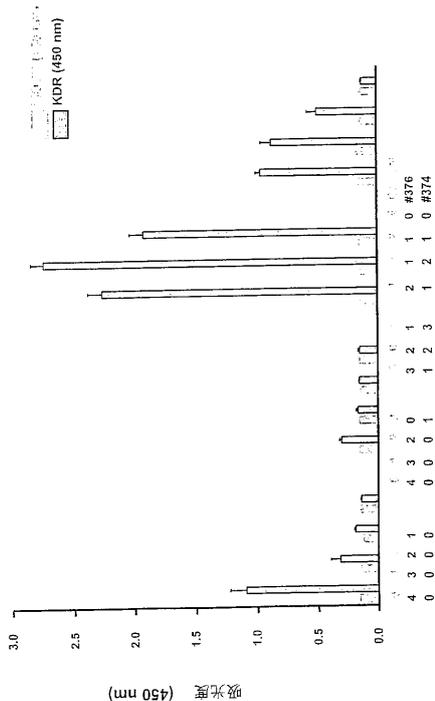
【 図 4 】



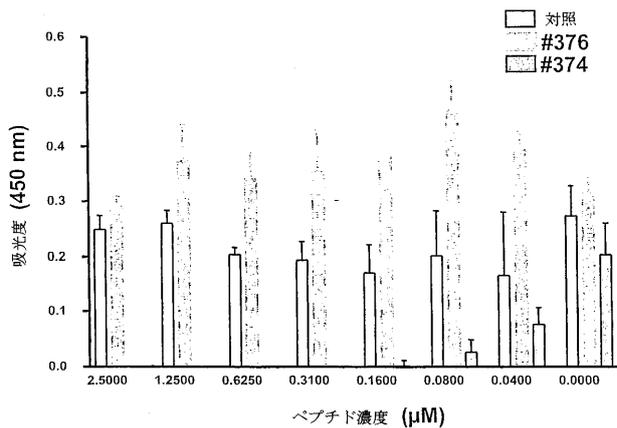
【 図 5 】



【 図 6 】



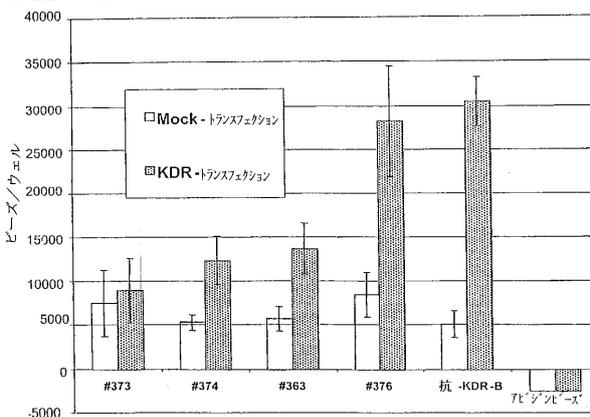
【 図 7 】



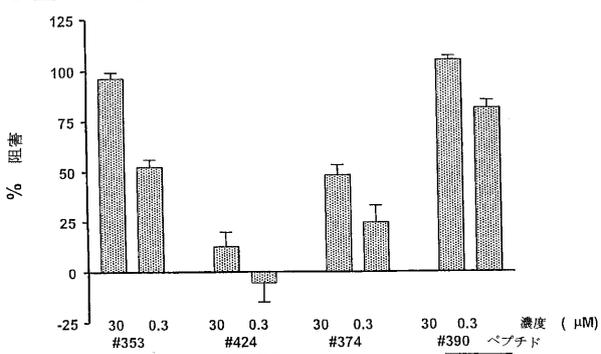
【 図 8 】

配列	配列番号	$K_D$ , B ( $\mu$ M)
GDSRVCWEDSWGGEVCFRYPDGGGK	428	0.069
VCWEDSWGGEVCFGGGK	446	0.91
GDSRVCWEDSWGGEVCFGGGK	447	1.30
VCWEDSWGGEVCFRYPDGGGK	448	0.040
SRVCWEDSWGGEVCFRYPGGGK	449	0.035
GDSRVCWEDSWGGEVCFRYPGGGK	450	0.060

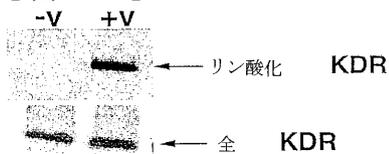
【 図 9 】



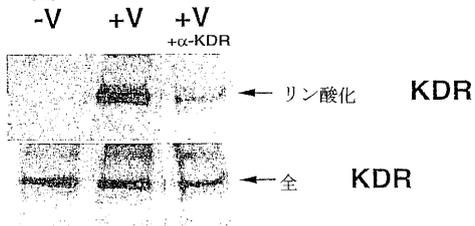
【 図 10 】



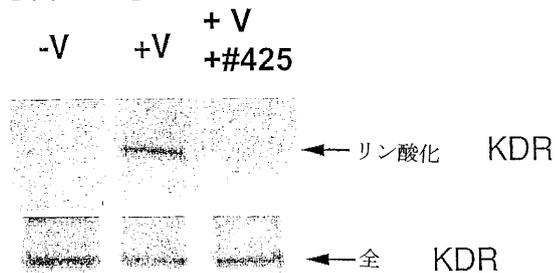
【 図 11 】



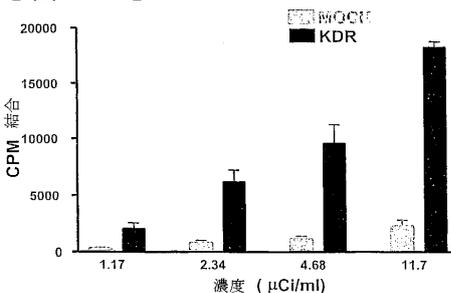
【 図 12 】



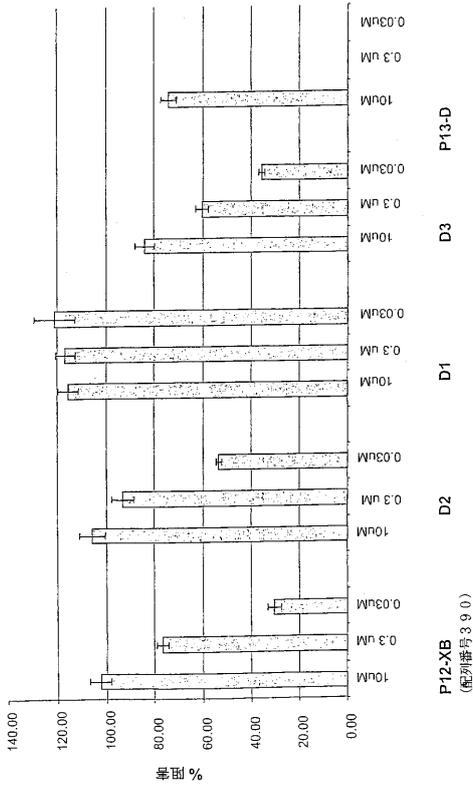
【 図 13 】



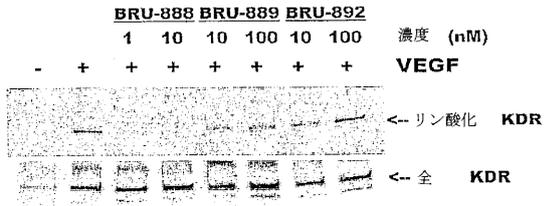
【 図 14 】



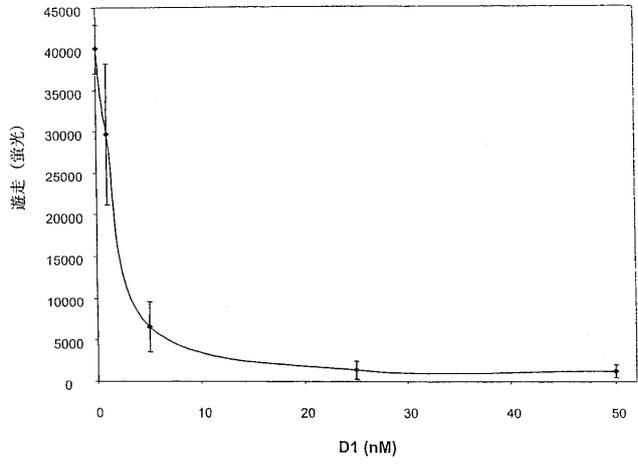
【図 15】



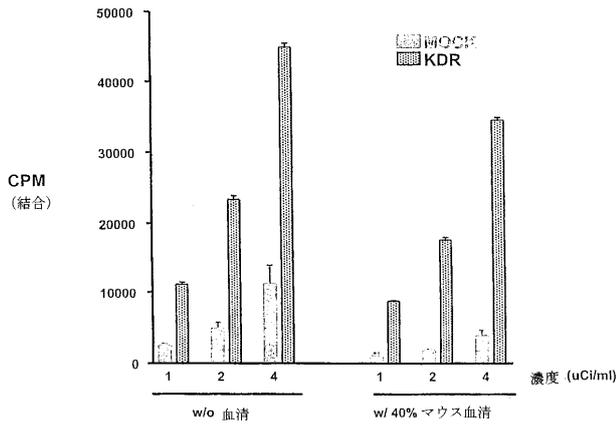
【図 16】



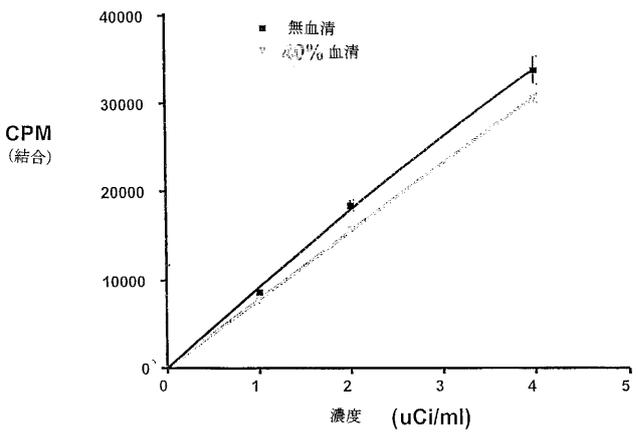
【図 17】



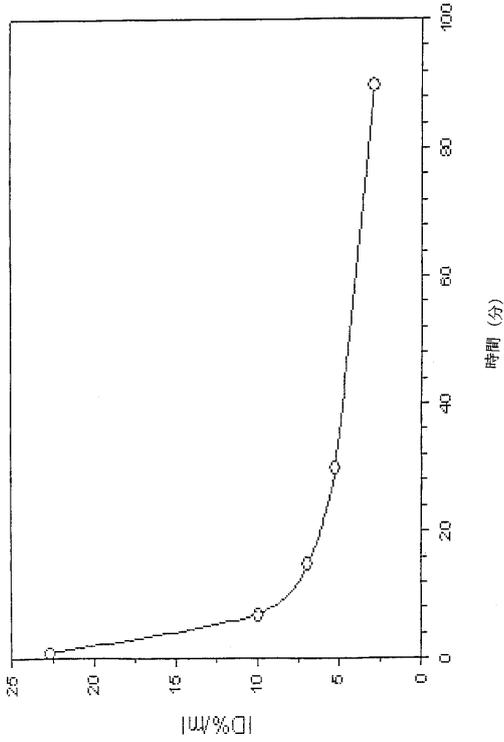
【図 18】



【図 19】

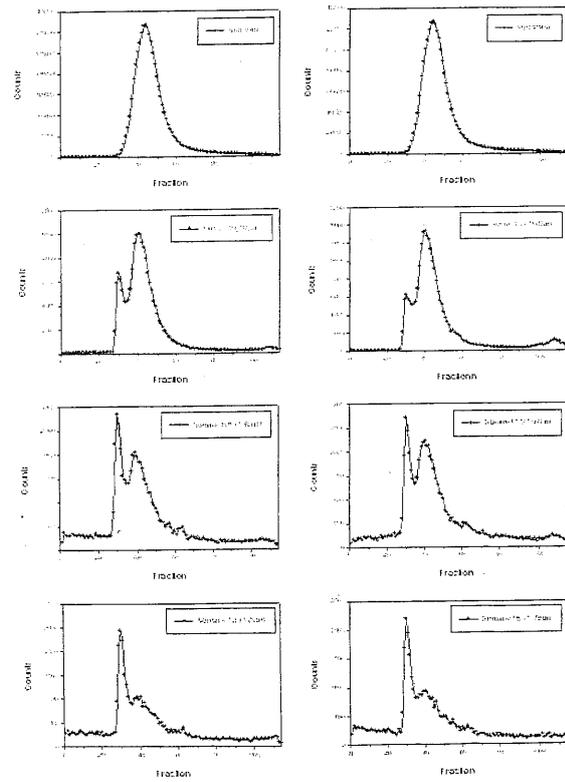


【 図 2 0 】

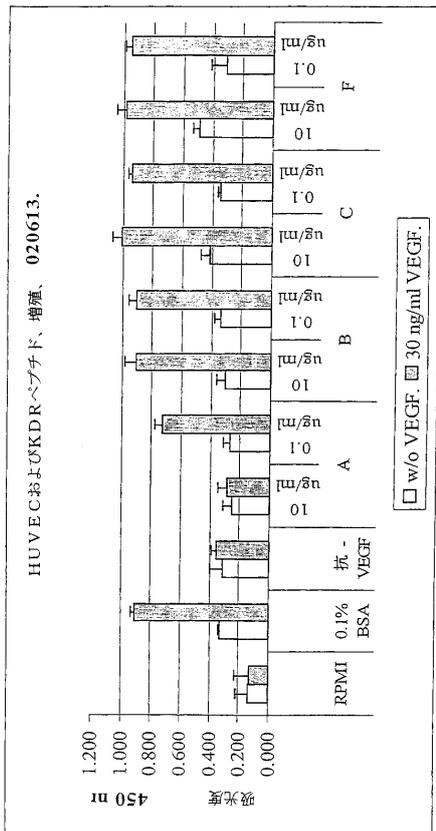


【 図 2 1 】

マウス血漿中の<sup>125</sup>I-DX-1235のSECクロマトグラム

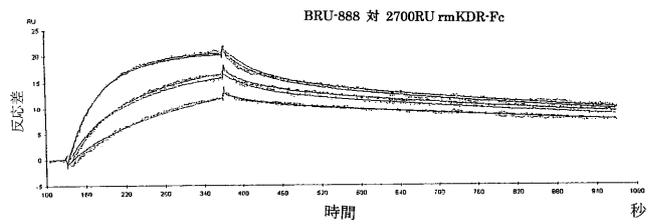


【 図 2 2 】



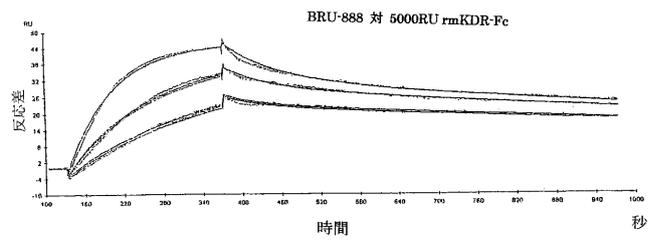
【 図 2 3 A 】

図 23A



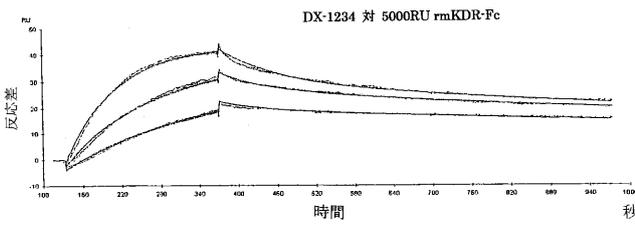
【 図 2 3 B 】

図 23B



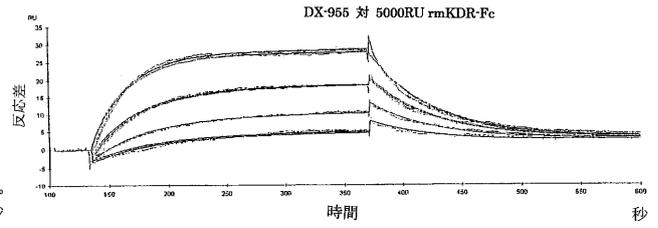
【 図 2 4 A 】

図 24A



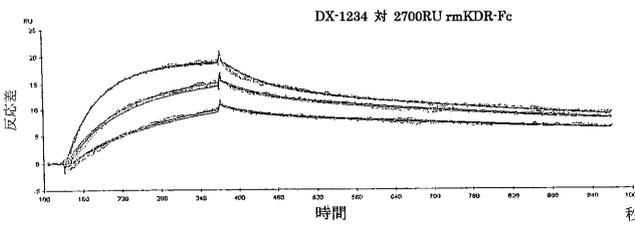
【 図 2 5 A 】

図 25A



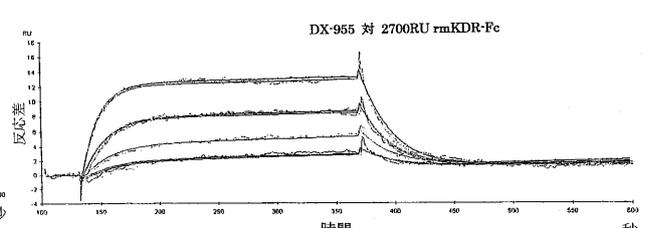
【 図 2 4 B 】

図 24B



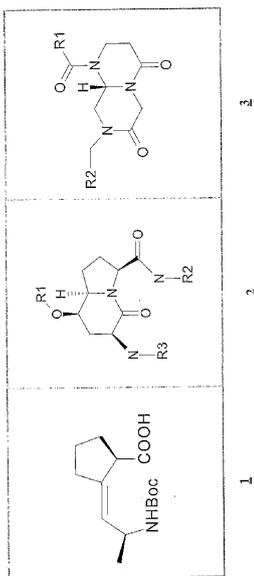
【 図 2 5 B 】

図 25B



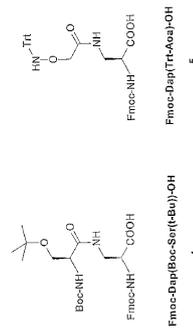
【 図 2 6 】

FIG. 26



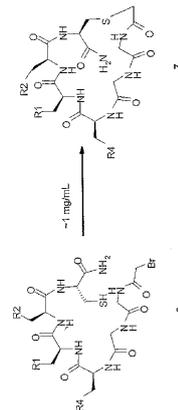
【 図 2 7 】

FIG. 27



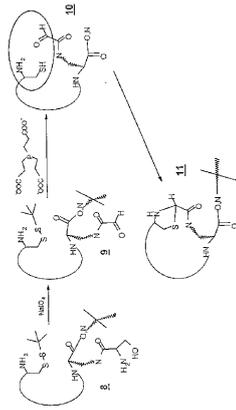
【 図 2 8 】

FIG. 28

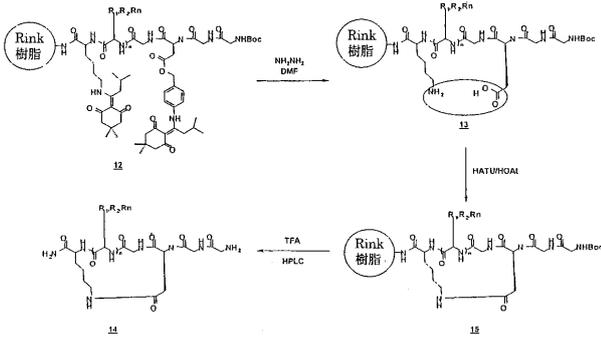


【 図 29 】

FIG. 29

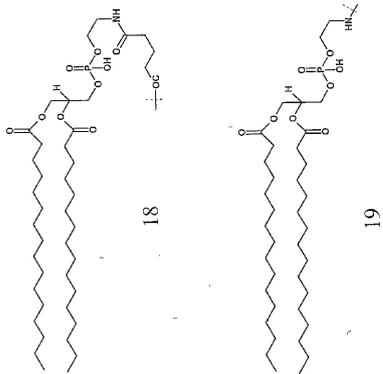


【 図 30 】



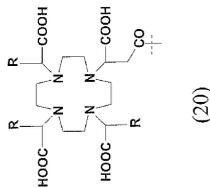
【 図 33 】

FIG. 33

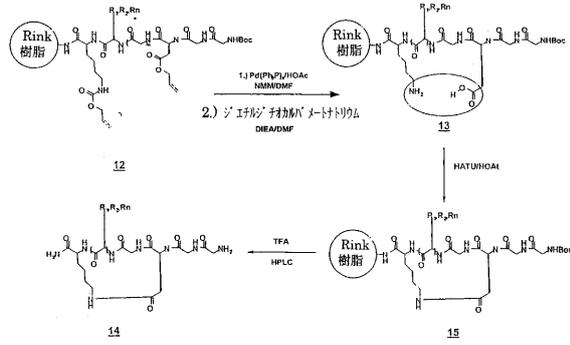


【 図 34 A 】

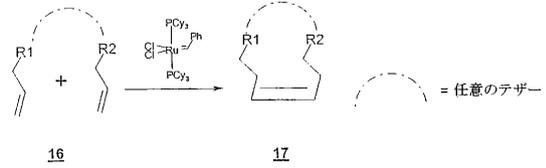
FIG. 34A



【 図 31 】

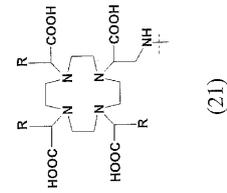


【 図 32 】



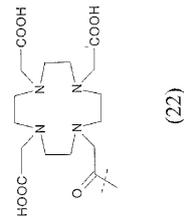
【 図 34 B 】

FIG. 34B



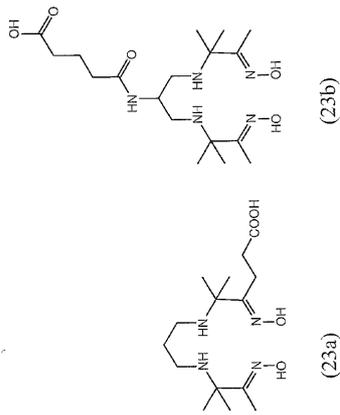
【 図 34 C 】

FIG. 34C



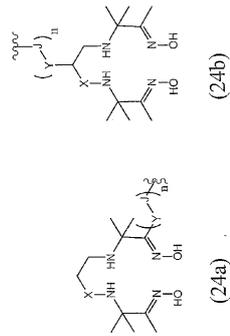
【 図 3 4 D 】

FIG. 34D



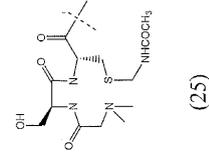
【 図 3 4 E 】

FIG. 34E



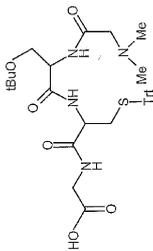
【 図 3 4 F 】

FIG. 34F

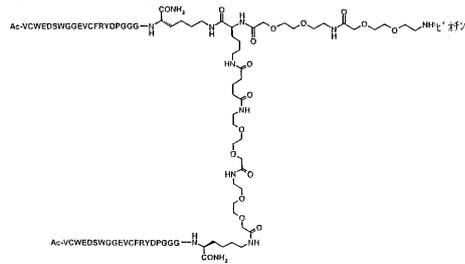


【 図 3 5 】

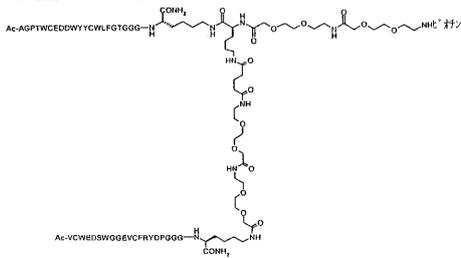
FIG. 35



【 図 3 8 】

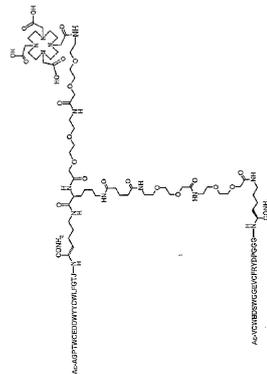


【 図 3 6 】

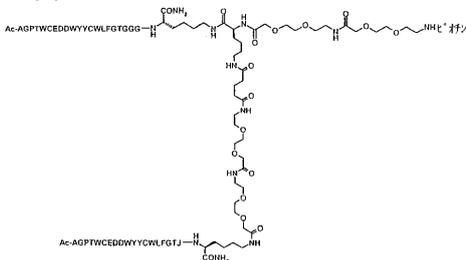


【 図 3 9 】

FIG. 39

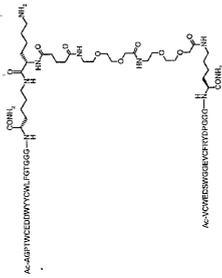


【 図 3 7 】

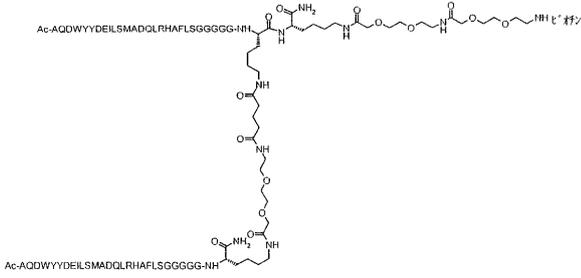


【 40 】

FIG. 40

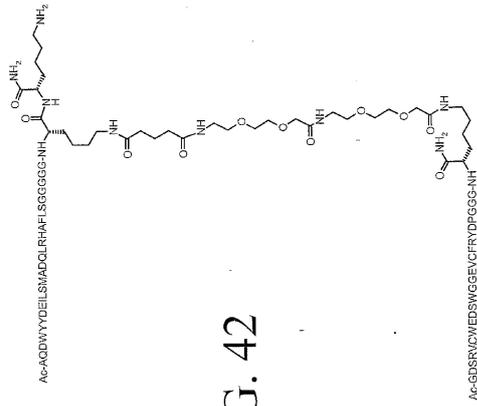


【 41 】



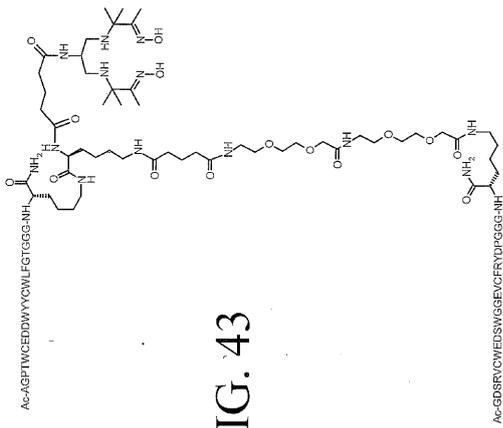
【 42 】

FIG. 42



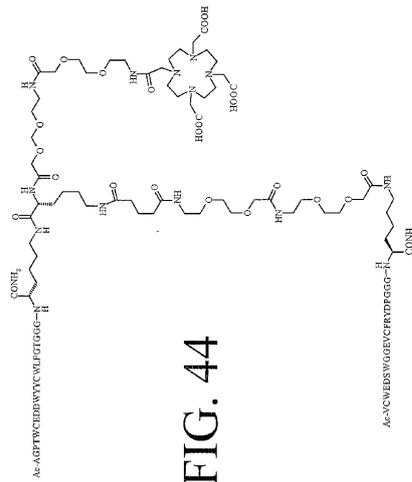
【 43 】

FIG. 43



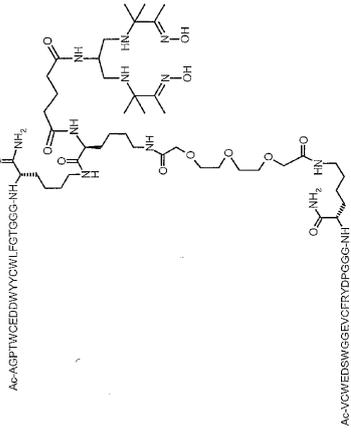
【 44 】

FIG. 44



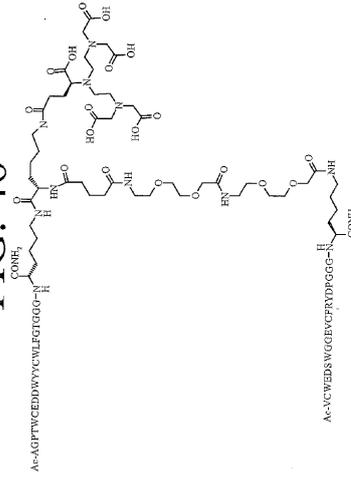
【 図 4 5 】

FIG. 45



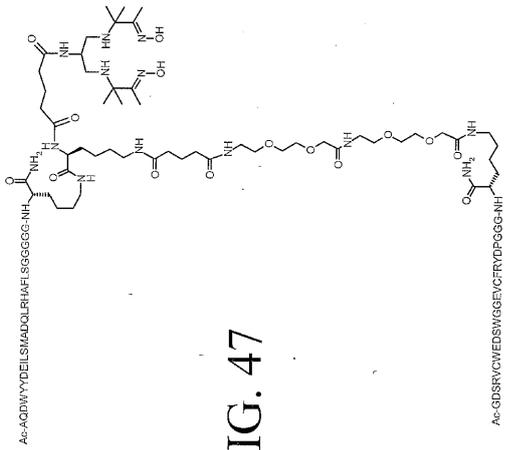
【 図 4 6 】

FIG. 46



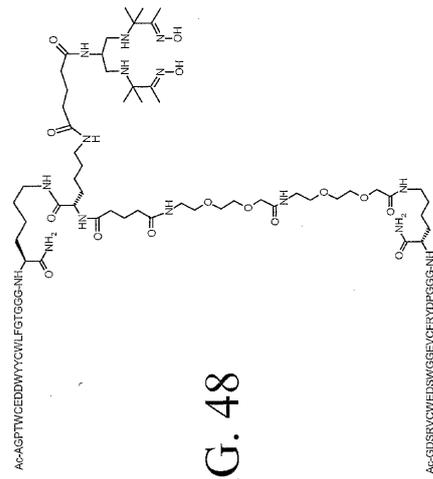
【 図 4 7 】

FIG. 47



【 図 4 8 】

FIG. 48



【 図 49 】

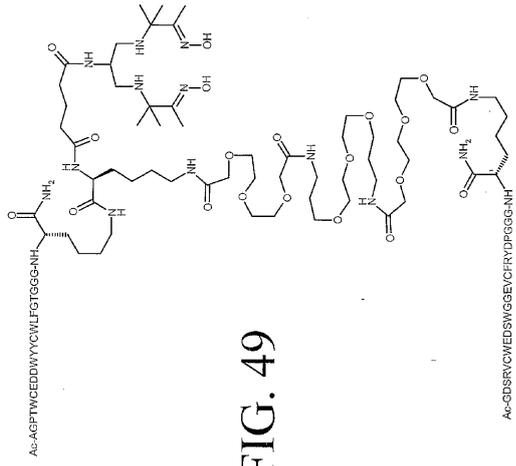


FIG. 49

【 図 50 】

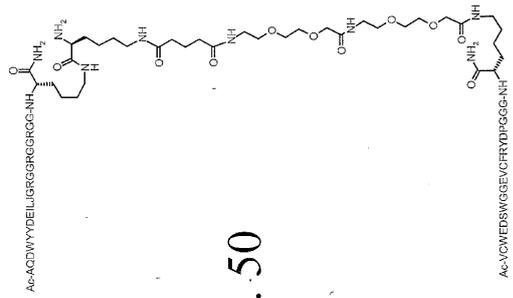


FIG. 50

【 図 51 】

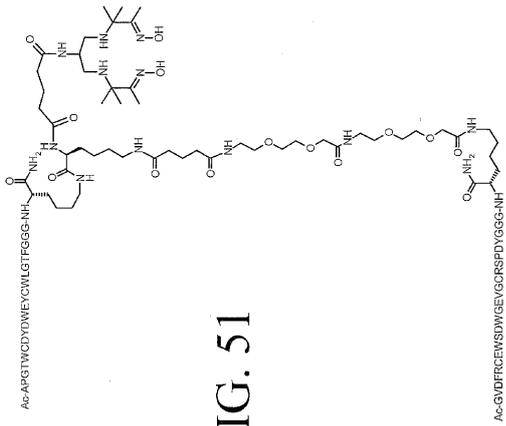


FIG. 51

【 図 52 】

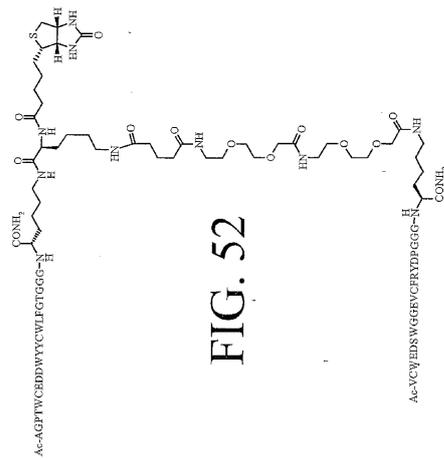


FIG. 52



【 57 】

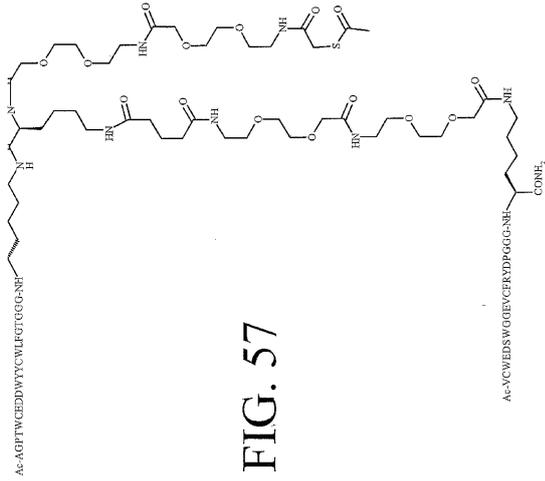


FIG. 57

【 58 】

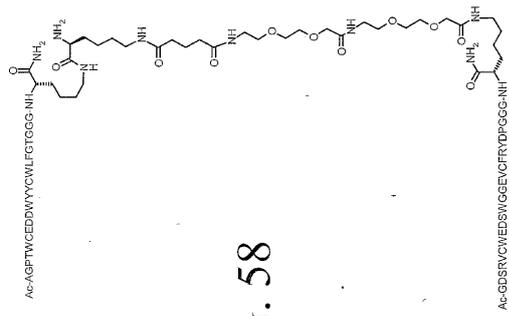


FIG. 58

【 59 】

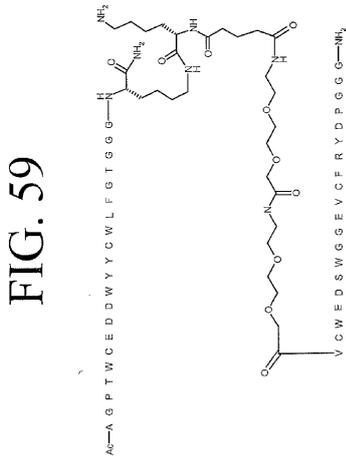


FIG. 59

【 60 】

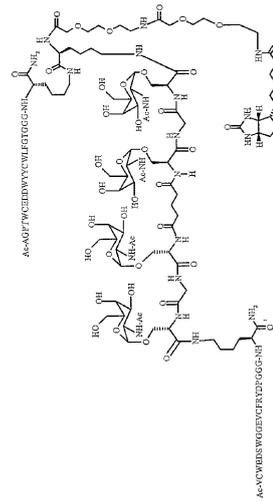
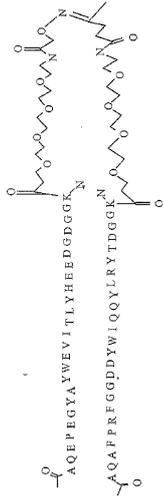


FIG. 60

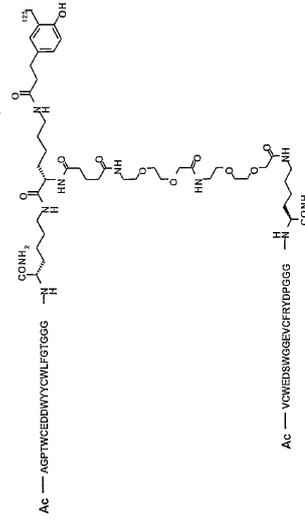
【 図 6 1 】

FIG. 61



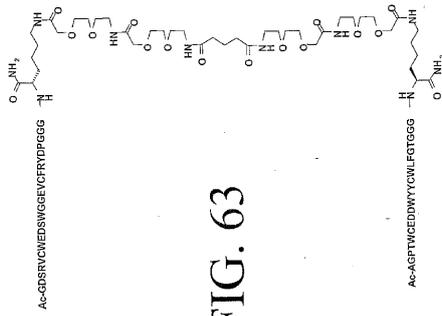
【 図 6 2 】

FIG. 62



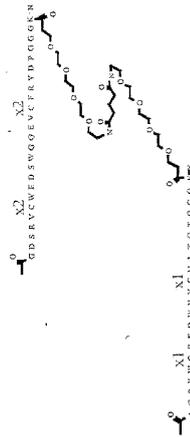
【 図 6 3 】

FIG. 63

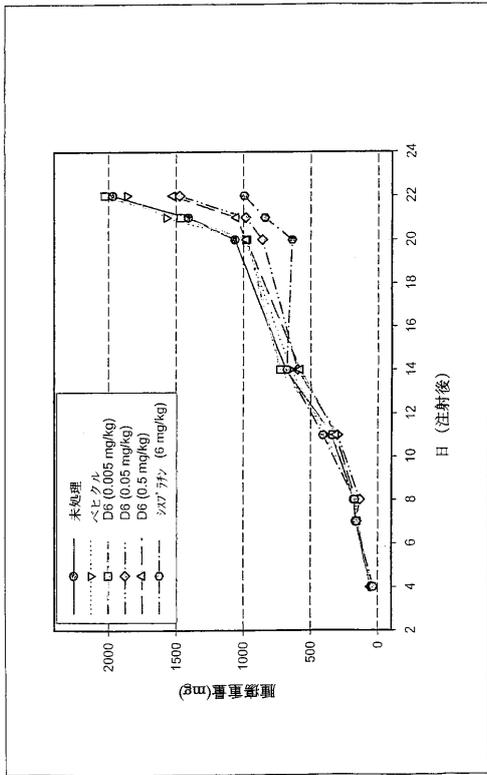


【 図 6 4 】

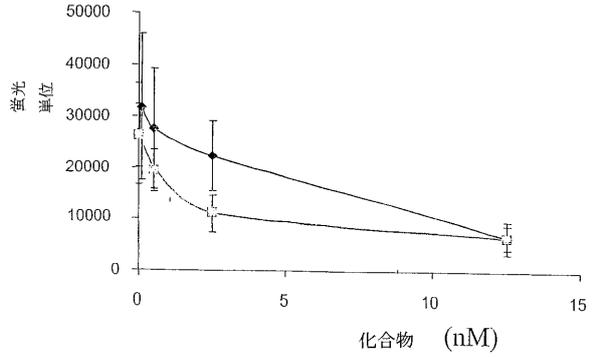
FIG. 64



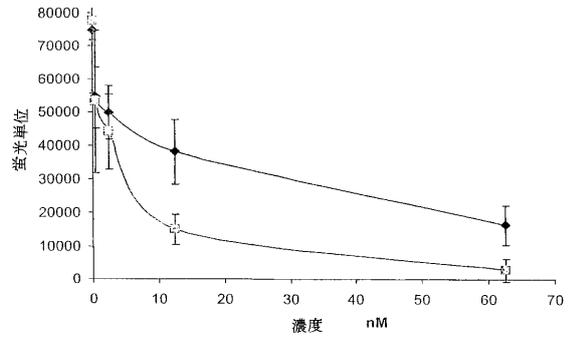
【 図 6 5 】



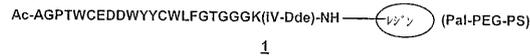
【 図 6 6 】



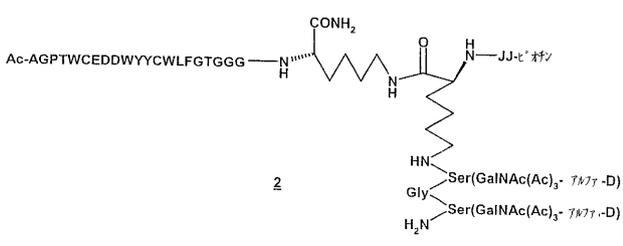
【 図 6 7 】



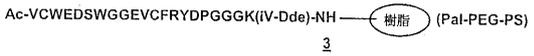
【 図 6 8 】



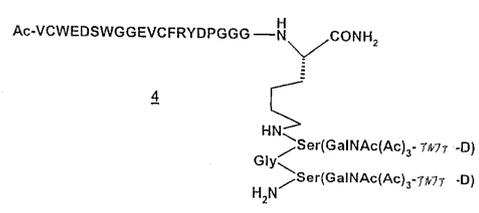
1. DMF中10% ピペリジン (2 x 10分)
2. Fmoc-Lys(IV-Dde)-OH/HOBt/DIC/DMF
3. DMF中20% ピペリジン (2 x 10分)
4. Fmoc-NH-JJ-ヒドリン/HOBt/DIC/DMF
5. NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>/DMF (10%, 2 x 10分)
6. Fmoc-Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D)-OH/HATU/DIEA/DMF
7. DMF中20% ピペリジン (2 x 10分)
8. Fmoc-Gly-OH/HOBt/DIC/DMF
9. DMF中20% ピペリジン (2 x 10分)
10. Fmoc-Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D)-OH/HATU/DIEA/DMF
11. DMF中20% ピペリジン (2 x 10分)
12. 試薬B
13. DMSO/水性N-ヒドリン/調整pH8/空気/2日



【 図 6 9 】



1. DMF中10% ピペリジン (2 x 10分)
2. Fmoc-Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D)-OH/HATU/DIEA/DMF
3. DMF中20% ピペリジン (2 x 10分)
4. Fmoc-Gly-OH/HOBt/DIC/DMF
5. DMF中20% ピペリジン (2 x 10分)
6. Fmoc-Ser(GalNAc(Ac)<sub>3</sub>-α-D)-OH/HATU/DIEA/DMF
7. DMF中20% ピペリジン (2 x 10分)
8. 試薬B
9. DMSO/N-ヒドリン/調整pH8/空気/2日







【 図 7 9 C 】

化合物配列/構造 (レッドテキスト中の親配列)	得られたか 否か? Y/N	SEQ ID NO	MS データ <sup>1</sup>
Ac-AGPTWCEDaDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	406	2505.8 [M-H], 1252.1 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDaYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	407	2506.0 [M-H], 1252.0 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDaYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	408	2434.4 [M-H], 1217.1 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYaCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	409	2458 [M-H], 1228.6 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYaCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	410	2457.6 [M-H], 1228.5 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCaLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	411	2434.8 [M-H], 1228.1 [M-3H+Na] <sup>2</sup> , 1217.0 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCwLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	412	2507.7 [M-H], 1254.1 [M-3H+Na] <sup>2</sup> , 1253.6 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCwLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	413	2473.6 [M-H], 1247.6 [M-3H+Na] <sup>2</sup> , 1236.2 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCwLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	414	2563.7 [M-H], 1279.3 [未帰属], 1292.7 [M-3H+Na] <sup>2</sup> , 1281.5 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCwLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	415	2519.0 [M-H], 1259.5 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	294	
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	416	1401.9 [M-3H+Na], 1391.7 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	417	1664.4 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	418	1664.7 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	277	
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	419	1267.9 [M-2H] <sup>2</sup>
DWYY 37-71 に対する最小数の AA		420	
Ac-GDWYGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	421	1041.2 [M-H] <sup>1</sup>
Ac-EDDYYGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	422	1228.3 [M-H], 612.8 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AQDWYYAWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	423	1859 [M-H], 986.4 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AQDWYYAWL-NH <sub>2</sub>	Y	424	1254.4 [M-H] <sup>1</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	277	
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	425	1281.5 [M-2H] <sup>2</sup> , 853.6 [M-3H] <sup>3</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	426	1285.4 [M-2H] <sup>2</sup> , 856.8 [M-3H] <sup>3</sup>

図 79C

【 図 7 9 D 】

化合物配列/構造 (レッドテキスト中の親配列)	得られたか 否か? Y/N	SEQ ID NO	MS データ <sup>1</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	427	1265.8 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	277	
Ac-AGPTWAEDDYYAWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	428	2486.9 [M-H], 1243.6 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AAFAWCAADYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	429	1272.5 [M-TFA- 2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCADDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	430	2192.6 [M-H], 1096.0 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	277	
Ac-CEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	431	2037.6 [M-H], 1018.4 [M-2H] <sup>2</sup> , 520.8 [M-3H+2Na] <sup>3</sup>
Ac-WCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	432	1111.6 [M-2H] <sup>2</sup> , 740.7 [M-3H] <sup>3</sup>
Ac-WCAADYYCWL-NH <sub>2</sub>	Y	433	1863.5 [M-H] <sup>1</sup>
Ac-WCEDDYYCWL-NH <sub>2</sub>	Y	434	1766.5 [M-H], 882.1 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	277	
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK (V-Dde)-Adca3-NH <sub>2</sub>	Y	373	1665.2 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	294	
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	337	1448.3 [M-2H] <sup>2</sup> , 955.9 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	435	1344.0 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	294	
Ac-GDSRVAWEDSWGGEVAFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	436	1369.4 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	437	1095.8 [M-2H] <sup>2</sup> , 2172.0 [M-H]
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	437	1086.0 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	438	1401.9 [M-3H+Na] <sup>2</sup> , 1391.7 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	439	1428.7 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	440	1436.7 [M-3H+Na] <sup>2</sup> , 1420.1 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	441	1444.5 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	442	1435.1 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	443	1435.5 [M-2H] <sup>2</sup>
KDR-VEGF 複合体に結合する配列			
Ac-AGPQPCCKGYMPHCWVMGTGGGK(SCF)-NH <sub>2</sub>	Y	321	1543.7 [M-2H] <sup>2</sup> , 1028.6 [M-3H] <sup>3</sup> , 771.3 [M-4H] <sup>4</sup> , 617.0 [M-5H] <sup>5</sup>

図 79D

【 図 7 9 E 】

化合物配列/構造 (レッドテキスト中の親配列)	得られたか 否か? Y/N	SEQ ID NO	MS データ <sup>1</sup>
Ac-AGPQPCCKGYMPHCWVMGTGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	321	2937.4 [M-H], 1468.2 [M-2] <sup>2</sup>
Ac-AGMPVCKEDHWDCWVWGTGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	444	1622.5 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGYQPCCKNMPFWMCVHBTGGGK(SCF)-NH <sub>2</sub>	Y	323	2860.1 [M-H], 1429.8 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGYQPCCKNMPFWMCVHBTGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	323	1058.6 [M-2H] <sup>2</sup>
病原性配列			
Ac-GDGSWCENRQDVGRWNCSPDDPGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	445	1537.5 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-GCKTKISKVKKKWNCYSNNKYTGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	446	1706.8 [M+2H] <sup>2</sup> , 1138.6 [M+3H] <sup>3</sup> , 654.0 [M+4H] <sup>4</sup> , 663.7 [M+5H] <sup>5</sup> , 568.8 [M+6H] <sup>6</sup> , 488.5 [M+7H] <sup>7</sup> , 1817.5 [M+2H] <sup>2</sup> , 1211.8 [M+3H] <sup>3</sup> , 909.1 [M+4H] <sup>4</sup> , 727.5 [M+5H] <sup>5</sup>
Ac-KQFCEENWERGRNHYYCLTLGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	447	1675.2 [M+2H] <sup>2</sup> , 1116.9 [M+3H] <sup>3</sup> , 838.2 [M+4H] <sup>4</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	448	
AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	277	
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK(mSbGJ)-NH <sub>2</sub>	Y	277-nSbGJ	1621.5 [M-2H] <sup>2</sup>
AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	277	
Daisy-NH-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK(SCF)-NH <sub>2</sub>	Y	277-5CF	1549.1 [M-2H] <sup>2</sup>
他の KDR 化合物 - DX-684 切断などのような 2001 年からのタグ <sup>100</sup>			
Ac-CEEDDYYCWLFGTGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	449	1232.5 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPKWCEEDYYCMTfT-NH <sub>2</sub>	Y	450	1509.6 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AAFKWCEEDYYCMTfTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	451	2504.2 [M-H], 1251.8 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AAFKWCEEDYYCMTfTGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	451	1508.6 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPDWCAADYYCYITG-NH <sub>2</sub>	Y	452	1982.5 [M-H], 991.5 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWCEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	277	
Ac-AGPTWEEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 777A)	Y	453	1291.9 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWKEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 777A)	Y	454	1291.9 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTW-Dpp-EDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 777A)	Y	455	1263.9 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWEDDYY-Dpp-WLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 777A)	Y	456	1263.9 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub> (6-13 777A)	Y	457	1285.1 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AGPTWEDDYYCWLFGTGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	457	1294.1 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSCGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y/N	356	

図 79E

【 図 7 9 F 】

化合物配列/構造 (レッドテキスト中の親配列)	得られたか 否か? Y/N	SEQ ID NO	MS データ <sup>1</sup>
Ac-AQDWYYDEILSMADQLR-NH <sub>2</sub>	Y	458	2156.9 [M-H], 1077.9 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-DWYYDEILSMADQL-NH <sub>2</sub>	Y	459	1800.5 [M-H], 900.2 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLS-NH <sub>2</sub>	Y	460	1355.2 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AQDWYYGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	461	1183.3 [M-H] <sup>1</sup>
Ac-DWYYGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	462	964.2 [M-H] <sup>1</sup>
Ac-AQDWYYDEIL-NH <sub>2</sub>	Y	463	1354.5 [M-H] <sup>1</sup>
Ac-AEWSYQDMRLDYADLQLSHFAGGGGK (t' #7-JJ)-NH <sub>2</sub>	Y	464	1820.1 [M+2H] <sup>2</sup>
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLS-GGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	356	1562.1 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLS-GGGGK-NH <sub>2</sub>	Y	356	1562.3 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLS-GGGGK(V-Dde)-NH <sub>2</sub>	Y	356	1729.7 [M-2H] <sup>2</sup> , 1152.5 [M-3H] <sup>3</sup>
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLS-GGGGK(SATA)-NH <sub>2</sub>	Y	356-SATA	1620.2 [M-2H] <sup>2</sup>
Ac-AEWSYQDMRLDYADLQLSHFAGGGGK(SATA)-NH <sub>2</sub>	Y	464	1620.4 [M+2H] <sup>2</sup>
各種親配列			
Ac-AQDWYYDEILGRGRGGG-NH <sub>2</sub>	Y	465	1185.0 [M+2H] <sup>2</sup> , 790.8 [M+3H] <sup>3</sup>
Ac-EDDYYJGRGGGGRGG-NH <sub>2</sub>	Y	466	972.3 [M+2H] <sup>2</sup> , 648.0 [M+3H] <sup>3</sup>
Ac-QDWYYJGRGGGGRGG-NH <sub>2</sub>	Y	467	879.3 [M+2H] <sup>2</sup> , 586.6 [M+3H] <sup>3</sup>
Ac-AQDWYYAWLFTJGRGGGGRGG-NH <sub>2</sub>	Y	468	1259.7 [M+2H] <sup>2</sup> , 840.1 [M+3H] <sup>3</sup>
Ac-AQDWYYAWLJGRGGGGRGG-NH <sub>2</sub>	Y	469	1135.5 [M+2H] <sup>2</sup> , 757.5 [M+3H] <sup>3</sup>

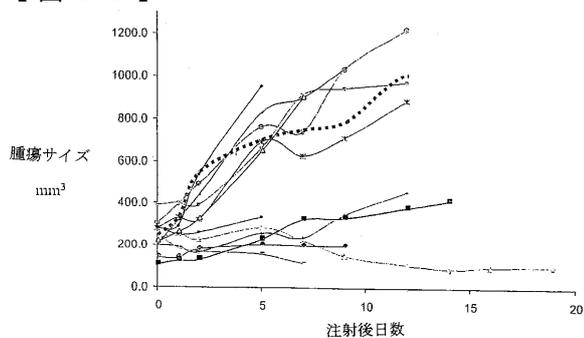
図 79F

【 図 7 9 G 】

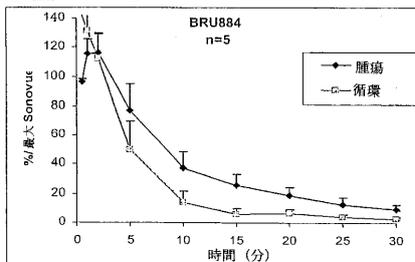
化合物配列/構造 (レッドテキスト中の観配列)	得られたか 否か? Y/N	SEQ ID NO	MS データ†
Ac-AQDWYYDEILJGRGGRGGGGK(I)-NH <sub>2</sub>	Y	470	1416.8 [M+2H] <sup>2+</sup> , 844.8 [M+3H] <sup>3+</sup> , 708.9 [M+4H] <sup>4+</sup> , 571.5 [M+4H+Na] <sup>5+</sup>
Ac-GDSRVCWPDSWGGEVCFRYDP-NH <sub>2</sub>	Y	471	1234.1 [M-2H] <sup>2+</sup>
Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDP-NH <sub>2</sub>	Y	472	1250.0 [M-2H] <sup>2+</sup>
Ac-AQDWYYDEILJGRGGRGGGGK(II)-NH <sub>2</sub>	Y	473	930.23 [M+3H] <sup>3+</sup> , 697.9 [M+4H] <sup>4+</sup> , 558.5 [M+5H] <sup>5+</sup>
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHFSLGGGGK(C' 特異的)-NH <sub>2</sub>		356	
Ac-WYLDKQADFMYSAAQEDSLILHGGGGK(C' 特異的)-NH <sub>2</sub>	Y	474	1820.5 [M-2H] <sup>2+</sup> , 1213.4 [M-3H] <sup>3+</sup>

図 79G

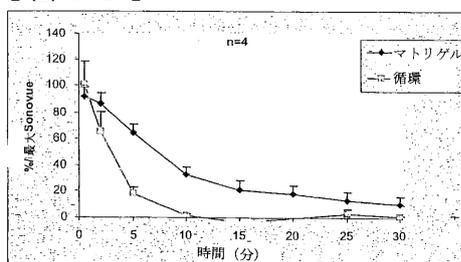
【 図 8 0 】



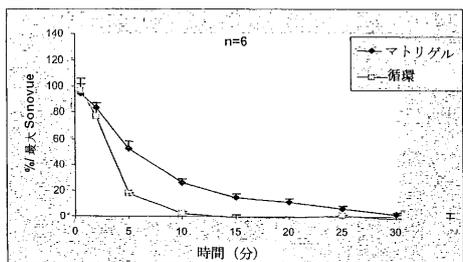
【 図 8 1 】



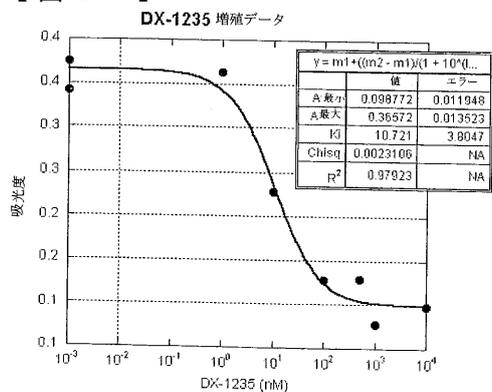
【 図 8 2 】



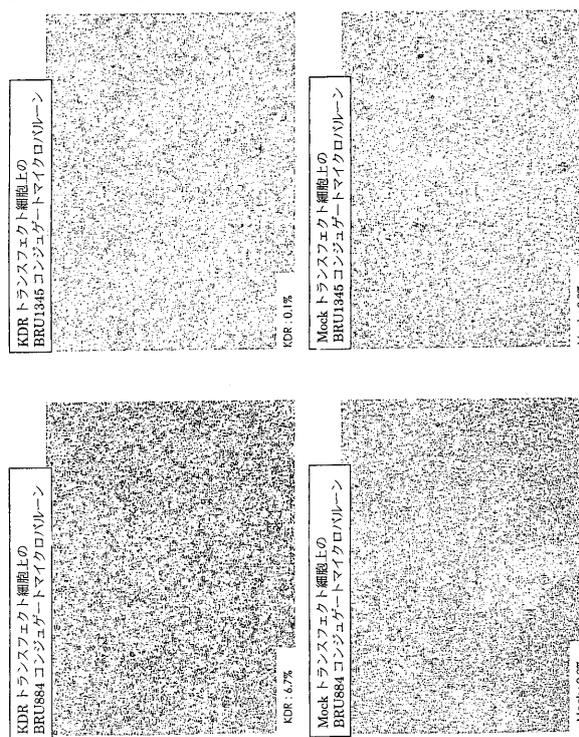
【 図 8 3 】



【 図 8 4 】



【 図 8 5 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
<b>C 0 7 K 1/08 (2006.01)</b>	C 0 7 K 1/08	
<b>C 0 7 K 7/08 (2006.01)</b>	C 0 7 K 7/08	
<b>C 0 7 K 14/005 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/005	
<b>C 1 2 N 7/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/00	
<b>C 1 2 N 7/02 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/02	
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
<b>C 1 2 Q 1/25 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/25	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	Z
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 K 51/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 43/00	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100076691

弁理士 増井 忠次

(74) 代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74) 代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72) 発明者 サト, アーロン・ケイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 5, ソマービル, ペンブローク・ストリート 1 1, ナンバー 2

(72) 発明者 セクストン, ダニエル・ジェイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 4, ソマービル, ヨークタウン・ストリート 9 3

(72) 発明者 ラドナー, ロバート・シー

アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 7 5 4, イージャムスビル, グリーン・バレー・ロード 3 8 2 7

(72) 発明者 ドランズフィールド, ダニエル・ティー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 3 4 1, ハンソン, ジョージ・ストリート 1 4

(72) 発明者 スウェンソン, ロルフ・イー

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 4 0, プリンストン, フィールドトン・ロード 3 5

(72) 発明者 マリネッリ, エドモンド・アール

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 6 4 8, ローレンスビル, エルドリッジ・アベニュー 1 9 0

(72) 発明者 ラマリガン, コンダレッディア

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 1 0, デイトン, リバティー・プレイス 4 6

(72) 発明者 ナン, エイドリアン・ディー

- アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 3 0 , ランバービル, ミル・ロード 3 3
- (72)発明者 ボン・ウロンスキー, マシュー・エイ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 0 5 7 , モーレストاون, オールドショー・アベニュー  
6 0 4
- (72)発明者 シュリバスターバ, アジャイ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 3 6 , プレインズボロ, フィーサント・ホロー・ドラ  
イブ 1 8 - 1 6
- (72)発明者 ポーション, スィビル  
スイス国セアッシュ - 1 2 5 6 トロイネックス, ルーテ・デ・ボッセイ 7 6
- (72)発明者 ビュッサット, フィリップ  
フランス国エフ - 7 4 1 6 0 フェイガース, アレ・デュ・サレブ 4 6
- (72)発明者 アーボガスト, クリストファー  
フランス国エフ - 7 4 2 5 0 ビュイツ - エン - サラツ, ラ・サルデーニユ
- (72)発明者 フィライ, ラドハクリシーナ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 1 2 , クランバリー, ウォルナット・コート 1 2
- (72)発明者 ファン, ホン  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 3 6 , プレインズボロ, バーリー・コート 3
- (72)発明者 リンダー, カレン・イー  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 2 8 , キングストン, ベイスン・ストリート 1 4
- (72)発明者 ソング, ボ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 4 0 , プリンストン, イングリッシュ・レーン 1
- (72)発明者 ナンジャッパン, パラニアッパ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 1 0 , デイトン, リバティ・ドライブ 3 0
- F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA63 CA04 DA02 EA04 GA11 HA11  
4B063 QA01 QA05 QQ08 QQ79 QR01 QR48 QR77 QR80 QS38 QX02  
QX07  
4B065 AA90Y AA98X AA98Y AB01 BA01 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA06 AA12 BA44 CA62 DC50 MA66 NA14 ZB262 ZB332  
ZB382 ZC552  
4C085 HH03 HH07 HH09 HH11 JJ05 KA27 KA28 KA29 KB82 LL01  
LL18  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19  
BA20 BA21 BA30 BA34 BA53 CA01 EA20 EA23 EA34 EA50  
FA33 FA41 FA74 GA25