

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0115003
(43) 공개일자 2021년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 51/08 (2006.01) **A61K 51/04** (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 51/088 (2020.05)
A61K 51/0474 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2021-7025921
 (22) 출원일자(국제) 2020년01월17일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2021년08월13일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2020/014110
 (87) 국제공개번호 WO 2020/150617
 국제공개일자 2020년07월23일
 (30) 우선권주장
 62/793,789 2019년01월17일 미국(US)

(71) 출원인
 케이스 웨스턴 리저브 유니버시티
 미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900
 (72) 발명자
 루, 쉐-롱
 미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900
 가오, 송치
 미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900
 (74) 대리인
 특허법인(유한)아이스

전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **종양 세포의 기질의 종양단백질에 특이적인 펩티드 PET/SPECT 프로브**

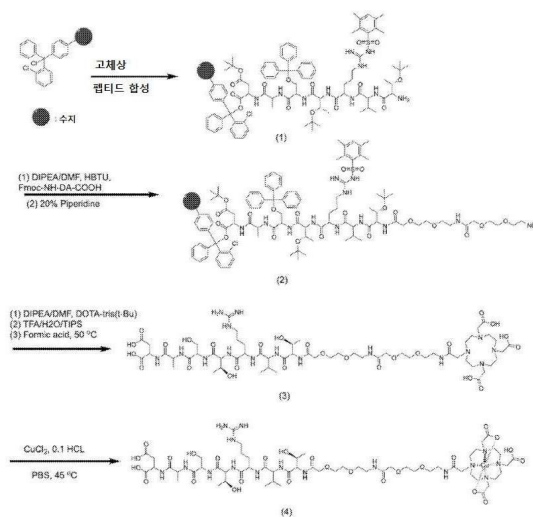
(57) 요약

PET/SPECT 프로브는 하기 식을 포함한다:



상기 식에서 P는 EDB-FN 표적화 펩티드이고, C는 PET/SPECT 조영제이고; 및 L은 펩티드를 조영제에 공유적으로 연결하는 선택적인 링커이다.

대표도

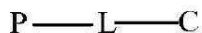


명세서

청구범위

청구항 1

하기 식을 포함하는 PET/SPECT 프로브:



상기 식에서 P는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 및 이들의 레트로-인verso(retro-inverso) 아미노산 서열로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드이고; C는 PET/SPECT 조영제(contrast agent)이고; 및 L은 펩티드를 PET/SPECT 조영제에 공유적으로 연결하는 선택적인 링커이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 링커가 지방족, 헤테로지방족, 사이클릭, 및/또는 헤테로사이클릭 링커인, 프로브.

청구항 3

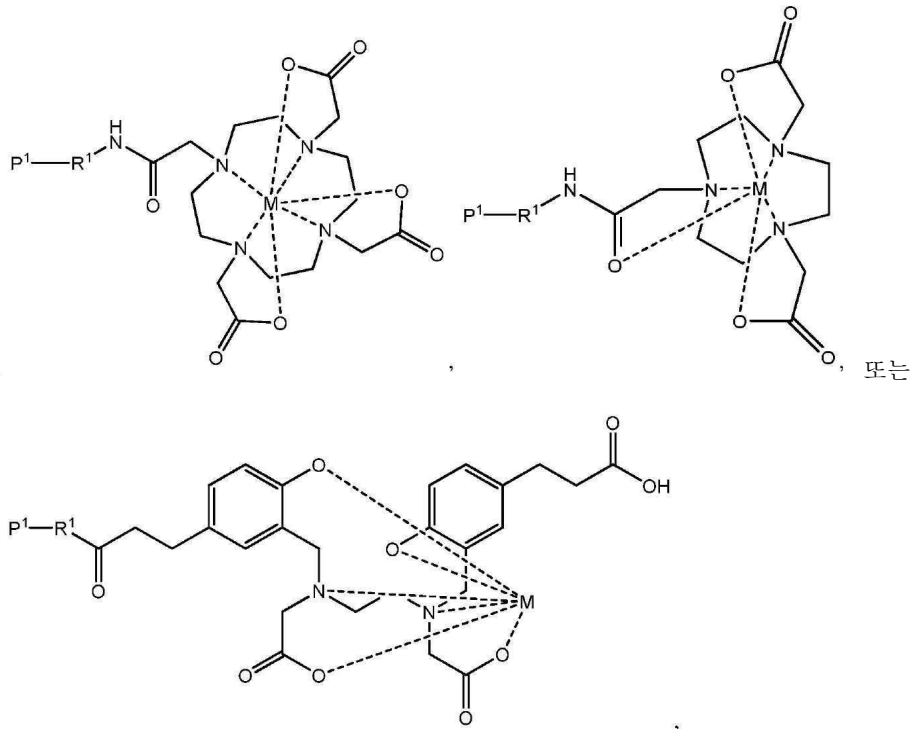
제1항에 있어서, 링커가 펩티드와 조영제를 공유적으로 연결하는 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커를 포함하는, 프로브.

청구항 4

제1항에 있어서, 조영제가 디에틸렌트리아민펜타아세트레이트(DTPA) 또는 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도데칸테트라아세트레이트(DOTA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도데칸-1,4,7-트리아세트레이트(D03A) 및 그의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세트레이트(EDTA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸테트라아세트산(TRITA) 및 그의 유도체, 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도데칸테트라메틸아세트레이트(DOTMA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도데칸-1,4,7-트리메틸아세트레이트(D03MA) 및 그의 유도체, N,N',N'',N'''-테트라포스포나토메틸(tetraphosphonatomethyl)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸(DOTP) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 메틸포스폰산)(DOTMP) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 페닐포스폰산)(DOTPP), N,N'-에틸렌디(ethylenedi)-L-시스테인, 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA), 1,4,7-트리아자사이클로노난(TACN), N,N'-비스(2-하이드록시-5-(에틸렌-베타-카르복시)벤질)에틸렌디아민 N,N'-디아세트산(HBED-CC), 및 이들의 유도체 중 적어도 하나를 포함하는 금속 킬레이트제를 포함하는, 프로브.

청구항 5

제1항에 있어서, 하기 화학식을 가지는, 프로브:



상기 식에서:

P₁은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 및 서열번호 24로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것이고;

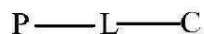
R¹은 선택적인 링커이며 존재하는 경우 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커이고; 및

M은 ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm, 또는 ⁸⁹Sr로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 금속; 또는 이의 염이다.

청구항 6

하기 단계를 포함하는, 암세포 및/또는 암세포 공격성(aggressiveness)을 검출, 모니터링, 및/또는 영상화하는 방법:

대상체의 조직을 PET/SPECT 프로브와 접촉시키는 단계로서, 분자 프로브가 하기 식을 포함하는 단계:



상기 식에서 P는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 및 이들의 레트로-인verso 아미노산 서열로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드이고; C는 PET/SPECT 조영제이고; 및 L은 펩티드를 PET/SPECT 조영제에 공유적으로 연결하는 선택적인 링커이고; 및

대상체의 조직에서 PET/SPECT 프로브를 검출하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, PET/SPECT 프로브를 검출하여 조직 내 암세포의 위치 및/또는 분포를 검출하는, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 접촉 단계가 생체 내인, 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 프로브가 암이 있거나 암이 의심되는 대상체에게 전신적으로 투여되는, 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 암이 유방암, 간암, 위암, 결장암, 췌장암, 난소암, 폐암, 신장암, 전립선암, 고환암, 교모세포종(glioblastoma), 육종(sarcoma), 골암, 뇌암, 두경부암, 또는 피부암 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 대상체가 암이 있고, PET/SPECT 프로브가 대상체의 조직에 투여되어 암 공격성을 결정하는, 방법.

청구항 12

제6항에 있어서, 링커가 지방족, 헤테로지방족, 사이클릭, 및/또는 헤테로사이클릭 링커인, 방법.

청구항 13

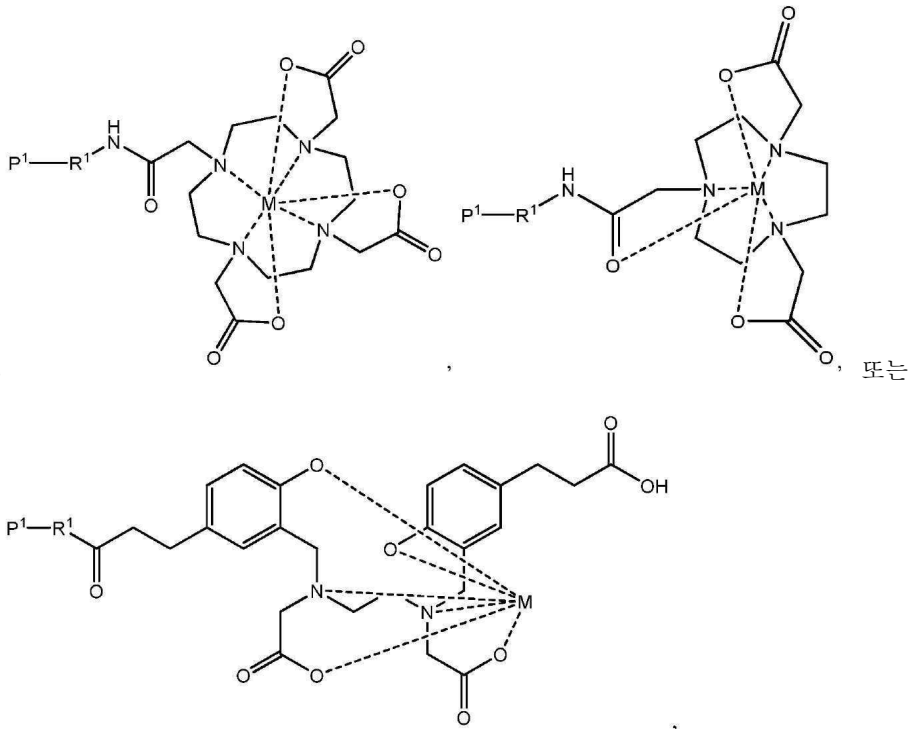
제6항에 있어서, 링커가 펩티드와 조영제를 공유적으로 연결하는 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커를 포함하는, 방법.

청구항 14

제6항에 있어서, 조영제가 디에틸렌트리아민펜타아세트레이트(DTPA) 또는 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도테칸테트라아세트레이트(DOTA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도테칸-1,4,7-트리아세트레이트(DO3A) 및 그의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세트레이트(EDTA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로트리테칸테트라아세트산(TRITA) 및 그의 유도체, 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라테칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도테칸테트라메틸아세트레이트(DOTMA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도테칸-1,4,7-트리메틸아세트레이트(DO3MA) 및 그의 유도체, N,N',N'',N'''-테트라포스포나토메틸(tetraphosphonatomethyl)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도테칸(DOTP) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도테칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 메틸포스폰산)(DOTMP) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도테칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 페닐포스폰산)(DOTPP), N,N'-에틸렌디(ethylenedi)-L-시스테인, 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA), 1,4,7-트리아자사이클로노난(TACN), N,N'-비스(2-하이드록시-5-(에틸렌-베타-카르복시)벤질)에틸렌디아민 N,N'-디아세트산(HBED-CC), 및 이들의 유도체 중 적어도 하나를 포함하는 금속 킬레이트제를 포함하는, 방법.

청구항 15

제6항에 있어서, PET/SPECT 프로브가 하기 화학식을 가지는, 방법:



상기 식에서:

P₁은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 및 이들의 레트로-인verso 아미노산 서열로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것이고;

R¹은 선택적인 링커이며 존재하는 경우 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커이고; 및

M은 ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm, 또는 ⁸⁹Sr로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 금속; 또는 이의 염이다.

청구항 16

하기 단계를 포함하는, 체장암 세포 및/또는 체장암 세포 공격성을 검출, 모니터링, 및/또는 영상화하는 방법:

대상체의 조직을 PET/SPECT 프로브와 접촉시키는 단계로서, 분자 프로브가 하기 식을 포함하는 단계:



상기 식에서 P는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 및 이들의 레트로-인verso 아미노산 서열로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드이고; C는 PET/SPECT 조영제이고; 및 L은 펩티드를 PET/SPECT 조영제에 공유적으로 연결하는 선택적인 링커이고; 및 대상체의 조직에서 PET/SPECT 프로브를 검출하는 단계.

청구항 17

제16항에 있어서, PET/SPECT 프로브를 검출하여 조직 내 암세포의 위치 및/또는 분포를 검출하는, 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 접촉 단계가 생체 내인, 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 프로브가 암이 있거나 암이 의심되는 대상체에게 전신적으로 투여되는, 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 대상체가 암이 있고, PET/SPECT 프로브가 대상체의 조직에 투여되어 암 공격성을 결정하는, 방법.

청구항 21

제16항에 있어서, 링커가 지방족, 헤테로지방족, 사이클릭, 및/또는 헤테로사이클릭 링커인, 방법.

청구항 22

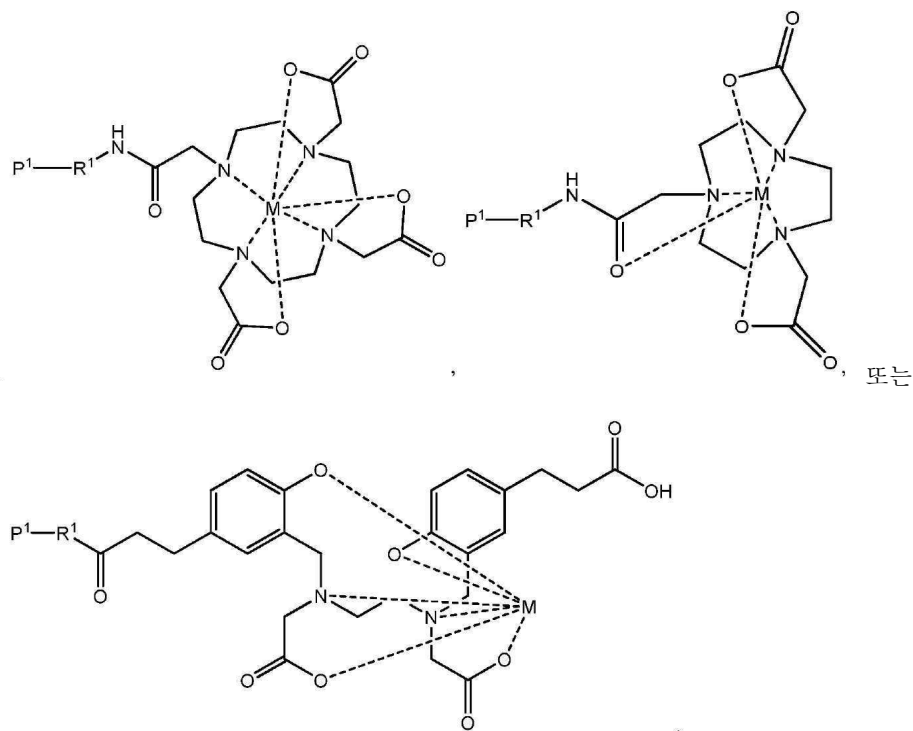
제16항에 있어서, 링커가 펩티드와 조영제를 공유적으로 연결하는 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커를 포함하는, 방법.

청구항 23

제16항에 있어서, 조영제가 디에틸렌트리아민펜타아세테이트(DTPA) 또는 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도데칸테트라아세테이트(DOTA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도데칸-1,4,7-트리아세테이트(D03A) 및 그의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세테이트(EDTA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸테트라아세트산(TRITA) 및 그의 유도체, 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도데칸테트라메틸아세테이트(DOTMA) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자도데칸-1,4,7-트리메틸아세테이트(D03MA) 및 그의 유도체, N,N',N'',N'''-테트라포스포나토메틸(tetraphosphonatomethyl)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸(DOTP) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 메틸포스포산)(DOTMP) 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 페닐포스포산)(DOTPP), N,N'-에틸렌디(ethylenedi)-L-시스테인, 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA), 1,4,7-트리아자사이클로노난(TACN), N,N'-비스(2-하이드록시-5-(에틸렌-베타-카르복시)벤질)에틸렌디아민 N,N'-디아세트산(HBED-CC), 및 이들의 유도체 중 적어도 하나를 포함하는 금속 킬레이트제를 포함하는, 방법.

청구항 24

제16항에 있어서, PET/SPECT 프로브가 하기 화학식을 가지는, 방법:



상기 식에서:

P₁은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 및 이들의 레트로-인verso 아미노산 서열로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것이고;

R¹은 선택적인 링커이며 존재하는 경우 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아틸렌, 또는 알킬렌아틸렌 링커이고; 및

M은 ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm, 또는 ⁸⁹Sr로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 금속; 또는 이의 염이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2019년 1월 17일에 출원된 미국 가출원 번호 62/793,789로부터 우선권을 주장하며, 그 내용은 전체로서 여기에 참조로 포함된다.

[0003] **정부 자금(Government Funding)**

[0004] 본 발명은 National Institutes of Health(NIH)에서 수여한 승인 번호 CA211762 및 CA194518에 따른 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 보유한다.

배경 기술

[0005] 암의 검출 및 치료는 암세포와 정상 세포를 구별할 수 없기 때문에 방해받고 있다. 암의 조기 진단을 위해서는 암 또는 종양 영상화(이미징)를 위한 더 나은 검출 도구가 필요하다. 종양 세포의 분자 인식은 가이드된(guided) 외과적 절제를 용이하게 할 것이다. 외과적 절제를 개선하기 위해서는, 표적화(targeted) 영상 도구는 주요 종양에서만 아니라 종양의 경계(edge)를 따라 그리고 몸 전체에 흩어져 있는 작은 종양 세포 클러스터에서도 종양 세포를 특이적으로 표지(label)해야 한다. 종양 미세환경에 축적되는 분자를 표지하도록 설계된 표적화 영상 도구는 주요 종양 세포 집단과 종양 재발에 기여하는 침윤 세포가 있는 영역을 모두 식별할 수 있기 때문에 치료 표적화제로도 유리할 수 있다. 종양 세포 및/또는 그 미세환경을 직접적으로 표적으로 삼는 능력은 현재 치료의 특이성과 민감성을 모두 증가시킬 것이며, 따라서 신체 전체의 세포에 영향을 미치는 화학요법의 비특이적 부작용을 감소시킬 것이다.

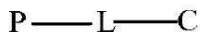
[0006] 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET) 영상은, 정상 조직의 포도당 대사에 비해 전립선암의 높은 포도당 대사에 기반하여, 주로 [¹⁸F]-FDG를 사용하여 전립선암의 임상 검사에 적용되어 왔다. 그러나, [¹⁸F]-FDG PET는 양성(benign) 전립선암을 공격적인 전립선암과 구별하는 능력을 입증하지 못하였다. PSMA-특이적 PET 프로브가 최근 전립선암에 대해 개발되었다. 임상 연구는 PSMA-양성 전립선 종양의 효과적인 검출을 위한 PSMA 프로브의 능력을 입증하였다. 그러나, 최근 연구에서는 PSMA 프로브가 양성 조직을 전립선암과 구별하지 못할 수 있다고 경고하였다. 암의 정밀한 임상 관리를 위한 비침습적 진단 양식(modality)의 임상적 요구를 충족하기 위해 공격적인 암을 감지하고 위험을 계층화하는데(risk-stratify) PET 프로브가 필요하다.

발명의 내용

[0007] **개요**

[0008] 본원에 기재된 구현에는 종양 및/또는 암 세포의 기질의 종양단백질(oncoprotein)에 대한 펩티드 양전자 방출 단층촬영(PET)/단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT) 프로브에 관한 것으로, 이는 대상체의 조직 내 암의 위치 및/또는 분포, 대상체에서 암의 공격성(aggressiveness), 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 암 치료제 및/또는 암 요법의 효능을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0009] 일부 구현예에서, PET/SPECT 프로브는 하기 식을 포함할 수 있다:



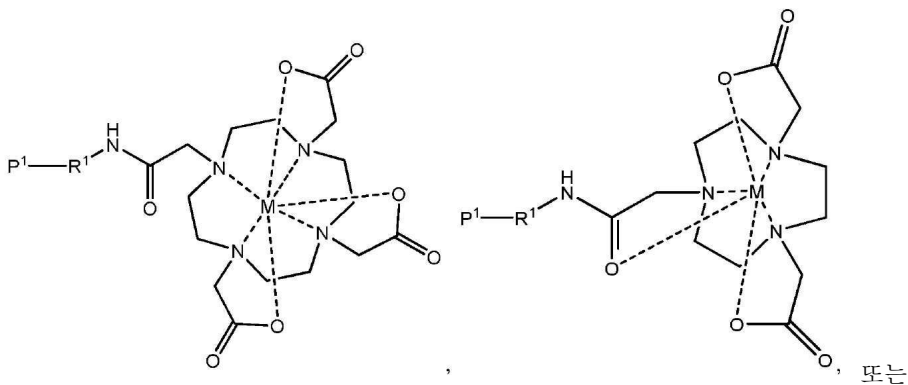
[0010]

[0011] 상기 식에서 P는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24; 및 이들의 레트로-인verso(retro-inverso) 아미노산 서열로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드이고; C는 PET 또는 SPECT 조영제(contrast agent)이고; 및 L은 펩티드를 PET/SPECT 조영제에 공유적으로 연결하는 선택적인 링커이다.

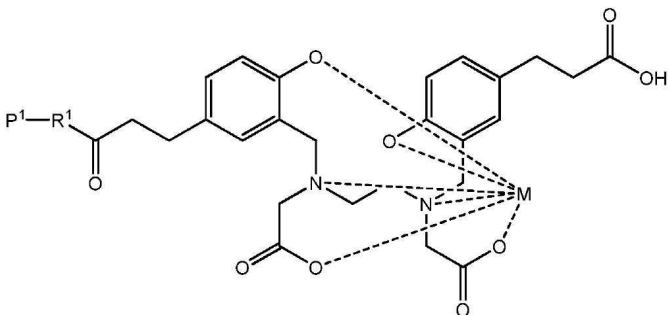
[0012] 일부 구현예에서, 링커는 비-펩티드 링커이다. 비-펩티드 링커는 비-펩티드 지방족, 헤테로지방족, 사이클릭, 및/또는 헤테로사이클릭 링커일 수 있다. 비-펩티드 링커는, 예를 들어, 펩티드와 조영제를 공유적으로 연결하는 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커를 포함할 수 있다.

[0013] PET/SPECT 조영제는 금속 킬레이트제 또는 메탈로풀러렌(metallofullerene) 및 양전자 또는 감마 방출 방사성핵종(radionuclides) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 금속 킬레이트제는, 예를 들어, 디에틸렌트리아민펜타아세테이트(DTPA), 1,4,7,10-테트라아자도데칸테트라아세테이트(DOTA), 1,4,7,10-테트라아자도데칸-1,4,7-트리아세테이트(DO3A), 에틸렌디아민테트라아세테이트(EDTA), 1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸테트라아세트산(TRITA), 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA), 1,4,7,10-테트라아자도데칸테트라메틸아세테이트(DOTMA), 1,4,7,10-테트라아자도데칸-1,4,7-트리메틸아세테이트(DO3MA), N,N',N'',N'''-테트라포스포나토메틸(tetraphosphonatomethyl)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸(DOTP), 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 메틸포스폰산)(DOTMP), 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 페닐포스폰산)(DOTPP), N,N'-에틸렌디(ethylenedi)-L-시스테인, 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA), 1,4,7-트리아자사이클로노난(TACN), N,N'-비스(2-하이드록시-5-(에틸렌-베타-카르복시)벤질)에틸렌디아민 N,N'-디아세트산(HBED-CC), 및 이들의 유도체 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 양전자 또는 감마 방출 방사성핵종은, 예를 들어, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm, 또는 ⁸⁹Sr를 포함할 수 있다.

[0014] 일부 구현예에서, PET/SPECT 프로브는 하기 화학식을 가질 수 있다:



[0015]



[0016]

[0017] 상기 식에서:

[0018] P₁은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서

열번호 9, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 및 이들의 레트로-인verso 아미노산 서열로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

[0019] R^1 은 선택적이고 존재하는 경우 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커, 예컨대 $-(CH_2)_n-$, $-(OCH_2CH_2)_n$, 또는 아릴렌을 포함할 수 있고, 여기서 n 은 1에서 18 사이의 정수이고; 및

[0020] M 은 ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{153}Sm , 또는 ^{89}Sr 로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 금속; 또는 이의 염이다.

[0021] 또 다른 구현예에서, PET/SPECT 프로브는 대상체에서 암의 분포 및/또는 위치 뿐만 아니라 암 공격성(aggressiveness)을 검출하기 위해 대상체에게 전신적으로 투여될 수 있다. 암은, 예를 들어, 유방암, 간암, 위암, 결장암, 췌장암, 난소암, 폐암, 신장암, 전립선암, 고환암, 교모세포종(glioblastoma), 육종(sarcoma), 골암, 뇌암, 두경부암, 또는 피부암 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 $ZD2\text{-DA-}(^{64}\text{Cu-DOTA})$ 의 합성을 보여주는 개략도를 나타낸 것이다.

도 2는 $ZD2\text{-DA-}(^{64}\text{Cu-DOTA})$ 주사 후 4시간 및 22시간에 LNCaP 및 PC3 종양을 보유하는 2마리의 대표적인 마우스의 거시적 명시야(macroscopic bright-field) 및 3D 체적 렌더링 PET/CT 이미지를 나타낸 것이다.

도 3은 $ZD2\text{-DA-}(^{64}\text{Cu-DOTA})$ 주사 후 4시간 및 22시간에 근육, 간, 심장, 및 LNCaP 및 PC3 종양의 정량적 추적자 흡수를 나타낸 것이다($N = 4$).

도 4는 주사 후 24시간에 상이한 조직에서 $ZD2\text{-DA-}(^{64}\text{Cu-DOTA})$ 의 생체 분포를 보여주는 그래프를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ sem($N = 3$)으로 표시하였다.

도 5는 LNCaP 및 PC3 전립선 종양 절편에서 EDB-FN의 면역형광 염색을 보여주는 이미지를 나타낸 것이다 스케일 바: 50 μm .

도 6은 $ZD2\text{-(Ga-NOTA)}(4)$ 의 합성 과정을 보여주는 개략도를 나타낸 것이다.

도 7(A-B)는 BXP3, Capan-1, Panc 10.05 및 Panc-1 인간 췌장암 세포(A) 및 마우스의 종양 이종이식편(B)에서 EDB-FN의 발현을 보여주는 웨스턴 블롯(A) 및 형광 공초점 이미지(B)를 나타낸 것이다. 조직 슬라이드는 BC-1 항-EDB-FN 모노클로날 항체와 AF-488 및 DAPI로 표지된 이차 항체로 염색된 것이다.

도 8은 BXP3, Capan-1, Panc 10.05 및 Panc-1 인간 췌장암 이종이식편 표본에서 EDB-FN에 대한 $ZD2\text{-Cy5.5}$ 의 특이적 결합을 보여주는 이미지를 나타낸 것이다. BC-1/ $ZD2$ 의 컬럼은 $ZD2\text{-Cy5.5}$ 의 결합이 표본과 BC-1 항체의 사전 인큐베이션에 의해 차단되었음을 보여준다.

도 9는 인간 췌장암, 췌장 상피내 종양(intraepithelial neoplasia) 및 정상 췌장의 표본에서 EDB-FN에 대한 $ZD2\text{-Cy5.5}$ 의 결합 패턴을 보여주는 형광 이미지를 나타낸 것이다.

도 10은 $ZD2\text{-(}^{68}\text{Ga-NOTA)}$ 를 300 μCi /마우스 용량으로 정맥 주사한 지 1시간 및 2시간 후 Capan-1 및 BXP3 인간 췌장암 이종이식편을 보유하는 마우스의 2차원 관상 PET/CT 이미지를 나타낸 것이다. T: 종양; B: 방광.

도 11은 $ZD2\text{-(}^{68}\text{Ga-NOTA)}$ 를 300 μCi /마우스 용량으로 정맥 주사한 지 1시간 후 Capan-1 및 BXP3 인간 PaCa 이종이식편을 보유하는 마우스의 3차원 PET 이미지를 나타낸 것이다. T: 종양; K: 신장; B: 방광.

도 12는 $ZD2\text{-HBED-CC}$ 의 합성을 보여주는 개략도를 나타낸 것이다.

도 13은 $ZD2\text{-AH-HBED-CC}$ 의 합성을 보여주는 개략도를 나타낸 것이다.

도 14는 $ZD2\text{-(Ga-HBED-CC)}$ 의 합성을 보여주는 개략도를 나타낸 것이다.

도 15는 $ZD2\text{-AH-(Ga-HBED-CC)}$ 의 합성을 보여주는 개략도를 나타낸 것이다.

도 16은 $ZD2\text{-(}^{68}\text{Ga-HBED-CC)}$ 과 함께 BXP3 및 Capan-1 인간 췌장 종양 이종이식편을 보유하는 마우스의 PET/CT

이미지를 나타낸 것이다.

도 17은 ZD2-AH-(⁶⁸Ga-HBED-CC)와 함께 BXPC3 및 Capan-1 인간 췌장 종양 이중이식편을 보유하는 마우스의 PET/CT 이미지를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 통상적인 분자 생물학 기술을 포함하는 방법이 본원에 설명되어 있다. 이러한 기술은 일반적으로 당업계에 공지되어 있으며 방법론 논문(methodology treatises), 예컨대 Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (주기적인 업데이트 포함)에 자세히 설명되어 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어는 본 출원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 분자 생물학 용어의 일반적으로 이해되는 정의는, 예를 들어, Rieger *et al.*, Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th Edition, Springer-Verlag: New York, 1991, 및 Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994.에서 찾을 수 있다.
- [0024] 관사 "a" 및 "an"은 본원에서 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하는 데 사용된다. 예를 들어, "요소(an element)"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.
- [0025] 용어 "포함하다(comprise)", "포함하는(comprising)", "포함하다(include)", "포함하는(including)", "가지다(have)," 및 "가지는(having)"은 포괄적이고 개방적인 의미(open sense)로 사용되며, 이는 추가적인 요소가 포함될 수 있음을 의미한다. 본원에서 사용되는 용어 "~와 같은(such as)", "예를 들어(e.g.)"는 비제한적이며 단지 예시적인 목적을 위한 것이다. "포함하는(including)"과 "포함하지만 이에 국한되지 않는"은 상호교환적으로 사용된다.
- [0026] 본원에서 사용되는 용어 "또는"은 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한 "및/또는"을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0027] 용어 "제제(agent)"는 본원에서 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자(macromolecule), 또는 생물학적 물질로부터 제조된 추출물을 나타내기 위해 사용된다.
- [0028] 용어 "암" 또는 "종양"은 초기 종양 및 임의의 전이를 포함하는 대상체에서의 임의의 신생물(neoplastic) 성장을 지칭한다. 암은 액체 또는 고형 종양 유형일 수 있다. 액체 종양은, 예를 들어, 골수종(예: 다발성 골수종), 백혈병(예: 발덴스트롬 증후군(Waldenstrom's syndrome), 만성 림프구성 백혈병, 기타 백혈병), 및 림프종(예: B-세포 림프종, 비호지킨 림프종)을 비롯한 혈액학적 기원의 종양을 포함한다. 고형 종양은 장기(organ)에서 발생할 수 있으며 폐, 뇌, 유방, 전립선, 난소, 결장, 신장 및 간의 암을 포함한다.
- [0029] 용어 "암세포" 또는 "종양 세포"는 비정상적인(즉, 증가된) 속도로 분열하는 세포를 지칭할 수 있다. 암세포는 암종(carcinoma), 예컨대 편평 세포 암종, 비-소세포 암종(예: 비-소세포 폐 암종), 소세포 암종(예: 소세포 폐 암종), 기저 세포 암종, 땀샘(sweat gland) 암종, 피지선(sebaceous gland) 암종, 선암종(adenocarcinoma), 유두 암종, 유두 선암종, 낭선암종(cystadenocarcinoma), 수질암종(medullary carcinoma), 미분화 암종, 기관지암종, 흑색종, 신세포 암종, 간암-간세포 암종(hepatoma-liver cell carcinoma), 담관 암종(bile duct carcinoma), 담관암(cholangiocarcinoma), 유두 암종, 이행 세포 암종(transitional cell carcinoma), 융모막암(choriocarcinoma), 정액종(seminoma), 배아 암종, 유선 암종(mammary carcinomas), 위장관 암종, 결장암종, 방광 암종, 췌장 암종, 전립선 암종, 및 목 및 머리 부위의 편평 세포 암종; 육종(sarcoma), 예컨대 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma), 지방육종, 연골육종, 골형성 육종, 척삭육종(chordosarcoma), 혈관육종(angiosarcoma), 내피육종(endotheliosarcoma), 림프관육종(lymphangiosarcoma), 활액육종(synoviosarcoma) 및 중피육종(mesotheliosarcoma); 혈액암(hematologic cancer), 예컨대 골수종, 백혈병(예: 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 과립구 백혈병, 단핵구 백혈병, 림프구성 백혈병), 림프종(예: 여포성 림프종, 외투 세포 림프종(mantle cell lymphoma), 미만성 거대 B-세포 림프종, 악성 림프종, 형질세포종(plasmocytoma), 세망 세포 육종(reticulum cell sarcoma), 또는 호지킨병), 및 신경교종(glioma), 다형 교모세포종(glioblastoma multiform), 수막종(meningioma), 수모세포종(medulloblastoma), 신경초종(schwannoma) 및 부고환종(epidymoma)을 포함하는 신경계 종양을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.
- [0030] DNA 또는 RNA와 같은 핵산 또는 아미노산과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "단리된"은 거대분자의 천연 공급원에 존재하는 각각 다른 DNA, 또는 RNA, 폴리펩티드 또는 단백질로부터 분리된 분자를 지칭한다. 본원에서 사

용되는 단리된이라는 용어는 또한 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 때 세포성 물질, 또는 배양 배지, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 기타 화합물질이 실질적으로 없는 핵산 또는 펩티드를 지칭한다. 나아가, "단리된 핵산" 또는 "단리된 펩티드"는 단편으로서 자연적으로 발생하지 않고 자연 상태에서 발견되지 않는 핵산 단편 또는 펩티드 단편을 포함하는 것을 의미한다.

[0031] 용어 "핵산"은 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 데옥시리보핵산(DNA) 및 적절한 경우, 리보핵산(RNA)을 지칭한다. 이 용어는 또한, 등가물(equivalent)로서, 뉴클레오타이드 유사체(analog)로부터 제조된 RNA 또는 DNA의 유사체, 및 설명되는 구현예에 적용 가능한 단일(센스 또는 안티센스) 및 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0032] 용어 "폴리뉴클레오타이드 서열" 및 "뉴클레오타이드 서열"은 또한 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0033] "비경구(parenteral) 투여" 및 "비경구로 투여되는"이라는 문구는 당업계에서 인정되는 용어이며, 주사와 같은 장관(enteral) 및 국소(topical) 투여 이외의 투여 방식을 포함하며, 정맥내, 근육내, 흉막내(intrapleural), 혈관내, 심낭내(intrapericardial), 동맥내(intraarterial), 척수강내(intrathecal), 피막내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내(intracardiac), 피내(intradermal), 복강내, 기관내(transtracheal), 피하, 표피하(subcuticular), 관절내, 피막하(subcapsular), 지주막하(subarachnoid), 척수내 및 경막내(intrastemal) 주사 및 주입을 포함하며 이에 제한되지 않는다.

[0034] 용어 "환자", "대상체(subject)", "포유류 숙주" 등은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 인간 및 수의학 대상체를 포함하는 포유동물을 지칭한다.

[0035] 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합(즉, 펩티드동배체(isostere))을 통해 연결된 아미노산 잔기, 관련된 천연 발생 구조 변이체, 및 합성 비-천연 발생 유사체로 구성된 폴리머, 이의 관련된 천연 발생 구조 변이체, 및 합성 비-천연 발생 유사체, 글리코실화된 폴리펩티드, 및 모든 "모방체(mimetic)" 및 "펩티도모방체(peptidomimetic)" 폴리펩티드 형태를 지칭한다. 합성 폴리펩티드는, 예를 들어, 자동화 폴리펩티드 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 상기 용어는 올리고펩티드, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열, 또는 이들 중 임의의 것의 단편, 일부(portion), 또는 서브유닛을 지칭할 수 있다. 용어 "단백질"은 일반적으로 큰 폴리펩티드를 지칭한다. 용어 "펩티드"는 일반적으로 짧은 폴리펩티드를 지칭한다.

[0036] 폴리펩티드 또는 단백질의 "일부(portion)"는 폴리펩티드의 적어도 약 3개의 순차적 아미노산 잔기를 의미한다. 폴리펩티드의 일부는 폴리펩티드의 모든 아미노산 잔기를 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0037] 폴리펩티드(또는 이를 암호화하는 DNA)의 "돌연변이체(mutant)", "유도체(derivative)," 및 "변이체(variant)"는 펩티드(또는 핵산)가 야생형 서열과 동일하지 않지만 야생형 폴리펩티드(또는 핵산)와 상동성을 가지도록 하나 이상의 아미노산(또는 하나 이상의 뉴클레오타이드)에서 변형되거나 변경될 수 있는 폴리펩티드이다.

[0038] 폴리펩티드(또는 이를 암호화하는 DNA)의 "돌연변이(mutation)"는 펩티드(또는 핵산)이 본원에서 언급된 서열과 동일하지 않지만 야생형 폴리펩티드(또는 핵산)와 상동성을 가지도록 하는 하나 이상의 아미노산(또는 하나 이상의 뉴클레오타이드에서)의 변형 또는 변경이다.

[0039] 본원에서 사용되는 "재조합"은 단백질이 원핵생물 또는 진핵생물 발현 시스템으로부터 유래됨을 의미한다.

[0040] 본원에서 사용되는 "전신(systemic) 투여", "전신적으로 투여되는", "말초 투여" 및 "말초적으로 투여되는"라는 문구는 치료 중인 대상체의 특정 조직, 기관, 또는 영역(예를 들어, 뇌)으로의 직접적 이외의 방식으로 화합물, 제제 또는 기타 물질의 투여에 의해 동물의 시스템에 들어가서 대사(metabolism) 및 기타 유사한 과정을 거치게 되는 것을 의미하며, 예를 들어, 피하 투여가 있다.

[0041] 용어 "야생형"은 생체 내에서 정상적으로 존재하는 바 대로의 단백질, 또는 이의 일부, 또는 단백질 서열, 또는 이의 일부를 각각 암호화하는 자연 발생 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.

[0042] 명세서 전체에 걸쳐, 구성물이 특정 성분을 가지거나(having), 포함하거나(including), 또는 포함하는(comprising) 것으로 기술되는 경우, 구성물은 또한 상기 언급된 성분으로 본질적으로(essentially) 구성되거나 이로 구성되는 것으로 고려된다. 유사하게, 방법 또는 공정이 특정 공정 단계를 가지거나, 포함하거나, 또는 포함하는 것으로 기술되는 경우, 공정은 또한 상기 언급된 공정 단계로 본질적으로 구성되거나 이로 구성된다. 또한, 본원에 설명된 구성물 및 방법이 작동 가능한 상태로 유지되는 한, 특정 작업을 수행하기 위한 단계 또는 순서의 순서는 중요하지 않음을 이해해야 한다. 나아가, 두 개 이상의 단계 또는 작업은 동시에 수행될 수

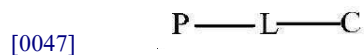
있다.

[0043] 본원에 기재된 구현예는 종양 및/또는 암 세포의 기질의 종양단백질(oncoprotein)에 대한 펩티드 양전자 방출 단층촬영(PET)/단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT) 프로브에 관한 것으로, 이는 대상체에서 암 분포 및/또는 위치 및/또는 암세포 전이, 이동, 및/또는 침윤의 검출, 모니터링, 및/또는 영상화, 대상체에서 암세포 공격성 및/또는 악성(malignancy)의 검출 및/또는 모니터링, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 암 치료제 및/또는 암 요법의 효능의 결정 및/또는 모니터링에 사용될 수 있다.

[0044] 본원에 기재된 PET/SPECT 프로브는 종양태아 피브로넥틴(oncofetal fibronectin, onfFN) 이소폼, 엑스트라도메인-B 피브로넥틴(EDB-FN) 또는 엑스트라도메인-A(EDA-FN) 피브로넥틴에 특이적으로 결합하고/하거나 이와 복합체를 형성하는 펩티드 서열을 가지는 표적화 펩티드를 포함한다. 암, 특히 악성 암은 암세포의 생존, 증식, 및 전이를 촉진하는 독특한 종양 미세환경을 가지고 있다. onfFN의 존재는 전립선암, 유방암 및 췌장암을 비롯한 다양한 인간 암 유형에서 발견되었다. onfFN, EDB-FN 및/또는 EDA-FN의 높은 발현은 암 공격성과 상관관계가 있고 환자 생존과 반비례한다. EDB-FN 및/또는 EDA-FN에 특이적으로 결합하는 표적화 펩티드를 포함하는 PET/SPECT 프로브가 대상체의 조직에서 암세포의 검출, 모니터링, 및/또는 영상화 뿐만 아니라 암세포 공격성, 악성, 전이, 이동, 분산, 및/또는 침윤을 결정하는데 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0045] 표적화 펩티드를 포함하는 PET/SPECT 프로브는 정맥내 또는 비경구 투여와 같이 대상체에게 전신적으로 투여되어, 세포의 기질 단백질 EDB-FN 및/또는 EDA-FN을 쉽게 표적화하여 대상체에서 암세포 위치, 분포, 및/또는 공격성 뿐만 아니라 종양 세포 가장자리(margin)를 규정지을(define) 수 있다.

[0046] 일부 구현예에서, PET/SPECT 프로브는 하기 식을 포함할 수 있다:



[0048] 상기 식에서 P는 표적화 펩티드이고, C는 PET/SPECT 조영제이고; 및 L은 펩티드를 조영제에 공유적으로 연결하는 선택적인 링커이다.

[0049] 일부 구현예에서, 표적화 펩티드는 EDB-FN에 특이적으로 결합할 수 있다. EDB-FN에 특이적으로 결합하는 표적화 펩티드는 TVRTSAD (서열번호 1), NWGDRIL (서열번호 2), NWGKPIK (서열번호 3), SGVKSFA (서열번호 4), GVKSUNE (서열번호 5), IGKTNTL (서열번호 6), IGNSNTL (서열번호 7), IGNTIPV (서열번호 8), 및 LYANSPF (서열번호 9)의 아미노산 서열을 가지는 선형 펩티드, CTVRTSADC (서열번호 10), CNWGDRLC (서열번호 11), CNWGKPIK (서열번호 12), CSGVKSFA (서열번호 13), CGVKSUNE (서열번호 14), CIGKTNTLC (서열번호 15), CIGNSNTLC (서열번호 16), CIGNTIPVC (서열번호 17), 또는 CLYANSPFC (서열번호 18)의 아미노산 서열을 가지는 사이클릭 펩티드, CTVRTSAD (서열번호 42), CNWGDRL (서열번호 43), CNWGKPIK (서열번호 44), CSGVKSFA (서열번호 45), CGVKSUNE (서열번호 46), CIGKTNTL (서열번호 47), CIGNSNTL (서열번호 48), CIGNTIPV (서열번호 49), CLYANSPF (서열번호 50)의 아미노산 서열을 가지는 시스테인 링커를 갖는 선형 펩티드, 또는 선형 펩티드의 레트로-인버소 아미노산 서열을 가지는 레트로-인버소 펩티드를 포함할 수 있다.

[0050] 다른 구현예에서, 표적화 펩티드는 EDA-FN에 특이적으로 결합할 수 있다. EDA-FN에 특이적으로 결합하는 표적화 펩티드는 WNYPFRL (서열번호 19), SNTSYVN (서열번호 20), SFSYTSG (서열번호 21), WSPAPMS (서열번호 22), TREHPAQ (서열번호 23), 또는 ARIIDNA (서열번호 24)의 아미노산 서열을 가지는 선형 펩티드, CWNYPFRLC (서열번호 25), CSNTSYVNC (서열번호 26), CSFSYTSGC (서열번호 27), CWSPAPMSC (서열번호 28), CTREHPAQ (서열번호 29), 또는 CARIIDNAC (서열번호 30)의 아미노산 서열을 가지는 사이클릭 펩티드, CTVRTSAD (서열번호 51), CNWGDRL (서열번호 52), CNWGKPIK (서열번호 53), CSGVKSFA (서열번호 54), CGVKSUNE (서열번호 55), CIGKTNTL (서열번호 56), CIGNSNTL (서열번호 57), CIGNTIPV (서열번호 58), 및 CLYANSPF (서열번호 59)의 아미노산 서열을 가지는 시스테인 링커를 갖는 선형 펩티드, 또는 선형 펩티드의 레트로-인버소 아미노산 서열을 가지는 레트로-인버소 펩티드를 포함할 수 있다.

[0051] 표적화 펩티드는 다양한 변화, 치환, 삽입, 및 결실을 거칠 수 있으며, 이러한 변화는 사용 시 특정 이점을 제공한다. 이와 관련하여, EDB-FN 및/또는 EDA-FN에 결합하고/하거나 이와 복합체를 형성하는 표적화 펩티드는 하나 이상의 변화가 발생하는 인용된 펩티드의 서열과 동일하기 보다는 실질적으로 상동일 수 있으며, 이는 EDB-FN 및/또는 EDA-FN에 특이적으로 결합 및/또는 복합체화로 기능하는 능력을 유지한다.

[0052] 표적화 펩티드는 아미드, 단백질과의 접합체, 고리화된 폴리펩티드, 중합된 폴리펩티드, 레트로-인버소 펩티드,

유사체, 단편, 화학적으로 변형된 폴리펩티드, 및 기타 유도체를 포함하는 임의의 다양한 형태의 폴리펩티드 유도체일 수 있다.

[0053] 레트로-인버소 펩티드는 아미노산 서열이 역전되고(reversed) 아미노산 서브유닛의 α -중심 키랄성(chirality) 또한 역전된 선형 펩티드이다. 이러한 유형의 펩티드는 D-아미노산을 역순(reverse sequence)으로 포함함으로써 설계된 것으로 원래 L-아미노산 펩티드와 유사한 측쇄 토폴로지(topology)를 유지하도록 돕고 단백질(proteolytic) 분해에 대한 저항성을 높인다. D-아미노산은 생물학적 시스템에 존재하는 천연 단백질에서 발생하는 천연 L-아미노산의 입체구조적(conformational) 거울 이미지를 나타낸다. D-아미노산을 포함하는 펩티드는 L-아미노산만 포함하는 펩티드에 비해 장점이 있다. 일반적으로, 이러한 유형의 펩티드는 단백질 분해에 덜 민감하고 사용 시 더 긴 유효 시간을 가진다. 또한, D-아미노산만 포함하거나 L-아미노산 사이에 있는 서열 블록으로서 선택된 서열 영역에 D-아미노산을 삽입하면 단백질 분해에 저항성이 있을 뿐만 아니라 생체활성이고 생체이용률이 증가된 표적화 펩티드를 설계할 수 있다. 또한, 적절히 설계된다면, 레트로-인버소 펩티드는 L-펩티드와 유사한 결합 특성을 가질 수 있다.

[0054] 용어 "유사체"는 본원에 구체적으로 기재된 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 잔기 서열을 가지며 하나 이상의 잔기가 기능적으로 유사한 잔기로 보존적으로 치환되고 본원에 기재된 바와 같은 EDB-FN 및/또는 EDA-FN 에 특이적으로 결합하고/하거나 이와 복합체를 형성하는 임의의 펩티드를 포함한다. 보존적 치환의 예는 하나의 비극성(소수성) 잔기, 예컨대 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 다른 것으로의 치환, 하나의 극성(친수성) 잔기의 다른 것으로의 치환, 예컨대 아르기닌과 리신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이, 글리신과 세린 사이, 하나의 염기성 잔기, 예컨대 리신, 아르기닌 또는 히스티딘의 다른 것으로의 치환, 또는 하나의 산성 잔기, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산의 다른 것으로의 치환을 포함한다.

[0055] "보존적 치환"이라는 어구는 또한 비-유도체화된 잔기 대신에 화학적으로 유도체화된 잔기의 사용을 포함하며 이는 이러한 펩티드가 필요한 결합 활성을 나타내는 경우에 한한다.

[0056] "화학적 유도체"는 기능적 측기(side group)의 반응에 의해 화학적으로 유도체화된 하나 이상의 잔기를 가지는 대상 펩티드를 지칭한다. 이러한 유도체화된 분자로는, 예를 들어, 유리 아미노기가 유도체화되어 아민 하이드로클로라이드, p-톨루엔 술폰닐기, 카르보벤족시기, t-부틸옥시카르보닐기, 클로로아세틸기 또는 포르밀기를 형성하는 분자를 포함한다. 유리 카르복실기는 유도체화되어 염, 메틸 및 에틸 에스테르 또는 다른 유형의 에스테르 또는 히드라이드를 형성할 수 있다. 유리 하이드록실기는 유도체화되어 O-아실 또는 O-알킬 유도체를 형성할 수 있다. 히스티딘의 이미다졸 질소는 유도체화되어 N-벤질히스티딘을 형성할 수 있다. 20개의 표준 아미노산 중 하나 이상의 자연 발생 아미노산 유도체를 함유하는 폴리펩티드도 화학적 유도체로서 포함된다. 예를 들어, 4-하이드록시프롤린은 프롤린을 대체할 수 있고; 5-하이드록시리신은 리신을 대체할 수 있고; 3-메틸히스티딘은 히스티딘을 대체할 수 있고; 호모세린은 세린을 대체할 수 있고; 및 오르니틴(ornithine)은 리신을 대체할 수 있다. 본원에 기술된 펩티드는 필요한 결합 특이성 또는 활성이 유지되는 한, 서열이 본원에 제시된 펩티드의 서열에 대하여 하나 이상의 추가 및/또는 결실 또는 잔기를 가지는 임의의 펩티드를 또한 포함한다.

[0057] 용어 "단편"은 아미노산 잔기 서열이 본원에 제시된 폴리펩티드의 아미노산 잔기 서열보다 짧은 아미노산 잔기 서열을 가지는 임의의 대상 펩티드를 지칭한다.

[0058] 임의의 폴리펩티드 또는 화합물은 약제학적으로 허용되는 염의 형태로 또한 사용될 수 있다. 폴리펩티드와 염을 형성할 수 있는 산은 무기산, 예컨대 트리플루오로아세트산(TFA), 염산(HCl), 브롬화수소산, 과염소산(perchloric acid), 질산, 티오시안산, 황산, 인산 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 안트라닐산, 신남산, 나프탈렌술폰산, 술파닐산(sulfanilic acid) 등을 포함한다.

[0059] 폴리펩티드와 염을 형성할 수 있는 염기는 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨 등과 같은 무기 염기; 및 모노-, 디- 및 트리-알킬 및 아릴-아민(예: 트리에틸아민, 디이소프로필아민, 메틸아민, 디메틸아민 등) 및 임의로 치환된 에탄올아민(예: 에탄올아민, 디에탄올아민 등)과 같은 유기 염기를 포함한다.

[0060] 표적화 펩티드는 재조합 DNA 기술을 포함하여 폴리펩티드 기술분야의 숙련자에게 공지된 임의의 기술에 의해 합성될 수 있다. 고체상 Merrifield-형 합성과 같은 합성 화학 기술은 순도, 항원 특이성, 원치 않는 부산물로부터의 자유, 생산 용이성 등의 이유로 사용될 수 있다. 사용 가능한 많은 기술에 대한 요약은 고체상 펩티드 합성에 대해서는 Steward et al., "Solid Phase Peptide Synthesis", W. H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Bodanszky, et al., "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Second Edition, 1976; J. Meienhofer,

"Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983; Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-96, 1969; Fields et al., int. J. Peptide Protein Res., 35:161-214, 1990; 및 미국 특허 제4,244,946호에서, 그리고 고전적인 용액 합성에 대해서는 Schroder et al., "The Peptides", Vol. 1, Academic Press (New York), 1965에서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 이러한 합성에 사용할 수 있는 적절한 보호기는 상기 텍스트 및 J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, New York, 1973에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0061] 일반적으로, 고려되는 고체상 합성 방법은 성장하는 펩티드 사슬에 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 적절하게 보호된 아미노산 잔기를 순차적으로 첨가하는 것을 포함한다. 통상, 첫 번째 아미노산 잔기의 아미노기 또는 카르복실기는 적절하고 선택적으로 제거 가능한 보호기에 의해 보호된다. 리신과 같은 반응성 측기를 포함하는 아미노산에는 선택적으로 제거 가능한 다른 보호기가 사용된다.

[0062] 예로서 고체상 합성을 사용하여, 보호되거나 유도체화된 아미노산이 그의 보호되지 않은 카르복실기 또는 아미노기를 통해 불활성 고체 지지체에 부착될 수 있다. 그런 다음 아미노기 또는 카르복실기의 보호기가 선택적으로 제거될 수 있고 적절하게 보호된 상보적인 (아미노 또는 카르복실) 기를 가지는 서열의 다음 아미노산이 고체 지지체에 이미 부착된 잔기와 아미드 결합을 형성하기에 적합한 조건하에서 혼합되고 반응된다. 그런 다음 이 새로이 추가된 아미노산 잔기로부터 아미노기 또는 카르복실기의 보호기가 제거될 수 있고, 그런 다음 (적절하게 보호된) 다음 아미노산이 추가되는 식이다. 모든 원하는 아미노산이 적절한 서열로 연결된 후, 임의의 나머지 말단 및 측기 보호기 (및 고체 지지체)를 순차적으로 또는 동시에 제거하여 최종 선형 폴리펩티드를 수득할 수 있다.

[0063] 나아가, 본원에 기재된 표적화 펩티드는 유사한 리간드 결합 능력을 가지는 고친화성 소분자, 펩티드, 항체, 및/또는 항체 단편을 개발하기 위한 출발점으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 인 실리코(in silico) 스크리닝을 사용하여 펩티드의 약리부분(pharmacophore)으로부터 소분자의 개발 및 스크리닝을 용이하게 수행할 수 있으며, 이러한 확인된 분자의 결합 친화도를 본원에 기재된 검정을 사용하여 표적화 펩티드에 대하여 쉽게 스크리닝하여 소분자 체제를 선택할 수 있다.

[0064] 펩티드가 다른 폴리펩티드, 단백질, 검출가능한 모이어티, 표지, 고체 매트릭스, 또는 담체에 편리하게 연결 및/또는 부착될 수 있도록 하는 "링커"를 제공하기 위한 목적으로 펩티드의 어느 한쪽 말단에 추가의 잔기가 또한 추가될 수 있다.

[0065] 아미노산 잔기 링커는 일반적으로 적어도 하나의 잔기이며 40개 이상의 잔기, 더 빈번하게는 1 내지 10개의 잔기일 수 있다. 연결에 사용되는 전형적인 아미노산 잔기는 글리신, 티로신, 시스테인, 리신, 글루탐산 및 아스파르트산 등이다. 또한, 대상 표적화 펩티드 체제는 말단-NH₂ 아실화, 예를 들어, 아세틸화, 또는 티오글리콜산 아미드화(thioglycolic acid amidation)에 의해, 말단-카르복실아미드화, 예를 들어, 암모니아, 메틸아민 등의 말단 변형에 의해 변형되는 서열에 의해 상이할 수 있다. 말단 변형은 잘 알려진 바와 같이 단백질분해효소(proteinase) 분해(digestion)에 의한 감수성을 감소시키는 데 유용하므로, 용액, 특히 프로테아제(protease)가 존재할 수 있는 생물학적 유체에서 폴리펩티드의 반감기를 연장하는 역할을 한다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 고리화 역시 유용한 말단 변형이고, 고리화에 의해 형성된 안정한 구조 때문에 그리고 본원에 기재된 바와 같은 그러한 고리형 펩티드에 대해 관찰된 생물학적 활성의 관점에서 특히 바람직하다.

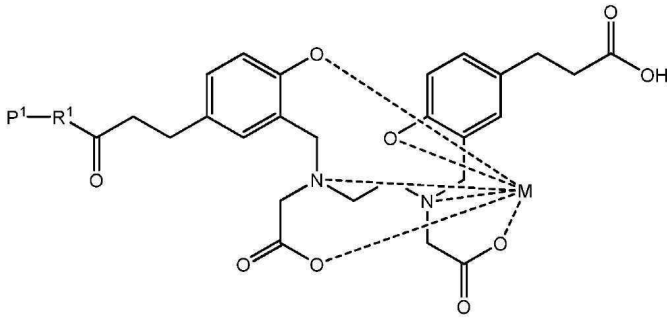
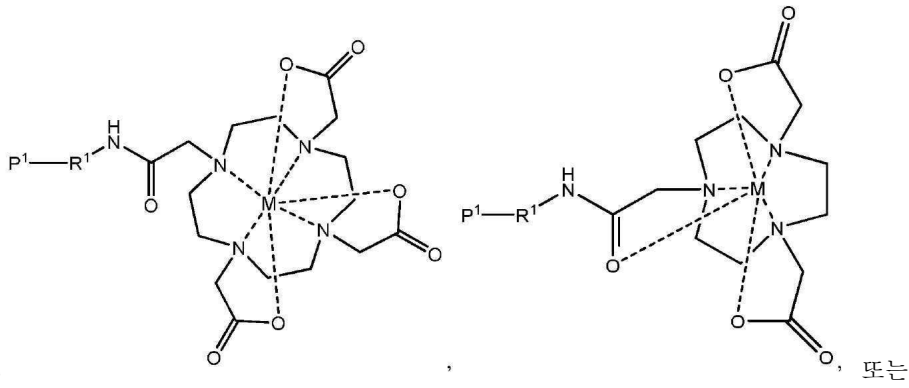
[0066] 링커가 펩티드 링커인 경우, 폴리펩티드-링커는 통상적인 분자 생물학적/재조합 DNA 방법을 사용하여 단일 재조합 폴리펩티드로서 생산될 수 있다.

[0067] 예를 들어, 표적화 펩티드는, 무수물(anhydride) 또는 산 할로겐화물(acid halide)과 같은 카르보닐-함유 기, 또는 우수한 이탈기(예를 들어, 할로겐화물)를 함유하는 알킬기와 반응할 수 있는 리신을 포함할 수 있다. 표적화 펩티드는 또한 티올-선택적 화학(예를 들어, 말레이미드-활성화 화합물)을 통해 화학적 커플링을 촉진하는 시스테인을 포함할 수 있다. 또한, 표적화 펩티드는 디아조늄(diazonium) 커플링 반응을 사용하여 변형될 수 있는 티로신을 포함할 수 있다. 예시적인 구현예에서, 아미노산 잔기 링커는 시스테인-글리신(CG) 링커이다.

[0068] 다른 구현예에서, 화학적 결합제(binder) 그룹이 사용될 수 있다. 결합제 그룹은 표적화 펩티드 또는 표적화 펩티드가 결합된 화합물 또는 분자 상의 치환기의 화학적 반응성을 증가시키는 역할을 할 수 있으며, 이에 따라 커플링 효율을 증가시킬 수 있다. 결합제 화합물질은 티올기에 결합하는 데 사용할 수 있는 말레이미드 결합제, 유리 아민기에 결합할 수 있는 이소티오시아네이트 및 숙신이미드(예: N-히드록시숙신이미드(NHS)) 결합제, 페놀에 결합하는 데 사용할 수 있는 디아조늄, 및 카르보디이미드 활성화를 사용하여 카르복실레이트기와 같은 유

리산과 결합하는 데 사용할 수 있는 아민을 포함할 수 있다.

- [0069] 존재하는 특정 아미노산을 기반으로 하여 표적화 펩티드 상에 유용한 작용기가 존재하고, 추가 그룹을 설계할 수 있다. 다양한 이관능성(bifunctional) 또는 다관능성(polyfunctional) 시약으로서, 양자 모두 호모- 및 이종-관능성인(예를 들어, Pierce Chemical Co., Rockford, IL 의 카탈로그에 기재된 것과 같은) 시약이 결합제 그룹으로 사용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 커플링은, 예를 들어, 아미노기, 카르복실기, 설프하이드릴기(sulfhydryl group) 또는 산화된 탄수화물 잔기를 통해 수행될 수 있다.
- [0070] 다른 유형의 결합 화학도 사용할 수 있다. 예를 들어, 폴리사카라이드를 펩티드에 접합시키는 방법은 알파- 또는 엡실론-아미노기를 통한 NaIO_4 -활성화 올리고사카라이드로의 커플링(Bocher et al., J. Immunol. Methods 27, 191-202 (1997)), 커플링 시약으로서 스쿠아린산 디에스테르 (1,2-디에톡시시클로부텐-3,4-디온)의 사용(Tietze et al. Bioconjug Chem. 2:148-153 (1991)), 폴리사카라이드가 환원 말단을 가지고 카르복실기가 없는 펩티드 결합제를 통한 커플링(미국 특허 제5,342,770호), 및 인간 heat shock 단백질 hsp65에서 유래한 합성 펩티드 담체와의 커플링(미국 특허 제5,736,146호)에 의해 예시되나, 이에 국한되지는 않는다. 폴리사카라이드, 단백질, 및 지질을 펩티드에 접합시키는 추가 방법은 미국 특허 제7,666,624호에 기재되어 있다.
- [0071] 일부 구현예에서, 링커는 비-펩티드 링커이다. 비-펩티드 링커는 비-펩티드 지방족, 헤테로지방족, 사이클릭, 및/또는 헤테로사이클릭 링커일 수 있다. 비-펩티드 링커는, 예를 들어, 펩티드와 조영제를 공유적으로 연결하는 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커를 포함할 수 있다.
- [0072] 다른 구현예에서, 링커는 PEG 분자 링커일 수 있다. PEG 분자는, 예를 들어, PEG 200, PEG 1000, PEG 1500, PEG 4600, PEG 10,000, 또는 이들의 조합을 포함하는 다양한 길이 및 분자량을 가질 수 있다.
- [0073] PET/SPECT 조영제는 표적화 펩티드에 직접 접합되거나 링커를 통해 표적화 펩티드에 연결될 수 있다. 조영제의 역할은 EDB-FN 및/또는 EDA-FN에 대한 표적화 펩티드를 포함하는 PET/SPECT 프로브의 결합에 의해 형성된 복합체를 가시화함으로써 검출 또는 진단 방법의 검출 단계를 용이하게 하는 것이다. 조영제는 신호를 생성하도록 선택될 수 있으며, 이는 측정될 수 있고 그 강도는 분석되는 조직에 결합된 PET/SPECT 프로브의 양과 관련(바람직하게는 비례)된다.
- [0074] 특정 구현예에서, 조영제는 킬레이트제 및 금속 이온을 포함한다. 킬레이트제는 일반적으로 링커와 공유 결합을 형성할 수 있는 하나 이상의 기를 보유한다. 당업계에 공지된 다수의 상이한 킬레이트제가 본원에서 사용될 수 있다. 일 측면에서, 킬레이트제는 영상화제와 배위할 수 있는 고립쌍(lone-pair) 전자를 가지는 적어도 하나의 헤테로원자(예를 들어, 산소, 질소, 황, 인)를 포함하는 비환식 또는 환식 화합물을 포함한다. 금속 킬레이트제는, 예를 들어, 디에틸렌트리아민펜타아세트레이트(DTPA), 1,4,7,10-테트라아자도데칸테트라아세트레이트(DOTA), 1,4,7,10-테트라아자도데칸-1,4,7-트리아세트레이트(DO3A), 에틸렌디아민테트라아세트레이트(EDTA), 1,4,7,10-테트라아자사이클로트리데칸테트라아세트산(TRITA), 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA), 1,4,7,10-테트라아자도데칸테트라메틸아세트레이트(DOTMA), 1,4,7,10-테트라아자도데칸-1,4,7-트리메틸아세트레이트(DO3MA), N,N',N'',N'''-테트라포스포나토메틸(tetraphosphonatomethyl)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸(DOTP), 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 메틸포스포산)(DOTMP), 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라키스(메틸렌 페닐포스포산)(DOTPP), N,N'-에틸렌디(ethylenedi)-L-시스테인, 1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA), 1,4,7-트리아자사이클로노난(TACN), N,N'-비스(2-하이드록시-5-(에틸렌-베타-카르복시)벤질)에틸렌디아민 N,N'-디아세트산(HBED-CC), 및 이들의 유도체 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 용어 "유도체"는 여기서 킬레이트제의 상응하는 염 및 이의 에스테르로 정의된다.
- [0075] 금속 이온의 선택은 검출 기술(예: PET 또는 SPECT)에 따라 달라질 수 있다. PET 및 SPECT 영상화에 유용한 금속 이온은 ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , $^{90\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{153}Sm , 또는 ^{89}Sr 을 포함할 수 있다.
- [0076] 일부 구현예에서, PET/SPECT 프로브는 하기 화학식을 가질 수 있다:



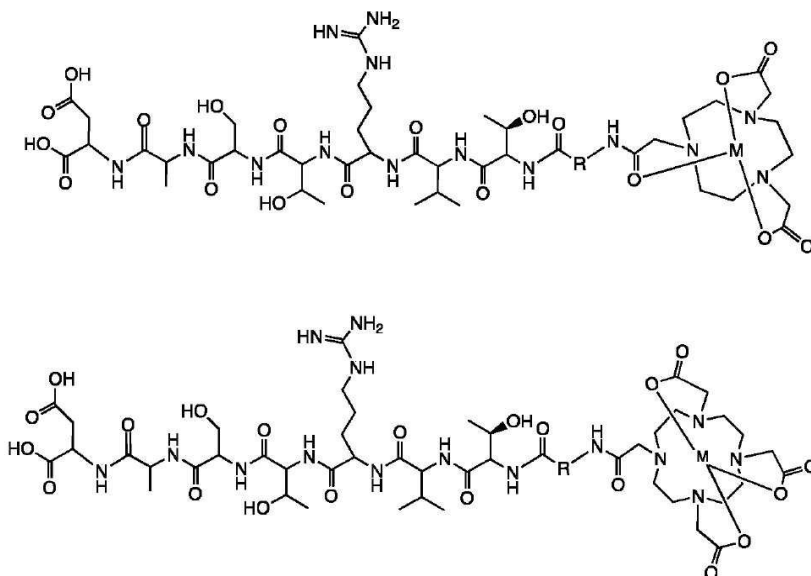
[0079] 상기 식에서:

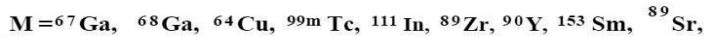
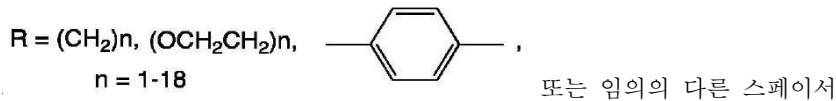
[0080] P_1 은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, WNYPFRL (서열번호 19), SNTSYVN (서열번호 20), SFSYTSYG (서열번호 21), WSPAPMS (서열번호 22), TREHPAQ (서열번호 23), ARIIDNA (서열번호 24), 및 이들의 레트로-인verso 아미노산 서열로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

[0081] R^1 은 선택적이고 존재하는 경우 알킬렌, 알킬렌 옥사이드, 아릴렌, 또는 알킬렌아릴렌 링커, 예컨대 $-(CH_2)_n-$, $-(OCH_2CH_2)_n$, 또는 아릴렌를 포함하고, 여기서 n 은 1에서 18 사이의 정수이고; 및

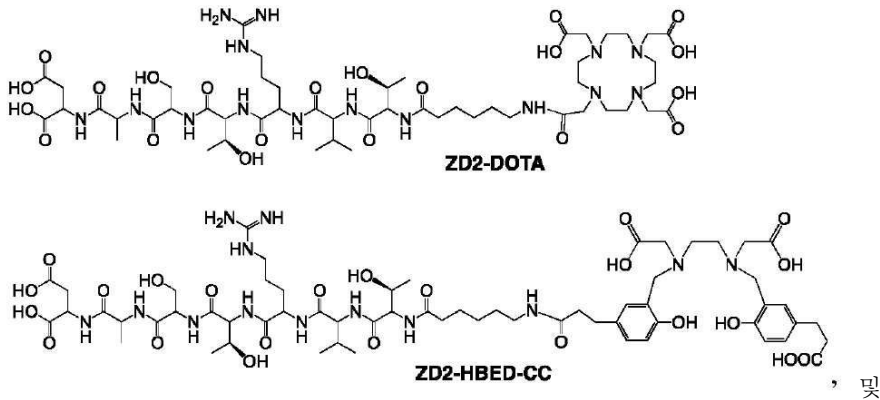
[0082] M 은 ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{153}Sm , 또는 ^{89}Sr 로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 금속; 또는 이의 염이다.

[0083] 다른 구현예에서, PET/SPECT 프로브는 하기 화학식을 가질 수 있다:





또 다른 구현예에서, PET/SPECT 프로브는 하기 화학식을 가질 수 있다:



${}^{67}\text{Ga}, {}^{68}\text{Ga}, {}^{64}\text{Cu}, {}^{99m}\text{Tc}, {}^{111}\text{In}, {}^{89}\text{Zr}, {}^{90}\text{Y}, {}^{153}\text{Sm}$, 또는 ${}^{89}\text{Sr}$ 로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 PET/SPECT 방사성 핵종(radionuclide); 또는 이의 염.

본원에 기재된 PET/SPECT 프로브는, 예를 들어, 전신, 국소, 및/또는 비경구 투여 방법에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 주사, 주입, 침착, 이식, 또는 국소 투여, 또는 분자 프로브에 의한 조직에의 접근이 요구되는 임의의 다른 투여 방법을 포함한다. 일 예에서, 분자 프로브의 투여는 대상체에서 분자 프로브의 정맥내 주사에 의해 이루어질 수 있다. 프로브의 단일 또는 다중 투여가 주어질 수 있다. 본원에서 사용되는 "투여되는"은 대상체에서 암세포를 표지하기에 효과적인 양(들) 및 기간(들)으로 분자 프로브를 제공 또는 전달하는 것을 의미한다.

본원에 기재된 표적화 펩티드를 포함하는 PET/SPECT 프로브는, 환자에게 분자 프로브 또는 이의 약제학적으로 허용되는 수용성 염을 함유하는 약제학적 조성물의 검출가능한 양으로 대상체에게 투여될 수 있다.

"검출가능한 양"은 투여되는 분자 프로브의 양이 암세포 미세환경에서 암세포 또는 다른 세포에 의해 발현되는 EDB-FN 및/또는 EDA-FN에 대한 프로브의 결합 또는 복합체화의 검출을 가능하게 하기에 충분함을 의미한다. "영상화 유효량(imaging effective quantity)"은 투여되는 PET/SPECT 프로브의 양이 암세포 미세환경에서 암세포 또는 다른 세포의 EDB-FN 및/또는 EDA-FN에 대한 분자 프로브의 결합 또는 복합체화의 영상화를 가능하게 하기에 충분함을 의미한다.

투여될 PET/SPECT 프로브의 제형은 선택되는 투여 경로(예를 들어, 용액, 에멀전, 캡슐 등)에 따라 달라질 것이다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체는 화합물의 생물학적 활성을 과도하게 억제하지 않는 불활성 성분을 함유할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 생체적합성, 예를 들어, 무독성, 비염증성, 비면역원성이어야 하고 대상체에 투여시 다른 바람직하지 않은 반응이 없어야 한다. Remington's Pharmaceutical Sciences, ibid에 기재된 것과 같은 표준 약제학적 제제 기술이 사용될 수 있다. 비경구 투여에 적합한 약제학적 담체는, 예를 들어, 멸균수, 생리 식염수, 정균 식염수(약 0.9% mg/ml 벤질 알코올을 함유하는 식염수), 포스페이트 완충 식염수, 헹크 용액(Hank's solution), 링거-락테이트 등을 포함한다.

용해되거나 분산된 활성 성분을 함유하는 약리학적 조성물의 제조는 당업계에 잘 알려져 있다. 전형적으로 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사제로 제조되지만, 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태를 사용하기 전에 액체로 제조할 수도 있다. 제형은 선택되는 투여 경로(예를 들어, 용액, 에멀전, 캡슐)에 따라 달라질 것이다.

임의의 폴리펩티드 또는 화합물은 또한 약제학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있다. 폴리펩티드와 염을 형성할 수 있는 산은 무기산, 예컨대 트리플루오로아세트산(TFA) 염산(HCl), 브롬화수소산, 과염소산(perchloric acid), 질산, 티오시아산, 황산, 인산 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 안트라닐산, 신남산, 나프탈렌술폰산, 술파닐산(sulfanilic acid)

등을 포함한다.

- [0096] 폴리캡티드와 염을 형성할 수 있는 염기는 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨 등과 같은 무기 염기; 및 모노-, 디- 및 트리-알킬 및 아릴-아민(예: 트리에틸아민, 디이소프로필아민, 메틸아민, 디메틸아민 등) 및 임의로 치환된 에탄올아민(예: 에탄올아민, 디에탄올아민 등)과 같은 유기 염기를 포함한다.
- [0097] 본원에 기재된 PET/SPECT 프로브는 대상체의 기관, 조직, 또는 신체 부위에서 EDB-FN 및/또는 EDA-FN을 발현하는 암세포의 존재, 위치, 및/또는 분포를 검출 및/또는 결정하는 방법에 사용될 수 있다. 동물의 조직, 예를 들어, 전립선 조직에서 프로브의 존재, 위치, 및/또는 분포를 시각화할 수 있다(예를 들어 상기에서 설명한 생체 내 영상화 방식(modality)을 사용하여). 본원에서 사용되는 "분포"는 면적 또는 체적에 걸쳐 흩어져 있는 공간적 특성이다. 이 경우에, "암세포의 분포"는 동물의 조직, 예를 들어, 전립선 조직에 포함된 면적 또는 체적에 걸쳐 흩어져 있는 암세포의 공간적 특성이다. 따라서 분자 프로브의 분포는 조직 내 암세포의 존재 또는 부재와 상관관계가 있을 수 있다. 분포는 암세포의 존재 또는 부재에 대해 처분을 내릴(dispositive) 수 있거나, 당업자에 의해 다른 인자 및 증상과 조합되어 이동하거나 분산하는 암세포, 암 전이의 존재 또는 부재를 양성적으로 검출하거나 대상체에서 종양 가장자리(margin)를 규정지을 수 있다.
- [0098] 일 측면에서, PET/SPECT 프로브는 대상체에 투여되어 대상체에서 악성 또는 전이성 암세포의 분포를 평가하고 분포를 특정 위치와 상관시킬 수 있다. 외과 의사는 외과 절제술에서 정위(stereotactic) 기술 및 수술 중(intra-operative) MRI(iMRI)를 일상적으로 사용한다. 이를 통해 그들은 종양 경계(edge) 또는 종양 중심과 같은 종양의 별개 영역으로부터의 조직을 구체적으로 식별하고 샘플링할 수 있다. 흔히, 그들은 종양 경계(edge) 외부에 있는 종양 가장자리(margin)의 조직 영역을 또한 샘플링하는데, 이 조직 영역은 전체적으로 정상으로 보이지만 조직학적 검사를 해보면 분산하는 종양 세포에 의해 침윤되어 있다.
- [0099] 악성 또는 전이성 세포와 관련된 EDB-FN 및/또는 EDA-FN에 특이적으로 결합하고/하거나 이와 복합체를 형성하는 PET/SPECT 프로브는 수술 중 영상 기술에 사용되어 외과적 절제를 가이드하고 외과의사가 종양 가장자리(margin)의 위치에 대한 "교육적 추측(educated guess)"을 제거할 수 있다. 이전 연구에서는 보다 광범위한 외과적 절제가 환자의 생존율을 향상시킨다고 판단하였다. 따라서, 진단 분자 영상화제로 기능하는 프로브는 환자의 생존율을 증가시킬 가능성이 있다.
- [0100] 일부 구현예에서, 암세포의 제거를 확인하고 용이하게 하기 위하여, 현미경적 수술 중 영상화(intra-operative imaging, IOI) 기술을 본원에 기재된 전신 투여 또는 국소 투여되는 PET/SPECT 프로브와 조합할 수 있다. 대상체에 투여시 PET/SPECT 프로브는 환자의 장기 또는 신체 부위에서 암세포, 즉 EDB-FN 및/또는 EDA-FN 발현과 관련된 암세포의 존재, 위치, 및/또는 분포를 표적화하고 검출 및/또는 결정할 수 있다. 일 예에서, 프로브는 IOI와 조합되어 종양 가장자리(margin)에 침윤되고/되거나 침윤되기 시작하는 악성 세포를 식별할 수 있다. 이 방법은 수술 중 실시간으로 수행할 수 있다. 이 방법은 PET 또는 SPECT 조영제와 같은 검출 가능한 모이어티를 포함하는 PET/SPECT 프로브의 국소 또는 전신 적용을 포함할 수 있다. 그런 다음 영상화 방식을 사용하여 영상(image) 데이터를 감지하고 이어서 수집할 수 있다. 수득한 영상 데이터는 적어도 부분적으로 외과적 및/또는 방사선학적 치료를 결정하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 이 영상 데이터는 적어도 부분적으로 자동화된 수술 장치(예를 들어, 레이저, 외과용 메스(scalpel), 마이크로머신)를 제어하거나 수술의 수동 안내를 보조하는 데 사용될 수 있다. 또한, 영상 데이터는 치료제의 전달을(예를 들어, 마이크로-전자 기계 또는 마이크로-기계에 의해) 계획 및/또는 제어하는 데 사용될 수 있다.
- [0101] 본원에 기재된 또 다른 구현예는 대상체에서 암세포의 공격성 또는 악성을 결정하는 방법에 관한 것이다. 암에 대한 PET/SPECT 프로브의 결합 강도는 암 공격성과 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다. 향상된 결합은 더 공격적인 암과 상관관계가 있는 반면, 더 낮거나 감소된 결합은 덜 공격적이거나 양성인 종양과 상관관계가 있었다. 일 예에서, 전립선 종양 절편에 대한 프로브의 결합은 종양 공격성을 기반으로 하는 글리슨(Gleason) 점수와 상관관계가 있었으며, 여기서 분자 프로브의 향상된 결합 강도는 공격성 또는 악성 전립선암과 상관관계가 있었고 이는 프로브의 더 낮은 결합 강도를 나타내는 양성 전립선 비대증과 구별되었다. 본원에 기재된 방법 및 분자 프로브는 암 치료제 또는 암 요법의 투여 전, 투여 동안, 또는 치료 요법 후 대상체에서 암의 공격성을 모니터링 및/또는 비교하는 데 사용될 수 있다.
- [0102] 본원에 기재된 또 다른 구현예는 대상체에게 투여되는 암 치료제 또는 암 요법의 효능을 모니터링하는 방법에 관한 것이다. 본원에 기재된 방법 및 PET/SPECT 프로브는 암 치료제 또는 암 요법의 투여 전, 투여 동안, 또는 치료 요법 후 대상체에서 암의 공격성, 침습, 이동, 분산, 및 전이를 모니터링 및/또는 비교하는데 사용될 수 있다.

- [0103] 본원에서 사용되는 "암 치료제" 또는 "암 요법"은, 예를 들어, 암세포를 죽이고, 암세포에서 세포자멸사(apoptosis)를 유도하고, 암세포의 성장 속도를 감소시키고, 전이의 발생 또는 수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고, 종양 성장을 억제하고, 종양 또는 암세포에 대한 혈액 공급을 감소시키고, 암세포 또는 종양에 대한 면역 반응을 촉진하고, 암의 진행을 예방 또는 억제하고, 또는 암에 걸린 동물의 수명을 연장함으로써, 동물에서 암에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 임의의 제제 또는 치료 요법을 포함할 수 있다. 암 치료제는 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 및/또는 생물학적 요법/면역요법과 같은 하나 이상의 요법을 포함할 수 있지만 이에 국한되지는 않는다. 예를 들어, 대상체에서 암 부피, 성장, 이동, 및/또는 분산의 감소는 주어진 요법의 효능을 나타낼 수 있다. 이것은 암 치료제의 직접적인 임상 효능 종말점 측정을 제공할 수 있다. 따라서, 또 다른 측면에서, 암 치료제의 효능을 모니터링하는 방법이 제공된다. 보다 구체적으로, 본 출원의 구현에는 암 요법의 효능을 모니터링하는 방법을 제공한다.
- [0104] 암 치료제의 효능을 모니터링하는 방법은 본원에 기재된 바와 같은 PET/SPECT 프로브를 동물에게 생체내 투여하는 단계, 그런 다음 동물에서 프로브의 분포를 가시화하는 단계(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 생체 내 영상화 방식을 사용하여), 및 그런 다음 프로브의 분포를 암 치료제의 효능과 상관시키는 단계를 포함할 수 있다. 투여 단계는 선택된 치료 요법의 효능을 결정하기 위해 치료 요법의 과정 전, 도중, 및 후에 발생할 수 있는 것으로 고려된다. 암 치료제의 효능을 평가하는 한 가지 방법은 암 요법 전후의 프로브 분포를 비교하는 것이다.
- [0105] 일부 구현예에서, EDB-FN 및/또는 EDA-FN에 결합되고/되거나 이와 복합체화된 PET/SPECT 프로브를 대상체에서 검출하여 대상체에서 암세포의 공격성, 위치 및/또는 분포를 검출 및/또는 제공한다. 그런 다음, 대상체에서 암세포의 공격성, 위치 및/또는 분포를 대조군과 비교하여 암 치료제 및/또는 암 요법의 효능을 결정할 수 있다. 대조군은 암 치료제 및/또는 암 요법의 투여 이전의 대상체에서 암세포의 위치 및/또는 분포일 수 있다. 암 치료제 및/또는 암 요법의 투여 이전의 대상체에서 암세포의 위치 및/또는 분포는 암 치료제 및/또는 암 요법의 투여 이전의 대상체에 프로브를 투여하고 대상체에서 암세포에 결합하고/하거나 이와 복합체화된 프로브를 검출함으로써 결정될 수 있다.
- [0106] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 방법 및 PET/SPECT 프로브는 전이성 또는 공격성 암을 치료하기 위하여 대상체에 투여된 치료제의 효능을 측정하는데 사용될 수 있다. 이 구현예에서, 프로브는 치료 요법의 투여 전, 도중, 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있고 암세포의 분포를 영상화하여 치료 요법의 효능을 결정할 수 있다. 일 예에서, 치료 요법은 전이성 암의 외과적 절제를 포함할 수 있고 프로브를 사용하여 수술 전 및 수술 후 전이성 암의 분포를 규정지음으로써 외과적 절제의 효능을 결정할 수 있다. 선택적으로, 수술 동안 암세포 덩어리 또는 부피를 보다 쉽게 규정 및/또는 영상화하기 위하여, 외과적 종양 절제술과 같은 수술 중의 외과적 절차에 방법 및 프로브를 사용할 수 있다.
- [0107] 다른 구현예에서, 표적화 펩티드는 치료제에 접합될 수 있고 암, 예컨대 전이성 암을 치료하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 이 구현예에서, 치료제에 접합된 표적화 펩티드는 대상체에게 투여될 수 있고 전이성 세포는 치료제로 표적화될 수 있다.
- [0108] 치료제는 항신생물(antineoplastic), 화학요법, 항바이러스, 항유사분열(antimitotic), 항종양(antitumorigenic), 및/또는 면역요법 효과를 발휘하는 항증식제, 예를 들어, 생물학적 반응 변형과 같은 기전을 통해 간접적으로가 아니라, 예를 들어 세포 증식 억제(cytostatic) 또는 세포사멸(cytocidal) 효과에 의해 종양 세포에 직접적으로, 신생물 세포의 발달, 성숙, 또는 확산을 방지하는 항증식제를 포함할 수 있다. 상업적 사용, 임상 평가 및 전임상 개발에서 사용할 수 있는 항증식제가 많이 있다. 논의의 편의를 위해, 항증식제는 다음과 같은 부류, 아형 및 종으로 분류된다: ACE 억제제, 알킬화제, 혈관신생 억제제, 안지오테닌, 안트라사이클린/DNA 삽입제(intercalator), 항암 항생제 또는 항생제 유형 제제, 항대사물질, 항전이 화합물, 아스파라기나제, 비스포스포네이트, cGMP 포스포디에스테라제 억제제, 탄산칼슘, 사이클로옥시게나제-2 억제제, DHA 유도제, DNA 토포아이스오머라제(topoisomerase), 엔도스타틴, 에피도도필로톡신(epidodophylotoxin), 제니스테인(genistein), 호르몬 항암제, 친수성 담즙산(URSO), 면역조절제 또는 면역학적 제제, 인테그린 길항제, 인터페론 길항제 또는 제제, MMP 억제제, 기타 항신생물 제제, 모노클로날 항체, 니트로소우레아(nitrosourea), NSAID, 오르니틴 데카르복실라제 억제제, pBATT, 방사선/화학 증감제/보호제, 레티노이드, 내피세포의 증식 및 이동의 선택적 억제제, 셀레늄, 스트로멜리신(stromelysin) 억제제, 타산, 백신, 및 빈카(vinca) 알칼로이드.
- [0109] 일부 항증식제가 속하는 주요 범주에는 항대사제, 알킬화제, 항생제형 제제, 호르몬성 항암제, 면역학적 제제, 인터페론형 제제, 및 기타 항신생물 제제의 범주가 포함된다. 일부 항증식제는 다중 또는 알려지지 않은 메커니

즘을 통해 작동하므로 하나 이상의 범주로 분류될 수 있다.

[0110] 일부 구현예에서, 표적화 펩티드는 연결 분자를 사용하여 치료제에 커플링될 수 있다. 연결 분자는 링커일 수 있다. 대안적으로, 연결 분자는 비-펩티드 링커일 수 있다.

[0111] 실시예

[0112] 실시예 1

[0113] 본 발명자들은 EDB-FN에 대한 PET 프로브로서 ZD2-⁶⁴Cu-DOTA 접합체를 개발하였고 공격적인 PC3 및 느리게 성장하는 LNCaP 인간 전립선 종양 이종이식편을 보유하는 마우스에서 PET 영상화에 대한 그 효능을 평가하였다. 본 발명자들은 EDB-FN이 공격적인 PC3 종양에서 높게 발현되고 느리게 성장하는 비전이성 LNCaP 종양에서는 무시할 정도로 발현된다는 것을 보여주었다. EDB-FN 표적화 조영제 ZD2-Gd(HP-D03A)를 사용한 MRI는 LNCaP 종양보다 PC3 종양에서 더 강한 조영 증강을 나타내었다. ⁶⁴Cu의 사용은 12.74시간의 반감기 때문에 특히 매력적이며, 특히 방광에서 최소한의 배경 추론(background inference)으로 전립선에서의 암 탐지를 위한 연장된 영상화 시간 프레임을 제공한다. PET 프로브는 ZD2 펩티드를 거대고리(macrocyclic) 리간드인 DOTA에 접합시킨 후 ⁶⁴CuCl₂와 복합체를 형성하여 합성하였다. 암 탐지 및 종양 공격성의 특성화에 있어서의 PET 프로브의 능력을 PC3 및 LNCaP 종양을 보유하는 마우스에서 평가하였다.

[0114] 재료 및 방법

[0115] ZD2-PEG-DOTA 및 킬레이트의 합성

[0116] 화학 합성에 사용된 시약은 달리 명시되지 않는 한 Sigma-Aldrich(Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Fmoc-보호된 아미노산 및 2-클로로트리틸(chlorotrityl) 클로라이드 수지는 Chem-Impex International, Inc.(Wood Dale, IL)에서 입수하였다. 스페이서인 Fmoc-8-아미노-3,6-디옥사옥탄산(Fmoc-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂COOH)은 Chempep(Wellington, FL)에서 입수하였다. 1,4,7,10-테트라아자-사이클로도데칸-1,4,7-트리스-tert-부틸 아세테이트-10-아세트산(DOTA-트리스(t-Bu))은 TCI America(Portland, OR)에서 구입하였다.

[0117] ZD2 펩티드(서열: TVRTSAD), NH₂-(CH₂CH₂O)₂-CH₂COOH의 2개 반복체 및 DOTA를 포함하는 전구체 ZD2-DA-DOTA를 표준 Fmoc-펩티드 화학을 사용하여 고체상에서 수지에 상응하는 보호된 아미노산, Fmoc-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂COOH, 및 t-Bu-DOTA를 순차적으로 첨가하여 합성하였다. 이어서, 트리플루오로아세트산/트리이소프로필 실란/H₂O(96.5:1:2.5)를 사용하여 생성물을 수지로부터 절단하고 실온에서 3시간 동안 교반하고 에테르에서 침전시켜 조 생성물을 수득하였다. 최종 생성물을 반분취용(semipreparative) C18 컬럼(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)이 장착된 Agilent 1100 HPLC 시스템에서 분취용 HPLC를 사용하여 정제하였다. R 2,5-디하이드록시벤조산을 매트릭스로 사용하는 선형 모드에서 Voyager DE-STR 분광계(PerkinElmer, Waltham, MA)에서 MALDI-TOF 질량 분석법으로 ZD2-PEG-DOTA를 특성화하였다(M + 1: 1425.8, 관측치: 1425.7, 계산치).

[0118] 세포 배양 및 동물 모델

[0119] 동물 연구는 케이스 웨스턴 리저브 대학(CWRU)의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았으며, 모든 피험자는 사전 동의서에 서명하였다. PC3 및 LNCaP 세포를 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 입수하여, 37℃ 및 5% CO₂로 유지되는 습한 인큐베이터에서 10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 0.1 mg/mL 스트렙토마이신이 보충된 Roswell Park Memorial Institute 배지(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)에서 배양하였다. 수컷 흥선 누드 마우스(4-6주령)를 Case Comprehensive Cancer Center(Cleveland, OH, USA)에서 입수하여 CWRU 동물 핵심 시설에 수용하였다. 고농도 Matrigel(Corning, Tewksbury, MA)의 3백만 세포를 종양 접종에 사용하였다. LNCaP 세포를 마우스의 왼쪽 옆구리에 피하 접종하였다. 4주 후, PET 영상화를 위해 동일한 마우스의 오른쪽 옆구리에 PC3 세포를 접종하였다.

[0120] 방사성 표지

[0121] 방사성 동위원소 ⁶⁴Cu(II)를 University of Wisconsin-Madison(Madison, WI)에서 입수하였다. Cu(II)를 사용한 ZD2-PEG-DOTA의 킬레이트화를 방사성 표지와 동일한 조건에서 0.1 N HCl 수용액 중 차가운 CuCl₂로 먼저 테스트

하였다. PBS 완충액(pH 7.4) 및 CuCl_2 용액 중 동일 몰의(equal molar) ZD2-DA-DOTA를 혼합하고 45℃에서 30분 동안 교반하였다. ZD2-DA-(Cu-DOTA)의 형성을 MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 확인하였다($M + 1$: 1487.8, 관측치; 1486.04, 계산치). 방사성 표지를 위해, 10 mCi $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ 를 200 μL 의 0.1 N HCl에 용해시켰다. 20 마이크로리터의 $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ 용액(약 1 mCi)을 1.5 mL 미세원심분리 튜브에서 480 μL 의 ZD2-DA-DOTA (0.05 mg/mL, 과량, PBS)와 혼합하였다. 그런 다음, 간헐적으로 진탕시키면서 45℃에서 30분 동안 가열함으로써 용기를 유지하였다. 주입 전 NaOH 용액을 사용하여 용액의 최종 pH를 중성으로 조정하였다.

[0122] PET 영상화

[0123] 모든 생체 내 영상화 연구는 CWRU 동물 연구 위원회에서 승인한 프로토콜 및 지침에 따라 수행하였다. 마우스를 산소 중 2% 이소플루란으로 마취하고 꼬리 정맥을 통해 약 200 μCi [약 7.4 MBq] ZD2-DA- $^{64}\text{Cu}(\text{DOTA})$ 를 주사하였다. 마우스를 4시간 및 22시간 흡수 기간 PET 스캔(Inveon microPET, Siemens Medical Solutions USA Inc.) 후 10분 정적(static) PET 스캔을 받게 하였다. 이미지는 3D 히스토그램(histogramming) 및 1.0의 확대/축소 계수(zoom factor)가 있는 3D-OSEM을 사용하여 재구성하였다(2회 반복 후 18회 반복으로 MAP). CT 스캔(Siemens Medical Solutions USA Inc.)은 해부학적 동시 등록을 위해 PET 절차 후에 수행하였다. AMIDE 버전 1.0.557 및 AMIRA 소프트웨어를 사용하여 PET/CT 이미지를 분석하였다. PC3 및 LNCaP 종양에 대한 ROI를 그리 비특이적(근육) 결합에 대한 특이적 결합의 비율을 계산하였다.

[0124] 생체 분포

[0125] 주사 후 22시간에 마지막 micro-PET/CT 영상화 후, 3마리의 마우스를 안락사시키고, 장기와 혈액을 수집하고 무게를 측정하고, 감마 계수기에서 활성을 측정하였다. 조직 그램당 퍼센트 주입 용량은 주입 용량의 2%를 포함하는 표준을 사용하여 계산하였다.

[0126] 조직학적 분석

[0127] 이미지 획득 후, 마우스를 안락사시켰다. 종양을 수확하고, 최적의 절단 온도 배지에 포매하고, -80℃에서 동결하고, 5 μm 으로 동결절단하고, 차가운 아세톤으로 투과시켰다. 조직을 PBS 중의 소 혈청 알부민(1%)으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 항-EDB-FN BC1 항체(Abcam, Cambridge, MA)를 PC3 및 LNCaP 종양의 조직 절편과 함께 인큐베이션하였다. 광범위한 세척 후, 이차 항-마우스 Alexa Fluor 488 항체를 1시간 동안 인큐베이션하였다. 조직 절편을 4' 6-디아미디노-2-페닐-인돌(Thermo Fisher, Waltham, MA)을 사용하여 Prolong Gold 변색 방지 장막 배지로 대조염색하였다. 염색된 조직을 Olympus FV1000 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 이미지화하였다.

[0128] 결과

[0129] ZD2 ^{64}Cu -DOTA 접합체는 고체상 펩티드 화학을 사용하여 ZD2 펩티드를 거대고리 킬레이트 DOTA에 접합시킨 다음 $^{64}\text{CuCl}_2$ 와 복합체를 형성하여 합성하였다(도 1). 8-아미노-3,6-디옥사옥탄산의 2개 반복을 가지는 짧은 스페이서를 펩티드와 킬레이터 사이에 도입하였다. 표적화 리간드 ZD2-DA-DOTA를 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 정제하였고, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) 질량 분석법으로 특성화하였다($m/z = 1425.8$ ($M + 1$), 관측치; 1425.5, 계산치). 표적화 PET 프로브의 제조는 방사성 표지에 사용된 것과 동일한 조건인 45℃에서 30분 동안 인산염 완충 식염수(PBS) 완충액(pH 7.4) 및 무게 한 HCl(0.1 N) 중 차가운 CuCl_2 에서의 동일 몰의 ZD2-DA-DOTA의 복합체화에 의해 입증하였다. ZD2-DA-(Cu-DOTA)의 형성은 MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 확인하였다($m/z = 1487.8$ ($M + 1$), 관측치; 1486.04, 계산치).

[0130] 그런 다음 전립선암 PET 영상화에 대한 ZD2-DA-(^{64}Cu -DOTA)의 효능을 PC3 및 LNCaP 인간 전립선암 이종이식편을 모두 보유하는 수컷 누드 마우스에서 조사하였다. 이전에, 본 발명자들은 EDB-FN이 공격적인 PC3 종양에서 높게 발현되고 느리게 성장하는 비전이성 LNCaP 종양에서는 무시할 정도로 발현된다는 것을 보여주었다. 종양 모델을 사용하여 고위험 및 저위험 전립선 종양을 묘사하고 공격적인 전립선암을 탐지하고 계층화하는 프로브의 능력을 테스트하였다. 1.5 mL 미세원심분리 튜브에서 20 μL 의 $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ 용액(0.1 N HCl, 약 1 mCi 또는 37 MBq)을 480 μL 의 ZD2-DA-DOTA (0.05 mg/mL, 과량, PBS, pH = 7.4)와 혼합하여 방사성 표지를 수행하였고, 간헐적으로 진탕시키면서 45℃에서 30분 동안 유지하였다. 그런 다음, 반응 혼합물을 PBS로 1:2의 비율로 희석하고 정맥 주사를 위한 중성 pH를 보장하기 위해 pH 종이로 시험하였다. 방사성추적자(radiotracer)를 마우스당 7.4 MBq (200

μCi)의 용량으로 정맥내 주사하였다. 주사 후 4시간 및 22시간에 PC3 및 LNCaP 종양 이중이식편을 모두 보유하는 4마리의 마우스 그룹에서 마우스의 PET 영상화를 획득하였다.

[0131] 도 2는 ZD2-DA-(^{64}Cu -DOTA) 주사 후 4시간 및 22시간에 2마리의 종양-보유 마우스의 대표적인 3차원(3D) 체적 렌더링 및 축 PET/컴퓨터 단층촬영(CT) 이미지를 보여준다. 느리게 성장하는 LNCaP 종양보다 공격적인 PC3 종양에서 더 강한 신호를 볼 수 있었다. PC3 종양의 위치 및 크기가 PET 이미지에서 명확하게 묘사되었다. 추적자 흡수 또는 신호 강도를 4시간 및 22시간에 관심 영역(region of interest, ROI)에서 정량적으로 분석하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, ZD2-DA-(^{64}Cu -DOTA)는 LNCaP 종양보다 PC3 종양에서 더 높은 프로브 흡수를 초래하였다. 22시간에, PET는 덜 공격적인 LNCaP 종양($3213 \pm 1511 \text{ Bq/mL}$)에 비해 매우 공격적인 PC3 종양($7711 \pm 1994 \text{ Bq/mL}$)에서 PET 추적자의 2배 이상 더 높은 축적을 나타내었다($N = 4$, $P < 0.05$, 양측 스튜던트 t 검정). 상당한 방사성추적자 흡수를 나타낸 다른 기관은 간, 위, 및 신장이었고, 이는 간 및 신장 경로를 통한 방사성추적자의 제거를 나타낸다.

[0132] 주사 후 24시간에 마우스를 희생시킨 후 방사성추적자의 생체 분포를 측정하였다(도 4). 생체 분포 패턴은, 종양, 간, 및 신장에서의 강한 흡수와 함께, PET 영상화에서의 발견과 일치하였다. 뇌와 근육과 같은 다른 기관은 낮은 방사성추적자 흡수를 나타내었으며, 이는 방사성추적자의 바람직한 특성이다. PC3 및 LNCaP 종양에서의 방사성추적자 흡수의 비교 결과 PC3에서의 방사성추적자 축적($1.64 \text{ ID \%g}$)이 LNCaP 종양에서의 축적($0.86 \text{ ID \%g}$)보다 더 높았는데($N = 3$, $P = 0.32$, 양측 스튜던트 t 검정), 이는 프로브가 비전이성 LNCaP 종양보다 더 공격적인 PC3 종양에 우선적으로 축적된다는 것을 입증하였다.

[0133] PET 영상화 후 항-EDB-FN 모노클로날 항체 BC1을 사용하여 PC3 및 LNCaP 종양의 조직 절편의 면역형광 염색에 의해 전립선 종양에서의 EDB-FN의 발현을 결정하였다. Alexa Fluor 488-접합된 항-마우스 항체를 사용하여 BC1 항체 및 EDB-FN을 염색하였다. 도 5는 Olympus FV1000 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 획득한 종양 절편의 형광 이미지를 보여준다. PC3 종양 절편에서는 강한 형광 염색이 관찰된 반면, LNCaP 종양에서는 염색이 거의 관찰되지 않았다. 일관되게, 본 발명자들은 이전에 LNCaP 세포에서의 EDB mRNA 수준이 PC3 세포에서의 수준보다 낮다는 것을 보여주었다. 두 개의 다른 전립선 종양에서 EDB-FN 발현 수준은 PET 분자 영상으로 관찰된 것과 잘 상관되었다. 결과는 ZD2-DA-(^{64}Cu -DOTA)가 전립선암에서 EDB-FN 발현의 민감하고 정량적인 시각화에 효과적임을 시사한다.

[0134] 본 발명자들은 이 실시예에서, 전립선암의 검출 및 특성화를 위한 펩티드 프로브 ZD2-DA-(^{64}Cu -DOTA)를 사용한 ECM 종양단백질 EDB-FN의 PET 영상화의 가능성을 보여주었다. 이전에, 본 발명자들은 EDB-FN이 빠르게 성장하는 PC3 종양에서는 높게 발현되고 느리게 성장하는 LNCaP 종양에서는 낮게 발현된다는 것을 보여주었다. ZD2 펩티드-표적화된 MRI 조영제는 LNCaP 종양보다 PC3 종양에서 강력한 신호 향상을 생성할 수 있었다. 특히 주사 후 22시간에, ZD2-DA-(^{64}Cu -DOTA)를 사용한 EDB-FN의 PET 분자 영상화의 결과는 ZD2 펩티드-표적화된 MRI 조영제를 사용한 MR 분자 영상과 일치한다. 종양에서의 프로브 흡수를 비교해보면, 느리게 성장하는 LNCaP 종양에서보다 높은 EDB-FN 발현을 가지는 빠르게 성장하는 PC3 종양에서 더 강한 PET 신호가 검출되었다. 그러나, PET 이미지의 LNCaP 종양에서는 여전히 상당한 신호 강도가 관찰되었다. 이는 ^{64}Cu -DOTA 모노아미드의 상대적으로 낮은 킬레이트화 안정성 때문일 수 있다. 동물 모델에서 킬레이트로부터 방출된 유리 $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ 가 전립선 종양에 축적될 수 있는 것으로 나타났다. LNCaP 종양에서 상대적으로 높은 신호 강도는 프로브로부터 방출된 유리 $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ 의 축적에 기인할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 프로브의 ZD2 펩티드의 표적화 효과는 여전히 LNCaP 종양에서보다 PC3 종양에서 상당히 더 높은 신호 강도를 초래하였다. MR 분자 영상과 비교하여, PET 영상은 전립선암에서 EDB-FN 발현 수준의 민감하고 정량적인 시각화 및 측정을 생성하고, 이는 공격적인 전립선암의 더 정확한 위험 계층화를 제공한다.

[0135] 일반적으로, 상대적으로 반감기가 짧은 프로브를 사용한 PET 영상은 제한된 영상 창(imaging window)으로 인해 전립선의 원발성 종양을 영상화함에 있어서 방광으로부터 상당한 신호 추론을 겪는다. 상대적으로 긴 반감기의 ^{64}Cu 는 방광을 비우고 방광으로부터의 잠재적인 신호 간섭을 최소화하기에 충분한 시간을 허용하며, 이는 전립선의 원발성 종양을 조기에 발견하는 데 중요하다. 주사 후 22시간에 종양에서 상당한 신호를 여전히 볼 수 있었고, 방광에서는 거의 신호가 없었다. ZD2-DA-(^{64}Cu -DOTA)를 사용하여 간에서 상당한 신호 강도가 관찰되었으며, 이 또한 Cu-DOTA 모노아미드의 상대적으로 낮은 안정성에 기인할 수 있다. 킬레이트로부터 유리 $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ 의 방

출은 간에서 방사성 동위원소의 비특이적 축적을 유발할 수 있다.

- [0136] 전립선암을 포함한 암의 검출을 위해 EDB-FN을 표적으로 하는 항체 및 항체 단편이 개발되었다. 이 연구는 EDB-FN에 특이적인 작은 펩티드-표적화된 PET 프로브 역시 전립선암 영상화에 대한 잠재력을 가지고 있음을 보여주었다. 항체 기반 프로브와 비교하여, 작은 펩티드 PET 프로브는 비용 효율적인 생산, 확산 및 관류를 통한 더 나은 중앙 침투, 결합되지 않은 프로브의 순환으로부터의 빠른 배설을 포함하여 몇 가지 장점을 가지고 있다.
- [0137] 실시예 2
- [0138] 본 발명자들은 EDB-FN이 인간 췌장암(PaCa) 표본 및 마우스 PaCa 모델의 PaCa 조직에서 높게 발현되며, 이들 중 어느 시나리오에서도 정상 췌장 조직에서는 발현되지 않음을 보여주었다. PaCa 종양 ECM에 EDB-FN의 존재는 민감한 분자 영상화 및 PaCa 진단을 위한 표적화 추적자의 신속하고 특이적 결합을 허용할 것이다. EDB 단편의 펩티드 서열은 모든 포유류 종에서 보존된다.
- [0139] 본 발명자들은 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 펩티드 ZD2(Thr-Val-Arg-Thr-Ser-Ala-Asp)를 식별하였다. ZD2 펩티드는 고등급 전립선 종양에 대하여 강한 결합 친화력을, 저등급 종양에 대하여 약한 결합 친화력을, 그리고 정상 조직에서는 비결합을 나타내었다. 이 실시예에서, 본 발명자들은 ZD2 펩티드가 췌장암의 정확한 검출 및 위험 계층화를 위하여 EDB-FN의 민감하고 정량적인 분자 영상화를 위한 PET 프로브를 개발하는 데 사용될 수 있음을 보여준다. 본 발명자들은 링커 6-아미노헥산산(6-aminohexanoic acid)을 사용하여 NOTA를 ZD2 펩티드에 접합함으로써 ZD2 펩티드 표적화된 Ga(III) PET 프로브를 설계하고 합성하였다. 본 발명자들은 공격적이고 빠르게 성장하는 PC3와 느리게 성장하는 LNCaP 전립선암 이종이식편을 보유하는 수컷 누드 마우스에서 PET 영상화를 위한 표적화된 Ga(III) 추적자의 효능을 평가하였다.
- [0140] 실험
- [0141] 재료
- [0142] 펩티드 합성을 위한 보호된 아미노산은 Novabiochem(Burlington, MA, USA)에서 구입하였다. N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA)은 MP Biomedical LLC(Santa Ana, CA, USA)에서 구입하였다. O-벤조트리아졸-N,N',N'-테트라메틸-우로늄-헥사플루오로포스페이트(HBTU)는 Anaspec Inc(Fremont, CA, USA)에서 구입하였다. Fmoc-6-아미노헥산산은 Chem-IMPEX International(WD, IL, USA)에서 구입하였다. t-부틸 브로모아세테이트는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 다른 모든 화학 시약은 Thermo Fisher에서 구입하였다. ¹H-NMR 스펙트럼은 TMS를 내부 표준으로 사용하여 500 MHz Varian Inova NMR 분광계(공급업체 및 주소)에서 획득하였다. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) 질량 스펙트럼은 2,5-디하이드록시벤조산을 매트릭스로 사용하여 선형 모드에서 Voyager DE-STR 분광계(PerSeptive BioSystems)에서 얻었다. ZORBAX 300 SB-C18 컬럼 반분취용 HPLC가 있는 Agilent 1100을 다음 조건에서 리간드의 정제에 사용하였다: 용리액 A, H₂O/TFA (0.1%); B, MeCN/TFA (0.1%); 15분 동안 0% B, 30분 동안 0-50% B, 5분 동안 50% B, 2분 동안 50%-100% B, 5분 동안 100% B, 유속 2 mL/min, 210 nm에서 UV-검출. 0.1 M HCl로 희석된 ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga 발생기(ITG isotope technologies Garching GmbH, Germany)에서 Ga를 얻었다.
- [0143] 합성
- [0144] 1,4-비스(tert-부톡시카르보닐메틸)-1,4,7-트리아자노란의 합성
- [0145] 1,4,7-트리아자사이클로노란(1.5 g, 11.62 mmol)을 빙욕(ice bath)에서 무수 CHCl₃(15 mL)에 용해시키고, CHCl₃(30 mL) 중 tert부틸 브로모아세테이트(4.98 g, 25.56 mmol)를 1.5시간에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하고 용매를 제거하였다. 잔류물을 탈이온수(15 mL)로 처리하고 1 M HCl로 pH 3으로 조정하고 에테르(50 mL × 2)로 추출하였다. 유기상을 제거하고 수상을 1 M NaOH로 pH 8-9로 조정하고 다시 CH₂Cl₂ (25 mL × 3)로 추출하였다. 마지막으로, 유기상을 증발시켜 생성물을 수득하였다. 수율: 36%, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.48 (s, 18H), 2.79 (s, 4H), 3.03~3.07(m, 4H), 3.24 (s, 4H), 3.37 (s, 4H), 9.46 (s, H).
- [0146] NOTA-비스(t-Bu 에스테르)의 합성
- [0147] 1,4-비스(tert-부톡시카르보닐메틸)-1,4,7-트리아자노란(0.3 g, 0.84 mmol) 및 브로모아세트산(0.415 g, 3

mmol)을 메탄올(3 mL)에 용해시키고, 물(3 mL) 중 K_2CO_3 (0.53 g, 3.84 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고 농축하였다. 그런 다음 잔류물을 물에 용해시키고 1 M HCl로 pH 4로 조정하였다. 회전 증발에 의해 물을 제거하고, 생성물을 플래쉬 크로마토그래피(메탄올:에틸 아세테이트 6.5:3.5)로 정제하였다. 수율: 64%, 1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 1.48 (s, 18H), 2.84 (s, 4H), 3.08(m, 4H), 3.35 (s, 4H), 3.47 (s, 4H).

[0148] ZD2-HA-NOTA의 합성

[0149] ZD2-HA를 고체상 화학을 사용하여 합성하였다. 10 mL 건조 DMF 중 6-아미노헥산산(1.5 eq.), HBTU(1.5 eq.), DIPEA(1.5 eq.)의 혼합물을 펩티드 합성(0.5 mmol 펩티드)이 끝날 때 수지에 첨가하고 닐하이드린(ninhydrin)이 색을 바꾸지 않을 때까지(카이저 테스트) 진탕하였다. 그런 다음 DMF(10 mL $\times$ 3) 및 DCM(10 mL $\times$ 3)을 사용하여 수지를 세척하였다. TFA:H₂O:TIBS(96.5:2.5:1)의 각테일을 사용하여 3시간 동안 ZD2-HA를 수지로부터 연속적으로 절단하였다. ZD2-HA를 차가운 에틸 에테르에 침전시키고, 원심분리하고 동결건조시켰다. 생성물을 MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 특성화하였다: [M]에 대해 계산된 m/z, $C_{47}H_{83}N_{15}O_{18}$, 1146.25; 실측치 ($M+H^+$), 1147.56.

[0150] 차가운 Ga-ZD2-HA-NOTA의 합성

[0151] 10 mL의 NaAc-Ac 완충액(0.1 M, pH 5.5)에 용해된 ZD2-HA-NOTA(0.11 g, 0.1 mmol)의 용액에 $Ga(NO_3)_3$ (0.076 g, 0.3 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 밤새 교반하고, 최종적으로 생성물을 분취용 HPLC를 사용하여 정제하고 동결건조하여 솜털 같은 백색 분말을 수득하였다. 수율: 43%. 생성물을 MALDI-TOF 질량 분석법으로 특성화하였다. [M]에 대해 계산된 m/z, $C_{47}H_{81}GaN_{15}O_{18}$, 1212.51; 실측치 ($M+H^+$), 1213.54.

[0152] 결과 및 토론

[0153] 화학 및 방사선 화학

[0154] ZD2-HA-NOTA의 합성을 도 6에 도시하였다. 출발 물질로서 TACN으로부터 2회 치환에 의해 NOTA-비스(t-Bu 에스테르)를 제조하였다. 그런 다음 고체상 펩티드를 사용하여 NOTA-비스(t-Bu 에스테르)와 ZD2-HA를 접합하여 전구체 ZD2-HA-NOTA를 성공적으로 합성하고 RP-HPLC로 정제하였다. 정제된 ZD2-HA-NOTA를 MALDI-TOF(m/z = 1147.56) 및 HPLC(순도: 약 98%)로 특성화하였다. ^{nat}Ga -ZD2-HA-NOTA를 또한 제조하였고 MALDI-TOF(m/z = 1213.54) 및 RP-HPLC(순도: 약 96%)로 특성화하였다.

[0155] 차가운 ZD2-(Ga-NOTA)를 도 6에 도시된 절차에 따라 먼저 합성하였다. 거대고리 리간드 NOTA는 비교적 온화한 조건에서 ^{68}Ga (III)와 안정한 킬레이트를 쉽게 형성할 수 있기 때문에 사용하였으며, 이는 펩티드의 결합 특성을 보존하는 데 중요하다. ZD2 펩티드는 표준 고체상 펩티드 합성을 사용하여 합성하였고 그런 다음 6-아미노헥산산(HA)을 스페이서로서 펩티드의 N-말단에 접합하였다. NOTA-비스(t-Bu 에스테르)를 최종적으로 수지의 아미노기에 접합하였고 TFA:H₂O:TIBS(96.5:2.5:1)의 각테일로 수지를 처리하여 표적화 리간드 ZD2-NOTA를 수득하였다. 최종 생성물을 분취용 HPLC로 정제하였다. 정제된 ZD2-NOTA를 MALDI-TOF로 특성화하였고(m/z = 1147.56 [M+1], 관찰치; 1146.25, 계산치), 약 98%의 순도(HPLC)를 나타내었다. 도 7A,B 참조. 그런 다음 실온에서 아세테이트 완충액(0.1 M, pH 5.5)에서 리간드를 과량의 $GaCl_3$ 와 반응시켜 ZD2-(^{nat}Ga -NOTA)를 제조하였다. ZD2-(^{nat}Ga -NOTA)를 분취용 HPLC를 사용하여 정제하였고 MALDI-TOF로 특성화하였으며(m/z = 1213.54 [M+1], 관찰치; 1212.51, 계산치), 약 96% 순도(HPLC)를 나타내었다. 도 43C,D 참조. 펩티드와 ZD2-(^{nat}Ga -NOTA)는 수용성이 높는데, 이는 비특이적 조직 결합을 최소화하는 유리한 특징이다.

[0156] 에이브릴 박사(Dr. Avril)와 공동으로 클리블랜드 대학 병원(UH)의 cGMP 방사성 의약품 연구소에서 90°C에서 15 분 동안 아세트산 나트륨 완충 용액(0.1 M, pH 5.5)에서 ZD2-NOTA를 $GaCl_3$ 와 반응시켜 방사성추적자 ZD2-(^{68}Ga -NOTA)를 방사성 합성하였다. 반응 용액의 pH를 최종적으로 NaOH로 조절하였다. 방사선화학적 수율은 방사선검출기 및 Zorbax Eclipse C18 컬럼(물 + 0.1% TFA/아세트오닐트릴 + 0.1% TFA의 구배, UV 220 nm)이 장착된 HPLC에 의해 측정시 약 77% 이었다. 방사성 표지된 추적자를 영상화하기 전에 C-18 컬럼이 있는 역상 HPLC를 사용하여 정제하였다. ZD2-(^{68}Ga -NOTA)의 HPLC 크로마토그램을 도 8에 나타내었고, 생성물 파라미터를 표 3에 요약하였다. 주요 피크 주변의 작은 피크가 방사성 표지된 펩티드 생성물에서 공통적으로 관찰되며, 이는 ^{68}Ga (III)와 펩티드

의 복합체화 때문일 수 있다. 방사성 표지 수율은 임상 추적자의 수율과 비슷하다. 생성물의 순도 역시 임상 등급 제품과 동등하다.

[0157] 표 3 - ZD2-(⁶⁸Ga-NOTA)의 제품 사양

파라미터	ZD2-(⁶⁸ Ga-NOTA)
전구체 순도, %	98
RCY (n.d.c), %	52
RCY (d.c.), %	77
제품 방사능 (~14 mL 최종 부피), mCi	16.64
제품 방사성 순도, %	96.7
제품 UV-순도, %	100
pH	7.5
즉각적 무균(Immediate sterility)	통과(Passed)

[0158]

[0159] 인간 췌장암 세포 및 종양 이종이식편에서 EDB-FN의 발현

[0160] 웨스턴 블롯팅을 통해 BXP3, Capan-1, Panc 10.05 및 Panc-1 세포를 포함하는 4가지 다른 인간 췌장암 세포주에서 EDB-FN의 발현을 먼저 입증하였다. 이러한 인간 PaCa 세포주는 전임상 연구에서 마우스 PaCa 암 모델을 개발하는 데 통상적으로 사용된다. 시험된 모든 암 세포주는 EDB-FN의 높은 발현을 가진다. 도 9A 참조. ATCC의 지침에 따라 암컷 누드 마우스의 옆구리에 암세포를 피하 이식하여 종양 모델을 개발하였다. BC-1 항-EDB-FN 모노클로날 항체로 면역형광 염색을 사용하여 인간 PaCa 세포의 종양 이종이식편에서 EDB-FN 발현이 입증되었다. 도 9B에 나타난 바와 같이, 4개의 PaCa 서브타입 모두에서 EDB-FN의 실질적인 발현이 관찰되었고, 보고된 결과와 일치하게, 정상 췌장 및 근육에서는 발현이 관찰되지 않았다. PaCa 종양의 ECM에서 EDB-FN의 높은 발현이 관찰되었다. 결과는 EDB-FN이 PaCa 세포 및 종양에 의해 고도로 발현되고 PaCa의 분자 영상화 및 검출을 위한 유망한 종양단백질 표적임을 나타낸다.

[0161] PaCa 종양에서 EDB-FN에 결합하는 ZD2 펩티드

[0162] ZD2 펩티드(Thr-Val-Arg-The-Ser-Ala-Asp) 표적화된 형광 추적자 ZD2-Cy5.5를 보고된 방법에 따라 합성하여 PaCa 종양에서 EDB-FN에 대한 펩티드의 결합을 평가하였다. ZD2-Cy5.5를 상기 종양 이종이식편의 종양 슬라이드와 함께 인큐베이션하여 췌장암에서 EDB-FN에 대한 ZD2 펩티드의 결합 특이성을 테스트하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, ZD2-Cy5.5의 강한 결합(적색)이 도 9B의 면역형광 염색과 유사하게 시험된 모든 4개의 종양 조직에서 관찰되었다. 정상 췌장 및 근육에서는 ZD2-Cy5.5의 어떠한 유의한 결합도 관찰되지 않았다. PaCa에서 EDB-FN에 대한 ZD2-Cy5.5의 강한 결합은 BC-1 항-EDB-FN 모노클로날 항체에 의해 차단되었다(BC-1/ZD2). BC-1 항체와 이어서 ZD2-Cy5.5와 함께 사전 인큐베이션된 PaCa 표본에 대해서는 적색 형광 염색이 거의 관찰되지 않았다(BC-1/ZD2). 결과는 ZD2-Cy5.5 및 BC-1 양자 모두가 종양 조직에서 동일한 EDB-FN 단백질 표적에 특이적으로 결합함을 시사한다. ZD2 펩티드는 PaCa 종양에서 EDB-FN의 특이적 결합을 위한 유망한 표적화제이다.

[0163] 인간 PaCa 종양에서 EDB-FN의 발현

[0164] 인간 췌장암 표본을 ZD2-Cy5.5로 염색함으로써 인간 췌장암에서 EDB-FN 발현을 입증하였다. 도 11에 나타난 바와 같이, 인간 PaCa 표본에서는 강한 적색 형광이 관찰되었고, 정상 췌장에서는 거의 형광이 관찰되지 않은 반면, 전암성 췌장 상피내 종양(intraepithelial neoplasia)에서는 약간의 형광 강도가 관찰되었다. 형광 강도는 PaCa에서 높은 EDB-FN 발현, 전암성 조직에서 낮은 발현, 그리고 정상 췌장에서 발현 없음을 시사한다.

[0165] ZD2-(⁶⁸Ga-NOTA)를 사용한 PaCa의 PET 영상화

[0166] EDB-FN의 민감한 분자 영상화 및 PaCa의 검출을 위한 ZD2-(⁶⁸Ga-NOTA)의 효과를 microPET/CT 상에서 Capan1 및 BXP3 인간 PaCa 이종이식편을 보유하는 마우스 모델에서 평가하였다. 종양 모델을 C.1에서와 같이 암컷 누드 마우스에서 유사하게 개발하였다. 상기 방법을 사용하여 합성한 추적자를 마우스당 300 μCi의 용량으로 정맥 주사하였다. 도 12는 추적자 주사 후 1시간 및 2시간에서의 종양을 보여주는 대표적인 2D 관상 PET/CT 이미지를 보여준다. 두 시점 모두에서 종양과 방광에서 추적자의 강한 흡수가 관찰되었다. 주사한 지 1시간 후에 정상 조

직 및 기관, 특히 뇌, 간 및 폐에서는 거의 흡수가 관찰되지 않았다. 주사한 지 2시간 후에 백그라운드 노이즈가 약간 증가하였는데 이는 방사능 감소와 스캔 시간 연장으로 인한 것일 수 있다. 두 종양에서의 신호 강도는 주사한 지 1시간 및 2시간 후 근육에서의 신호 강도의 약 5배였다. 3차원 PET 영상에서도 종양에서 강한 흡수를 나타내었고, 신장과 방광을 제외한 주변 정상 조직과 장기에서는 약간의 비특이적인 흡수를 나타내었다. 도 13 참조. 신장과 방광에서의 높은 신호 강도는 추적자가 주로 신장 여과를 통해 배설됨을 나타낸다. 이러한 결과는 EDB-FN의 분자 영상화 및 PaCa의 조기 검출을 위한 ZD2-(⁶⁸Ga-NOTA)의 효과 및 높은 특이성을 입증하고, PaCa에서 EDB-FN의 특이적 발현을 추가적으로 검증하는 것이다. ZD2 펩티드 표적화된 ⁶⁸Ga 킬레이트는 임상 실습에서 체장암의 민감한 조기 발견에 유망하다.

[0167] 실시예 3

[0168] ZD2-HBED-CC의 합성

[0169] ZD2 펩티드를 표준 고체상 화학을 사용하여 합성하였다. 그런 다음 HBED-CC-tris(tBu) 에스테르를 수지 상의 ZD2 펩티드의 N-말단에 접합시켰다. 그 후, TFA/물/TIBS(96.5/2.5/1)의 각테일을 사용하여 펩티드를 수지로부터 절단하였다. 생성물을 에틸 에테르에서 침전시키고, 분취용 HPLC로 정제하고, 동결건조하고, MALDI-TOF 질량 분석법으로 특성화하였다. (M+1) m/z, 1264.02 관측치; 1264.32 C55H82N12O22에 대한 계산치.

[0170] ZD2-AH-HBED-CC의 합성

[0171] ZD2 펩티드를 표준 고체상 화학을 사용하여 합성하였다. 그런 다음 Fmoc-6-아미노헥산산을 수지 상의 ZD2 펩티드의 N-말단에 접합시켰다. 그 후, HBED-CC-tris(tBu) 에스테르를 펩티드와 반응시킨 다음, TFA/물/TIBS(96.5/2.5/1)의 각테일을 사용하여 수지로부터 절단하였다. 생성물 ZD2-AH-HBED-CC를 에틸 에테르에서 침전시키고, 분취용 HPLC로 정제하고, 동결건조하고, MALDI-TOF 질량 분석법으로 특성화하였다. (M+1) m/z, 1377.1 관측치; 1377.48 C61H93N13O23에 대한 계산치.

[0172] ZD2-(Ga-HBED-CC)의 합성

[0173] 링커가 없는 리간드 ZD2-HBED-CC, 및 질산갈륨을 PBS에서 90℃에서 2분 동안 혼합하였다. 그런 다음 생성물 ZD2-(Ga-HBED-CC)를 분취용 HPLC로 정제하고 MALDI-TOF 질량 분석법으로 특성화하였다. (M+1) m/z, 1329.8 관측치; 1329.47 C55H79GaN12O22에 대한 계산치.

[0174] ZD2-AH-(Ga-HBED-CC)의 합성

[0175] 링커가 있는 리간드 ZD2-HBED-CC, 및 질산갈륨을 PBS에서 90℃에서 2분 동안 혼합하였다. 그런 다음 생성물 ZD2-AH-(Ga-HBED-CC)를 분취용 HPLC로 정제하고 MALDI-TOF 질량 분석법으로 특성화하였다. (M+1) m/z, 1442.9 관측치; 1442.55 C61H90GaN13O23에 대한 계산치.

[0176] 종양이 있는 마우스의 PET 영상

[0177] 모든 생체 내 영상 연구는 CWRU 동물 연구 위원회에서 승인한 프로토콜 및 지침에 따라 수행하였다. BxPC3 또는 Capan-1 인간 체장 이종이식편을 보유하는 마우스를 산소 중 2% 이소플루란으로 마취시켰다. 추적자 ZD2-(⁶⁸Ga-HBED-CC) 또는 ZD2-AH-(⁶⁸Ga-HBED-CC)를 꼬리 정맥을 통해 100-300 μCi [5.3-13.0 MBq]의 용량으로 주사하였다. 그런 다음 마우스를 30분 또는 60분의 흡수 기간 후에 10분 또는 20분 정적 PET 스캔(Inveon microPET, Siemens Medical Solutions USA Inc.)을 받게 하였다. 해부학적 동시 등록을 위해 모든 PET 절차 후에 CT 스캔을 수행하였다. Inveon Research Workplace 버전 3.0과 Horos 소프트웨어를 사용하여 PET/CT 이미지를 분석하였다. 종양, 주요 장기 및 근육에 대한 관심 영역(ROI)을 그려, 특이적 및 비특이적 조직 흡수의 비율을 계산하였다. 두 번의 반복으로 3D-OSEM을 사용하여 1.0의 확대/축소 비율로 3D 재구성으로 이미지를 처리한 다음, 18회 반복으로 MAP을 수행하였다.

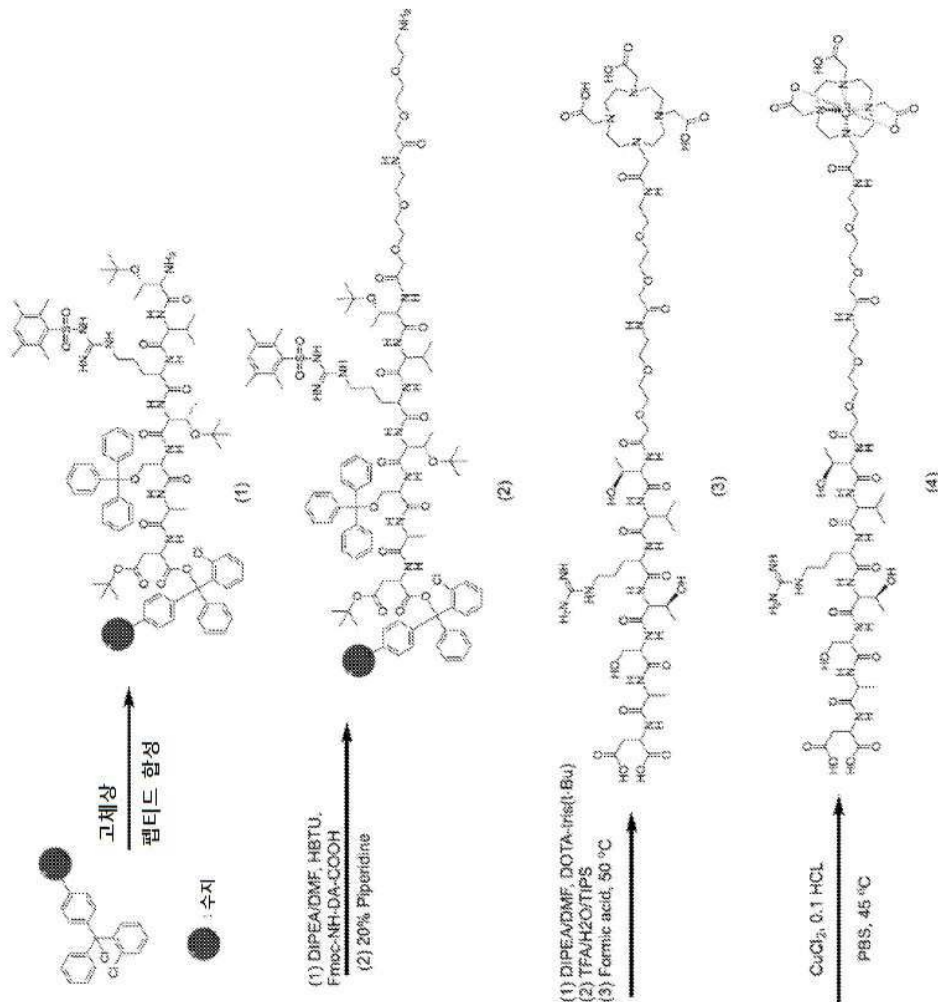
[0178] EDB-FN의 민감한 분자 영상화 및 체장암 검출을 위한 ZD2-(⁶⁸Ga-HBED-CC)의 효과를 microPET/CT 상에서 Capan-1 및 BxPC3 인간 체장암 이종이식편을 보유하는 마우스 모델에서 평가하였다. 도면은 주사 후 30분 또는 60분에 종양 보유 마우스의 대표적인 2D 및 3D 전신 PET/CT 이미지를 보여준다. 전신 PET 이미지에서 볼 수 있듯이 주사 후 30분 또는 60분에 종양, 신장 및 방광에서 추적자의 강한 흡수가 관찰되었다. 두 종양 모두에서 추적자의 흡수는 뇌, 심장, 간 및 근육을 포함한 정상 기관 및 조직보다 상당히 높았다. 신장과 방광에서의 높은 신호 강도는 추적자가 주로 신장 여과를 통해 배설됨을 나타낸다.

[0179] 정량 분석에 따르면 BxPC3 및 Capan-1 종양 모두에서의 흡수가 주사 후 30분 또는 60분에 뇌, 심장, 간 및 근육을 포함한 정상 조직에서보다 유의적으로 높았다. ZD2-AH-(^{68}Ga -HBED-CC)의 경우, 종양 흡수는 주사 후 60분에 BxPC3 및 Capan-1 종양에 대하여 각각 근육 흡수의 대략 18.3배 및 13배($p < 0.01$)였다. 링커가 없는 ZD2-(^{68}Ga -HBED-CC)의 경우, 종양 흡수는 주사 후 60분에 BxPC3 및 Capan-1 종양에 대하여 각각 근육 흡수의 대략 10.2배 및 7.3배($p < 0.01$)였다. 종양 흡수는 두 종양 모델 모두에서 정상 조직보다 유의하게 높게 유지되었다($p < 0.05$). 이러한 결과는 ZD2-(^{68}Ga -HBED-CC) 및 ZD2-AH-(^{68}Ga -HBED-CC) 양자 모두가 간을 포함한 정상 조직에서는 최소한의 흡수로 체장암 종양에 고도로 특이적임을 입증하는 것이다.

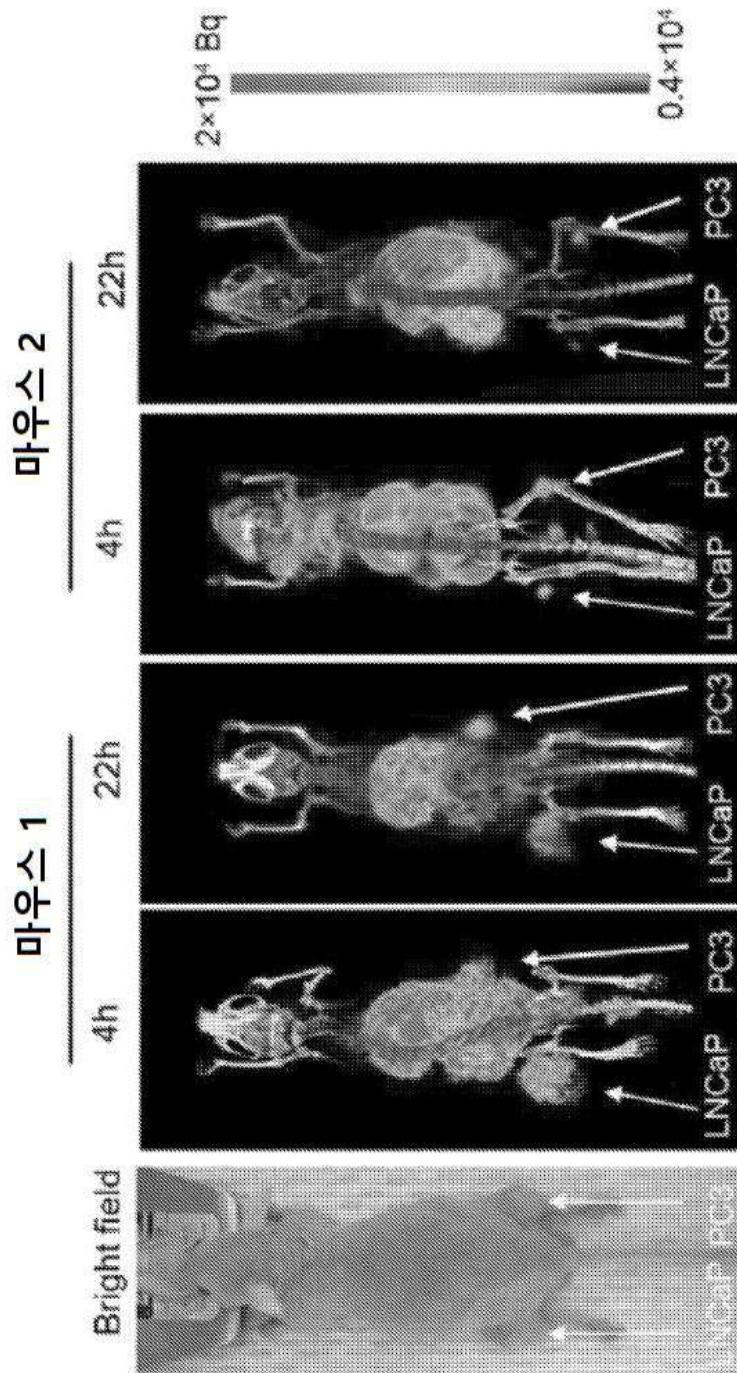
[0180] 본 발명의 상기 설명으로부터, 당업자는 개선, 변경 및 수정을 이해할 것이다. 당해 기술 범위내 이러한 개선, 변경 및 수정은 첨부된 청구범위에 의해 포함되도록 의도된다. 본 출원에 인용된 모든 참고문헌, 간행물, 및 특허는 그 전체가 참고로 여기에 포함된다.

도면

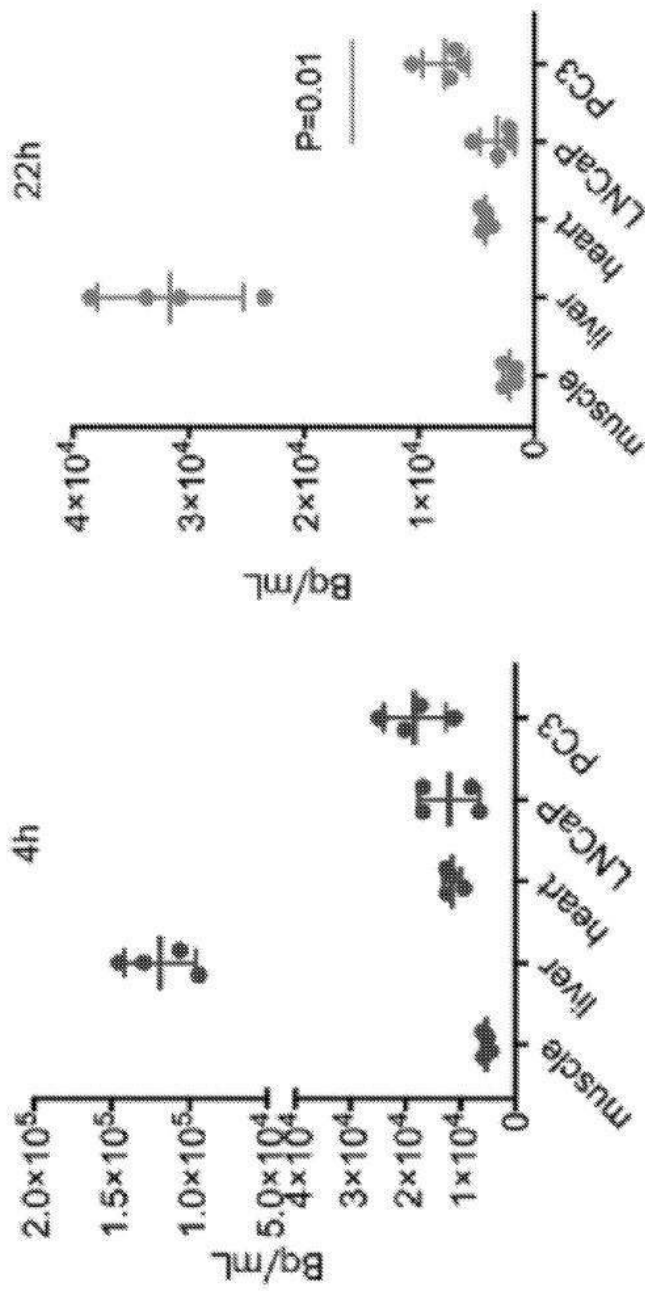
도면1



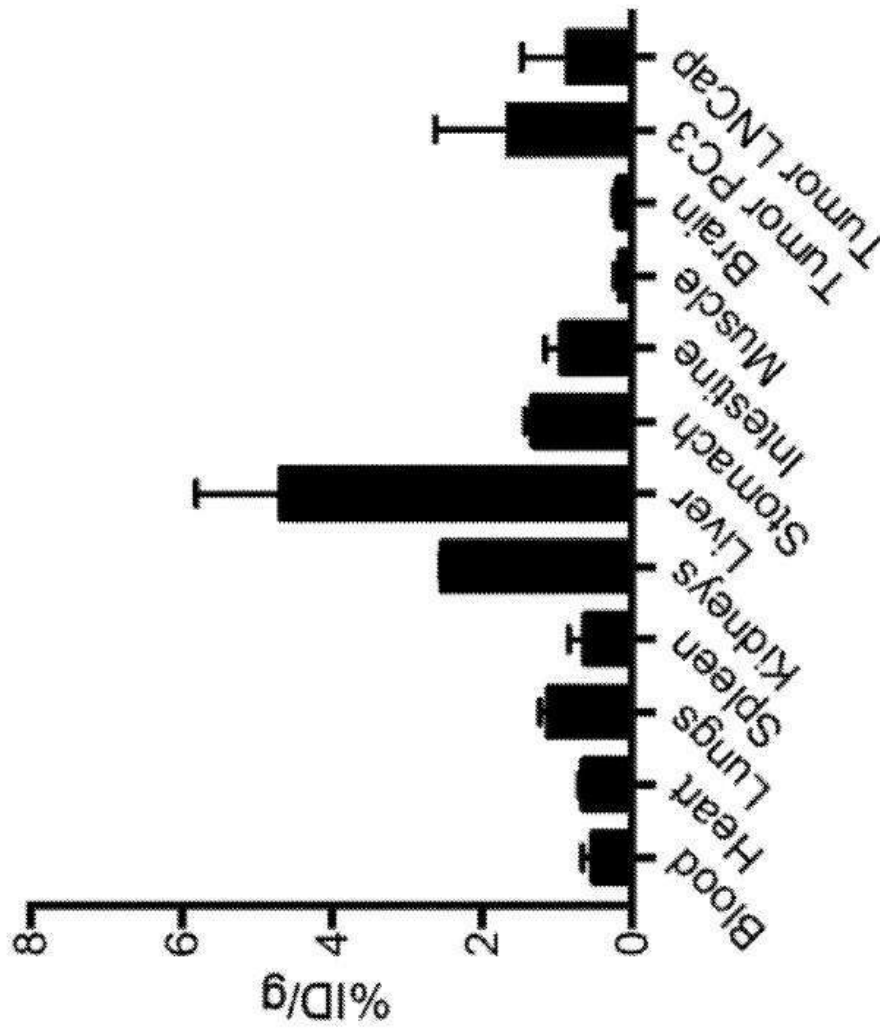
도면2



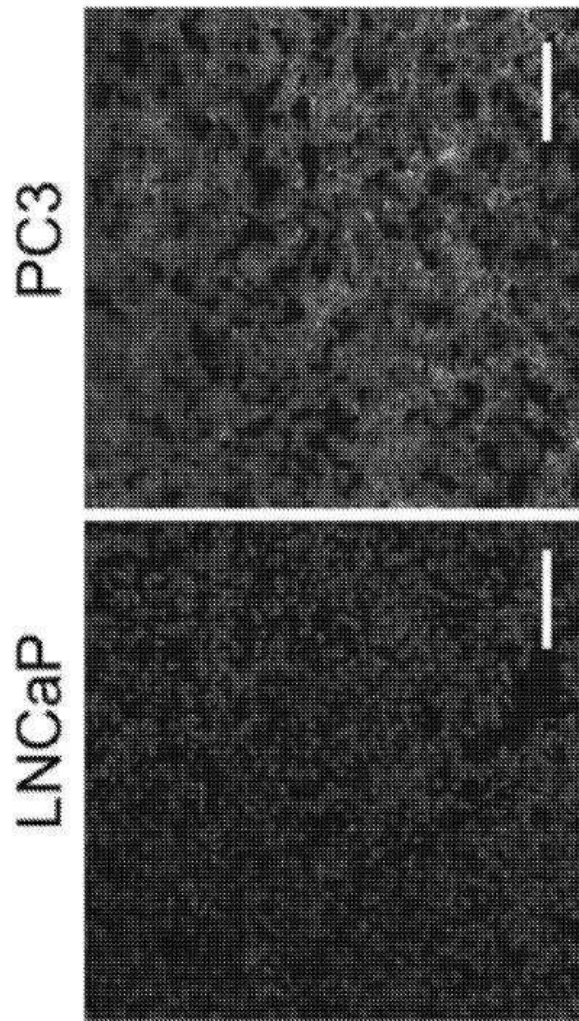
도면3



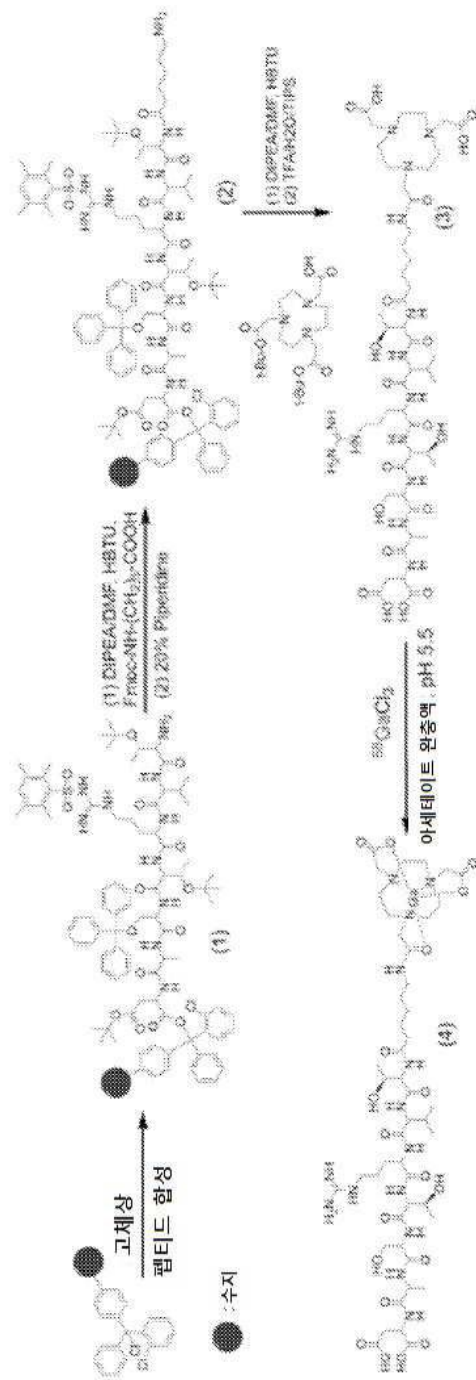
도면4



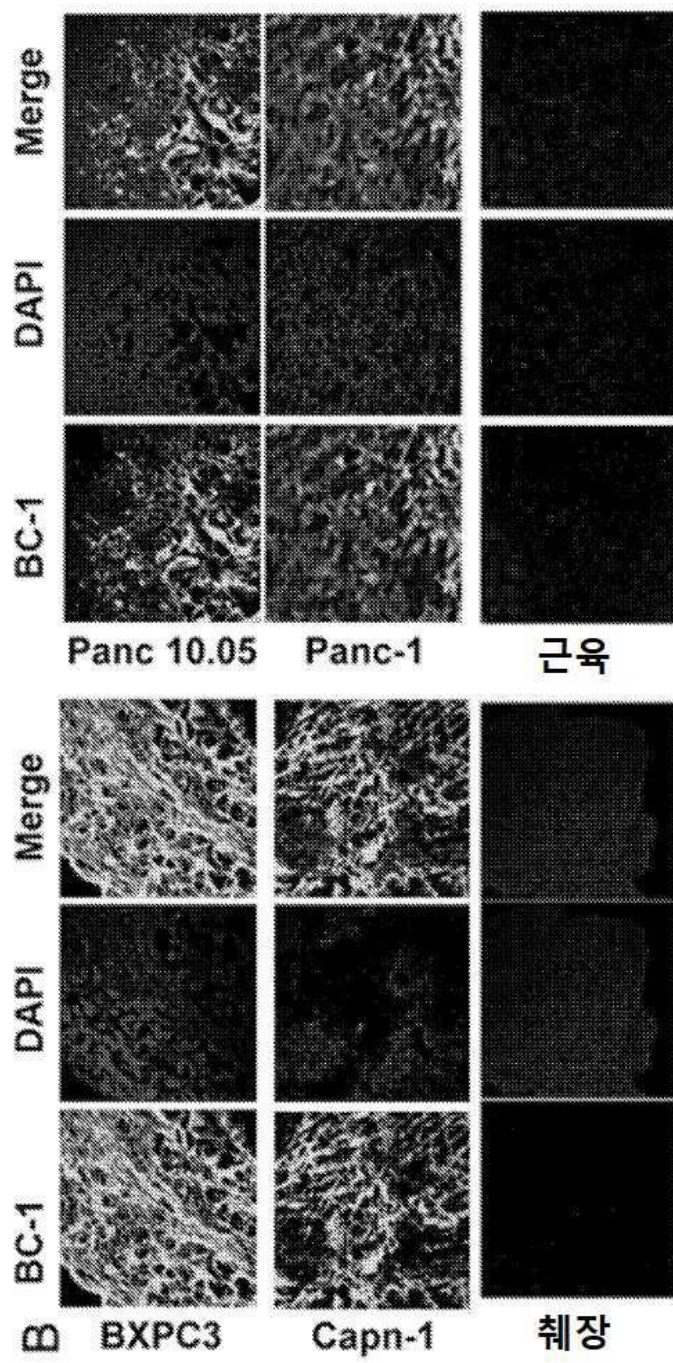
도면5



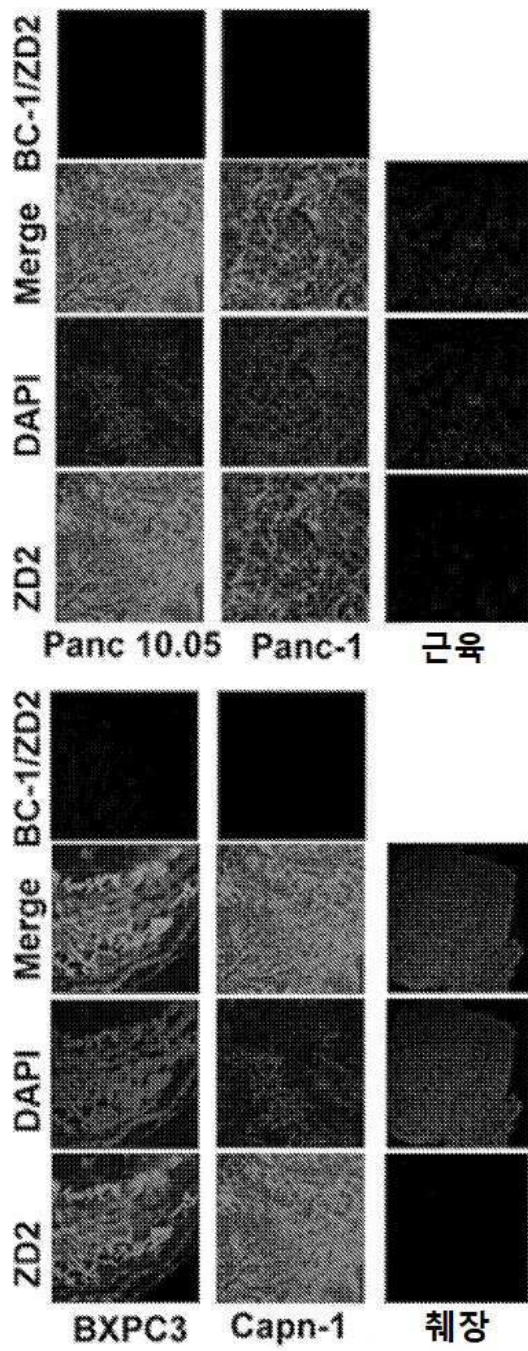
도면6



도면7

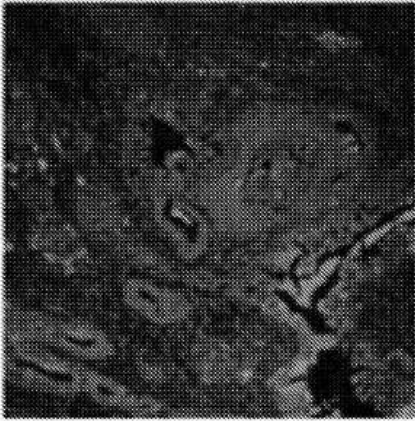


도면8

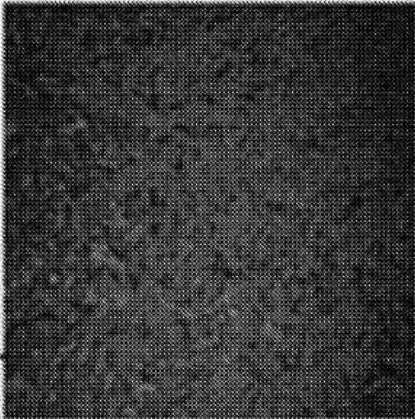


도면9

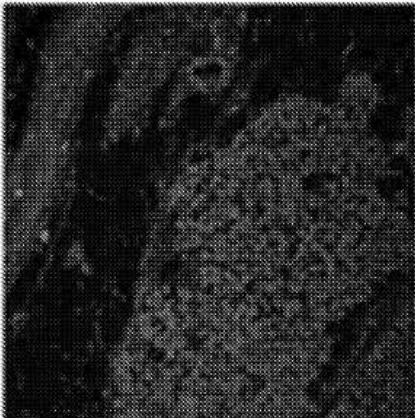
암
상
상
상



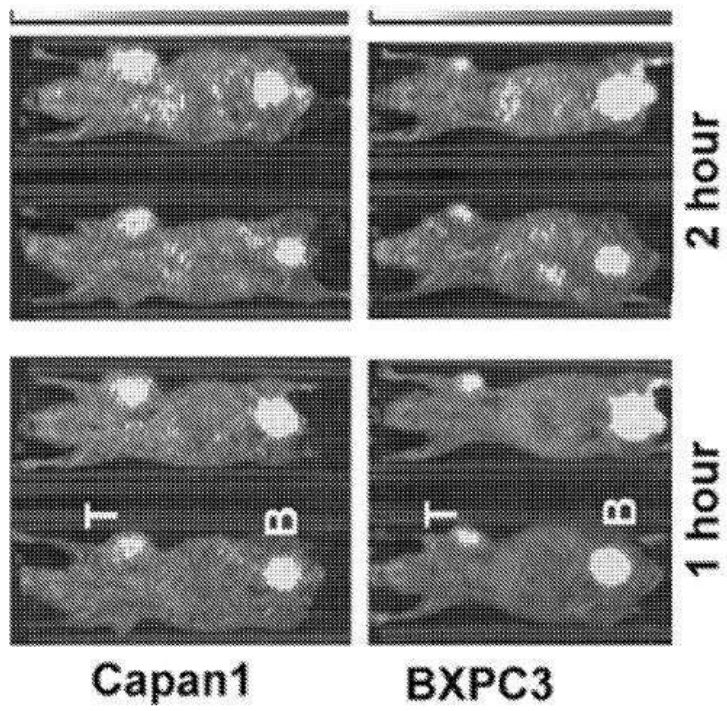
암
상
상
상
상
상
상
상



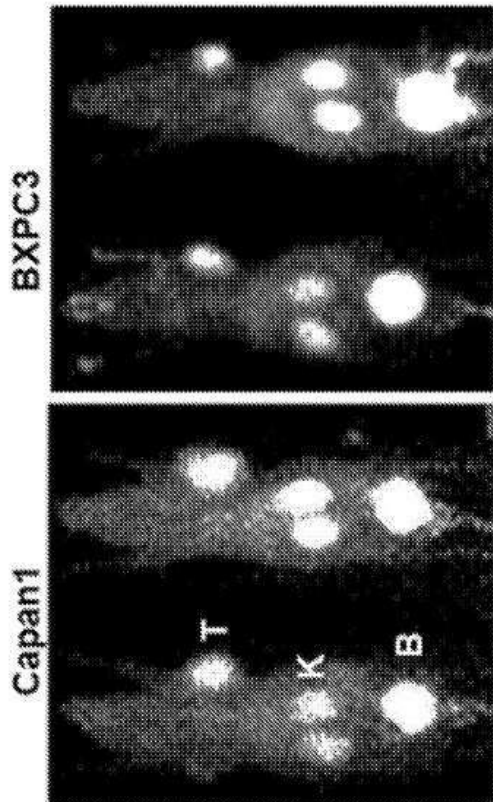
암
상
상
상
상



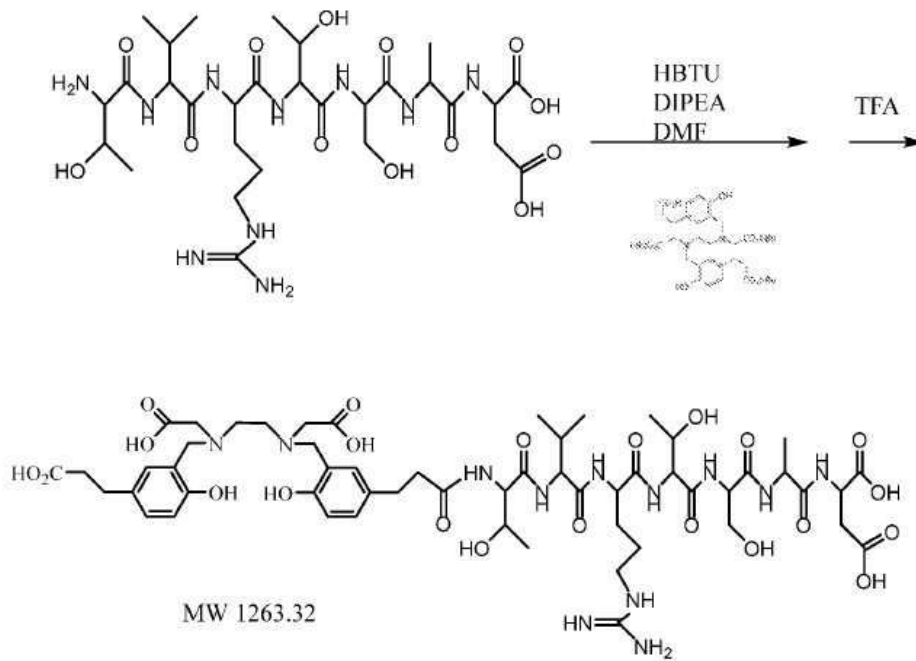
도면10



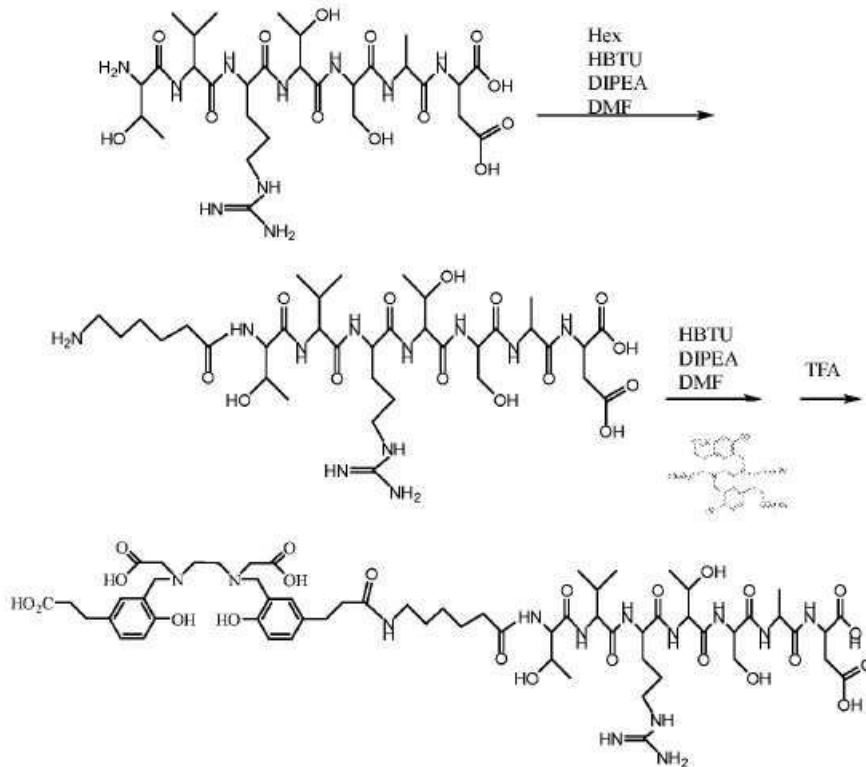
도면11



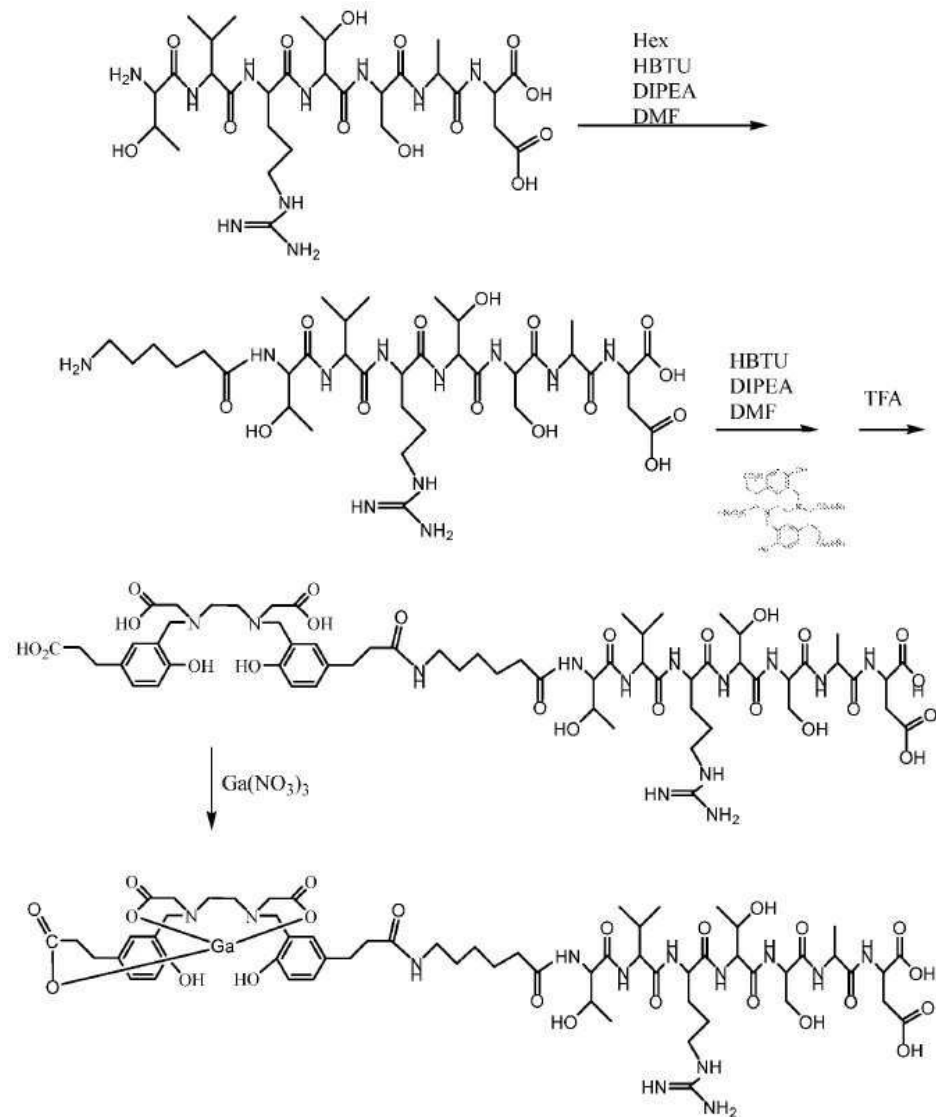
도면12



도면13



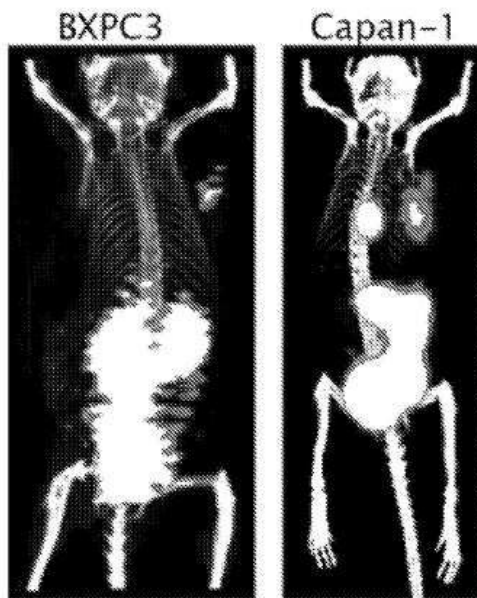
도면15



도면16



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY

<120> PEPTIDE PET/SPECT PROBES SPECIFIC TO ONCOPROTEINS IN TUMOR
EXTRACELLULAR MATRIX

<130> CWR-028324WO ORD

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Thr Val Arg Thr Ser Ala Asp

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Asn Trp Gly Asp Arg Ile Leu

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Asn Trp Gly Lys Pro Ile Lys

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Ser Gly Val Lys Ser Ala Phe

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Gly Val Lys Ser Tyr Asn Glu

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

Ile Gly Lys Thr Asn Thr Leu

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

Ile Gly Asn Ser Asn Thr Leu

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

Ile Gly Asn Thr Ile Pro Val

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

Leu Tyr Ala Asn Ser Pro Phe

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

Cys Thr Val Arg Thr Ser Ala Asp Cys

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

Cys Asn Trp Gly Asp Arg Ile Leu Cys

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

Cys Asn Trp Gly Lys Pro Ile Lys Cys

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

Cys Ser Gly Val Lys Ser Ala Phe Cys

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

Cys Gly Val Lys Ser Tyr Asn Glu Cys

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

Cys Ile Gly Lys Thr Asn Thr Leu Cys

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

Cys Ile Gly Asn Ser Asn Thr Leu Cys

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

Cys Ile Gly Asn Thr Ile Pro Val Cys

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

Cys Leu Tyr Ala Asn Ser Pro Phe Cys

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

Trp Asn Tyr Pro Phe Arg Leu

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

Ser Asn Thr Ser Tyr Val Asn

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

Ser Phe Ser Tyr Thr Ser Gly

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

Trp Ser Pro Ala Pro Met Ser

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

Thr Arg Glu His Pro Ala Gln

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

Ala Arg Ile Ile Asp Asn Ala

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

Cys Trp Asn Tyr Pro Phe Arg Leu Cys

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

Cys Ser Asn Thr Ser Tyr Val Asn Cys

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

Cys Ser Phe Ser Tyr Thr Ser Gly Cys

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

Cys Trp Ser Pro Ala Pro Met Ser Cys

1 5

<210> 29

<211>

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

Cys Thr Arg Glu His Pro Ala Gln Cys

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 30

Cys Ala Arg Ile Ile Asp Asn Ala Cys

1 5