(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5078212号
(P5078212)

(45)発行日　平成24年11月21日(2012.11.21)　(24)登録日　平成24年9月7日(2012.9.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06	ZNA
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	

請求項の数 24　(全 118 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-587817(P2001-587817)
(86)(22)出願日　平成13年6月4日(2001.6.4)
(65)公表番号　特表2004-500854(P2004-500854A)
(43)公表日　平成16年1月15日(2004.1.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/018053
(87)国際公開番号　WO2001/091805
(87)国際公開日　平成13年12月6日(2001.12.6)
審査請求日　平成20年5月15日(2008.5.15)
(31)優先権主張番号　09/585,364
(32)優先日　平成12年6月2日(2000.6.2)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　511044009
ブラッコ・スイス・ソシエテ・アノニム
スイス国　６９２８　マンノ，ヴィア・カントナーレ　２
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(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　100091638
弁理士　江尻　ひろ子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】内皮細胞を標的とするための化合物、それを含む組成物およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式：Ａ－Ｌ－Ｂ（Ｉ）
［式中、Ａは、ＴＫＰＰＲの単量体もしくは多量体、または、ＧＴＫＰＰＲであるＴＫＰＰＲ類似体の単量体もしくは多量体であり、
Ｌはリンカーであり、および、
Ｂは合成または通常天然に存在する、両親媒性かつ生体適合性の化合物であり、当該化合物は、脂肪酸；リソリピッド；リン脂質；ホスファチジルイノシトール；スフィンゴ脂質；糖脂質；グルコリピド；スルファチド；スフィンゴ糖脂質；ホスファチジン酸；ポリマー含有脂質；スルホン化モノ、ジ、オリゴまたはポリサッカリド含有脂質；コレステロール、硫酸コレステロール；コレステロールヘミスクシネート；トコフェロールヘミスクシネート；エーテルおよびエステル結合脂肪酸を含む脂質；重合化脂質；ジアセチルホスフェート；ジセチルホスフェート；ステアリルアミン；カルジオリピン；炭素鎖長が６～８の短鎖脂肪酸を有するリン脂質；非対称のアシル鎖を含む合成リン脂質；セラミド；非イオン性リポソーム；糖酸のステロールエステル；糖および脂肪酸のエステル；サポニン；グリセロールジラウレート；グリセロールトリラウレート；グリセロールジパルミテート；グリセロール；グリセロールエステル；長鎖アルコール；６－（５－コレステン－３β－イルオキシ）－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド；ジガラクトシルジグリセリド；６－（５－コレステン－３β－イルオキシ）ヘキシル－６－アミノ－６－デオキシ－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド；６－（５－コレステン－３β－イルオキシ）ヘキ

シル－６－アミノ－６－デオキシ－１－チオ－β－Ｄ－マンノピラノシド；１２－（（（７'－ジエチルアミノクマリン－３－イル）カルボニル）メチルアミノ）オクタデカン酸；Ｎ－［１２－（（（７'－ジエチルアミノクマリン－３－イル）カルボニル）メチルアミノ）オクタデカノイル］－２－アミノパルミチン酸；Ｎ－スクシニルジオレイルホスファチジルエタノールアミン；１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロール；１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－３－スクシニルグリセロール；１，３－ジパルミトイル－２－スクシニルグリセロール；１－ヘキサデシル－２－パルミトイルグリセロホスホエタノールアミン；パルミトイルホモシステイン、およびそれらの組み合わせ、からなる群より選択される化合物である］
で示される化合物を含む、ＮＰ－１を発現する細胞を標的とするのに使用するための組成物。

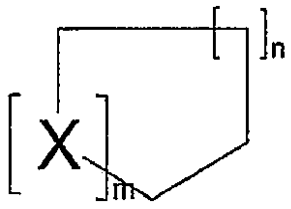
【請求項２】
Ａがｔｋｐｐｒまたはｔｋｐｐｒ類似体の四量体である、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】
Ｂがさらに治療物質を含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項４】
Ｌは、単結合であるか、または、炭素数１～６０００のアルキル鎖から誘導され、ここで当該炭素数１～６０００のアルキル鎖は、直鎖または分岐鎖であり、飽和または不飽和であり、１以上の基で分断または置換されてもよく（ここで当該１以上の基としては、Ｏ、Ｓ、ＮＲ、ＯＲ、ＳＲ、ＣＯＲ、ＣＯＯＨ、ＣＯＯＲ、ＣＯＮＨＲ、ＣＳＮＨＲ、Ｃ＝Ｏ、Ｓ＝Ｏ、Ｓ（＝Ｏ）$_2$、Ｐ＝Ｏ（Ｏ）$_2$ＯＲ、Ｐ（Ｏ）$_2$（ＯＲ）$_2$、ハロゲン、またはフェニル基があり、ここで当該フェニル基は、１以上の－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、－Ｎ－Ｃ＝Ｓ、－Ｎ－Ｃ＝Ｏ、ハロゲンで置換されてもよく、ここで、
Ｒは、Ｈ、または、炭素数１～４の直鎖または分岐鎖アルキル基であり、１以上の－ＯＨで置換されてもよく）、
当該炭素数１～６０００のアルキル鎖は、１以上の炭素数３～９の飽和または不飽和の環式基で分断または置換されてもよく（１以上のＯ、ＳまたはＮＲで分断されてもよく）、１以上の基で分断または置換されてもよい（ここで当該１以上の基としては、－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、またはフェニル基があり、当該フェニル基は、１以上の－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、－Ｎ－Ｃ＝Ｓ、－Ｎ－Ｃ＝Ｏ、ハロゲンで置換されてもよい）、請求項１に記載の組成物。

【請求項５】
Ｌ中に存在する環式基が飽和または不飽和であり、以下の一般式（ＩＩＩ）：

【化１】



に相当し、式中、
ｎは０～４の範囲に及ぶことができ、
ｍは０～２範囲に及ぶことができ、
ＸはＮＨ、ＮＲ、Ｏ、ＳまたはＳＲであることができる、
請求項４に記載の組成物。

【請求項６】
リンカーＬが、１～１００個の天然または合成アミノ酸を含むオリゴペプチドである、請求項４に記載の組成物。

【請求項７】

前記アミノ酸が、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、γ－アミノ－酪酸およびトランス－４－アミノメチル－シクロヘキサンカルボン酸からなる群より選択される、請求項６に記載の組成物。

【請求項８】

Ｌが、二官能価のＰＥＧ（ポリエチレングリコール）誘導体から誘導される、請求項４に記載の組成物。

【請求項９】

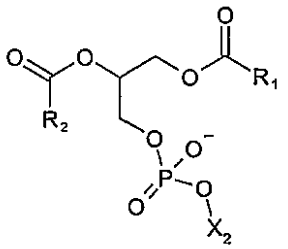
Ｌが、グルタル酸、コハク酸、マロン酸、シュウ酸、および２個のCH_2CO基で誘導体化したＰＥＧからなる群より選択される、請求項４に記載の組成物。

【請求項１０】

ＮＰ－１を発現する細胞を標的とするのに用いられる請求項１に記載の化合物であって、ここで、

基質がB_{1a}であって、式（ＩＩ）：

【化２】



M (II)

で示されるリン脂質成分を含み、式中、

Ｍはアルカリ金属またはアルカリ土類金属カチオンであり、

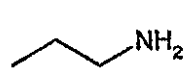
R_1およびR_2は、それぞれ独立して、炭素数１２～２０の直線状の長鎖に相当し、飽和または不飽和であり、Ｃ＝ＯまたはＯで分断されてもよく、；および、

X_2は、

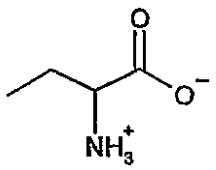
【化３】



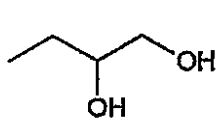
ホスファチジン酸



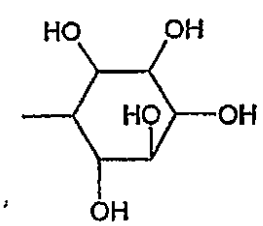
エタノールアミン



セリン



グリセロール



イノシトール

からなる群より選択される、前記化合物。

【請求項１１】

R_1およびR_2が、それぞれ独立して、炭素数１２～２０の飽和の直線状の長鎖である、請求項１０に記載の化合物。

【請求項１２】

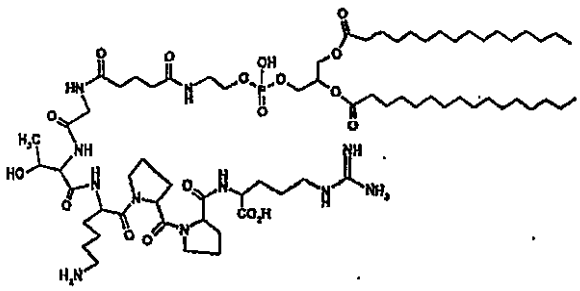
式（ＩＩ）で示されるリン脂質が、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノレイルホスファチジルエタノールアミン，これらいずれかのフッ素化類似体、および、これらいずれかの混合物からなる群より選択されるリン脂質を含む、請求項１１に記載の化合物。

【請求項１３】

式（ＩＩ）で示されるリン脂質が、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項１２に記載の化合物。

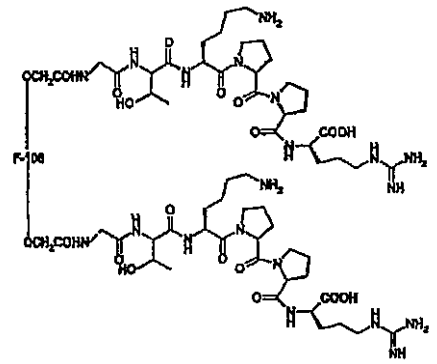
【請求項１４】

【化４】



および、

【化５】



からなる群より選択される化合物を含む、ＮＰ－１を発現する細胞を標的とするのに使用するための組成物。

【請求項１５】

ガス充填マイクロバブルの懸濁液を含む超音波造影剤であって、前記マイクロバブルが、請求項１、または１０－１４のいずれかに記載の化合物を含む、前記超音波造影剤。

【請求項１６】

ガス充填マイクロバブルの懸濁液を含む超音波造影剤であって、前記マイクロバブルが請求項１０に記載の化合物を含み、前記ガスがフッ素化ガスを含む、前記超音波造影剤。

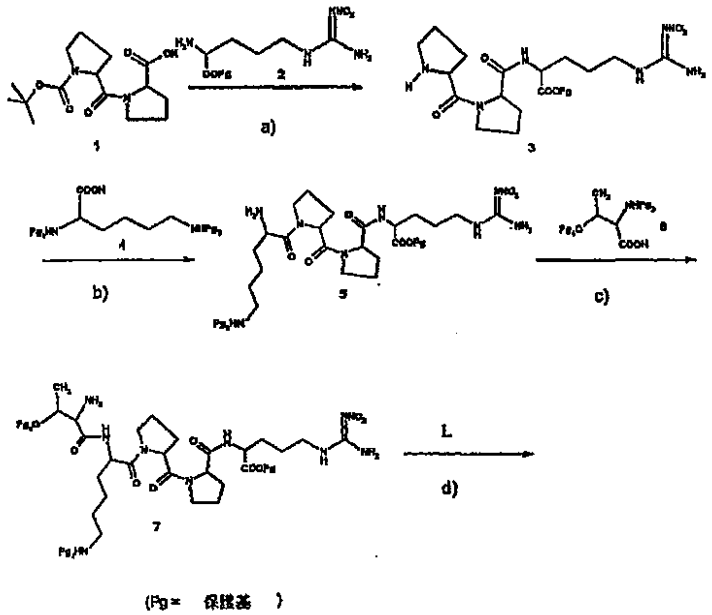
【請求項１７】

ガス充填マイクロバブルの懸濁液を含む超音波造影剤であって、前記マイクロバブルが請求項１０に記載の化合物を含み、式中、ＡはＴＫＰＰＲ四量体であり、前記ガスが、SF_6、または、C_3F_8、C_4F_8、C_4F_{10}、C_5F_{12}、C_6F_{12}、C_7F_{14}およびC_8F_{18}からなる群より選択されるペルフルオロカーボンを含む、前記超音波造影剤。

【請求項１８】

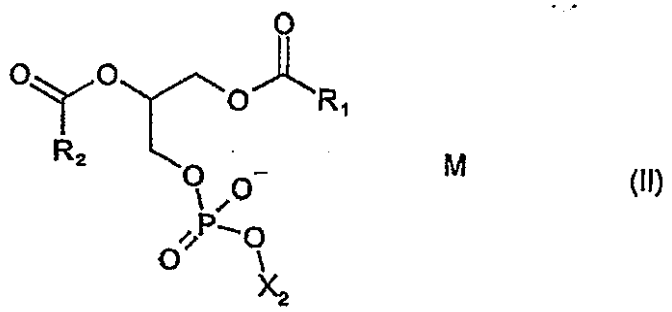
ａ）ＴＫＰＰＲの単量体または多量体またはＧＴＫＰＰＲであるＴＫＰＰＲ類似体の単量体または多量体を得ること、

ｂ）ＴＫＰＰＲの単量体または多量体と、リンカーとを複合させることにより、式：Ａ－Ｌ（ＩＩｂ）で示される化合物を得ること、および、
ｃ）式（ＩＩｂ）で示される化合物と基質Ｂとの間に共有結合または非共有結合を形成すること、または、基質Ｂとリンカーとの間に共有結合を形成することにより、複合体Ｂ－Ｌを形成し、さらに、複合体Ｂ－Ｌと、ＴＫＰＰＲまたはＴＫＰＰＲ類似体の単量体または多量体とを複合させること、
を含む、請求項１に記載の化合物の調製方法。
【請求項１９】
式（ＩＩｂ）で示される化合物が、以下のスキームに従って調製され、
【化６】



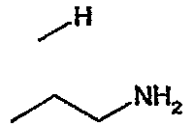
(Pg＝ 保護基)

ここで、工程ａ）、ｂ）およびｃ）は全て塩基条件下で行われる縮合反応であり、工程ｄ）は、塩基条件下でのリンカーとの縮合である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
ガス充填マイクロバブルの懸濁液を含む超音波造影剤を含む超音波画像化用組成物であって、前記マイクロバブルは、請求項１に記載の化合物を含み、
ここで
ＢはＢ$_{1a}$であって、式（ＩＩ）：
【化７】



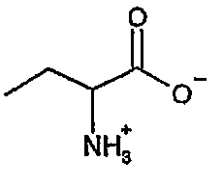
で示されるリン脂質成分を含み、式中、
Ｍは、アルカリ金属またはアルカリ土類金属カチオンであり；
Ｒ$_1$およびＲ$_2$は、それぞれ独立して、炭素数１２～２０の直線状の長鎖に相当し（ここで当該炭素数１２～２０の直鎖は、飽和または不飽和であり、Ｃ＝ＯまたはＯで分断されてもよい）、
Ｘ$_2$は、

【化８】

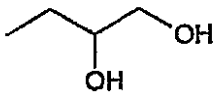


ホスファチジン酸

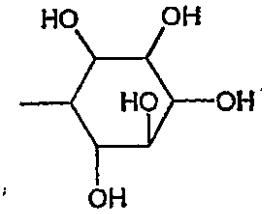
エタノールアミン



セリン



グリセロール



イノシトール

からなる群より選択される、前記組成物。

【請求項２１】

検出可能な成分および請求項１に記載の化合物を含む、ヒトまたは動物の腫瘍のステージングのための組成物。

【請求項２２】

脈管形成に関する障害に罹った患者へ、インビボで、治療的活性物質を治療的に運搬するための、請求項３に記載の組成物。

【請求項２３】

脈管形成に関する障害の作用を示す個体の治療のための、請求項３に記載の組成物。

【請求項２４】

放射線を検出するカメラを用いてヒトまたは動物の全部または一部を画像化するための、ヒトまたは動物の画像化のための請求項９に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本発明は、２０００年６月２日付で出願された米国特許出願第０９／５８５，３６４号の利益を主張し、さらに、当該出願の一部継続出願であり、その全内容は参照することによって本願に含まれる。

【０００２】

発明の分野

本発明は、内皮細胞、または内皮細胞に共通するマーカーを発現する細胞（特定の腫瘍細胞を含む）を標的にするのに有用な化合物、それを含む組成物、その使用、および、それをスクリーニングする方法に関する。より特定には、本発明は、内皮細胞、または内皮細胞に共通のマーカーを発現する細胞を選択的に標的とすることができる新規の化合物およびそれを含む組成物を提供し、当該細胞は、ヒトおよび動物に非経口または局所的に投与した後、上記組成物が近づきやすい細胞であり、また、本発明の化合物および組成物は、インビボおよびインビトロで、どのような画像化様式でも検出できる検出可能な成分を含み得る。また本発明の組成物は、治療効果または放射線治療効果を提供できる成分を含み、当該成分として例えば、金属イオンまたは生理活性剤と錯体を形成する金属キレート化

用の基がある。本発明の化合物は、薬物運搬および遺伝子治療用途に用いることができる。また、本発明は、本発明の化合物および組成物、同様にそれらを含むキットの使用方法を提供する。

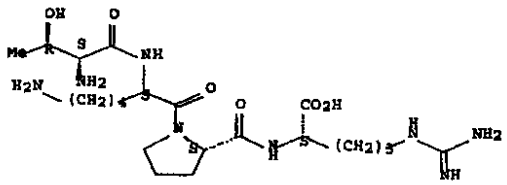
【０００３】

発明の背景

天然に存在するテトラペプチドであるＴＫＰＲ（タフトシン，（配列番号１）ＣＡＳ　ＲＮ＝９０６３－５７－４）、Ｌ－スレオニル－Ｌ－リシル－Ｌ－プロリル－Ｌ－アルギニンは、好中球およびマクロファージの外表面に発現した受容体に結合することによって食細胞活動を刺激することがわかっている。

【０００４】

【化９】



【０００５】

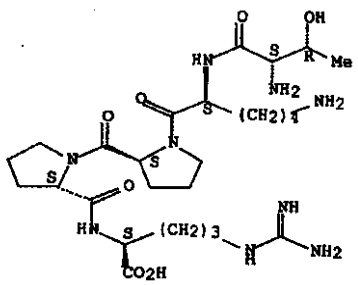
食細胞活動は、細菌感染に対する宿主の主要な防御線である。それゆえに、食細胞活動の刺激物質として、タフトシンは、感染性炎症の部位を画像化するのに適切なペプチドとして期待されている。しかしながら、放射性核種金属で標識したタフトシンは非標的組織中に望ましくなく蓄積してしまうということが研究により示されている。

【０００６】

放射標識したタフトシン受容体アンタゴニストの使用に基づいた感染または炎症を画像化するための代替方法が、Pollak A.等の米国特許第５，４８０，９７０号、５，６５９，０４１号、５，６６２，８８５号、５，５６９，７４５号および５，６７９，６４２号に開示されている。これらの特許は、感染または炎症を画像化するために、タフトシン受容体アンタゴニストのＴｃ－９９ｍキレート複合体（文献として、Nishioka K. et aL, Curr. Med. Chem., 1996, 153－66を参照）、すなわち、ＴＫＰＰＲ（配列番号２）、（ＣＡＳ　ＲＮ＝４１９６１－５８－４）、またＩＵＰＡＣ命名法に従うと、Ｌ－アルギニン、Ｌ－スレオニル－Ｌ－リシル－Ｌ－プロリル－Ｌ－プロリルの使用を開示しており、以下の構造を有する。

【０００７】

【化１０】



【０００８】

これらの特許は、キレート化剤として、ジアミドチオール（N_2S_2）およびトリアミドチオール（N_3S）を開示する。当該キレート化剤は、タフトシンアンタゴニストに連結基を介して付着し得る。

【０００９】

内皮細胞は、正常および／または病気の細胞および／または組織の集合体と定義することができ、この集合体は、扁平な透明の内皮細胞の単層からなり、この単層の端と端とが連結するか、または、オーバーラップして結合して、膜を形成する。内皮細胞は、漿膜の遊

離表面上で、心臓、血管、およびリンパ管の管壁膜として、脳および脊髄表面上で、および、眼の前房中で、見出される。内皮は、胎芽の中胚葉に由来し、心臓の組織、例えば、梗塞した心臓の組織、心臓血管系、動脈、静脈、および毛細血管のような末梢血管系（これらの位置は心臓の周辺であることを特記する）、および、アテローム斑周辺の領域に関して見出される。加えて、内皮細胞に共通するマーカーを発現する細胞、特に循環系に接触する内皮細胞に共通するマーカーを発現する細胞も、本発明における重要な標的であり得る。例えば、黒色腫細胞は、A. J. Maniotis等（Am. J. Path., 155, 3, 739－752, 1999 and in Science, 285, 5433, 1475, 1999）が説明したように、血管の流路を形成し、内皮細胞マーカーを発現することが観察されており、本発明が提供する診断および／または治療の重要な標的であり得る。

【００１０】

心臓血管疾患を診断するための心エコー検査の使用は、一般的に、心臓の壁運動における異常の検出および定量を含む間接的な方法に限定されてきた。また心エコー検査は、心臓の質量、塞栓性、血栓性、増殖性の病変（vegetative lesion）（心内膜炎）、粘液腫、および他の病変を同定するための心臓病理の検出方法に関して用いられてきた。

【００１１】

従って、血管系および血管関連器官の医学的に有用な画像を提供できる改良された画像化技術、加えて改良された造影剤が必要である。本明細書で用いられる画像化技術とは、X線による画像化、磁気共鳴による画像化、光による画像化、シンチグラフィーおよび超音波検査法を含む。

【００１２】

特に超音波検査法（超音波）に関して、超音波により得られたイメージの質が近年顕著に改良されている。特に造影剤に関して努力した新しい画像化法、または造影剤に関連した新しい画像化法が開発されており、例えば、ネイティブティッシュハーモニック画像化法(Native Tissue Harmonic Imaging)、セカンドハーモニック画像化法(2nd Harmonic Imaging)、パルスインバージョン画像化法(Pulse Inversion Imaging)、音響的な誘導放出（Acoustically Stimulated Emission: ＡＳＥ）等がある。それでも、特に血管の血液供給で十分に潅流した組織に関するイメージに対してさらなる改良が必要である。

【００１３】

従って、血管系および血管関連器官の医学的に有用な画像を提供できる改良された超音波技術、加えて改良された造影剤が必要である。

また本発明の化合物は、脈管形成分野でも有用であり得る。当業者であれば、腫瘍が直径数ミリ以上成長し、転移するのに血管の供給が必要でありこと、さらに、血液が供給されるプロセスは一般的に脈管形成と呼ばれることは明白である。このプロセスにおいて、血管の供給は、組織の成長、成熟および維持に関する既存の血管系から発達する。脈管形成は、血管内腔の内皮細胞に関する複雑な多段階プロセスである。内皮細胞は、管、ブランチおよび毛細管ネットワークを形成するために増殖および移動するのに必要な全ての情報を含む。

【００１４】

脈管形成性の内皮細胞の標的化は、これらの細胞中で、その上に、またはその近辺で、アップレギュレートされる分子に選択的に結合するリガンドを付着させることによって達成できる。このような分子としては、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）受容体、例えばＦｌｔ－１（またはＶＥＧＦＲ－１ともいう）、ＫＤＲ／Ｆｌｋ－１（またはＶＥＧＦＲ－２ともいう）およびＮＰ－１（またはＮＲＰ－１またはニューロピリン－1ともいう）等、$\alpha_v\beta_3$および$\alpha_v\beta_5$インテグリン、マトリックスメタロプロテイナーゼ、ならびに、特定の細胞外基質タンパク質およびその断片がある。ＮＰ－１またはＫＤＲのようなＶＥＧＦ受容体は、特に有用な標的である。ＶＥＧＦは、胎芽の脈管形成を調節し、同様に、生理学的な脈管形成や腫瘍の脈管形成も調節する。成熟したＶＥＧＦは、単量体がジスルフィド架橋により「頭が末尾に（head to tail）」連結したホモ二量体である。８個のエキソンを含む一種の遺伝子を代わる代わるスプライシングすることによって、いくつものＶ

ＥＧＦアイソフォームが生産される。ＶＥＧＦ$_{121}$およびＶＥＧＦ$_{165}$（それぞれ１２１個および１６５個のアミノ酸を含む）は、最も大量に存在するアイソフォームである。これら２種のＶＥＧＦアイソフォームは生物活性において異なる。例えば、ＶＥＧＦ$_{165}$は、より強力な内皮細胞マイトジェンであり、ヘパリンに結合するが、ＶＥＧＦ$_{121}$はそうではない。

【００１５】

ＶＥＧＦ受容体ＫＤＲは、主として内皮細胞に関連する２種のＶＥＧＦ受容体チロシンキナーゼのうちの一つである（他方はＦｌｔ－１）。ＫＤＲは、正常な成熟した血管において少量しか存在しないが、脈管形成（低酸素症、炎症およびガンにより誘導される脈管形成を含む）部位で強くアップレギュレートされる。ＫＤＲ発現の主な部位は内皮細胞であるが、造血幹細胞、巨核球および網膜の前駆細胞でもＫＤＲを発現することが報告されている。加えて、いくつかの腫瘍細胞系は、同様にＫＤＲを発現する可能性がある。

【００１６】

ＮＰ－１は、膜内外の糖蛋白質であり、発達中の神経、心臓血管系および骨格系で発現し、同様に、成体の内皮細胞、腫瘍細胞、および、胎盤、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、骨髄の間葉系細胞、骨芽細胞およびケラチノサイトのような多様な組織でも発現する。まず、ＮＰ－１が神経細胞の誘導と軸索成長に関与することが同定された。しかしながら、ごく最近、ＮＰ－１がＶＥＧＦ$_{165}$（およびＶＥＧＦ－Ｂ、ＶＥＧＦ－Ｅ）に対する受容体にも関与することが同定された。ＫＤＲのように、ＮＰ－１は脈管形成部位で強くアップレギュレートされる。ＮＰ－１は、脈管形成の、特に乳ガンや前立腺ガンおよび黒色腫のような腫瘍における脈管形成のメディエイターである（Cell Vol. 92; 735-74 (1998)）。実際には、ＫＤＲとは異なり、ＮＰ－１は、インビトロおよびインビボのいずれにおいても腫瘍細胞により豊富に発現される。従って、ＶＥＧＦ$_{165}$の腫瘍細胞への結合は主にＮＰ－１による。腫瘍でＮＰ－１が発現することにより、実質的に増加した腫瘍の脈管形成に付随して腫瘍が肥大してしまう、ということが報告されている。さらに、ＮＰ－１は腫瘍のＶＥＧＦを保持し、腫瘍細胞からのＶＥＧＦ拡散を防ぐ、ということが示唆されている（Miao et al “Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression” FASEB J. Vol 14, Dec. 2000）。

【００１７】

従って、ＶＥＧＦ受容体、例えばＫＤＲ、またより好ましくはＮＰ－１に特異的な分子は、脈管形成の診断、画像化および治療に有用なはずである。

脈管形成は、ガンの発達だけに関与するのではない。脈管形成は、異なる生理学的システムに影響を及ぼす多くの病気または症状に関与する。上記病気または症状としては、特に骨や靭帯に影響を及ぼす関節炎およびアテローム斑、眼に影響を及ぼす糖尿病性網膜症、血管新生緑内障、トラコーマおよび角膜移植の血管新生、特に皮膚に影響を及ぼす乾癬、強皮症、血管腫および肥大性の瘢痕化、特に血液系に影響を及ぼす血管の癒着および血管線維腫がある。それゆえに、上述の受容体に結合することによって機能する抗脈管形成因子は、これらの病気および組織または器官の治療または診断において、同様に、ガン治療および診断において、用途を見出すことができる。

【００１８】

それゆえに、上記画像化様式のいずれかによって内皮細胞を可視化できる薬剤、特に脈管形成部位における内皮細胞の増殖または移動を可視化できる薬剤が必要である。さらに脈管形成部位で増殖する内皮細胞を破壊し、それにより血液が腫瘍に達するのを防いで腫瘍を餓死させる化合物、または、一般的に不適切な脈管形成を治療するための化合物が必要である。

【００１９】

発明の要約

驚いたことに、ＴＫＰＰＲの単量体、多量体もしくはポリマー、または類似体ペプチドが、内皮細胞、または内皮細胞に共通するマーカーを発現する細胞（特定の腫瘍細胞を含む）を標的とするのに用いることができる、ということが見出された。特に、ＴＫＰＰＲの

単量体、多量体またはポリマーまたはその類似体が、ＶＥＧＦが結合した受容体ＮＰ－１に結合することによって内皮細胞および他の細胞を標的とすることを見出した。それゆえに、本発明は、新規の診断および／または治療上活性な薬剤、および、その使用方法を提供する。特に、本発明の化合物は、内皮細胞、腫瘍細胞、またはＮＰ－１を発現する他の細胞（例えば特定の型の腫瘍細胞など）の可視化、治療または放射線治療に有用な、診断用、治療用または放射線治療用の組成物である。特に、本発明の化合物は、脈管形成の組織または器官の可視化、治療または放射線治療に用いることができる。

【００２０】

これら組成物は、ＴＫＰＰＲ（またはＴＫＰＰＲ類似体であり、これらはＮＰ－１、内皮細胞、腫瘍細胞またはＮＰ－１を発現する細胞に特異的に結合する）の単量体、多量体またはポリマーおよび製薬上許容できる担体を含む。また本発明は、診断用、治療用または放射線治療用の組成物を含み、当該組成物において、ＴＫＰＰＲ（またはＴＫＰＰＲ類似体）の単量体、多量体またはポリマーは、場合により連結基を介して、基質に複合化される。

【００２１】

これら化合物は、一般式：Ａ－Ｌ－Ｂ（Ｉ）で示され、式中、

Ａは、１以上の可能な位置に連結したＴＫＰＰＲの単量体、多量体またはポリマー、もしくは、ＴＫＰＰＲ類似体の単量体、多量体またはポリマーであり、

Ｌはリンカーであり、

Ｂは基質である。

【００２２】

基質としては、例えば、脂質、ポリマー、検出可能な成分またはラベル（超音波、ＭＲＩ、Ｘ線、シンチグラフィー等で検出できる成分を含む）；生理活性剤（治療的効果または細胞傷害効果を含む生物学的作用を提供できる化合物）、薬物運搬賦形剤または遺伝子運搬賦形剤がある。従って、上記基質としては、例えば、場合によりシンチグラフィー画像化法または放射線治療に有用な金属と錯体を形成する金属キレート化用の基、超音波造影剤（例えばガス充填マイクロバブルまたはガス充填微小中空球等）の調製に有用な脂質またはポリマー、治療剤または薬物、もしくは、薬物、治療物質または遺伝物質のための運搬賦形剤がある。

【００２３】

特に好ましくは、一般式（Ｉａ）で示される化合物であり、ここで、一般式（Ｉ）においてＢは、

$Ｂ_1$：共有結合または非共有結合でリンカーと結合することができる脂質、

$Ｂ_2$：共有結合でリンカーと結合することができる非脂質ポリマー、

$Ｂ_3$：微小中空球の調製に有用なポリマー、または、

Ｂｃ：金属キレート化用の基（場合により金属と錯体を形成する）、

に相当する。

【００２４】

さらにより好ましくは、ＡがＴＫＰＰＲまたはＴＫＰＰＲ類似体の多量体である一般式（Ｉａ）で示される化合物であり、特に好ましい実施形態において、ＡはＴＫＰＰＲの四量体であり、Ｂは上述した$Ｂ_1$、$Ｂ_2$、$Ｂ_3$またはＢｃである。

【００２５】

本発明の新規の化合物は、治療および／または診断用途に関する画像化のための新規の組成物を調製するのに有用であり、当該組成物は、いかなる画像化様式で検出可能な成分と組み合わされても、組み合わされなくてもよく、本発明の化合物または組成物は、例えば、生理活性剤、または、それ自身が生理活性である（例えば核医学において）検出可能な成分を含む。

【００２６】

発明の詳細な記述

驚いたことに、ＴＫＰＰＲおよびその類似体（同様に、ＴＫＰＰＲおよびその類似体の単

量体、多量体およびポリマー）が、内皮細胞上のＶＥＧＦ結合受容体ＮＰ－１に結合することが見出された。さらに、これらＴＫＰＰＲおよびその類似体の単量体、多量体またはポリマーは、内皮細胞への結合において、ＶＥＧＦと競合できる。ＶＥＧＦの内皮細胞への結合は脈管形成に必要であるため、本発明の化合物、特に、ＴＫＰＰＲ四量体を含む化合物は、ＶＥＧＦによって誘導された脈管形成を抑制する。従って、本発明の化合物および組成物は、治療用途に有用であり得、他の生理活性物質を含ませる必要がない。特に、式：（ＴＫＰＰＲ）$_n$を有するペプチドまたは式：（ＴＫＰＰＲ）$_n$を有するペプチドの製薬上許容できる塩［式中、ｎは１～３０、好ましくは１～１０、または、より好ましくは４～１０である］、および、その類似体（例えば、ＮＰ－１、内皮細胞または内皮細胞に共通するマーカーを発現する細胞に、ＴＫＰＰＲと同等またはそれよりも大きい親和性で特異的に結合するペプチド）は、ＮＰ－１およびＮＰ－１を発現する細胞（例えば内皮細胞や腫瘍細胞）に結合することが見出された。本発明のペプチドは、内皮細胞および腫瘍細胞上でのＶＥＧＦ受容体に対するＶＥＧＦの結合をブロックする。これら細胞へのＶＥＧＦの結合をブロックすることによって、それらは、これら細胞で生じる脈管形成性の活性ＶＥＧＦを抑制する。従って、これらペプチドは、ガンや不適切な脈管形成に関する他の病気を治療する治療剤として用いることができる。好ましい実施形態において、上記ペプチドは、ＴＫＰＰＲまたはＴＫＰＰＲ類似体の多量体である。特に好ましい実施形態において、上記ペプチドはＴＫＰＰＲ四量体である。

【００２７】

本発明のペプチドは、ガンや不適切な脈管形成に関する他の病気（すなわち、骨や靭帯に影響を及ぼす関節炎およびアテローム斑、眼に影響を及ぼす糖尿病性網膜症、血管新生緑内障、トラコーマおよび角膜移植の血管新生、特に皮膚に影響を及ぼす乾癬、強皮症、血管腫および肥大性の瘢痕化、特に血液系に影響を及ぼす血管の癒着および血管線維腫）に関する多様な治療および製薬用途において用いることができる。本発明のペプチドは、一般的に、製薬上許容できる希釈剤または担体と共に、本発明の化合物または生理学的に許容できるその塩を含む医薬組成物として投与される。適切な製薬上許容できる担体としては、これらに限定されないが、滅菌水、食塩水、緩衝食塩水（リン酸緩衝液や酢酸緩衝液のような緩衝液を含む）、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、粘性のパラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、石油エーテル性脂肪酸エステル（petroetheral fatty acid ester）、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルピロリドン等がある。

【００２８】

さらに上記組成物は、通常の添加剤、すなわち、非経口、経腸または鼻腔内の適用に適し、活性化合物と有害な反応を起こさない、製薬上許容できる有機または無機の担体物質を含む。上記医薬配合物は、滅菌することができ、所望であれば、補助剤と混合することもでき、当該補助剤としては、例えば、活性化合物と有害な反応を起こさない潤滑剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響する塩、緩衝液、着色剤、着香料、および／または芳香物質等がある。上記医薬組成物は、Rerngton's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. Eaton, PA 16th Ed, 1980.で説明されたような既知の方法のいずれかによって調製することができる。

【００２９】

上記医薬組成物は、錠剤や溶液のような様々な形態をとることができ、様々な経路、例えば非経口的に（静脈内、筋肉内、皮下および腹膜内を含む）、特定の実施形態においては、経口的に、または鼻に投与することができる。

【００３０】

経口投与では、特に、錠剤、糖衣剤またはカプセルが適切であり、これらは、タルクおよび／または炭化水素担体の結合剤等、好ましくはラクトースおよび／またはコーンスターチおよび／またはポテトスターチ等の担体を含む。加糖した賦形剤を用いる場合、シロップ、エリキシル等を用いることができる。持続放出性組成物を配合することができ、例え

ばマイクロカプセル化、多層コーティングなどによって活性成分を段階的に分解可能なコーティングで保護したものがある。

【００３１】

用いられる活性化合物の実際的な好ましい量は、利用する特定の化合物、配合された特定の組成物、適用の様式、および投与の特定部位によって変動できることが了解されうる。。定められた投与方法における最適な投与の割合は、前述のガイドラインに従って行われる通常の供与量決定試験を用いて、当業者により簡単に確認することができる。

【００３２】

本発明に係る医薬組成物の「治療上有効な量」とは、望ましい薬理学的効果が十分に得られる量である。

一般的に、本組成物の有効な量を提供するのに必要な供与量は、当業者によって調節可能であり、レシピエントの年齢、健康、身体的な状態、性別、体重、および病気の進行度により変動させることができる。加えて、供与量は、治療の頻度、望ましい効果の性質や範囲によって決定できる。適切な供与量は、慣用の方法を用いて当業者により決定される。ガン、特に小細胞肺ガン（ＳＣＬＣ）を治療する場合、培養細胞系を患者から単離し、用量の反応性を試験することもできる（Trepel et al., Biochem, Biophys. Res. Commun. 156：1383（1988）；Mahmoud et al., Life Sci, 44：367（1989））。一般的に、用量は、体重１ｋｇにつき活性化合物が０．００１～^{125}１００ｍｇの範囲である。好ましくは、体重１ｋｇにつき活性物質が０．０１～５０ｍｇの範囲である。本発明の好ましい組成物は、例えば、単位投与形態で経口投与するのに適切な組成物であり、上記形態は、例えば、各用量中にペプチドを１μｇ～５００ｍｇ、より好ましくは１０～１００ｍｇ含む錠剤またはカプセルであり、そうすることによって、体重１ｋｇにつき１ｎｇ～５０ｍｇ、より好ましくは０．１～２５ｍｇ／ｋｇの１日の経口用量が達成される。他の好ましい組成物は、非経口投与に適した組成物であり、当該組成物は、溶液１ｍｌにつきペプチドを０．５～１００ｍｇ、より好ましくは溶液１ｍｌにつきペプチドを１～１０ｍｇ含み、そうすることによって、体重１ｋｇにつき１ｎｇ～１０ｍｇ、より好ましくは０．１～１０ｍｇ／ｋｇの１日の非経口用量が達成される。

【００３３】

また本発明の組成物は、本発明のペプチドに加えて、他の既知の生理活性（例えば、治療的な活性、細胞毒性活性）薬剤のうち１種を含んでもよく、当該薬剤については以下でより詳細に説明する。

【００３４】

ＴＫＰＰＲ類似体は、ＴＫＰＰＲよりも強いかまたは同等の親和性で、ＮＰ－１、ＶＥＧＦ結合受容体を標的とする分子、ならびにＴＫＰＰＲの突然変異蛋白質、レトロペプチドおよびレトロ逆転ペプチドを含む。当業者であれば明白であるが、これら類似体は、１以上のアミノ酸の置換および／または欠失および／または付加を含むが、本明細書で説明されたペプチドの生物活性を否定的に改変しないような改変も含む。

【００３５】

上述のアミノ酸の置換は、１以上のアミノ酸をそれと同義のアミノ酸で置き換えることによって実行できる。グループ内で同義のアミノ酸とは、分子の生物学的機能が保存されるように、グループのメンバー間での置換を可能にするのに十分な物理化学的特性を有するアミノ酸と定義される。本明細書で用いられる同義のアミノ酸とは、これらアミノ酸の合成誘導体（例えばＤ型アミノ酸や他の合成誘導体など）、および、Ｄ型アミノ酸および他の合成誘導体を含み、以下の表に記載のものが含まれる。チャート中、および本明細書を通して、アミノ酸は、３文字表記または１文字表記のいずれかで交換可能に略記されており、このような略記は当業者に周知である。従って、例えば、ＴまたはＴｈｒはスレオニン、ＫまたはＬｙｓはリシン、ＰまたはＰｒｏはプロリン、ＲまたはＡｒｇはアルギニンを表す。

【００３６】

【表１】

アミノ酸	同義のグループ
Ａｒｇ	Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ
Ｐｒｏ	Ｐｒｏ、Ａｌａ、Ｔｈｒ、Ｇｌｙ、Ｎ－メチルＡｌａ、ピペコリン酸、アゼチジンカルボン酸
Ｔｈｒ	Ｔｈｒ、Ｐｒｏ、３－ヒドロキシプロリン、４－ヒドロキシプロリン、Ｓｅｒ、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｇｌｎ
Ｌｙｓ	Ｌｙｓ、オルニチン、Ａｒｇ、２－アミノエチル－システイン、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ、Ｈｉｓ

【００３７】
またアミノ酸の欠失または挿入は、定義された配列に導入することができるが、その際、前記配列の生物学的機能を改変させない。好ましくは、このような挿入または欠失は、１、２、３、４または５個のアミノ酸に限定されるべきであり、機能的コンフォメーションに決定的なアミノ酸は、除去もしくは物理的に妨害または排除されるべきではない。
【００３８】
本明細書で説明されるペプチドまたはポリペプチドの突然変異蛋白質は、本明細書で開示される配列に相同な配列を有してよく、ここでアミノ酸置換、欠失または挿入は１以上のアミノ酸位置に存在する。突然変異蛋白質は、本明細書で説明されるペプチドの少なくとも４０％、好ましくは少なくとも５０％、より好ましくは６０～７０％、最も好ましくは８０～９０％の生物活性を有し得る。しかしながら、それらはまた、特に例示されたペプチドより大きい生物活性を持ってもよく、従って、例示されたペプチドの生物学的機能と必ずしも同一である必要はない。
【００３９】
またＴＫＰＰＲ類似体は、ペプチド主鎖のアミド結合への改変を含むペプチド模擬体またはプソイドペプチドも含まれ、例えばチオアミド、メチレンアミン、およびＥ－オレフィンがある。また、置換ヒドラジンカルボニル化合物（またアザアミノ酸として知られる）によって置換されたアミノ酸を有するＴＫＰＰＲまたはそのペプチド類似体の構造に基づくペプチドも、本明細書で用いられる類似体という用語のなかに含まれる。
【００４０】
本発明の好ましい実施形態において、ＴＫＰＰＲ標的用分子であるＡは、基質におよび場合によりリンカーに複合化され、基質とおよび場合によりリンカーと複合体を形成し、一般式（Ｉａ）で示される化合物を形成し、式（Ｉａ）中、Ａは、ＴＫＰＰＲ標的用分子であり、当該分子は、１以上の利用可能な官能基を介してリンカーに結合できるＴＫＰＰＲペプチドまたはその類似体、もしくは、ＴＫＰＰＲまたはその類似体の多量体またはポリマーを含む。好ましくは、ペプチドまたはペプチド類似体のＣ末端および／またはＮ末端は、リンカーとカップリングできるように選択されるが、内部のアミノ酸または類似体へのリンカーのカップリングも本発明の実施形態として可能である。
【００４１】
上記ペプチドＡは、ペプチド合成の分野で一般的に確立された技術で調製され、例えば、典型的な溶液法（Bodansky, M and Bodansky, A The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin, 1984）または固相法（Barany, G., Kneib-Cordonier, N. , and Mullen, D.G. Solid Phase Peptide Synthesis: A Silver Anniversary Report., Int. J. Pept. Protein Res. 1987 30, 705-739. Fields, G.B. and Noble, R.L. 1990. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. Int. J. Pept. Protein Res. 1990 35, 161-214）がある。
【００４２】

固相合成は、例えば、ポリスチレンのような不溶性マトリックスまたは支持体に連結した生成ペプチド鎖に、段階的にアミノ酸残基を付加することを含む。初めに、ペプチドのＣ末端残基を、市販の支持体に固定し（Principles and Practice of Solid Phase Peptide Synthesis;Fields, G.B., Tian, Z., and Barany, G. “Principles and Practice of Peptide Synthesis” in Grant, G.A. ed. Synthetic Peptides-A Users Guide Oxford University Press, New York, NY 1992, Chapter 3 pp 104-119）、ここで当該支持体において、そのアミノ基はＮ末端保護剤（例えばｔ－ブチルオキシカルボニル基（ｔ－Ｂｏｃ）またはフルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）基）で保護されており、さらに必要に応じて、その側鎖もペプチド鎖延長法の条件に適した保護基で保護される（Principles and Practice of Solid Phase Peptide Synthesis Fields, G.B., Tian, Z., and Barany, G. “Principles and Practice of Peptide Synthesis” in Grant, G.A. ed. Synthetic Peptides-A Users Guide Oxford University Press, New York, NY 1992, Chapter 3 pp 81- 103）。アミノ保護基は、適切な脱保護剤（例えばｔ－Ｂｏｃの場合はＴＦＡ、または、Ｆｍｏｃの場合はピペリジン）で除去され、その次のアミノ酸残基（必要に応じて、所望のＮ末端保護基やその側鎖の保護基を有する）を、場合により添加剤の存在下で、カルボジイミドをベースとしたカップリング剤（例えばジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）またはジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ））と共に添加し、ここで当該添加剤として例えば、ＨＯＢｔ（１－ヒドロキシベンゾトリアゾール）またはＨＯＡｔ（１－ヒドロキシ－７－アザベンゾトリアゾール）、ウロニウム塩をベースとしたカップリング剤、例えばＨＢＴＵ（２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、または、関連誘導体、例えばＨＡＴＵ［（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］（Carpino, L.A., EI-Faham, A., Minor, C.A. and Albericio, F. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1994 201-203）、または、ホスホニウム塩をベースとしたカップリング剤、例えばＢＯＰ、ベンゾトリアゾール－１－イロキシ－トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、または、関連誘導体、例えばＰｙＢＯＰがあり、通常１～１０当量の第三アミン塩基（例えばＮ－メチルモルホリン、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、２，４，６－トリメチルピリジン（コリジン））の存在下である（Principles and Practice of Solid Phase Peptide Synthesis;Fields, G.B., Tian, Z., and Barany, G. "Principles and Practice of Peptide Synthesis" in Grant, G.A. ed. Synthetic Peptides-A Users Guide Oxford University Press, New York, NY 1992, Chapter 3 pp 119-125）。ペプチド結合の形成の際、試薬を支持体から洗い落とす。最後の残基の添加の後、および、Ｎ末端のＦｍｏｃ基（Ｆｍｏｃ方法の場合）の除去等のその他いずれかの操作の後、または、任意の化学的技術を用いてその他いずれかの必要な成分を、樹脂に結合させたペプチドへ付加した後、ペプチドを、適切な試薬（例えばトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）またはフッ化水素（ＨＦ））で支持体から分離する。

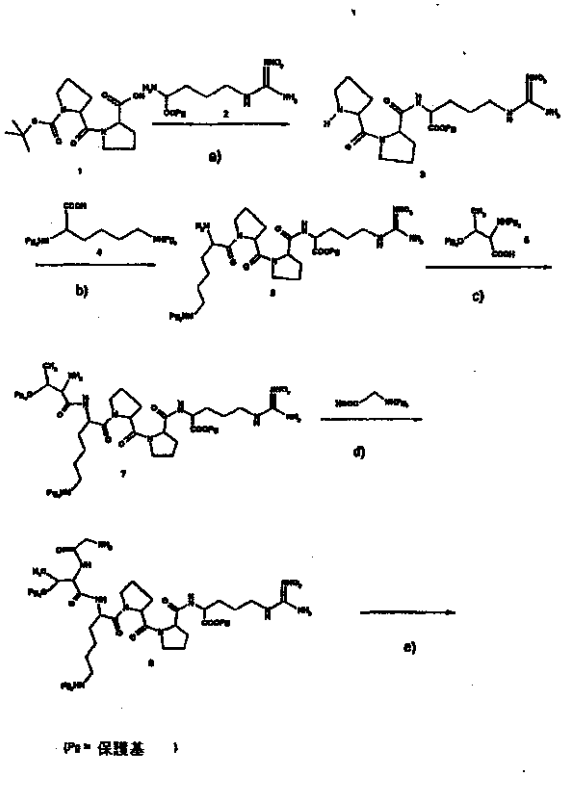
【００４３】

典型的な溶液法は、スキーム１で説明され、当該スキームは、ペプチドＴＫＰＰＲの、またより一般的にはペプチドＡの調製例として本発明で用いられる。

【００４４】

【化１１】

スキーム１



【００４５】
工程ａ）、ｂ）、ｃ）、およびｄ）は全て塩基条件下での通常の方法に従った縮合反応であり、当該塩基条件は、ジイソプロピルエチルアミンのような適切な塩基の添加や、ＤＣＣ、ＤＩＣまたはＨＡＴＵのような縮合剤の使用によって達成できる。
【００４６】
特に好ましくは、ＨＡＴＵ（［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］であり、これは、高い反応速度が得られ、副反応の発生率が低く、新しく導入されるアミノ酸の炭素原子におけるラセミ化が起こりにくいために、特に有効である。
【００４７】
最後の工程ｅ）は、塩基条件下での、適切なリンカーを用いた縮合である。
上記ペプチドの立体化学は、スキーム１のプロセスの反応に影響を受けないので、絶対的なキラル中心の配位は維持される。
【００４８】
上記分子に存在する利用可能な官能基とリンカーＬの前駆体の適切な官能基とを反応させることにより、ペプチド成分をカップリングし、複合体を形成する。
Ｌは、単結合、または、炭素数１～６０００のアルキル鎖であり、ここで当該炭素数１～６０００のアルキル鎖は、直鎖または分岐鎖であり、飽和または不飽和であり、場合により、１以上の基で分断または置換され（ここで当該１以上の基としては、Ｏ、Ｓ、ＮＲ、ＯＲ、ＳＲ、ＣＯＲ、ＣＯＯＨ、ＣＯＯＲ、ＣＯＮＨＲ、ＣＳＮＨＲ、Ｃ＝Ｏ、Ｓ＝Ｏ、Ｓ（＝Ｏ）$_2$、Ｐ＝Ｏ（Ｏ）$_2$ＯＲ、Ｐ＝Ｏ（Ｏ）$_2$Ｒ、Ｐ（Ｏ）$_2$（ＯＲ）$_2$、ハロゲン、またはフェニル基があり、ここで当該フェニル基は、場合により、１以上の－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、－Ｎ－Ｃ＝Ｓ、－Ｎ－Ｃ＝Ｏ、ハロゲンで置換され、ここで、
Ｒは、Ｈ、または、炭素数１～４の直鎖または分岐鎖アルキル基であり、場合により、１以上の－ＯＨで置換される）、
当該炭素数１～６０００のアルキル鎖は、１以上の炭素数３～９の飽和または不飽和の環式基で分断または置換されてもよく（場合により、１以上のＯ、ＳまたはＮＲで分断される）；１以上の基で分断または置換されてもよい（ここで当該１以上の基としては、－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、またはフェニル基があり、当該フェニ

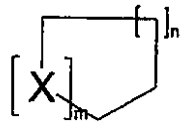
ル基は、場合により、１以上の－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、－Ｎ－Ｃ＝Ｓ、－Ｎ－Ｃ＝Ｏ、ハロゲンで置換される）。

【００４９】

最も好ましい飽和または不飽和の環式基は、前述のＬの定義に従って、以下の一般式（ＩＩＩ）を有し、

【００５０】

【化１２】



(III)

【００５１】

式中、

ｎは０～４の範囲に及ぶことができ、

ｍは０～２範囲に及ぶことができ、

Ｘは、ＮＨ、ＮＲ、Ｏ、Ｓ、ＳＲ、Ｓ＝ＯおよびＳＯ$_2$であることができ、

ここでＲはすでに定義された意味と同義である。

【００５２】

他の好ましい実施形態において、リンカーＬが、１～１００個の天然または合成アミノ酸からなるオリゴペプチド成分またはレトロペプチド成分であり得る。特に好ましくは、グリシル、グルタミル、アスパルチル酸（aspartyl acid）、γ－アミノブチリル、トランス－４アミノメチル－シクロヘキサンカルボキシルである。

【００５３】

好ましい実施形態において、Ｌ前駆体が、二官能価のＰＥＧ（ポリエチレングリコール）誘導体である。

好ましい実施形態において、Ｌ前駆体は、以下のように定義される。すなわち、

Ｌ$_1$は、リンカーの少なくとも２つの位置に同じ求電子体Ｅ１または同じ求核体Ｎｕ１を有するリンカー前駆体であり、

Ｌ$_2$は、求電子体Ｅ１と、リンカーの他の位置に異なる求電子体Ｅ２とを有するリンカー前駆体であり、

Ｌ$_3$は、求核体Ｎｕ１と、リンカーの他の位置に異なる求核体Ｎｕ２とを有するリンカー前駆体であり、

Ｌ$_4$は、１つの末端を求電子体Ｅ１で機能化し、他方を求核体Ｎｕ１で機能化したリンカー前駆体である。

【００５４】

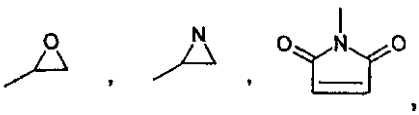
本発明の好ましい求核性Ｎｕ１／Ｎｕ２としては、－ＯＨ，－ＮＨ、－ＮＲ、－ＳＨ、－ＨＮ－ＮＨ$_2$、－ＲＮ－ＮＨ$_2$、および－ＲＮ－ＮＨＲ’があり、ここでＲ’およびＲは、それぞれ独立して、上記で与えられたＲの定義から選択されるが、Ｒ’はＨではない。

【００５５】

本発明の好ましい求電子体Ｅ１／Ｅ２としては、－ＣＯＯＨ、－ＣＨ＝Ｏ（アルデヒド）、－ＣＲ＝ＯＲ’（ケトン）、－ＲＮ－Ｃ＝Ｓ、－ＲＮ－Ｃ＝Ｏ、－Ｓ－Ｓ－２－ピリジル、－ＳＯ$_2$－Ｙ、－ＣＨ$_2$Ｃ（＝Ｏ）Ｙ

【００５６】

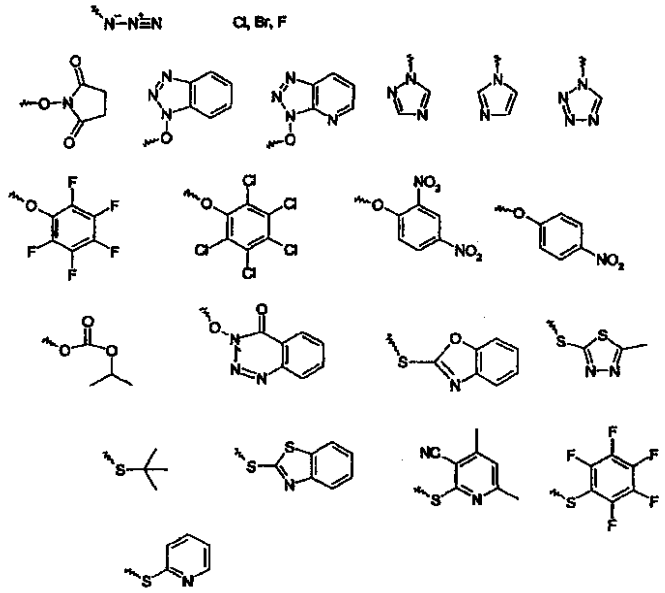
【化１３】



【００５７】

があり、ここでＹは以下の群より選択できる。

【００５８】
【化１４】



【００５９】
Ｌの定義として好ましくは、グルタル酸、コハク酸、マロン酸、シュウ酸の適切な誘導体、２種のCH_2COOHで誘導されたＰＥＧであり、その際、そのカルボキシル基を、リンカーＬとＡまたはＢそれぞれとの間の結合を形成するために行われる反応の前に、それと同時に、またはその後連続的に、Ｃ（＝Ｏ）Ｘ成分で変換し、必要であれば、第二のリンカー結合形成反応のために用いられるカルボキシル基に対して、何らかの中間体保護または脱保護工程を行い、ここでＹは上で示したＹ基のチャートに記載された成分からなる群より選択される。このような、類似または同一の官能基を連続的に脱保護および利用するための方法や技術は、当業者周知である。
【００６０】
あるいは、リンカーＬをまず基質Ｂにカップリングし、次に上記ペプチドにカップリングしてもよい。
特に好ましくは、一般式：Ａ－Ｌ（IIｂ）で示される化合物であり、当該化合物は、上述した一般的な方法に従って調製される基質Ｂに結合することができ、ここで、ＡおよびＬは本明細書で説明された意味と同義である。
【００６１】
一般式（Ｉａ）で示される新規の化合物は、選択した画像化様式によって異なる検出可能な成分を有する医薬組成物に配合することができる。
標的化用の成分の取り込みは、非共有結合的な関係、すなわち、様々な要素の機能、例えば、関連分子の極性、もしあるなら関連分子の電荷（正電荷または負電荷）、分子ネットワーク中の水素結合の程度等によってなされ得る。非共有結合の結合は、好ましくは、イオン相互作用、双極子－双極子相互作用、水素結合、親水性の相互作用、ファン・デル・ワールス力、およびその任意の組み合わせからなる群より選択される。非共有結合の相互作用は、以下で定義される様々な検出可能な成分の表面に式（Ｉａ）の化合物を直接結合させるために用いることができる。
【００６２】
特に、Ｘ線による画像化に関して、一般式（Ｉ）で示される新規の化合物は、例えば、Ｘ線ヨウ化造影剤を封入したリポソーム中で、Ｘ線造影剤に配合することができる。特に好ましくは、以下の特許または特許出願により調製されたリポソームであり、すなわち、米国特許第５，３１２，６１５号、米国特許第５，４４５，８１０号（ＷＯ－Ａ－８８／０９１６５）および米国特許第５，３９３，５３０号（欧州特許第５１４５２３号、ＷＯ－Ａ－９２／１０１６６）、米国特許第５，７０２，７２２号（ＷＯ－Ａ－９６／１０３９

３）、ＷＯ－Ａ－９６／２５９５５であり、これらの全内容はいずれも、参照することによって本明細書に含まれる。

【００６３】

磁気共鳴による画像化またはシンチグラフィーに関して、一般式（Ｉ）で示される新規の化合物は、適切な金属錯体、例えば放射性医薬品またはＭＲＩ分野で知られた錯体と共に、新規の標的化された造影剤を生産するための標的化用成分になり得る。

【００６４】

特に、ＭＲＩに関して、一般式（Ｉ）で示される化合物は、親油性の超常磁性造影剤に配合することができ、当該超常磁性造影剤として例えば、米国特許第５，４６４，６９６号、米国特許第５，５８７，１９９号、米国特許第５，９１０，３００号および米国特許第５，５４５，３９５号（ＷＯ－Ａ９４／０４１９７）で説明された超常磁性造影剤があり、これらの全内容はいずれも、参照として本明細書に含まれる。あるいは、一般式（Ｉ）で示される新規の化合物は、リポソームまたは混合ミセルをベースとしたＭＲＩ造影剤の表面上に含ませることができ、上記リポソームまたは混合ミセルはそれぞれ、上述のＸ線造影剤に関して引用された文献において、または、米国特許第５，８３３，９４８号（Ｗ０９７／００００７）または一連の出願０９／４４８，２８９において説明されようなものであり、参照として本明細書に含まれる。

【００６５】

シンチグラフィーと類似した方法において、一般式（Ｉ）で示される化合物は、放射性核種金属に対する適切な錯化剤を含むリポソームまたは混合ミセル中に含ませることができる。

【００６６】

その上、他の観点において、本発明は、一般式（Ｉ）で示される新規化合物を含む、シンチグラフィー用の新規な造影剤または核医学に関する新規な治療剤に関し、ここで当該化合物は、放射性核種に対して適切な錯化剤を含み、場合により、以下で説明する超音波造影剤、特にマイクロバブルまたは微小中空球中に含ませることができる。

【００６７】

本発明の化合物がシンチグラフィー用の新規の薬剤または放射線治療用の新規の化合物である場合の好ましい実施形態において、基質は金属キレート化用の基を含み、当該キレート化用の基は場合により金属と錯体を形成する。これらの組成物は、式：Ａ－Ｌ－Ｂｃで示される化合物を含み、式中、Ａは、ＴＫＰＰＲの単量体、多量体またはポリマーまたはＴＫＰＰＲ類似体であり、Ｌは、任意のリンカーであり、およびＢｃは、金属キレート化用の基である。当該金属キレート化用の基Ｂｃは、インビボで、金属イオンと安定な錯体を形成する分子である（すなわち、金属キレート化用の基と錯体を形成する）。加えて、当該金属キレート化用の基は、リンカーを介して、ＴＫＰＰＲターゲティング成分またはターゲティング成分のいずれかと直接複合化する。好ましい実施形態において、ＡはＴＫＰＰＲの多量体、例えばＴＫＰＰＲ四量体である。

【００６８】

金属キレート化用の基は、単座（monodentate）および多座（polydentate）キレート化剤であり得る［Parker, 1990；Frizberg et al., 1995；Lister－James et al., 1997；Li et al. , 1996b；Albert et al., 1991；Pollak et al., 1996；de Jong et al., 1997；Smith et al., 1997］。例えば、キレート化用の基は、三座金属キレート化剤であり、当該キレート化剤は大環状でも非大環状でもよく、４個の窒素および／または硫黄の金属が配位する原子を有してもよく［Parker et al., 1990；Li et al., 1996b］、N_4、S_4、N_3S、N_2S_2、NS_3キレート化剤と示される。タンパク質と受容体要求分子（receptor-avid molecule）とを複合させた際に用いられた多数の適切な多座キレート化剤は、Frizberg et al., 1995；Lister－James et al., 1997；Li et al., 1996b；Albert et al., 1991；Pollak et al., 1996；de Jong et al., 1997に示される。またこれらの多座キレート化剤は、様々な組み合わせで、他の金属が配位する原子（例えば酸素やリン）を含ませることもできる。また金属が結合する錯化成分は、「３＋１」キレート化剤も含まれる

［Seifert et al., 1998］。放射線診断用途において、オキサ－Ｐｎ　ＡＯリガンドが好ましく用いられる。これらのリガンドは、米国特許第６，０９３，３８２号および第５，６０８，１１０号で説明され、これらの全内容は参照として本明細書に含める。

【００６９】

キレート化用の基と場合により錯体を形成する金属は、特定の治療または診断用途のために選択された適切な金属のいずれでもよく、例えば、常磁性金属、ランタニド、オージェ電子放射同位体、陽電子放射同位体、遷移金属、および、α、βまたはγ放射同位体がある。医療的に有用な金属イオンのタイプは、特定の医療用途による。キレート化用の基を含む本発明の化合物は、放射性または非放射性金属錯体を形成するためのリガンドとして用いることができる。金属錯体は、好ましくは塩基条件下で、リガンドを原子番号２２～３１、３９～４９、５７～７１または７３～８２の金属、特に放射性金属と錯体を形成することによって形成することができる。好ましくは、^{99m}Ｔｃ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{111}Ｉｎ、^{88}Ｙ、^{90}Ｙ、^{105}Ｒｈ、^{153}Ｓｍ、^{166}Ｈｏ、^{165}Ｄｙ、^{177}Ｌｕ、^{64}Ｃｕ、^{97}Ｒｕ、^{103}Ｒｕ、^{186}Ｒｅ、および^{188}Ｒｅのような放射性金属を含む金属錯体である。

【００７０】

元素ＴｃおよびＲｅの放射性核種は、特に、診断のための画像化や放射線治療における使用に適用できる。診断または治療用途における他の放射性核種としては、これらに限定されないが、^{62}ＣＵ、^{64}ＣＵ、^{67}ＣＵ、^{97}Ｒｕ、^{109}Ｐｄ、^{166}Ｈｏ、^{198}Ａｕ、^{149}Ｐｍ、^{166}Ｄｙ、^{175}Ｙｂ、^{117}Ｓｎ、^{199}Ａｕ、^{203}Ｐｂ、^{211}Ｐｂおよび^{212}Ｂｉがある。

【００７１】

テクネチウム錯体は、放射線診断用途に特に有用である。用いられるテクネチウムは、好ましくは１以上の放射性核種^{99m}Ｔｃ、^{94m}Ｔｃまたは^{96}Ｔｃである。医療のための画像化のための好ましい放射線同位体は、^{99m}Ｔｃである。その１４０ｋｅＶγ－フォトンは、汎用のガンマカメラでの使用に対して理想的である。これは短い半減期（６時間）を有するので、患者の放射線量測定を検討する際に望ましい。^{99m}Ｔｃは、商業的に製造された^{99}Ｍｏ／^{99m}Ｔｃ発生剤系により、比較的低コストで容易に入手することができる。金属がテクネチウムである場合の本発明の錯体の調製は、テクネチウムを過テクネチウム酸イオンの形態で用いることによって達成することができる。^{99m}Ｔｃにおいて、過テクネチウム酸イオンは、好ましくは、市販のテクネチウム－９９ｍ、親－娘発生剤（parent-daughter generator）から得られ、このようなテクネチウムは、＋７酸化状態である。この種の発生剤を用いた過テクネチウム酸イオンの生産は当業界周知であり、より詳細には、米国特許第３，３６９，１２１号および第３，９２０，９９５号に説明される。一般的に、これらの発生剤を食塩水で溶離させ、得られた過テクネチウム酸イオンをナトリウム塩として得ることができる。また過テクネチウム酸は、当業界周知の方法を用いてサイクロトロンにより生産された放射性テクネチウムから調製することもできる。

【００７２】

これらの金属錯体は、診断および／または治療剤としての有用性がある。金属イオンの選択は、望ましい治療または診断用途に基づき決定される。本発明の金属錯体は、いずれの適切な経路によって、例えば、経口、非経口（例えば、静脈内、腹膜内、筋肉内、または皮下）によって、または、いずれの適切な方法で投与できる。例えば、本発明の錯体は、巨丸剤によって、または、ゆっくりとした点滴静脈注射によって、被験者に投与できる。投与量は、望ましい使用に基づいて選択でき、ここで当該使用とは、例えば、当業界で知られた方法によって、被験者の器官または他の部位、もしくは、望ましい放射線治療効果の診断用イメージを作製することである。模範的な供与量は、約３０～２００ｍＣｉレニウム（放射線治療に対して）または約１０～６０ｍＣｉテクネチウム（画像化に対して）である。

【００７３】

本明細書で開示されたリガンドを有する金属錯体を形成するための模範的な方法において、望ましい金属の錯体または塩は、望ましい酸化状態で、かつ１以上の容易に置換可能な（すなわち、不安定な）リガンド（例えば、H_2O、ハロゲン（例えばＣｌ）、NO_3^-、

または糖）を含み、望ましい錯体を形成するのに適切なｐＨ値でリガンドと混合される。上記不安定なリガンドは、本発明のリガンドにより金属から除去され、金属錯体が形成される。

【００７４】

例証となる方法を以下に示す。

【００７５】

【化１５】

$$(Met)(Lig_{lab})4 + (Lig_{inv}) \quad (Met)(Lig_{inv}) + 4(Lig_{lab}) \qquad (1)$$

【００７６】

式中、

Ｍｅｔは望ましい酸化状態の金属であり、

Lig_{lab}は、不安定なリガンドであり、例えばH_2O、Cl^-、Br^-、F^-またはNO_3^-であり、

Lig_{inv}は、キレート化用の基、任意のリンカー、および本発明のターゲティングペプチド（例えばＴＫＰＰＲまたはＴＫＰＰＲ類似体の単量体、多量体またはポリマー）を含むリガンドである。

【００７７】

【化１６】

$$(Met)OCl_4^- + (Lig_{inv}) \quad (Met)O(Lig_{inv}) + 4Cl^- \qquad (2)$$

$$(Met)O_2(Lig_{mono})_4 + (Lig_{inv}) \quad (Met)O_2(Lig_{inv}) + 4(Lig_{mono}) \qquad (3)$$

【００７８】

式中、

Lig_{mono}は、単座リガンドであり、例えばピリジン、ハロゲン化物、ホスフィンまたはアミンである。

【００７９】

【化１７】

$$(Met)(Lig_{bi})_2 + (Lig_{inv}) \quad (Met)(Lig_{inv}) + 2(Lig_{bi}) \qquad (4)$$

【００８０】

または

【００８１】

【化１８】

$$(Met)O(Lig_{bi})_2 + (Lig_{inv}) \quad (Met)O(Lig_{inv}) + 2(Lig_{bi}) \qquad (5)$$

【００８２】

式中、

Lig_{bi}は、二座リガンドであり、例えば糖、ジオール、ビスアミン、ビピリジンまたはホスフィンであり、ここで、上記の各反応式（１）～（５）に関して適切な電荷バランスが用いられる。

【００８３】

あるいは、金属錯体は、望ましい錯体の酸化状態と異なる酸化状態の金属から調製してもよい。その模範的な方法は、還元剤または酸化剤のいずれか（用いられる金属の酸化状態、および、望ましい最終産物の酸化状態による）が、金属を含む反応混合物に加えられ、金属を望ましい酸化状態にする方法である。酸化剤または還元剤を用いて、望ましい酸化状態だが、不安定なリガンドを有する錯体の中間体を形成することができ、次に本発明のリガンドを望ましくキレート化することによって不安定なリガンドを分離させる；あるい

は、酸化剤または還元剤を望ましいリガンドと共に金属を含む反応混合物に加えることによって、望ましい酸化状態へ変化させ、１工程で望ましい金属にキレート化することができる。

【００８４】

本発明の^{99m}Ｔｃ錯体の形成は、通常の食塩水中で、過テクネチウム酸イオンと適切なキレート化リガンドとを混合することによって達成される。適切な緩衝液もしくは生理学的に許容できる酸または塩基は、ｐＨを、選択されたキレート化リガンドに従って、約３～約９．５の範囲に調節するのに用いることができる。次に、還元剤の源を加え、リガンドでキレート化するのに望ましい酸化状態に過テクネチウム酸を還元する。好ましい還元剤は、第１スズイオンであり、第１スズ塩の形態、例えば塩化第１スズ、フッ化スズ、酒石酸スズ、またはクエン酸スズの形態で添加することができる。この反応は、水中または水／アルコールの混合物中で、室温～約１００℃の範囲の温度で、約５分～約１時間の反応時間で行うことが好ましい。上記還元剤は、５～５０μｇ／ｍＬの濃度で存在すべきである。上記リガンドは、最適には、０．１～２ｍｇ／ｍＬの濃度で存在すべきである。また本発明のテクネチウム錯体は、リガンドを交換することによって調製できる。不安定なＴｃ（Ｖ）錯体は、TcO_4^-と容易に交換可能なリガンドとの反応によって、当のリガンドを交換するのに適切なｐＨ値で（通常５～８）調製でき、当該リガンドとしては、例えば、ヒドロキシカルボキシレートリガンド、グルコヘプトネート、グルコナート、クエン酸塩、マレート、マンニトール、酒石酸塩、またはアミンカルボキシレート、例えばＥＤＴＡまたはＤＴＰＡである。上述した第１スズ塩のような還元剤を加えることによって、リガンドを交換した、不安定な還元Ｔｃ錯体が形成される。次に、この還元Ｔｃ錯体と望ましいキレート化リガンドとを、適切なｐＨ値で混合し、不安定な交換リガンドをＴＫＰＰＲを有するキレート化リガンドによって置換し、このようにして本発明の望ましいテクネチウム錯体が形成される。

【００８５】

放射線治療用途において、レニウム錯体が特に有用である。用いられるレニウムは、放射性核種であるＲｅ－１８６またはＲｅ－１８８のいずれか１種、もしくはその混合物が好ましい。金属がレニウムである場合の本発明の錯体の調製は、酸化状態が＋５または＋７のレニウム物質を用いることによって達成できる。レニウムがＲｅ（VII）状態である場合の化合物例は、NH_4ReO_4または$KReO_4$である。Ｒｅ（Ｖ）は、例えば、$[ReOCl_4](NBu_4)$、$[ReOCl_4](AsPh_4)$、$ReOCl_3(PPh_3)_2$として、および、$ReO_2(ピリジン)_4^+$として利用可能である。（Ｐｈはフェニルであり、Ｂｕはｎ－ブチルである）。レニウム錯体を形成可能な他のレニウム試薬もまた使用できる。

【００８６】

本発明の錯体は、それを用いようとする場所で、またはその近辺で調製することができるため、便利である。本発明に不可欠な部分として、１本または複数本のバイアルのキットがあり、当該キットは、テクネチウムイオンに加えて、本発明の錯体を調製するのに必要な成分全てを含む。

【００８７】

１本のバイアルのキットは、リガンド、第１スズ塩の源、または、他の製薬上許容できる還元剤を含み、製薬上許容できる酸または塩基で適切に緩衝され、ｐＨ値が約３～約９に調節される。キット内容物を凍結乾燥形態にすることが好ましい。このような１本のバイアルのキットは、場合により、不安定なリガンドまたは交換リガンド、例えばグルコヘプトネート、グルコナート、マンニトール、マレート、クエン酸または酒石酸を含んでもよく、また、反応調節剤、例えば、ジエチレントリアミン－ペンタ酢酸（ＤＰＴＡ）、エチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）、またはα、βまたはγシクロデキストリンを含んでもよく、これらは最終産物の放射化学的純度および安定性を改良するのに役立つ。

【００８８】

複数本のバイアルのキットは、１本のバイアル中に、過テクネチウム酸以外に、上述した

不安定なＴｃ（Ｖ）錯体を形成するのに必要な成分を含み得る。用いられるリガンドの量とタイプ、緩衝液のｐＨ、および還元剤の量とタイプは、形成しようとする交換錯体の性質に高く依存する。適切な条件は、当業者に周知である。過テクネチウム酸をこのバイアルに添加し、適切な時間待った後、このバイアルの内容物を、リガンドと、ｐＨをその最適な値に調節するのに適切な緩衝液とを含む第二のバイアルに添加する。約５～６０分の反応時間の後、本発明の錯体が形成される。この複数本のバイアルのキットの双方のバイアルの内容物は凍結乾燥されていることが有利である。上述したように、反応調節剤、交換リガンドおよび安定剤は、バイアルのいずれかに一方に存在しても、または双方に存在してもよい。加えて、凍結乾燥プロセスを補助するのに望ましい充填剤が存在してもよく、例えばマンニトールである。

【００８９】

投与される放射性医薬品の量は、当業界で知られた方法によって器官の診断用画像を作製するような、望ましい使用に基づき選択される。用量は、約２～２００ｍＣｉの範囲でもよく、または、放射性医薬品によって提供されるインビボでの放射線量測定により制限される範囲でもよい。

【００９０】

その上、本発明の他の実施形態において、一般式（Ｉ）で示される化合物を、市販の極微粒子、例えば蛍光マイクロスフェアに含ませることにより、インビトロおよびインビボで（動物に対してのみ）本発明のマイクロバブルまたは微小中空球剤をスクリーニングする化合物および方法を提供する。これは、誘導されたマイクロスフェアが、マイクロバブルおよび微小中空球に関して予想される方式に似た方式で、その表面にターゲティングベクターを表示するためであり、従って、当該マイクロスフェアは、上記それぞれのうち後者の２種のタイプのモデルとして行動し得る。このようなマイクロスフェアの一例としては、Fluosphere：登録商標（Molecular Probes Corporation, Eugene, Oregon USA）であり、これは、カルボキシレートまたはアミンを改変した改変官能価を有し、当該官能価により、市販のキットを用いて、そのＮ末端またはＣ末端を介してペプチドをビーズに付着させることができる。上記マイクロスフェアは、０．０２μｍから少なくとも４μｍの範囲の直径を有し、様々な色の蛍光性の染色成分を有する（例えば、青、黄－緑、ナイル赤、オレンジ、赤－オレンジ、クリムソンインフラレッドまたはファーレッド）。極微粒子は、インビボで、特に血管系において遭遇するような物理的応力に対して、極微粒子が固定されているか、または、末梢血管系、心臓血管系などの循環系全体や肺血管系全体を通って移動するかのいずれの場合においても安定である。

【００９１】

この場合、極微粒子の安定性がマイクロバブルより大きいため、より厳しい分析および分析条件を用いることが可能になる。これは有用であり、なぜならバブルはビーズに比べてかなり脆く、分析工程が自動化されている場合でも、そうでない場合でも、分析工程を切り抜けることができないためである。加えて、バブルは浮くため、ウェル／分析システムの底部または壁面上でバブルを基質にさらすことが難しい。ビーズは浮かず、強固なため、分析に非常に適している。極微粒子またはビーズは、検出システムを有してもよい。当該検出システムは、光または放射活性を利用することができる。

【００９２】

本発明の好ましい実施形態において、一般式（Ｉ）で示される新規の化合物は、それらを異なる方法で超音波造影剤に含ませることによって、超音波検査法に有用な新規の標的化診断および／または治療上活性な薬剤を調製するのに有用であり得る。さらなる実施形態において、本発明は、本発明の化合物および／または組成物を含む超音波造影剤を提供する。

【００９３】

本発明の超音波造影剤は、どのような便利な形態であってもよく、例えば、本発明の造影剤は、ガスを含有する調合物の形態でも、ガスを発生する調合物の形態でもよく、さらに、化学構造に取り込まれた複数の式（Ｉ）で示されるターゲティング成分を含む。

【００９４】
ガスマイクロバブルおよび他のガス含有物質は、好ましくは、１０μｍを超過しない程度の（例えば７μｍ以下の）初期の平均サイズを有し、それにより、例えば静脈注射によって投与された後、それらを自由に肺動脈系を通過させることができる。
【００９５】
特に、本発明のガス含有造影剤としては、ガス充填マイクロバブルの懸濁液、または、ガス充填微小中空球の懸濁液があり、これらの定義は例えば欧州特許第５５４２１３号および米国特許第５，４１３，７７４号で与えられた定義に従う。
【００９６】
「マイクロバブル」という用語は、特に、液状の懸濁液中の気泡を意味し、好ましくは、気泡の表面特性や安定性を制御するためにサーファクタントまたは界面活性剤も含む。好ましくは、マイクロバブル懸濁液は、サーファクタントまたは界面活性剤を含み、例えば、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマーサーファクタント（例えばPluronic：登録商標）、または例えば米国特許第５，９１９，３１４号で開示されたようなポリマーサーファクタントを含む。より好ましくは、水（または水性camer）の存在下で安定な膜を形成できる両親媒性の化合物と、ガスとが、安定化したマイクロバブルにおけるサーファクタントとして用いられる。このような化合物としては、例えば、皮膜形成脂質または好ましくはリン脂質がある。
【００９７】
「マイクロカプセル」または「微小中空球」という用語は、好ましくは、物質の境界または包、すなわち、ポリマー膜の壁で空気またはガスを充填した物質を意味しする。マイクロバブルおよび微小中空球はいずれも、超音波造影剤として有用である。
【００９８】
その上、薬物を内部にカプセル封入すること、または、本発明の造影剤をカプセル封入した壁に薬物を付着させるか、または、薬物を含ませることができる。従って、治療用化合物を、例えば共有結合またはイオン結合を介して壁の一部に連結してもよいし、または、カプセル封入物質へ物理的に混合してもよく、特に薬物が膜物質に対して似たような極性または溶解性を有する場合、薬剤が体内で意図されたように作用する前に、薬剤が生産物から漏れ出すことを防ぐことができる。例えばＷＯ－Ａ－９３／２５２４１または米国特許第５，４２５，３６６号で説明されたような、外部からの超音波を用いたガス充填微小中空球の破壊は、周知の現象であり、放出速度は、変換器からの超音波エネルギーを特定の量にすることによって、治療用途のタイプに応じて変動可能である。
【００９９】
治療剤を、適切な連結剤を用いて、カプセル封入する膜表面に共有結合で連結させることができる。従って、例えば、初めに疎水性誘導体を調製し、生分解性または選択的に開裂可能なリンカーを介して上記誘導体に結合させ、その後、微小中空球に物質を含ませることができる。あるいは、活性基を解放するためのプロセシングを必要としない疎水性誘導体を、膜に直接取り込むこともできる。活性薬物は、超音波ビームの強度を高めることによって放出することができる。
【０１００】
好ましい実施形態において、基質は脂質、B_1を含み、本発明の化合物はガス含有マイクロバブルに含まれる。上記脂質、B_1は、合成または天然に存在する化合物であり、一般的に、両親媒性かつ生体適合性であり、親水性成分および疎水性成分を含む。脂質、B_1は、本発明のガス含有剤の調製に有用であり、例えば：脂肪酸；リソリピッド（lysolipid）；以下のようなリン脂質であり、例えば、飽和および不飽和脂質の双方を含むホスファチジルコリン（ＰＣ）であり、例えば、以下のようなホスファチジルコリン、すなわちジオレイルホスファチジルコリン；ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジペンタデカノイルホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）；ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）；ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）；およびジアラキドニル（diarachidonyl）ホスファチジルコリン

（ＤＡＰＣ）を含む；ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）であり、例えば、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）およびジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）であり；ホスファチジルセリン（ＰＳ）、例えば、ジパルミトイルホスファチジルセリン（ＤＰＰＳ）、ジステアロイルホスファチジルセリン（ＤＳＰＳ）であり；ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）、例えば、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（ＤＳＰＧ）；ホスファチジルイノシトールであり；スフィンゴ脂質、例えば、スフィンゴミエリンであり；糖脂質、例えば、ガングリオシド、ＧＭ１およびＧＭ２であり；グルコリピド；スルファチド；スフィンゴ糖脂質；ホスファチジン酸、例えば、ジパルミトイルホスファチジン酸（ＤＰＰＡ）およびジステアロイルホスファチジン酸（ＤＳＰＡ）が挙げられ：以下のような脂肪酸であり、例えば、パルミチン酸；ステアリン酸；アラキドン酸；オレイン酸；ポリマー含有脂質、ここで当該ポリマーとしては、キチン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドンまたはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）があり、また当該ポリマー含有脂質は「ポリエチレングリコール付加した（pegylated）脂質」とも称され、好ましいポリマー含有脂質としては、例えばＤＰＰＥ－ＰＥＧ（ＤＰＰＥ－ＰＥＧ）であり（これはＰＥＧポリマーを付着させて含む脂質ＤＰＰＥの意味である）、例えばＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００であり（これは平均分子量約２０００のＰＥＧポリマーを付着させて含むＤＰＰＥの意味である）があり；スルホン化モノ、ジ、オリゴまたはポリサッカリド含有脂質；コレステロール、例えば、硫酸コレステロールおよびコレステロールヘミスクシネートであり；トコフェロールヘミスクシネート；エーテルおよびエステル結合脂肪酸を含む脂質；重合化脂質（広範な重合化脂質が当業界周知である）；ジアセチルホスフェート；ジセチルホスフェート；ステアリルアミン；カルジオリピン；炭素鎖長が約６～約８の短鎖脂肪酸を有するリン脂質；非対称のアシル鎖を含む合成リン脂質、例えば、一方が約６個の炭素からなるアシル鎖であり、他方が約１２個の炭素からなるアシル鎖である；セラミド；非イオン性リポソームであり、例えば、以下のようなニオゾーム（niosome）であり、すなわち、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪アルコール、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、ポリオキシエチル化ソルビタン脂肪酸エステル、グリセロールポリエチレングリコールリシノレエート、エトキシ化大豆ステロール、エトキシ化ヒマシ油、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンポリマー、およびポリオキシエチレン脂肪酸ステアレートであり；以下のようなステロール脂肪酸エステルであり、すなわち、コレステロールスルフェート、コレステロールブチレート、コレステロールイソブチレート、コレステロールパルミテート、コレステロールステアレート、ラノステロールアセテート、エルゴステロールパルミテート、およびフィトステロールｎ－ブチレートであり；以下のような糖酸のステロールエステルであり、すなわち、コレステロールグルクロニド（glucoronide）、ラノステロールグルクロニド、７－デヒドロコレステロールグルクロニド、エルゴステロールグルクロニド、コレステロールグルコナート、ラノステロールグルコナート、およびエルゴステロールグルコナートであり；以下のような糖酸とアルコールとのエステルであり、すなわち、ラウリルグルクロニド、ステアロイルグルクロニド、ミリストイルグルクロニド、ラウリルグルコナート、ミリストイルグルコナート、およびステアロイルグルコナートであり；以下のような糖および脂肪酸のエステルであり、すなわち、スクロースラウレート、フルクトースラウレート、スクロースパルミテート、スクロースステアレート、グルクロン酸、グルコン酸およびポリウロン酸；以下のようなサポニンであり、すなわち、サルササポゲニン、スミラゲニン、ヘデラゲニン、オレアノール酸、およびジギトキシゲニンであり；グリセロールジラウレート、グリセロールトリラウレート、グリセロールジパルミテート、グリセロール、および、以下のようなグリセロールエステルであり、すなわち、グリセロールトリパルミテート、グリセロールジステアレート、グリセロールトリステアレート、グリセロールジミリステート、グリセロールトリミリステートであり；以下のような長鎖アルコールであり、すなわち、ｎ－デシルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、およびｎ－オクタデシルアルコ

ールであり；６－（５－コレステニ－３β－ルオキシ）－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド；ジガラクトシルジグリセリド；６－（５－コレステニ－３β－ルオキシ）ヘキシル－６－アミノ－６－デオキシ－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド；６－（５－コレステニ－３β－ルオキシ）ヘキシル－６－アミノ－６－デオキシ－１－チオ－β－Ｄ－マンノピラノシド；１２－（（（７’－ジエチルアミノクマリン－３－イル）カルボニル）メチルアミノ）オクタデカン酸；Ｎ－［１２－（（（７’－ジエチルアミノクマリン－３－イル）カルボニル）メチルアミノ）オクタデカノイル］－２－アミノパルミチン酸；Ｎ－スクシニルジオレイルホスファチジルエタノールアミン；１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロール；１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－３－スクシニルグリセロール；１，３－ジパルミトイル－２－スクシニルグリセロール；１－ヘキサデシル－２－パルミトイルグリセロホスホエタノールアミンおよびパルミトイルホモシステイン、および／または、それらの組み合わせ、が挙げられる。

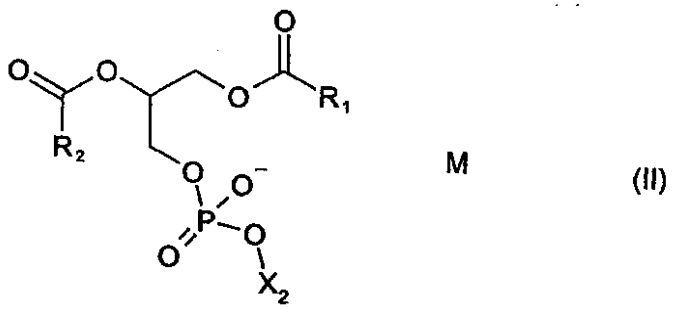
【０１０１】

より好ましい実施形態において、本発明は、一般式：Ａ－Ｌ－B_{1a}（ＩＩａ）で示される新規の化合物に関し、

式中、B_{1a}は、一般式（II）：

【０１０２】

【化１９】



M (II)

【０１０３】

で示されるリン脂質成分に相当し、

式中、Ｍはアルカリ金属またはアルカリ土類金属カチオンであり、

R_1およびR_2は、それぞれ独立して、飽和または不飽和であり、場合によりＣ＝Ｏまたは Ｏで分断される炭素数１２～２０の直線状の長鎖に相当し、

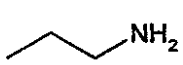
X_2は、以下の意味からなる群より選択することができる。

【０１０４】

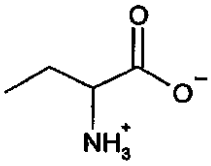
【化２０】



ホスファチジン酸

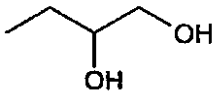


エタノールアミン

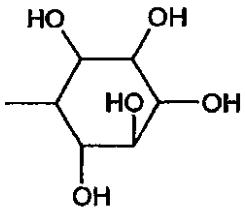


セリン

グリセロール

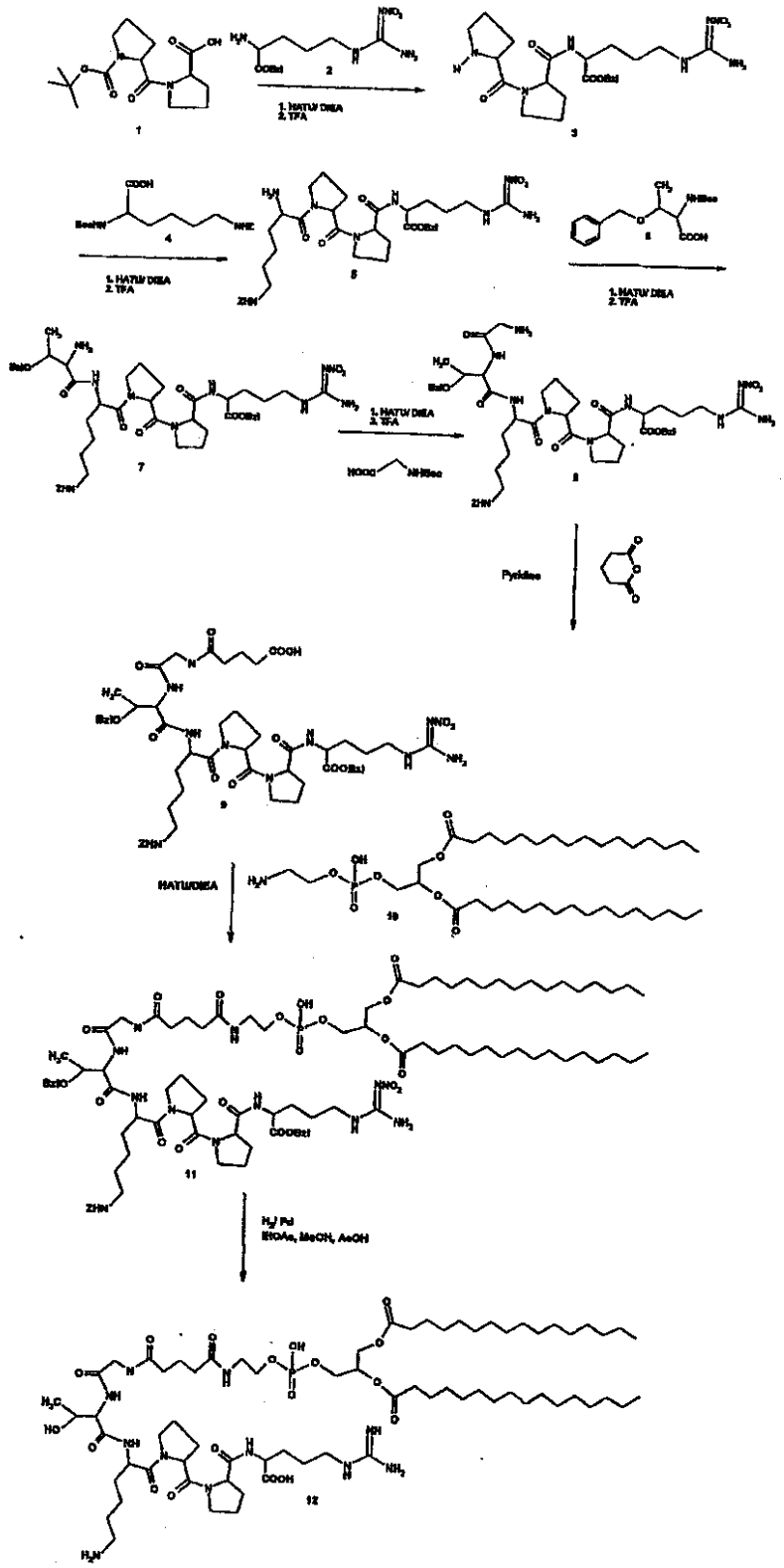


イノシトール



【０１０５】
好ましい実施形態において、Ａは、ＴＫＰＰＲの多量体であり、例えばＴＫＰＰＲ四量体である。
特に好ましくは、以下の群より選択される式（II）で示されるリン脂質である。すなわち、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、またはジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン；もしくは、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、またはジリノレイルホスファチジルエタノールアミン、これらいずれかのフッ素化類似体、これらいずれかの混合物から選択され、これらは飽和であることが好ましい。
【０１０６】
一般式（II）で示されるリン脂質は、例えば一般式（IIb）で示される化合物に容易にカップリング可能であり、以下のスキーム２で示されるように誘導体を調製することができ、この場合、一般式（IIａ）において、Ｂはジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンであり、Ｌはグルタル酸とグリシンとで構成される（実施例項目の実施例３を参照）。
【０１０７】
【化２１】

スキーム２



【０１０８】
一般式（ＩＩａ）の新規な化合物が合成されれば、当該化合物は、好ましい本発明のガス充填マイクロバブル造影剤を製造するための膜形成サーファクタントとして、従来のリン脂質と共に用いることができる。
【０１０９】
従来のリン脂質は、上記でB_1に与えられた定義に含まれるものに相当し、例えば、レシチン（すなわちホスファチジルコリン）、カルジオリピン（ＣＬ）、スフィンゴミエリン

、原形質、セレブロシド等のいずれか１種が含まれる。
【０１１０】
好ましい本発明のガス充填マイクロバブルは、当業界で知られた方法で調製でき、例えば、以下の特許のいずれかに記載の方法、すなわち、欧州特許第５５４２１３号、米国特許第５，４１３，７７４号、米国特許第５，５７８，２９２号、欧州特許第７４４９６２号、欧州特許第６８２５３０号、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、欧州特許第４７４８３３号、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、欧州特許第６１９７４３号、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号が挙げられる。
【０１１１】
ガス含有造影剤の調合物に関する全ての上記文献の開示を、参照として本明細書に含める。
欧州特許第４７４８３３号（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５，６４３，５５３号、米国特許第５，６５８，５５１号、米国特許第５，９１１，９７２号、米国特許第６，１１０，４４３号および米国特許第６，１３６，２９３号）で初めて開示されたようなマイクロバブルの水性懸濁液は、リン脂質の膜形成サーファクタントと場合により親水性の安定剤とから製造され、本発明でも使用可能である。本発明の好ましい実施形態において、総リン脂質濃度は０．０１％～２０％であり、マイクロバブル濃度は、好ましくは10^{7}～10^{10}バブル／ｍＬである。本発明のマイクロバブル懸濁液は、数ヶ月間安定を保つことが好ましい。
【０１１２】
好ましくは本発明のバブル濃度は、10^{8}～10^{9}バブル／ｍＬであり、本発明のマイクロバブルで用いられるリン脂質濃度は、マイクロバブル調製方法、マイクロバブル調製に用いられるリン脂質のタイプ、および、本発明の超音波造影剤に対して安定なマイクロバブルを達成するために用いられるペプチドまたはペプチド類似体、Ａの量にある程度依存する。
【０１１３】
本発明の組成物における総リン脂質濃度は、好ましくは、総脂質濃度の０．０１～１０％（ｗ／ｗ）の範囲である。最も好ましくは、０．１～１％（ｗ／ｗ）の範囲である。
【０１１４】
特に、一般式（IIａ）で示されるリン脂質の割合は、好ましくは、総脂質の０．１～２０％である（モル％として計算）。最も好ましくは、０．５～５％（ｗ／ｗ）の範囲である。
【０１１５】
本発明において、当業者が既知の他の添加剤を、膜形成サーファクタントと混合して、上述の脂質に加えることができる。例えば、ポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、および類似の化合物、同様にそれらの様々なコポリマー；脂肪酸、例えばミリスチン酸、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、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、没食子酸プロピル、アスコルビン酸パルミテート、およびブチル化ヒドロキシトルエンを、加えることができる。これら非膜形成サーファクタントの量は、通常、総サーファクタント量の５０重量％以下であるが、好ましくは０～３０％である。
【０１１６】
本発明のマイクロバブル懸濁液は、既知のプロセスを用いて、上記で定義した従来のリン

脂質とを組み合わせて、一般式（IIａ）で示されるリン脂質から調製でき、当該プロセスとしては、例えば、適切な溶媒を用いた原料リン脂質溶液を凍結乾燥または噴霧乾燥させるプロセスがある。水性担体中に分散させることによって上記懸濁液を作製する前に、凍結乾燥または噴霧乾燥したリン脂質粉末を、空気または他のガスに接触させる。水性担体と接触させることにより、リン脂質粉末の構造が崩壊し、層板状化または層状化したセグメントが形成され、その中にガスが分散したマイクロバブルは安定化される。本発明の懸濁液はまた、空気または他のガスとそれらとを接触させる前に層板状化または層状化されてあるリン脂質を用いて調製することもでき、便利である。従って、リン脂質と空気または他のガスとの接触は、リン脂質が乾燥粉末の形態、または、水性担体中で層状化したリン脂質を分散させた形態の場合に行うことができる。

【０１１７】

空気またはガスの、水性担体中に層状化したリン脂質を分散させたもの（例えばリポソーム溶液など）への導入は、通常の方法であるインジェクションによってなされ、すなわち、空気またはガスを小さな穴を通してリポソーム溶液に押し込むか、または、単に圧力をかけることによって溶液中にガスを溶解させ、次に突然圧力を解放することによってなされる。空気またはガスを、層状化したリン脂質を水性担体に分散させたものへ導入する他の方法としては、空気または他の生理学的に許容できるガスの存在下で、リポソーム溶液をかき混ぜる（高い剪断力での均質化）または音波破砕する方法がある。その上、リポソーム溶液自身の内でガスを発生させることができ、例えば、発泡性の化学反応によって、例えば溶存カーボネートまたはジカーボネートを酸で分解することによってなされる。

【０１１８】

層状化したサーファクタントを水性担体中に懸濁し、空気または他のガスを導入することによってマイクロバブルが生じたら、マイクロバブルは、リポソーム小胞の場合のように、自発的に、または、次第に、サーファクタント分子の単分子層（二分子層ではない）で取り巻かれ、安定化される、と考えられる。このようなサーファクタント分子の構造的な再編成は、機械的に（攪拌）または熱的に活性化できる。必要なエネルギーは、非リン脂質サーファクタント剤、例えばポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマー（例えばPluronic：登録商標、またはSynperonic：登録商標）の存在下では、より低い。

【０１１９】

最も好ましくは、他の方法で有機溶媒にリン脂質を溶解し、リポソーム形成段階を行わないで当該溶液を乾燥することによって、層板状化していない、または、層状化していないリン脂質を得てもよい。言い換えれば、これは、リン脂質を、親水性の安定化物質、例えば、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）等のようなポリマー、または、有機溶媒および水の双方に可溶な化合物と共に、適切な有機溶媒に溶解し、その溶液を凍結乾燥または噴霧乾燥することによって、なされ得る。水および有機溶媒に可溶な親水性の安定剤化合物のさらなる例としては、グリコール酸、マルトール等がある。適切な有機溶媒としては、その後の乾燥が容易になるように沸点が十分に低く、かつ融点が十分に高ければ、どのようなものでも使用可能である。代表的な有機溶媒としては、例えば、ジオキサン、シクロヘキサノール、第３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－ブタノールがあるが、２－メチル－２ブタノールと$C_2Cl_4F_2$とが好ましい。この実施形態において、親水性の安定剤の選択基準は、選択された有機溶媒へのその溶解性である。マイクロバブル懸濁液は、層状化したリン脂質粉末を用いた場合と同じ工程を用いて同様の粉末から製造される。また、このような親水性の化合物は、マイクロバブルの粒度分布の均質化を促進し、貯蔵の際の安定性を強化する。実際に、凍結乾燥リン脂質を、例えば重量比でポリエチレングリコール：脂質を１０：１～１０００：１にすることによって安定化し、当該凍結乾燥リン脂質の非常に薄い水溶液（０．０００１～０．０１重量％）を作製することによって、長期間貯蔵したとしても、顕著に目に付く変化なく、安定な水性マイクロバブル懸濁液を製造することができる。水性マイクロバブル懸濁液は、空気を

蓄えた乾燥層状化リン脂質を、振盪や激しい攪拌をほとんど行わずに、単に溶解することによって得られる。

【０１２０】

減圧下での凍結乾燥技術は特に有用であり、なぜなら、生理学的に許容できるガスならどれを用いても乾燥粉末上で圧力を回復することができ、それによって、このような条件下で処理されたリン脂質を分散した後、上記ガスを含むマイクロバブル懸濁液が得られるためである。

【０１２１】

本発明において有用な他のガス含有懸濁液としては、例えば、米国特許第５，７９８，０９１号（Trevino et al）およびＷＯ９７／２９７８３（米国を指定国とする、また、欧州特許第８８１９１５号）で開示されたものがあり、その全体を参照として本明細書に含める。例えば、米国特許第５，７９８，０９１号は、少なくとも第一および第二のサーファクタントの層で取り巻かれた複数のバブルを含むガス乳濁液と述べられたものを開示する。上記第一のサーファクタントとは、疎水性のリン脂質、または、少なくとも１種のアシル鎖を有するリン脂質の混合物であり、当該アシル鎖は少なくとも１０個の炭素原子を含み、総サーファクタントの少なくとも約５％（ｗ／ｗ）を占める。また上記第二のサーファクタントは、リン脂質またはリン脂質の混合物であっても、そうでなくてもよいが、上記第一のサーファクタントで提供されたリン脂質またはリン脂質の組み合わせより高い親水性を有する。好ましい第二のサーファクタントは、リン脂質、ホスホコリン、リソホスホリピッド（lysophospholipid）、非イオン界面活性剤、中性または陰イオンサーファクタント、フッ素化サーファクタント（中性または陰イオン性であり得る）、および、このような乳化剤または発泡剤の組み合わせからなる群より選択することができる。第二のサーファクタントとして有用なサーファクタントのいくつかの特定の例としては、ポリオキシプロピレンとポリオキシエチレンとのブロックコポリマー（このような分類の化合物の例としては、Pluronic、例えばPluronic F-68がある）、糖のエステル、脂肪アルコール、脂肪族アミン酸化物、ヒアルロン酸脂肪族エステル、ヒアルロン酸脂肪族エステル塩、ドデシルポリ（エチレンオキシ）エタノール、ノニルフェノキシポリ（エチレンオキシ）エタノール、誘導体化スターチ、ヒドロキシエチルスターチ脂肪酸エステル、脂肪酸の塩、市販の食用植物性スターチ、デキストラン脂肪酸エステル、ソルビトール脂肪酸エステル、ゼラチン、血清アルブミン、およびそれらの組み合わせが挙げられる。また上記第二のサーファクタントとして考えられるものは、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、例えばポリオキシエチレンステアレート、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、ポリオキシエチル化ソルビタン脂肪酸エステル、グリセロールポリエチレングリコールオキシステアレート、グリセロールポリエチレングリコールリシノレエート、エトキシ化大豆ステロール、エトキシ化ヒマシ油、およびそれらの水素化誘導体である。加えて、非イオン性アルキルグルコシド、例えばTween：登録商標、Span：登録商標、およびBrij：登録商標も、上記第二のサーファクタントとして用いることができる。

【０１２２】

ＷＯ９７／２９７８３は、診断研究に用いるための造影剤を開示しており、当該造影剤は、リン脂質含有両親媒性物質で安定化したガスマイクロバブルの、注射可能な担体水溶液中の懸濁液を含み、前記両親媒性物質は、本質的に、実効電荷を有する分子を主として含むリン脂質からなることを特徴とする。

【０１２３】

ＷＯ９７／２９７８３での教示によれば、調製および／または使用の条件下で、上記造影剤中の望ましくは少なくとも７５％のリン脂質物質、好ましくは実質的に全てのリン脂質物質が、実効電荷の全てを有する分子からなり、当該電荷は正電荷でもよいが、より好ましくは負電荷である。代表的な正電荷リン脂質としては、ジパルミトイルホスファチジン酸またはジステアロイルホスファチジン酸のようなホスファチジン酸と、ヒドロキシエチレンジアミンのようなアミノアルコールとのエステルがある。負電荷リン脂質の例としては、天然に存在する（例えば大豆または卵黄由来）、半合成の（例えば一部または全部水

素化）および合成のホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、およびカルジオリピンがある。一般的に、このようなリン脂質の脂肪酸アシル基はそれぞれ、例えばパルミトイルやステアロイル基のように、約１４～２２個の炭素原子を含み得る。また、このような荷電リン脂質のリソ形態も有用であり、ここで「リソ（lyso）」という用語は、脂肪酸アシル基を１つだけ含むリン脂質を意味し、当該脂肪酸アシル基は、好ましくはグリセリル成分の１位の炭素原子にエステル結合している。このような荷電リン脂質のリソ形態は、２つの脂肪酸アシル基を含む荷電リン脂質と混合して有利に用いることができる。

【０１２４】

これらの造影剤は、米国特許第５，７９８，０９１号またはＷＯ９７／２９７８３で開示されたように調整することができる。例えば、米国特許第５，７９８，０９１号での教示によれば、造影剤は、まず、親水性の単量体またはポリマーもしくはその組み合わせ、第一および第二のサーファクタント、および膨張剤を、水溶液中に分散させることによって調製できる。上記で開示したように、第一のサーファクタントは、リン脂質または少なくとも１種のアシル鎖を有するリン脂質の混合物であり、当該アシル鎖は、少なくとも１０個の炭素原子を含み、総サーファクタントの少なくとも約５％（ｗ／ｗ）を占めることが述べられており、第二のサーファクタントは前記第一のサーファクタントより高い水溶性を有する。次に、上記分散物を噴霧乾燥することによって膨張剤を蒸発させると、いわゆる乾燥した、中空の、粒状の、ほぼマイクロスフェア状物質のようなものが得られる。この乾燥した粒状物質を、少なくとも第一のガスに晒し、次に、水性の液体に溶解してもよく、それによっていわゆる水性ガス乳濁液組成物のようなものが形成される。上記特許によれば、上記組成物は、第一および第二のサーファクタントの層で取り巻かれたガスのバブルを含み、その安定性はリポソームとは無関係であることが述べられている。

【０１２５】

また、これらの造影剤は、ＷＯ９７／２９７８３によっても調製できる。ＷＯ９７／２９７８３によれば、これらの造影剤は、工程：

ｉ）膜形成脂質と称されるものを含む水性媒体中に、ガスマイクロバブルを分散させること；

ii）このようにして得られたガス分散を安定化した脂質を凍結乾燥して、乾燥脂質を含む生成物を得ること、および、

iii）注射可能な担体水溶液中で上記乾燥生成物を再生すること、

を含むプロセスによって調製できることが述べられている。

【０１２６】

工程（i）は、例えば、脂質含有水性媒体を、適切な乳濁液生成技術のいずれかで処理することによって達成することができることが述べられており、上記乳濁液生成技術として例えば、例えば、選択されたガスの存在下でローターステーターホモジナイザーを用いた音波破砕、振盪、高圧での均質化、高速攪拌または高剪断混合がある。上記水性媒体は、所望であれば添加剤を含んでもよく、これらは増粘剤として、および／または、脂質の溶解性補助として役立ち、例えば、アルコールまたはポリオール（例えばグリセロールおよび／またはプロピレングリコール）がある。

【０１２７】

生体適合性のガスであればどれでも本発明の造影剤中に存在してよく、ここで本明細書で用いられる「ガス」という用語は、正常なヒトの体温で実質的に気体状であればどのような物質でもよい（混合物も含む）。従って、当該ガスとしては、例えば、空気；窒素；酸素；CO_2；アルゴン；キセノンまたはクリプトン、フッ素化ガス（例えば、ペルフルオロカーボン、SF_6、SeF_6がある）、低分子量炭化水素（例えば１～７個の炭素原子からなるもの）、例えばアルカン（例えばメタン、エタン、プロパン、ブタンまたはペンタン）、シクロアルカン（例えばシクロプロパン、シクロブタンまたはシクロペンテン）、アルケン（例えばエチレン、プロペン、プロパジエンまたはブテン）、または、アルキン（例えばアセチレンまたはプロピン）および／またはそれらの混合物がある。

【０１２８】
好ましくはフッ素化ガスである。フッ素化ガスとしては、少なくとも１種のフッ素原子を含む物質があり、例えばSF_6、フレオン（１以上の炭素原子とフッ素とからなる有機化合物であって、すなわち、CF_4、C_2F_6、C_3F_8、C_4F_8、C_4F_{10}、$CBrF_3$、CCl_2F_2、C_2ClF_5、および$CBrClF_2$である）およびペルフルオロカーボンである。ペルフルオロカーボンという用語は、炭素とフッ素原子とのみからなる化合物のことであり、特に、飽和、不飽和、および環状のペルフルオロカーボンが含まれる。飽和のペルフルオロカーボンは、通常好ましく、式：C_nF_{n+2}で示され、式中、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、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としては、例えば、CF_4、C_2F_6、C_3F_8、C_4F_8、C_4F_{10}、C_5F_{12}、C_6F_{12}、C_7F_{14}、C_8F_{18}、およびC_9F_{20}がある。好ましくは、ガスまたはガス混合物は、SF_6、または、C_3F_8、C_4F_8、C_4F_{10}、C_5F_{12}、C_6F_{12}、C_7F_{14}、C_8F_{18}からなる群より選択されるペルフルオロカーボンを含み、特にC_4F_{10}が好ましい。

【０１２９】
上述したように、ガスは、上記で定義されたガスの混合物でもよい。なかでも、以下の組み合わせが特に好ましく、すなわち、ガス（Ａ）と（Ｂ）との混合物であり、ここで、少なくとも１種のガス（Ｂ）は、０．５～４１容量％の量で存在し、８０ダルトンより大きい分子量を有し、かつ（Ｂ）はSF_6、CF_4、C_2F_6、C_2F_8、C_3F_6、C_3F_8、C_4F_6、C_4F_8、C_4F_{10}、C_5F_{10}、C_5F_{12}およびそれらの混合物からなる群より選択され、（Ａ）は、空気、酸素、窒素、二酸化炭素およびそれらの混合物からなる群より選択され、上記混合物の残余はガス（Ａ）である。

【０１３０】
一定の環境においては、ガス物質への前駆体（例えば、インビボでガスに変換できる物質）が含まれることが好ましい場合がある。ガス前駆体、および、それより生成するガスが、生理学的に許容できることが好ましい。ガス前駆体は、ｐＨで活性化されるもの、光で活性化されるもの、温度で活性化されるものなどが可能である。例えば、温度によって活性化されるガス前駆体として、特定のペルフルオロカーボンを用いることができる。これらのペルフルオロカーボンは、例えばペルフルオロペンタンであり、これらは、室温（または造影剤を生産する、および／または、貯蔵する温度）より高いが、体温より低い液／気相の転移温度を有するため、上記ガスはヒトの体内で移相し、ガスへ再変換する。

【０１３１】
また実際には、全ての注射可能な組成物は、可能な限り血液と等張であるべきである。従って、注射の前に、少量の等張剤を本発明の懸濁液に加えてもよい。等張剤とは、一般的に薬剤に用いられる生理学的な溶液であり、水性食塩水（０．９％のＮａＣｌ）、２．６％のグリセロール溶液、５％のデキストロース溶液等を含む。

【０１３２】
本発明の方法の好ましい実施形態は、膜形成サーファクタントを選択すること、場合により、当業界で知られた方法または上記で開示された方法のいずれかを用いて当該サーファクタントを層状形態に変換すること、を含む。次に、上記サーファクタントを空気または他のガスと接触させ、密閉した容器中で水性の液状担体と混合し、それによってマイクロバブル懸濁液が形成される。その懸濁液をしばらくの間静置し、形成されたガス充填マイクロバブルの層を容器の上部に上昇させた状態しておく。次に、その母液の下の部分を取り除き、マイクロバブルの上澄み層をマイクロバブル調製に用いたガスを飽和させた水溶液で洗浄する。この洗浄は、実質的に全ての未使用または遊離のサーファクタント分子が除去されるまで、数回繰り返すことができる。未使用または遊離の分子とは、ガスマイクロバブルの周りの安定な単分子層の形成に関係しない全てのサーファクタント分子を意味する。

【０１３３】
本発明の標的化用成分を含むガス含有マイクロバブルの調合物は、適切な生理学的に許容

できる水性担体によって乾燥粉末から再生することによって調製でき、当該生理学的に許容できる水性担体として例えば、緩衝または緩衝していない生理食塩水（０．９％のＮａＣｌ水溶液；１０ｍＭのトリス－ＨＣｌ緩衝液）または５％のデキストロースまたはマンニトール水溶液または２．６％のグリセロール水溶液がある。本発明のマイクロバブルを含む注射可能な治療上有効な組成物の製造を考慮する場合、活性成分を含むマイクロバブルは、既知の添加剤や安定剤を含む、一般的に用いられる生理学的に許容できる担体に懸濁される。

【０１３４】

また本発明のマイクロバブルは、治療上活性な物質の運搬のために用いることもでき、この場合、上記活性物質を膜に含ませることができる。一般式（Ｉａ）または（IIａ）で示される化合物は、特に、脂質の膜物質、または脂質／ポリマーの膜物質に含ませるのに適切である。膜に取り込まれた親油性の活性物質の量は、その性質および分子量による；しかしながら、親油性物質を用いた場合、脂質に対して非常に高い割合の活性な物質が得られる。実質的には、本発明の治療用途に有用で、生物学的に活性ならばどのような物質でも本発明に係るマイクロバブルと共に用いることができ、このような物質としては、これらに限定されないが、抗腫瘍性の、抗脈管形成の、脈管形成の化合物、抗炎症性の化合物、遺伝子、アンチセンス化合物等がある。

【０１３５】

他の観点において、本発明は、マイクロカプセル／微小中空球（微小中空球）をベースとした薬剤に関し、当該薬剤において、一般式（Ｉ）およびより特定には（IIａ）で示される新規の化合物を含ませることができる。上述したように、「微小中空球」という用語は、物質的な境界または包を有するガス充填体を意味する。また、ガス充填リポソーム、例えば、米国特許第５，１２３，４１４号（Unger）（参考することによって本明細書に含まれる）によるガス充填リポソームもこのカテゴリーに属する。このような異なる調合物に関してより多くのものが、欧州特許－Ａ－０３２４９３８（米国特許第４，８４４，８８２号、Widder et al.）、米国特許第５，７１１，９３３号（Bichon et al.）、米国特許第４，９００，５４０号（Ryan）、米国特許第５，２３０，８８２号（Unger）、第５，４６９，８５４号（Unger）、第５，５８５，１１２号（Unger）、米国特許第４，７１８，４３３号（Feinstein）、米国特許第４７７４，９５８号（Feinstein）、ＷＯ９５／０１１８７（ＭＢＩ、米国を指定国とする）、米国特許第５，５２９，７６６号（Nycomed）、米国特許第５，５３６，４９０号（Nycomed）、米国特許第５，９９０，２６３号（Nycomed）で見出すことができ、これらの内容は、参照として本明細書に含まれる。

【０１３６】

好ましい本発明の微小中空球は、生分解性の生理学的に適合可能なポリマーB_3、または、生分解性の固形脂質B_{3a}で構成される包（envelope）を有する。

本発明の微小中空球の調製に有用な上記ポリマーB_3は、例えば、以下の特許のいずれかで説明されるような、生分解性の生理学的に適合可能なポリマーから選択することができ、すなわち、欧州特許第４５８７４５号、米国特許第５，７１１，９３３号、米国特許第５，８４０，２７５号、欧州特許第５５４２１３号、米国特許第５，４１３，７７４号および米国特許第５，５７８，２９２号であり、これらの全内容はいずれも、参照として本明細書に含まれる。特に、包または境界膜を構成するポリマーは、生分解性の生理学的に適合可能なポリマー、例えば水溶性が低いポリサッカリド、ポリラクチド、およびポリグリコリド、ならびにそのコポリマー、ラクチドとラクトンとのコポリマー、例えばε－カプロラクトン、γ－バレロラクトン、およびポリペプチドから選択することができる。敏感な患者の場合、天然タンパク質（アルブミン、ゼラチン）で製造された微小中空球（米国特許第４，２７６，８８５号またはＥＰ－Ａ－３２４．９３８など）の使用は避けることが望まれるため、合成ポリマー選択における広い多角性は、本発明の他の利点である。

他の適切なポリマーとしては、ポリ（オルト）エステル（例えば、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）；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、例えばＤＥＸＯＮ（J. Heller, Biomaterials 1（1980), 51を参照）；ポリ（ＤＬ－ラクチド－ｃｏ－ε－カプロラクトン）、ポリ（ＤＬ－ラクチド－ｃｏ－γ－バレロラクトン）、ポリ（ＤＬ－ラクチド－ｃｏ－γ－ブチロラクトン）、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；ポリジオキサノン；ポリ－β－アミノケトン（Polymer 23(1982), 1693）；ポリホフファゼン（Science 193（1976), 1214）；およびポリ無水物（polyanhydride）がある。生分解性のポリマーに関する参考文献としては、R. Langer et al., Macromol. Chem. Phys. C23（1983), 61 －126がある。また、ポリアミノ酸、例えばポリグルタミン酸およびポリアスパラギン酸も用いることができ、同様に、その誘導体、すなわち、低級アルコールまたはグリコールとの部分エステルも用いることができる。このようなポリマーの有用な例の一つとして、ポリ（ｔ－ブチル－グルタメート）がある。また、他のアミノ酸（例えばメチオニン、ロイシン、バリン、プロリン、グリシン、アラニン（alamine）等）とのコポリマーも、可能である。近年、生分解性を調節したポリグルタミン酸およびポリアスパラギン酸の新規の誘導体が報告されている（ＷＯ８７／０３８９１；米国特許第４，８８８，３９８号および欧州特許第１３０．９３５号を参照、参照することによって本明細書に含まれる）。本発明で有用な脂質B_{3a}を以下に開示する。

【０１３７】

本発明の特定の用途において特に有用であり得る微小中空球は、圧力を保持する微小中空球であり、様々な圧力下で一時的に変形できる軟らかく弾性のある膜で境界をなし、強化したエコー発生性（echogenicity）が付与され、生分解性である。

【０１３８】

本発明の微小中空球に配合することができる一般式（Ｉ）で示される化合物の量は、例えば、特に関与するポリマーB_3または脂質B_{3a}によって変動させることができる。特定の好ましい実施形態において、標的化用成分を含む微小中空球組成物は、一般式（Ｉ）で示される化合物を、ポリマーB_3または脂質B_{3a}総量の０．５モル％～５０モル％含んでよい。より好ましい範囲は、上記総量の５％～１５％である。

【０１３９】

本発明の微小中空球は、好ましくは、水相（通常、乳濁液安定剤として増粘剤を含む）中で疎水性相を乳化剤を用いて乳化し、それにより疎水性相の液滴状の水中油型乳濁液を得て、続いてそこに、揮発性有機溶媒に溶解した膜形成ポリマーを、水相と混和しなように加えることによって調製される。

【０１４０】

本発明に係る超音波による画像化に適した空気またはガス充填微小中空球は、既知の技術を応用して調整可能であり、その際、球のサイズ、バルーン壁の透過性または不透過性、および、空気または選択されたガスでカプセル封入された液相の置換を望ましい範囲に制御するのに適切な条件が用いられる。それらが目的とする使用、すなわち非経口投与（平均サイズは約０．５～１０μｍ）に微小中空球を適用するためには、全ての球のサイズを制御することが重要である。注射可能な水性担体相を確実に浸透させないために、または、エコーグラフ測定を損なわない程度の遅い速度で浸透させるために、バルーン壁の透過性の制御は重要であるが、相対的に速い試験後の生分解性、すなわち、確実に生物が迅速に懸濁液を代謝するのに十分であればよい。また、微小中空球の包の微孔質構造（厚さ５０～５００ｎｍの微小中空球の包において、数ｎｍ～数百ｎｍまたはそれ以上の孔）がそれらの弾性に影響し、すなわち、マイクロスフェアは、崩壊することなく、容易に圧力変化を受け入れることができる。好ましい孔サイズの範囲は、約５０～２０００ｎｍである。

【０１４１】

（Ｉａ）で示される本発明の化合物と混合されたポリマーB_3で構成される生分解性の包を有する微小中空球を形成するための好ましい方法としては、以下の方法があり、すなわち、

疎水性の有機相を水相に乳化することによって、水相中の水中油型乳濁液として前記疎水

性相の液滴を得て、
上記乳濁液に、水相に不溶な揮発性溶媒中の一般式（Ｉ）で示される化合物と共に、ポリマー溶液を加えることによって、上記液滴の周囲にポリマー層を形成し、
揮発性溶媒を蒸発させて、上記ポリマーを界面析出によって上記液滴の周りに付着させ、続いて当該液滴は、ポリマー膜でカプセル封入された疎水性相のコアを有するビーズを形成し、当該ビーズは水相における懸濁液の状態である、および、
カプセル封入された疎水性相を蒸発により除去できるような条件下で、上記懸濁液を減圧下にさらす、
という方法である。

【０１４２】

好ましくは、疎水性相は、減圧下で、実質的に水相と同時に疎水性相を蒸発させ、空気またはガスで置換し、それによって乾燥した、自由に流動する、容易に分散する微小中空球が得られるように選択される。より好ましくは、ポリマー添加および揮発性溶媒の蒸発工程を省略し、減圧している間に界面析出によりポリマー膜を形成することである。

【０１４３】

微小中空球の膜の透過性を制御を可能にする一つの要因は、上述の方法の場合は減圧している間の、例えば、以下で列挙する実施形態の場合は凍結乾燥条件下での、水の蒸発速度に対する疎水性相の蒸発速度である。例えば、蒸発が約－４０℃～０℃で行われ、疎水性相としてヘキサンが用いられ、５０：５０のＤＬ－ラクチド／グリコリドコポリマーが界面析出したポリマーである場合、比較的大きい孔を有するビーズは、選択された温度範囲における炭化水素の蒸気圧によって得られ、ここで上記温度範囲は水の場合より顕著に大きい。このようにして成立した条件によって、球の内部と外部との圧力差により膜の孔サイズは大きくなり、内部の物質を蒸発させることができる。それに対し、疎水性相としてシクロオクタン（水の蒸気圧と同じ－１７℃の蒸気圧を有する）を用いれば、蒸発中の球の内部と外部との圧力差が最小化されるため、非常に小さい孔を有するビーズを得ることができる。

【０１４４】

要求される多孔度に従って、本発明の微小中空球は、数時間から数ヶ月間、水性担体中で安定化することができ、再現可能なエコーグラフシグナルを長期間にわたり得ることができる。実際に、選択されたポリマーに従って、適切な浸透圧特性を有する、すなわち、適切な濃度で溶質を含む担体液に懸濁した際に、微小中空球の膜を実質的に不浸透性にすることができる。特筆すべきことは、本発明の微小中空球の包における微小孔の存在は、エコーグラフ応答にも関連する可能性があることであり、すなわち、他の全ての要因が一定の場合、微孔質の小胞は、相当する非多孔質の小胞に比べてより有効なエコーグラフシグナルを提供する。本発明において、約－４０℃～０℃の程度と同様のオーダーの蒸気圧を有する他の水不溶性有機溶媒は、疎水性溶媒として便利である。当該水不溶性有機溶媒としては、炭化水素、例えば、ｎ－オクタン、シクロオクタン、ジメチルシクロヘキサン、エチル－シクロヘキサン、２－、３－および４－メチル－ヘプタン、３－エチル－ヘキサン、トルエン、キシレン、２－メチル－２－ヘプタン、２，２，３，３－テトラメチルブタン等がある。この範囲において、エステル、例えば、プロピルおよびイソプロピルブチレート、および、イソブチレート、蟻酸ブチル等も便利である。凍結乾燥の他の利点は、空気の代わりにガスの減圧下で操作できることであり、それによって、ガス充填微小中空球を得ることができる。生理学的に許容できるガスとは、ガス充填マイクロバブルに関して挙げたものがある。放射性のトレーサー活性を有するガスを考慮してもよい。

【０１４５】

界面析出させるためにポリマーを溶解するために用いる揮発性、水不溶性溶媒として、ハロ化合物（halo－compounds）を用いてもよく、当該ハロ化合物として例えばCCl_4、CH_3Br、CH_2Cl_2、クロロホルム、上記で定義したペルフルオロカーボン、低沸点エステル、例えばメチル、エチルおよびプロピルアセテート、同様に、水溶性が低い低級エーテルおよびケトンがある。全く水に不溶性ではない溶媒、例えばジエチルエーテルを用

いる場合、予め前記溶媒で飽和させた水溶液を水相として用いることが有利である。

【０１４６】

疎水性相が水中油型乳濁液として乳化されている水相は、好ましくは、１～２０重量％の水溶性の親水性化合物（例えば糖）と、安定剤としてポリマー、例えばポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ゼラチン、ポリグルタミン酸、アルブミン、およびポリサッカリド（例えばスターチ、デキストラン、寒天、キサンタン等）を含む。類似の水相を、使用前に微小中空球が懸濁された担体液として用いてもよい。

【０１４７】

この水溶性ポリマーの一部を、微小中空球の包のなかに残してもよいし、または、カプセル封入された疎水性のコア相を最後に蒸発させる前に、それらを洗浄することによって除去してもよい。

【０１４８】

水相で疎水性相の水中油型乳濁液を得るために用いられる乳化剤（０．１～５重量％）としては、殆どの生理学的に許容できる乳化剤があり、例えば、上記で定義されたリン脂質である。また乳化剤としては、サーファクタント、例えば遊離脂肪酸、ポリオキシアルキレン化合物（例えば、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）との脂肪酸エステル；ポリオキシアルキレングリコールとの脂肪アルコールエーテル；ポリオキシアルキル化ソルビタンとの脂肪酸エステル；石鹸；グリセロール－ポリアルキレンステアレート；グリセロールポリオキシエチレンリシノレエート；ポリアルキレングリコールのホモポリマーおよびコポリマー；ポリエトキシ化大豆油およびヒマシ油、同様に水素化誘導体；脂肪酸、脂肪アルコール、場合によりポリオキシアルキル化されたものとの、スクロースまたは他の炭化水素のエーテルおよびエステル；飽和または不飽和の脂肪酸のモノ、ジおよびトリグリセリド；グリセリドまたは大豆油およびスクロースがある。

【０１４９】

添加剤を微小中空球のポリマー膜に含ませて、物理的な特性、例えば分散性、弾性、および透水性を改変させることができる。ポリマーを含ませるために、添加剤をポリマーを含む相（例えば水相で乳化しようとする疎水性相）に溶解させ、それによって、界面で膜が形成される間に、それらとポリマーとを共沈させることができる。

【０１５０】

有用な添加剤としては、透水性を減少させるために微小中空球の膜を「疎水性化（hydrophobize）」できる化合物があり、例えば、脂肪、ワックスおよび高分子炭化水素である。注射可能な液状担体中の微小中空球の分散性を高め、かつ本発明の組成物に含ませることができる添加剤としては、リン脂質のような両親媒性化合物がある。また当該両親媒性化合物は、透水性および／または生分解性速度を高めることもできる。

【０１５１】

膜の弾性を高め、かつ本発明の組成物に含ませることができる添加剤としては、イソプロピルミリステート等の可塑剤がある。また、非常に有用な添加剤は、膜それ自身のポリマーと同種であるが、比較的低分子量のポリマーで構成される。例えば、膜形成物質として、ポリ乳酸／ポリグリコール酸型のコポリマーを用いる場合、添加剤として、低分子量（１０００～１５，０００ダルトン）のポリグリコリドまたはポリラクチドを含ませることによって、膜の特性を有利に改変することができる（軟らかさや生分解性を高める）。また、低いＭｗに調節したポリエチレングリコール（例えばＰＥＧ２０００）も、有用な柔軟剤である。

【０１５２】

ステロール類は、他のグリセリドおよび／または脂肪酸と混合して用いることが好ましく、コレステロール、フィトステロール、ラノステロール、エルゴステロールなど、および上述の脂肪酸とのステロールエステルから選択されるが、コレステロールが好ましい。

【０１５３】

また本発明の微小中空球は、ＷＯ－Ａ－９６／１５８１５に記載の方法に従って調製することができ、すなわち、１以上の生分解性の固形脂質を、室温で、空気またはガスを含むコアをカプセル封入するのに用いる場合に、特に有用な、数μｍ～１０００μｍの平均サイズを有する固形マイクロカプセルを得ることができる、という驚くべき発見に基づいて調製することができる。有用な生分解性の脂質$Ｂ_{3a}$は、固形の水不溶性のモノ－、ジ－またはトリグリセリド、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロール、例えばコレステロール、ワックス、およびそれらの混合物である。モノ、ジおよびトリグリセリドとしては、主としてモノ、ジおよびトリラウリン化合物、同様に、それに相当するミリスチン、パルミチン、ステアリン、アラキジンおよびベヘニン誘導体がある。モノ、ジおよびトリミリスチン、－パルミチン、－ステアリン、および混合トリグリセリド、例えばジパルミトイルモノオレイルグリセリドが特に有用であるが、トリパルミチンおよびトリステアリンが好ましい。脂肪酸、または、脂肪酸とグリセリドおよび／またはステロールとの混合物から製造する場合、上記脂肪酸としては、室温で固形であり、１２個またはそれ以上の炭素原子を有する全ての脂肪酸が含まれる（好ましくは飽和されている）。このような脂肪酸としては、例えば、ラウリン酸、アラキジン酸、ベヘニン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、セバシン酸、ミリスチン酸、セロチン酸（cerotinic）、メリシン酸およびエルカ酸、脂肪酸エステルがある。好ましくは、脂肪酸およびそのエステルを他のグリセリドと混合して用いる。

【０１５４】

好ましい微小中空球組成物は、トリグリセリド、例えばトリパルミチン、トリステアリンまたは上述のトリグリセリドの混合物を用いて得られた。ジグリセリドを用いた場合、低い収率で、わずかに凝集する傾向を有する微小中空球が得られた。モノグリセリドを用いた場合、最も低い収率で、微小中空球が得られた。最も良好な微小中空球は、かなり疎水性の物質から得られ、疎水性が減少するにつれて、または表面活性が増加するにつれて、得られる微小中空球の質と量が低下する、という事実が、疎水性の度合により説明できるようである。用いられるトリグリセリド（脂質）が疎水性であればあるほど、微小中空球の収率は高くなり、製造プロセスをより円滑にすることができる。

【０１５５】

場合により、生分解性の水不溶性脂質は、生分解性のポリマーの７５重量％まで混合させることができる。生分解性のポリマーの量は、７５重量％までに限定され、なぜなら、グリセリド／ポリマー混合物の生分解性は、組成の一次関数には従わない、すなわち、生分解性は、混合物中に存在するポリマーの量の直接的な比率において増減しないで、ポリマーの生分解性よりむしろグリセリドの生分解性によって決定または影響されるためである。これは、２５重量％以上のグリセリドを含む混合物が、ポリマーの生分解性より脂質の生分解性に近い生分解性を有するように、グリセリド量が２５重量％と同等またはそれ以上でありさえすればよい。しかしながら、７５重量％以上のポリマーを含む混合物は、純粋なポリマーの生分解性により近い生分解性を有する。これは、生分解性の点で、２５％未満のグリセリドを含む混合物がほとんど純粋なポリマーのような挙動を示すことを意味する。しかしながら、脂質の量が２５％に近づく場合、混合物の特徴は変化し、さらに、脂質量が増加すると、ポリマーに脂質の生分解性速度が強制されるために、より重大な影響を混合物の生分解性に与えることができ、すなわち、ポリマー存在量を考慮して、予想以上の生分解性を混合物に与えることができる。これによって、混合物の生分解性は、個々の生分解性の単なる合計ではなく、過剰に存在する成分によって決定される、ということが明瞭に証明されるが、ただしこれは、グリセリドの影響が優勢であるような場合においてである。７５重量％を超過するポリマーを含む組成物に関して、その生分解性は、純粋なポリマーの生分解性に迅速に近づく。

【０１５６】

本発明の中空の微小中空球を含むグリセリドは、好ましくは、水中油型乳濁液が生成するように、有機溶媒に溶解させたマイクロカプセル包の１以上の固形成分からなる混合物を、水性担体相に分散させることによって、０．１μｍ～１０００μｍの平均サイズで調製

される。乳濁液の水相は、乳濁液を安定化させるのに用いる有効量のサーファクタントを含み得る。サーファクタント、例えば（ＰＶＡ）、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマー、リン脂質、例えば、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、およびそれらの混合物、ソルビタンエーテル、ソルビタンエステル、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、エトキシ化飽和グリセリド、および、部分的な脂肪酸グリセリドまたはポリグリセリド等を用いることができるが、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマー（例えばPluronico：登録商標、またはSynperonic：登録商標）およびリン脂質が好ましい。サーファクタントの存在は、最終産物のサイズまたは粒度分布が重要な場合にのみ必須である。非経口投与を目的として調整される場合、水相中のサーファクタントの存在は重要である。－３０℃より低い温度で凍結する前に、一定量の再分散剤を、水相中に有機溶液の小さい液滴を含む乳濁液に加える。次に、凍結乳濁液を減圧下にさらし、凍結乾燥する、すなわち、昇華によって液滴から有機溶媒を除去し、担体相の水を除去する。いかなる特定の理論によって束縛されることを好まないが、このように溶媒が比較的ゆっくり除去される間、膜成分は、凍った水の境界に到達するまで液滴の外面へ向かって移動し、そこでさらなる膜成分の動きが妨害され、それにより溶媒／氷の界面で分子レベルで組織化した緻密な析出層が形成され、溶媒と氷とが接した領域において、すなわち、溶媒と氷との界面で半晶質構造が得られる、ということが仮定できる。

【０１５７】

どのような便利な再分散剤を用いてもよいが、アルブミン、ゼラチン、ＰＶＰ、ＰＶＡ、ＰＥＧおよびポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマーから選択される再分散剤が好ましい。微小中空球が、融合していない形態で、即座に分散可能な乾燥粉末の形態である場合、粒子の凝集を防ぐために加えられる再分散剤が特に有用である。長期間貯蔵するために製造する場合、または、疎水性トリグリセリド系物質、例えばトリパルミチンまたはトリステアリンから製造する場合、本発明の微小中空球の調製は、１以上の再分散剤をさらに含む。微小中空球がガス充填リポソームを含む場合、微小中空球は、例えば、米国特許第５，１２３，４１４号、米国特許第５，４６９，８５４号、米国特許第５，５８５，１１２号およびＷＯ９２／２２２４７（Unger）（米国を指定国とする；これらの全内容は、参照として本明細書に含まれる）で説明されるように調製することができ、本明細書で説明された本発明の標的化用成分を含むように合わせる。

【０１５８】

本発明により製造された中空の微小中空球の多孔度は、通常、非常に低く、しばしば微小中空球は孔を全く有さない。多孔度は、脂質濃度またはマイクロカプセルの壁厚さの関数と考えられる。多孔質の場合、本発明の微小中空球は、２０～２，０００ｎｍの範囲の孔サイズを有する。

【０１５９】

すでに上述したように、本発明の微小中空球が１以上の生分解性の水不溶性脂質B_{3a}と生分解性のポリマーB_3との混合物から調製される場合、７５重量％までのポリマーを用いることができる。製造の際に、それぞれの脂質B_3と生分解性のポリマーB_3との比率を調節することによって、投与後の半減期を調節した微小中空球をカスタマイズできる。ポリマーの正確な量は、用途に依存し、要求される生分解性の度合いに直接関係する。例えば、特定の持続放出性の用途のためには、生分解性のポリマーの量は、３０重量％～６０重量％程度、場合によっては７５重量％までが可能である。しかしながら、本発明の微小中空球がエコーグラフ画像化法に用いられる場合、体からの望ましいクリアランス率により、生分解性のポリマーの量は、１～５０重量％、好ましくは０．５～１０重量％、また少なくとも０．１重量％であり得る。

【０１６０】

超音波検査法で用いられる微小中空球は、通常、比較的薄い壁を有し（例えば５０～５００ｎｍの厚さ）、それらの生分解性は非常に迅速であるため、特に有利である（すなわち

、脂質の包の体からのクリアランスが比較的短時間で起こる）。

【０１６１】

しかしながら、上述したように微小中空球が１以上の水不溶性の脂質B_{3a}と生分解性のポリマーB_3との混合物から製造される場合、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が好ましい。

【０１６２】

本発明の微小中空球は、治療上活性な物質の運搬に用いることができ、この場合、活性な物質は、膜に含めてもよいし、コアに添加してもよい。一般式（Ia）または（IIａ）で示される化合物は、脂質の膜物質または脂質／ポリマー膜物質に含ませるのに特に適切である。膜に含ませた親油性の活性物質の量は、その性質と分子量に依存するが、親油性の物質を用いた場合、活性物質が脂質に対して非常に高い割合になる。実質的には、本発明の治療用途に有用な生物学的に活性な物質のいずれも本発明に係る微小中空球と共に用いることができる。このような物質としては、これらに限定されないが、抗腫瘍性の、抗脈管形成の、脈管形成の化合物、抗炎症性の化合物、遺伝子、アンチセンス化合物等がある。

【０１６３】

本発明の微小中空球を活性物質のための運搬賦形剤として用いた場合、出発原料における脂質または脂質／ポリマー混合物の濃度を変化させることによって、異なる効果が得られる、ということが実験により示された。比較的薄い壁を有し、脂質または脂質／ポリマーに対して高い割合の活性物質を含む、すなわち、活性成分が高濃度の微小中空球により、周囲の組織でのショック治療を行うことができる、ということが確立された。本発明の微小中空球の特定の利点は、一定レベルに活性物質濃度を維持しながら割合または壁厚さを変化させることによって、ショック治療をカスタマイズし、それにより持続放出性システム形態を実現することができる、という事実にある。上記システムは、順に、含まれる物質に、意図された治療に、さらに患者の生理的な状態にも完全に適合させることができる。

【０１６４】

本発明は、当業者が既知の任意の添加剤および安定剤を含む製薬上許容できる液状担体中に有効な量の微小中空球の懸濁液を含む注射可能な組成物を提供する。

【０１６５】

エコーグラフ用造影剤は、本発明の微小中空球を適切な生理学的に許容できる水性担体に懸濁することによって容易に製造でき、当該水性担体として例えば、緩衝または非緩衝生理的食塩水（０．９％のＮａＣｌ水溶液；１０ｍＭのトリス－ＨＣｌ緩衝液）または５％のデキストロースまたはマンニトール水溶液または２．６％のグリセロール水溶液がある。本発明の微小中空球を含む注射可能な治療上有効な組成物の製造を考慮する場合、活性成分を含む微小中空球は、既知の添加剤および安定剤を含み、一般的に用いられる生理学的に許容できる担体に懸濁される。

【０１６６】

他の有用なガス含有造影剤の調合物は、ガス含有固形システム、例えば、そのなかにガスを含む、あるいは、それに接するガスを含む極微粒子（特に、極微粒子の凝集体）を含む（それに含まれるガスを含む、あるいは、それに接するガスを含む（例えば、その表面に吸着される、および／または、その中の空隙、空洞または孔に含まれる）粒子（特に、極微粒子の凝集体）に関して）。これらの造影剤は、本明細書で説明された本発明の標的化用成分を含むように適合させることができる。これらの造影剤を調製する方法としては、欧州特許第０１２２６２４号、欧州特許第０１２３２３５号、欧州特許第０３６５４６７号、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で説明された方法があり、これらの全内容はいずれも、参照として本明細書に含まれる。これら造影剤のエコー発生性は、含まれる／接するガスから、および／または、ガス（例えば本明細書で説明された）から直接得られることがわかる。これら造影剤の調製方法としては、欧州特許第０１２２６２

４号、欧州特許第０１２３２３５号、欧州特許第０３６５４６７号、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で説明された方法があり、これらの全内容はいずれも、参照として本明細書に含まれる。これら造影剤のエコー発生性は、含まれるガス／接するガスから、および／または、固形物質（例えば、極微粒子構造の溶解物上で）から解放されたガス（例えばマイクロバブル）から直接得られることがわかる。

【０１６７】

本発明の他の観点において、我々は、インビトロおよびインビボの本発明の薬剤のスクリーニングに関する新規のモデル（動物に対してのみ）を見出し、それにおいて、上記化合物は、検出可能なラベル（例えば蛍光染料）で標識されたポリマービーズまたは他の非脂質ポリマー物質に付着される。

【０１６８】

一般的に、望ましい部位へ結合した化合物のインビトロのスクリーニングは、適切なインビトロモデルで、標識した（放射性、蛍光性など）形態の化合物とインキュベートすることによって達成される。このような、化合物の結合を測定するために開発された分析は、いくつか制限がある。第一に、分析の感度が、しばしば、結合を容易に検出または定量できないほど低い。このため、多くのスクリーニング分析は、結合性標的を過剰発現するように操作した細胞系の細胞全部または膜分画を利用する。正確な結合性標的が未知の場合、または、遺伝学的方法により容易に発現されない場合、この方法はうまくいかない。第二に、上記分析は、通常、比較的高い親和性の結合現象しか検出できない。これは、適度に固い結合化合物を同定し、続いて結合を改善するために最適化し得る機会が失われる、ということを意味する。しかしながら、ビーズまたは他の粒子に化合物を付着させることによって、標識された化合物を用いたスクリーニングの限定を大きく克服することができる。ビーズまたは他の粒子の外径に付着させた（diameterattaching）化合物を含む、１種の蛍光標識したビーズにより、標識された化合物を用いたスクリーニングの限定を大きく克服することができる。約１μｍまたはそれ以上の直径を有する、１種の蛍光標識されたビーズは、通常の蛍光顕微鏡を用いて、容易に見られることができる。より高いスループットのスクリーニングに関して、蛍光ビーズは、蛍光マイクロプレートリーダー上で容易に検出および定量することができる。あるいは、容易に検出可能な量を、本発明の造影剤に含ませることができる。このような放射性物質を用いた分析は、個々に標識された化合物分子を用いるよりも高感度であり得る。

【０１６９】

スクリーニング目的で化合物をビーズに付着させることの他の利点は、１個のビーズにつき多数の化合物分子が付着するようになることである。結果的に分子が多価を示すことによって、ビーズの標的に対する結合活性が高められ、１種の分子として化合物の結合強度が比較的低いため、より古いスクリーニング分析では同定できなかった可能性のある化合物を検出することができる。その上、本発明の薬剤上の標的化用成分へのアクセスを改変させることができ、なぜなら、標的化用成分は大部分の表面上に提示されるからである。従って、標的化用成分は、小胞またはビーズに結合し、続いて、小分子または個々の分子として、異なる標的と相互作用できる。従って、本発明の他の観点は、同様に誘導体化された約１μｍ以上のマイクロスフェアの動作を予測するための、容易に調製されたビーズの使用であり、通常の蛍光顕微鏡を用いて用意に見ることができる。より高いスループットのスクリーニングに関して、蛍光ビーズは、蛍光マイクロプレートリーダー上で容易に検出および定量できる。あるいは、放射活性の容易に検出可能な量を、本発明の薬剤に配合することができる。このような放射性物質を用いた分析は、個々に標識された化合物分子を用いるより高感度であり得る。

【０１７０】

スクリーニング目的で化合物をビーズに付着させることの他の利点は、１個のビーズにつき多数の化合物分子が付着するようになることである。結果的に分子が多価を示すことに

よって、ビーズの標的に対する結合活性が高められ、１種の分子として化合物の結合強度が比較的低いため、より古いスクリーニング分析では同定できなかった可能性のある化合物を検出することができる。その上、本発明の薬剤上での標的化用成分へのアクセスを改変させることができ、なぜなら、標的化用成分は大部分の表面上に提示されるからである。従って、標的化用成分は、小胞またはビーズに結合し、続いて、小分子または個々の分子として、異なる標的と相互作用できる。従って、本発明の他の観点は、同様に誘導体化されたマイクロスフェアの動作を予測するための、容易に調製されたビーズの使用である。

【０１７１】

従って、本発明は、スクリーニングおよび他の分析で用いるために、ＴＫＰＰＲ（またはＴＫＰＰＲ類似体）の単量体、多量体またはポリマーをビーズに付着させることを含む。この実施形態において、本発明は、一般式：Ａ－Ｌ－$Ｂ_2$（Ｉｂ）で示される化合物を提供し、式中、

$Ｂ_2$は、共有結合でリンカーと結合することができる非脂質ポリマーであり、ＡおよびＬは、上記の定義と同じ意味を有する。

【０１７２】

本発明の好ましい実施形態において、$Ｂ_2$は、ポリマー$Ｂ_{2a}$に相当し、当該ポリマーは、酸基またはアミノ基のような官能基を含む極微粒子またはビーズを製造するのに用いられ、化学物質（chemical entity）に結合することができるか、または、$Ｂ_2$は、ビーズそのものである。一般的に、極微粒子は、球状または不規則な形で、その直径は約５０μｍ未満である、と考えられている。極微粒子は、いくつかの実践的な方法によって、様々な重合可能な単量体から調製することができ、当該単量体として例えば、スチレン、アクリレートおよび不飽和塩化物、エステル、アセテート、アミドおよびアルコールがある。極微粒子は、１以上の第二のポリマーでコーティングし、粒子の表面特性を改造することによって、さらに改変することができる。

【０１７３】

本発明のより好ましい実施形態において、上記ビーズは、市販のビーズであり、当該ビーズは、誘導体化可能であり、場合により検出可能なラベルを含んでもよい。検出可能なラベルは、好ましくは、当業界で知られたような、光または放射性シグナルを発生するものである。

【０１７４】

例えば、蛍光染料で標識されたビーズは、広範な用途で使用できることがわかっている。蛍光ビーズは、単分散の、化学的に不活性な生体適合性の粒子を用いることによって利益がある用途において最も一般的に用いられ、当該生体適合性の粒子は、検出可能な蛍光を放出し、その環境で特定の物質に結合できる。例えば、生物学的な分子を付着させた蛍光性の粒子は、核酸検出のためのイムノアッセイに（米国特許第４，８０８，５２４号（１９８９））および配列解析に（Vener, et al. ANALYT. BIOCHEM. 198, 308 (1991); Kremsky, et al., NUCLEIC ACIDS RES. 15, 2891 (1987); Wolf, et al., NUCLEIC ACIDS RES. 15, 2911 (1987)）、細胞表面抗原に対するラベルとして、ＦＬＯＷ　ＣＹＴＯＭＥＴＲＹ　ＡＮＤ　ＳＯＲＴＩＮＧ，ｃｈ．２０（2@nd ed.（1990））、および、細胞代謝プロセスを研究するためのトレーサーとして（J. LEUCOCYTE BIOL. 45, 277（1989））用いられる。ビーズの広い表面領域は、典型的な縮合剤を用いて、一般式（IIｂ）で示される化合物またはＡのような化学物質を付着させるのに優れたマトリックスを提供し、一方で、これら粒子の蛍光特性によりそれらビーズを高感度で検出することを可能にする。ビーズは、水性懸濁液中で、または、膜上に捕捉された状態でのいずれかにおいて、その蛍光を定量することができる。

【０１７５】

蛍光ビーズは、様々な画像化技術で視覚化することができ、当該画像化技術としては、通常の光または蛍光顕微鏡法や共焦点レーザー走査顕微鏡法があり、同様に、蛍光／フロー活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）があり、これは場合により細胞を分類する能力を有して

いてもよい。

【０１７６】

最も好ましい本発明のビーズは、蛍光性の、直径が２μの、カルボキシル基またはアミノ基を有するビーズであり、当該ビーズは、当業者既知のように誘導体化することができ、例えば、Molecular Probes社製のビーズがある。

【０１７７】

本発明において、ペプチドＡまたはその類似体は、流動下で、超音波用薬剤、例えばマイクロバブルまたは微小中空球もしくはビーズを、培養したＨＡＥＣ（ヒト大動脈の内皮細胞）に付着させるのに十分な結合強度を提供する。所望であれば、リード化合物の結合強度と安定性は、当業者が既知の方法を用いて最適化することができる。本発明の好ましい実施形態において、化合物ライブラリのビーズへの付着を容易にするために、上記化合物は、ビオチンのようなタグを用いて合成することができ、当該タグは、ビーズ上でアビジンのような受容体分子と強固に連結し、逆もまた同様である。

【０１７８】

上記ビーズは、蛍光または放射活性で必ずしも標識されなくてもよい。上記ビーズの調製は、ビーズを光で可視化する方法（比色法）で検出および定量できるように、または、ビーズが、標的へ特異的に結合した後に活性化可能な酵素または他のシグナルを生じる当業者が既知のシステムを含むようになされる。

【０１７９】

上記ビーズを一般式（IIｂ）で示される化合物と反応させ、一般式（Ｉｂ）で示される薬剤を得ることができる。次に、本発明の標的化用ペプチドを複合させたビーズは、例えば、内皮細胞への結合を評価するために用いることができる。特に、培養したヒトまたはウサギの大動脈の内皮細胞を、血管内皮に関するモデルとして用いた。これら細胞は、既知の内皮細胞に特異的なマーカーであるフォン－ウィルブランド因子およびＶＥ－カドヘリン（詳細には、例えば、H.M. Piper, et al. From H.M. Piper, ed., “Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research”, Springer-Verlag, Berlin (1990); p. 158-177. VE-cadherin was detected by a modification of the method used by Dejana et. al. (E. Dejana, et al., J. Cell Biol. (1987); 104:1403- 1411)参照）を発現させることによって、機械的に内皮細胞であることが証明された。本発明の標的化用ペプチドＡを複合させたビーズを、様々な条件下で、培養したＨＡＥＣ（ヒト大動脈の内皮細胞）の単分子層とインキュベートし、特異的に結合したビーズを定量し、さらに、非誘導体化ビーズ、または、内皮細胞を標的とすることが知られていない化合物（例えば、ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）、ペプチドＧＲＧＤＳＰ（配列番号３）、グリシン）で誘導体化されたビーズと比較した。一般式（IIｂ）で示される化合物により、効果的に誘導体化ビーズはＨＡＥＣを標的化（結合）し、一方で、非誘導体化ビーズ、または、ＢＳＡ、ＧＲＧＤＳＰ、またはグリシンで誘導体化されたビーズは標的化（結合）しない、という結果が示された。

【０１８０】

標的化用成分Ａを含む本発明の超音波造影剤も、同様の方法で処理された。またインキュベーションは、インビボ環境を模擬するため、流動条件下でなされた。このような研究により、超音波造影剤も、標的化用成分ＡによりＨＡＥＣを標的とし、それに対して、標的化用成分を有さない超音波用薬剤は結合しない、ということが示される。さらに、結合は、ウサギのような他の種からの大動脈の内皮細胞に拡張するが、ヒトの非内皮細胞系、ＫＢには拡張しないことが示された。

【０１８１】

本発明の他の好ましい実施形態において、本発明は、式：Ａ－Ｌ－$Ｂ_2$で示される化合物を含み、式中、$Ｂ_2$は、非イオン界面活性剤$Ｂ_{2b}$に相当し、例えば（ＰＶＡ）、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマー、例えばPluronic：登録商標、Synperonic：登録商標、Poloxamer：登録商標、Poloxamine：登録商標またはＢＲＩＪ：登録商標がある。

【０１８２】
これらの化合物は、親油性の鉄粒子をベースとした標的化したＭＲＩ造影剤の調製に特に有用である。本発明の新規の組成物、特にマイクロバブルおよび微小中空球は、上述したように、診断のための画像化における造影剤として有用であり、さらに、生理活性剤を含んでも含んでいなくても、治療剤としても適切である。これは、一般式Ｉで示される化合物を投与することによって達成でき、この際、当該化合物は、脈管形成に関与する受容体（例えばＮＰ－１　ＶＥＧＦ受容体）を占有し、ＶＥＧＦのような内在性の受容体の結合物質に対して非感受性にするような化合物である。
【０１８３】
他の治療方法は、賦形剤として、一般式Ｉで示される化合物を用いることであり、当該化合物により、生物学的に活性な化合物は望ましい部位を標的とすることができる。一実施形態において、本発明の組成物は、１以上の生理活性剤を送達するのに用いることができる。生理活性剤とは、治療的効果または細胞傷害効果などの生物学的な効果を与えることができる化合物である。この実施形態において、基質Ｂが、例えば、リポソーム、極微粒子等のような、既知の薬物運搬賦形剤である。好ましい実施形態において、標的化用成分Ａは、ＴＫＰＰＲ四量体のようなＴＫＰＰＲ多量体である。
【０１８４】
本発明では、生理活性剤は、遺伝物質を含むために用いられるため、基質Ｂも、既知の遺伝子または核酸運搬賦形剤（例えば、ウイルス粒子、遺伝子治療ベクター、リポソーム、脂質（例えばカチオン脂質）と遺伝物質との複合体、デキストラン誘導体と遺伝物質との複合体等）を含むことができる。
【０１８５】
加えて、本明細書中でより詳細に説明したように、Ａ、すなわち本発明の標的化用ペプチドは、生理活性剤含有ガス充填マイクロバブルまたは微小中空球を複合させることができる（場合によりリンカーを介して）。この実施形態において、ガス充填造影剤は、本発明の標的化用ペプチドを含み、従って、当該造影剤は、標的である腫瘍細胞または内皮細胞（および特に脈管形成性の内皮細胞）を標的とすることができる。次に、本発明の標的化された生理活性剤含有超音波造影剤を超音波で破壊し、それにより生理活性剤を放出させることができる。
【０１８６】
生理活性剤と望ましい標的との相互作用は、賦形剤の一部にとどまっている間、または、賦形剤から放出されて起こり、これは受動的な方法でも能動的な方法でもよい。受動的な方法としては、賦形剤がその標的に結合している間に賦形剤から拡散するような方法があり、能動的な方法としては、含まれる生理活性物質の破壊および放出を達成するために賦形剤に高周波または超音波を当てる（insonation）ような方法である。
【０１８７】
様々な生理活性剤のいずれも、本発明の組成物に用いることができ、本発明の組成物によって運搬することができる。生理活性剤とは、本明細書で用いられるように、インビボでの有用な治療的効果または細胞傷害効果を有する生理活性剤を意味する。本明細書で用いられるように、生理活性剤という用語は、遺伝物質を含み、治療剤、化学療法剤、薬物等という用語と同義である。適切な生理活性剤は、これらに限定されないが、抗腫瘍薬、例えば白金化合物（例えばスピロプラチン（spiroplatin）、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、アンサマイトシン、ブレオマイシン、シトシン、アラビノシド、アラビノシルアデニン、メルカプトポリリシン、ビンクリスチン、ブスルファン、クロラムブシル、メルファラン（例えば、ＰＡＭ、ａ、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、プロカルバジン塩酸塩、ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ）、ダウノルビシン塩酸塩、ドキソルビシン塩酸塩、タキソール、マイトマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、アミノグルテチミド、エストラムスチンホスフェートナトリウム、フルタミド、酢酸リュープロライド（leuprolide acetate）、酢酸メゲストロール、クエン酸タモキシ

フェン、テストラクトン、トリロスタン、アムサクリン（ｍ－ＡＭＳＡ）、アスパラギナーゼ（Ｌ－アスパラギナーゼ）、Erwina aparaginase、エトポシド（ＶＰ－１６）、インターフェロンα－２ａ、インターフェロンα－２ｂ、テニポシド（ＶＭ－２６）、硫酸ビンブラスチン（ＶＬＢ）、硫酸ビンクリスチン、硫酸ブレオマイシン、アドリアマイシン、およびアラビノシル；血液製剤、例えば、非経口の鉄、ヘミン、ヘマトポルフィリンおよびその誘導体、生物学的な応答の調節剤、例えば、ムラミールジペプチド、ムラミールトリペプチド、微生物の細胞壁成分、リンフォカイン（例えば、リポポリサッカリドのような細菌内毒素、マクロファージ活性化因子）、細菌（例えばマイコバクテリア、コリネバクテリア）のサブユニット、合成ジペプチドＮ－アセチル－ムラミール－１－アラニル－１）－イソグルタミン；抗菌剤、例えば、ケトコナゾール、ナイスタチン、グリセオフルビン、フルシトシン（５－ｆｃ）、ミコナゾール、アンホテリシンＢ、リシン、およびβ－ラクタム抗生物質（例えば、スルファゼシン（sulfazecin））；ホルモン、例えば成長ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、エストラジオール、ベクロメタゾン、ジプロピオネート、ベタメタゾン、酢酸ベタメタゾンおよびリン酸ベタメタゾンナトリウム、ベタメタゾン（vetamethsone）ジナトリウムホスフェート、ベタメタゾン（veternthsone）ナトリウムホスフェート、酢酸コルチゾン、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、フルニソリド、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンシピオネート、リン酸ナトリウムヒドロコルチゾン、コハク酸ナトリウムヒドロコルチゾン、メチルブレドニゾロン、酢酸メチルブレドニゾロン、コハク酸ナトリウムメチルブレドニゾロン、酢酸パラメタゾン、ブレドニゾロン、酢酸プレドニゾロン、リン酸ナトリウムブレドニゾロン、ブレドニゾロンテブテート、プレドニソン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンジアセテート、トリアムシノロンヘキサセトニド（hexacetonide）および酢酸フルドロコルチゾン；ビタミン、例えば、シアノコバラミンネイノックアシッド（neinoic acid）、レチノイドおよび誘導体、例えば、パルミチン酸レチノール、およびα－トコフェロール；酵素、例えば、マンガンスーパーオキシドジスムターゼまたはアルカリホスファターゼ；抗アレルギー剤、例えば、アメレキサノックス（amelexanox）；抗凝固剤、例えば、フェンプロクーモンおよびヘパリン；循環系作用薬、例えば、プロプラノロール；代謝強化剤（metabolic potentiator）、例えば、グルタチオン；抗結核薬、例えば、パラアミノサリチル酸、イソニアジド、カプレオマイシンスルフェートシクロスクリン（cycloscrine）、エタンブトール塩酸塩エチオンアミド、ピラジンアミド、リファンピン、および硫酸ストレプトマイシン；抗ウイルス剤、例えば、アシクロビア、アマンタジンアジドチミジン（ＡＺＴまたはジドブジン）、リバビリンおよびビダラビン一水化物（アデニンアラビノシド、ａｒａ－Ａ）；抗狭心症薬、例えば、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、エリトリトール四硝酸塩、イソソルビド二硝酸塩、ニトログリセリン（グリセリル三硝酸塩）およびペンタエリトリトール四硝酸塩；抗生物質、抗炎症薬、例えば、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（meclofenamate）、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チレート；抗原虫薬、例えば、クロロキン、水酸化クロロキン、メトロイダゾール（metroidazole）、キニンおよびメグルミンアンチモン酸塩；抗リウマチ薬、例えばペニシラミン；麻酔剤、例えば、アヘンチンキ；アヘン剤、例えば、コデイン、ヘロイン、メタドン、モルヒネおよびアヘン；強心配糖体、例えば、デスラノシド、ジギトキシン、ジゴキシン、ジギタリンおよびジギタリス、神経筋遮断薬、例えば、アトラクトリウムメシレート（atracutrium mesylate）、ガラミントリエチオダイド、臭化ヘキサフルオレニウム、ヨウ化メトクリン、臭化パンクロニウム、塩化スクシニルコリン（塩化スキサメトニウム）、塩化ツボクラリンおよび臭化ベクロニウム；鎮静剤（催眠薬）、例えば、アモバルビタール、アモバルビタールナトリウム、アプロバルビタール、ブタバルビタールナトリウム、抱水クロラール、エトクロルビノール、エチナメート、塩酸フルラゼパム、グルテチミド、塩酸メトトリメプラジン、メチプリロン、塩酸ミダゾラム、パラアルデヒド、ペントバルビタール、ペントバルビタールナトリウム、フェノバルビター

ルナトリウム、セコバルビタールナトリウム、タルブタール、テマゼパム、およびトリアゾラム；局所麻酔剤、例えば、塩酸ブピバカイン、塩酸クロロプロカイン、塩酸エチドカイン、塩酸リドカイン、塩酸メピバカイン、塩酸プロカインおよび塩酸テトラカイン；および全身麻酔剤、例えば、ドロペリドール、エトミデート、ドロペリドールを含むクエン酸フェンタニール、塩酸ケタミン、メトヘキシタールナトリウムおよびチオペンタールナトリウムがある。特定の実施形態において、治療剤は、モノクローナル抗体であり、例えば、黒色腫抗原に結合できるモノクローナル抗体である。

【０１８８】

他の好ましい治療剤は、天然または合成由来の核酸、ＲＮＡ、およびＤＮＡのような遺伝物質を含み、組換えＲＮＡおよびＤＮＡならびにアンチセンスＲＮＡおよびＤＮＡも含まれる。用いることができる遺伝物質のタイプとしては、例えば、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（ＹＡＣ’ｓ）および欠損または「ヘルパー」ウイルスのような発現ベクター、抗原核酸、一本鎖および二本鎖ＲＮＡおよびＤＮＡの両方、ならびにその類似体、例えば、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デオキシヌクレオチドを含む遺伝子がある。加えて、上記遺伝物質は、例えば、脂質、タンパク質、または他のポリマーと組み合わせてもよい。

【０１８９】

特定のタンパク質をコードしたＤＮＡを、多くの異なるタイプの病気の治療に用いることができる。例えば、アデノシンデアミナーゼは、ＡＤＡ欠乏症を治療するために提供され、腫瘍壊死因子および／またはインターロイキン－２は、進行ガンを治療するのに提供され、ＨＤＬ受容体は、肝臓疾患を治療するのに提供され、；チミジンキナーゼは、卵巣ガン、脳腫瘍、またはＨＩＶ感染を治療するのに提供され、ＨＬＡ－Ｂ７は、悪性黒色腫を治療するのに提供され、インターロイキン－２は、神経芽細胞腫、悪性黒色腫、または腎臓ガンを治療するのに提供され、インターロイキン－４は、ガンを治療するのに提供され、ＨＩＶ　ｅｎｖは、ＨＩＶ感染を治療するのに提供され、アンチセンスｒａｓ／ｐ５３は肺ガンを治療するのに提供され、および、第VIII因子は、血友病Ｂを治療するのに提供される。例えば、Science 258, 744-746を参照し、この文献は参照として本明細書に含まれる。

【０１９０】

本発明によれば、一般的には、患者を画像化する方法が提供され、および／または、特定には、患者における病気の組織の存在を診断する方法が提供される。本発明の画像化プロセスは、本発明の造影剤を患者に投与し、次に、例えば、超音波、コンピュータトモグラフィ、および／または、磁気共鳴による画像化もしくはシンチグラフィーを用いて患者をスキャニングすることによって実行され、患者の内部領域の可視の画像、および／または、その領域のいかなる病気の組織の可視の画像を得ることができる。患者の領域とは、患者の全身、もしくは、患者の特定のエリアまたは部分を意味する。

【０１９１】

それにもかかわらず、上述したように、本発明はまた、脈管形成プロセスの抑制剤として有用な治療剤として、ＴＫＰＰＲまたはＴＫＰＰＲ類似体のtimerまたはポリマーの、単量体、多量体またはポリマーを含む組成物を、生理活性剤を存在させないで使用する可能性を提供する。

【０１９２】

本発明の組成物の投与は、通常、非経口であり、その量および期間は、様々な要素に依存し、当該要素として例えば、投与しようとする組成物の容量、患者の体重、対象の領域などである。他の可能な投与経路は、局所適用であり、上述したような、脈管形成に関連する皮膚疾患に特に有用である。

【０１９３】

本発明の実施形態を以下に示す。

１．式：Ａ－Ｌ－Ｂ（Ｉ）で示される化合物であって、式中、

Ａは、ＴＫＰＰＲ、または、ＴＫＰＰＲと同等またはより大きい親和性で、内皮細胞に、

または内皮細胞に共通するマーカーを発現する細胞に特異的に結合するＴＫＰＰＲ類似体であり、
Ｌは、リンカーであり、
Ｂは、基質である。
【０１９４】
２．実施形態１に記載の化合物であって、ここでＢは、$Ｂ_1$に相当し、$Ｂ_1$は、共有結合または共有結合で上記リンカーに結合できる脂質である。
３．実施形態１に記載の化合物であって、ここでＢは、$Ｂ_2$に相当し、$Ｂ_2$は、共有結合で上記リンカーに結合することができる非脂質ポリマーである。
【０１９５】
４．実施形態２に記載の化合物であって、ここでＢは、合成または通常天然に存在する、両親媒性かつ生体適合性の化合物であって、脂肪酸；リソリピッド；リン脂質；ホスファチジルイノシトール；スフィンゴ脂質；糖脂質；グルコリピド；スルファチド；スフィンゴ糖脂質；ホスファチジン酸；ポリマー含有脂質；；スルホン化モノ、ジ、オリゴまたはポリサッカリド含有脂質；コレステロール、硫酸コレステロール；コレステロールヘミスクシネート；トコフェロールヘミスクシネート；エーテルおよびエステル結合脂肪酸を含む脂質；重合化脂質；ジアセチルホスフェート；ジセチルホスフェート；ステアリルアミン；カルジオリピン；炭素鎖長が約６～約８の短鎖脂肪酸を有するリン脂質；非対称のアシル鎖を含む合成リン脂質；セラミド；非イオン性リポソーム；；糖酸のステロールエステル；糖および脂肪酸のエステル；サポニン；グリセロールジラウレート；グリセロールトリラウレート；グリセロールジパルミテート；グリセロール；グリセロールエステル；長鎖アルコール；６－（５－コレステニ－３β－ルオキシ）－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド；ジガラクトシルジグリセリド；６－（５－コレステニ－３β－ルオキシ）ヘキシル－６－アミノ－６－デオキシ－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド；６－（５－コレステニ－３β－ルオキシ）ヘキシル－６－アミノ－６－デオキシ－１－チオ－β－Ｄ－マンノピラノシド；１２－（（（７’－ジエチルアミノクマリン－３－イル）カルボニル）メチルアミノ）オクタデカン酸；Ｎ－［１２－（（（７’－ジエチルアミノクマリン－３－イル）カルボニル）メチルアミノ）オクタデカノイル］－２－アミノパルミチン酸；Ｎ－スクシニルジオレイルホスファチジルエタノールアミン；１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロール；１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－３－スクシニルグリセロール；１，３－ジパルミトイル－２－スクシニルグリセロール；１－ヘキサデシル－２－パルミトイルグリセロホスホエタノールアミン；パルミトイルホモシステイン、およびそれらの組み合わせ、からなる群より選択される。
【０１９６】
５．実施形態３に記載の化合物であって、ここで$Ｂ_2$は、極微粒子の生産に有用なポリマー$Ｂ_{2a}$であり、または、非イオン界面活性剤$Ｂ_{2b}$である。
６．実施形態３に記載の化合物であって、ＰＶＡおよびポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマーからなる群より選択される。
【０１９７】
７．実施形態４に記載の化合物であって、ここで$Ｂ_{2a}$は、誘導体化可能であり、検出可能なラベルに付着されるビーズである。
８．実施形態７に記載の化合物であって、ここで検出可能なラベルは、蛍光性または放射性マーカーである。
【０１９８】
９．実施形態１～８のいずれかに記載の化合物であって、ここでＬは、単結合または炭素数１～６０００のアルキル鎖から誘導された形態であり、ここで、当該炭素数１～６０００のアルキル鎖は、直鎖または分岐鎖であり、飽和または不飽和であり、場合により、１以上の基で分断または置換され（ここで当該１以上の基としては、Ｏ、Ｓ、ＮＲ、ＯＲ、ＳＲ、ＣＯＲ、ＣＯＯＨ、ＣＯＯＲ、ＣＯＮＨＲ、ＣＳＮＨＲ、Ｃ＝Ｏ、Ｓ＝Ｏ、$Ｓ（＝Ｏ）_2$、$Ｐ＝Ｏ（Ｏ）_2ＯＲ$、$Ｐ（Ｏ）_2（ＯＲ）_2$、ハロゲン、またはフェニル基があり、

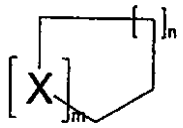
ここで当該フェニル基は、場合により、１以上の－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、－Ｎ－Ｃ＝Ｓ、－Ｎ－Ｃ＝Ｏ、ハロゲンで置換され、ここで、
Ｒは、Ｈ、または、炭素数１～４の直鎖または分岐鎖アルキル基であり、場合により、１以上の－ＯＨで置換される）、
当該炭素数１～６０００のアルキル鎖は、１以上の炭素数３～９の飽和または不飽和の環式基で分断または置換されてもよく（場合により１以上のＯ、ＳまたはＮＲで分断される）、１以上の基で分断または置換されてもよい（ここで当該１以上の基としては、－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、またはフェニル基があり、当該フェニル基は、場合により、１以上の－ＮＨＲ、－ＯＲ、－ＳＲ、－ＣＯＲ、－ＣＯＮＨＲ、－Ｎ－Ｃ＝Ｓ、－Ｎ－Ｃ＝Ｏ、ハロゲンで置換される）。

【０１９９】

１０．実施形態９に記載の化合物であって、ここでＬ中に存在する環式基は、飽和でも不飽和でもよく、以下の一般式（III）：

【０２００】

【化２２】



(III)

【０２０１】

に相当し、式中、
ｎは０～４の範囲に及ぶことができ、
ｍは０～２範囲に及ぶことができ、
Ｘは、ＮＨ、ＮＲ、Ｏ、ＳまたはＳＲであることができる。

【０２０２】

１１．実施形態１０に記載の化合物であって、ここでリンカーＬは、１～１００個の天然または合成アミノ酸からなるオリゴペプチドである。
１２．実施形態１１に記載の化合物であって、ここでアミノ酸は、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、γ－アミノ－酪酸、トランス－４－アミノメチル－シクロヘキサンカルボン酸からなる群より選択される。

【０２０３】

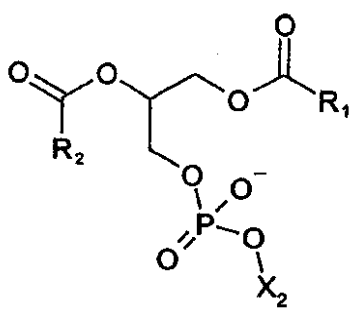
１３．実施形態１０に記載の化合物であって、ここでＬ前駆体は、二官能価のＰＥＧ（ポリエチレングリコール）誘導体に相当する。
１４．実施形態１０に記載の化合物であって、ここでＬは、グルタル酸、コハク酸、マロン酸、シュウ酸、２種のCH_2CO基で誘導されたＰＥＧからなる群より選択される。

【０２０４】

１５．実施形態２に記載の式：Ａ－Ｌ－B_{1a}（IIａ）で示される化合物であって、式中、B_{1a}は、式（II）：

【０２０５】

【化２３】



M

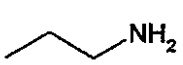
(II)

【０２０６】

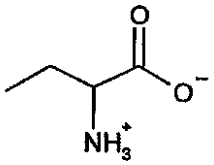
で示されるリン脂質成分であり、
Ｍは、アルカリ金属またはアルカリ土類金属カチオンであり、
R_1およびR_2は、それぞれ独立して、飽和または不飽和であり、場合によりＣ＝Ｏまたは
Ｏで分断される炭素数１２～２０の直線状の長鎖に相当する。
【０２０７】
X_2は、
【０２０８】
【化２４】



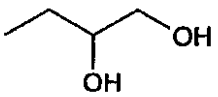
ホスファチジン酸



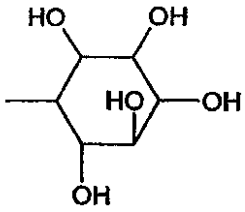
エタノールアミン



セリン

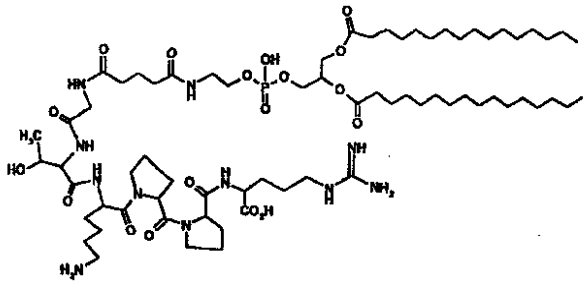


グリセロール

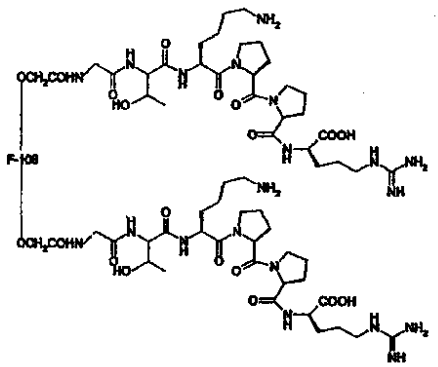


イノシトール

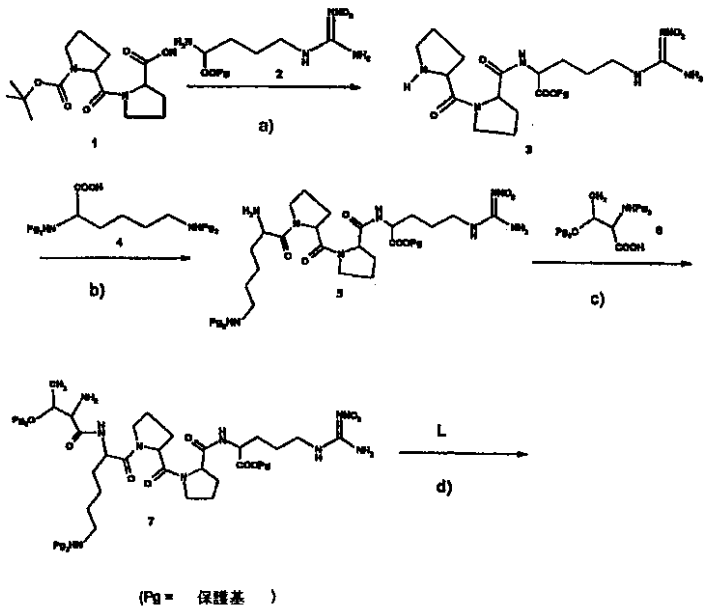
【０２０９】
からなる群より選択される。
１６．実施形態１５に記載の化合物であって、ここでR_1およびR_2は、それぞれ独立して、炭素数１２～２０の飽和の直線状の長鎖である。
【０２１０】
１７．実施形態１６に記載の化合物であって、ここで式（II）で示されるリン脂質は、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノレイルホスファチジルエタノールアミン、上述のこれらいずれかのフッ素化類似体、および、上述のこれらいずれかの混合物、からなる群より選択される。
【０２１１】
１８．実施形態１７に記載の化合物であって、ここで式（II）で示されるリン脂質は、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンである。
１９．
【０２１２】
【化２５】



【０２１３】
および
【０２１４】
【化２６】



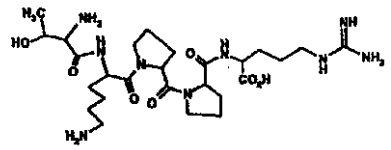
【０２１５】
からなる群より選択される化合物である。
２０．実施形態１に記載の化合物の調製方法であって、当該方法は、以下の工程：
ＴＫＰＰＲまたはその類似体を得ること、
ＴＫＰＰＲとリンカーとを複合させて、式：Ａ－Ｌ（IIｂ）で示される化合物を得ること、および、
式（IIｂ）で示される化合物と基質Ｂとの間に共有結合または非共有結合を形成すること、または、基質Ｂと上記リンカーとの間に共有結合を形成することによって、複合体Ｂ－Ｌを形成し、
複合体Ｂ－ＬとＴＫＰＰＲまたはその類似体とを複合させること、
を含む。
【０２１６】
２１．実施形態２０に記載の方法であって、ここで式（IIｂ）で示される化合物は、以下のスキームで説明されるように調製され、
【０２１７】
【化２７】



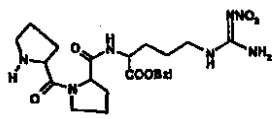
(Pg＝　保護基　)

【０２１８】
ここで、
工程ａ）、ｂ）およびｃ）は全て塩基条件下で行われる縮合反応であり、工程ｄ）は、塩基条件で、リンカーを用いて縮合することである。
【０２１９】
２２．インビボまたはインビトロで、ヒトおよび動物の内皮細胞を、または内皮細胞に共通するマーカーを発現する細胞を標的とするための組成物、および／または、少なくとも１種の生理活性剤を投与するための組成物であって、当該組成物は、実施形態１に記載の検出可能な成分を有する化合物を少なくとも１種含む。
【０２２０】
２３．実施形態２２に記載の組成物であって、当該組成物は、超音波で検出可能な成分と、少なくとも１種式（Ｉａ）または（IIａ）の化合物とを含む。
２４．実施形態２２に記載の組成物であって、検出可能な成分に取り込まれた少なくとも１種の生理活性剤をさらに含む。
【０２２１】
２５．実施形態２３に記載の組成物であって、当該組成物は、前記超音波で検出可能な成分を標的とするために、式（Ｉｂ）で示される化合物を含む。
２６．ヒトまたは動物における脈管形成部位の画像化方法であって、当該方法は、前記動物に、検出可能な成分と、式（Ｉａ）または（IIａ）で示される化合物とを組成物を投与すること、および、脈管形成部位における前記成分を検出すること、を含む。
【０２２２】
２７．動物における腫瘍のステージング方法であって、当該方法は、検出可能な成分と式（Ｉａ）または（IIａ）で示される化合物とを含む組成物を前記動物に投与すること、および、前記動物において前記成分を検出すること、を含む。
【０２２３】
２８．超音波による画像化方法であって、当該方法は、式（Ｉａ）または（IIａ）で示される化合物を含む超音波造影剤組成物を前記動物に投与すること、および、前記動物において前記造影剤を画像化すること、を含む。
【０２２４】
２９．動物の内皮細胞を、または内皮細胞に共通するマーカーを発現する細胞を標的とするために、少なくとも１種の薬剤を、前記薬剤の特異性に関してスクリーニングする方法であって、当該方法は、式（Ｉｂ）で示される化合物を含む組成物を前記動物に投与すること、または、インビトロで、前記細胞と、式（Ｉｂ）で示される化合物を含む組成物と

を接触させること、および、前記特異性を検出すること、を含む。
【０２２５】
３０．実施形態２９に記載の少なくとも１種の標的化された超音波造影剤をスクリーニングする方法であって、当該方法は、式（Ｉｂ）で示される化合物を投与または接触させることを含む。
【０２２６】
３１．インビボで、脈管形成疾患に関連する作用を受けている患者に、生理活性剤を治療的に運搬する方法であって、当該方法は、式（Ｉａ）または（IIａ）で示される化合物を含む組成物の治療上有効な量を投与することを含む。
【０２２７】
３２．脈管形成疾患の作用を受けている個体を治療方法であって、当該方法は、式（Ｉａ）または（IIａ）で示される化合物を含む組成物の治療上有効な量を投与することを含む。
【０２２８】
さらに本発明を以下の実施例によって説明する。実施例の目的は、説明のためであり、本発明の範囲を限定するものではない。
上述の参考文献、特許および特許出願の全ての開示は、これらの全内容のいずれも参照することによって本明細書に含まれる。
【０２２９】
実施例
全てのアミノ酸が、キラル中心における天然の配置Ｓを有し、例示された反応において配置が保持されるため、実施例の図面における化学結合の立体化学を省略する。
【０２３０】
実施例１：ＴＫＰＰＲ－ＯＨの調製
【０２３１】
【化２８】



【０２３２】
Ａ）Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌの調製
【０２３３】
【化２９】



【０２３４】
Ｂｏｃ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－ＯＨ（市販）（３．２ｇ、１０．２５ｍｍｏｌ）の塩化メチレン（１００ｍＬ）溶液に、Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ．ＰＴＳＡ塩（市販）（６．５４ｇ、１０ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を５分間攪拌した。この混合物を、５℃に冷却し、ＨＡＴＵ（［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］（市販）、（３．９ｇ、１０．２５ｍｍｏｌ）を１ロット加えて、続いて、ジイソプロピルエチルアミン（６．５ｇ、５０ｍｍｏｌ）を加えた。その反応混合物を室温で１２時間攪拌した後、真空中で溶媒を除去し、残部を酢酸エチルに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム、重硫酸ナトリウムで洗浄し、最後に水で洗浄した。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、カップリングされた生成物を得た。これを、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーで、溶離液として５％のメタノールの

酢酸エチル溶液を用いて精製した。純粋な物質を含む分画を合わせ、溶媒を除去し、純粋な生成物を得た。この保護されたトリペプチド（５．４２ｇ、９ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（１２ｍＬ）をトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）（１２ｍＬ）に加え、その混合物を室温で１時間攪拌した。ＴＦＡと塩化メチレンとを真空中で除去し、残部を無水エーテルと１５分間攪拌した。沈殿した固体を回収し、乾燥し、表題の化合物をそのＴＦＡ塩として５．２ｇ得た。

【０２３５】

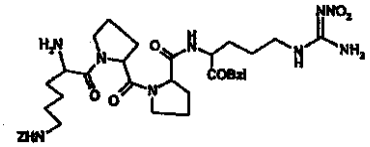
収率：９５％
ＨＰＬＣ純度：１００％
保持時間：９．８分
カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８（４．６×２５０ｍｍ）
溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む
溶離条件：２０％のアセトニトリルで始め、３０分で１００％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける
流速：１．０ｍＬ／分
検出：ＵＶ２５４ｎｍ
^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

【０２３６】

Ｂ）Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌの調製

【０２３７】

【化３０】



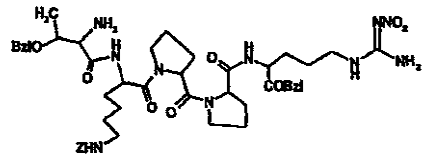
【０２３８】

Ｚで保護したリシン（市販）（３．０５ｇ、８．０２ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（６０ｍＬ）にＰｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）ＯｂｚｌのＴＦＡ塩（４．９３ｇ、８ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を５分間攪拌した。この混合物を５℃に冷却し、ＨＡＴＵ（３．０５ｇ、８．０２ｍｍｏｌ）を１ロット加え、続いてジイソプロピルエチルアミン（４．１６ｇ、３２ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を６時間攪拌した後、真空中で溶媒を除去し、残部を酢酸エチルに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム、重硫酸ナトリウムで洗浄し、最後に水で洗浄した。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、カップリングした生成物を得た。これをシリカゲル（１５０ｇ）のカラムクロマトグラフィーで、溶離液として５％のメタノールの酢酸エチル溶液を用いて精製した。純粋な物質を含む分画を合わせ、溶媒を除去し、純粋な生成物を得た。この保護されたテトラペプチド（６．０ｇ、７ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（１５ｍＬ）をＴＦＡ（１５ｍＬ）に加え、その混合物を室温で１時間攪拌した。ＴＦＡと塩化メチレンとを真空中で除去し、残部を無水エーテルと１５分間攪拌した。沈殿した固体を回収し、乾燥し、５．８ｇの表題の化合物をそのＴＦＡ塩として得た。

【０２３９】

収率：９５％
ＨＰＬＣ：９５．７％
保持時間：１４．０２分
カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８（４．６×２５０ｍｍ）
溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む
溶離条件：２０％のアセトニトリルで始め、３０分で１００％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける
流速：１．０ｍＬ／分

検出：ＵＶ２５４ｎｍ
^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。
【０２４０】
Ｃ）Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌの調製
【０２４１】
【化３１】



【０２４２】
Ｂｏｃ－スレオニンベンジルエーテル（市販）（１．９６ｇ、６．３ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（５０ｍＬ）にＬｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ（５．２５ｇ、６ｍｍｏｌ）のＴＦＡ塩を加え、その混合物を５分間攪拌した。この混合物を５℃に冷却し、ＨＡＴＵ（２．４１ｇ、６．３ｍｍｏｌ）を１ロット加え、続いてジイソプロピルエチルアミン（３．３５ｇ、２５ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を室温で４時間攪拌した後、真空中で溶媒を除去し、残部を酢酸エチルに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム、重硫酸ナトリウムで洗浄し、最後に水で洗浄した。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、カップリングした生成物を得た。これをシリカゲル（１５０ｇ）のカラムクロマトグラフィーで、溶離液として５％のメタノールの酢酸エチル溶液を用いて精製した。純粋な物質を含む分画を合わせ、溶媒を除去し、純粋な生成物を得た（５．０８ｇ、収率９１％）。この保護されたペンタペプチド（２．１ｇ、２ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（４ｍＬ）にＴＦＡを加え（４ｍＬ）、その混合物を室温で１時間攪拌した。ＴＦＡと塩化メチレンとを真空中で除去し、残部を無水エーテルと１５分間攪拌した。沈殿した固体を回収し、乾燥し、２．１ｇの表題の化合物をそのＴＦＡ塩として得た。
【０２４３】
収率：９８％
ＨＰＬＣ：９８．３％
保持時間：１６．１２分
カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８（４．６×２５０ｍｍ）
溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む
溶離条件：２０％のアセトニトリルで始め、３０分で１００％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける
流速：１．０ｍＬ／分
検出：ＵＶ２５４ｎｍ
^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。
【０２４４】
Ｄ）ＴＫＰＰＲ－ＯＨの調製
上記化合物（３００ｍｇ、０．２８ｍｍｏｌ）のメタノール（３０ｍＬ）および酢酸溶液（３．０ｍＬ）を、Ｐｄ（ＯＨ）$_2$（Degussaタイプ、１００ｍｇ）に加え、その混合物を、５０ｐｓｉで４８時間、水素化した。上記触媒をろ過して除き、溶媒を除去し、粗生成物を得た。これを無水エーテルで粉砕し、生成物を白色粉末として得た。さらにこの粗生成物をＣ－１８カラムを用いた分取用ＨＰＬＣで、６０分での０～３０％のアセトニトリルの直線的な勾配で精製した。純粋な化合物を含む分画をあわせ、凍結乾燥し、２１０ｍｇの純粋なＴＫＰＰＲ－ＯＨを得た。
【０２４５】
収率：８４％
保持時間：１３．４０分

カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８（４．６×２５０ｍｍ）
溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む
溶離条件：０％のアセトニトリルで始め、３０分で３０％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける
流速：１．０ｍＬ／分
検出：ＵＶ２２０ｎｍ
【０２４６】
【表２】

元素分析 ：

	C	H	N
計算値	40.13	5.47	13.16
実測値	40.55	5.55	12.79

【０２４７】
^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルはその構造および文献データと一致する。
実施例２：内皮細胞の結合、ＴＫＰＰＲを複合させた蛍光ビーズのＨＡＥＣへの結合
Ａ）細胞培養
Biowhittaker社製のヒト大動脈の内皮細胞（ＨＡＥＣ）を、製造者説明書に従って、Biowhittaker社製のＥＧＭ－ＭＶ培地で単分子層として培養した。
【０２４８】
簡単に説明すると、凍結した細胞の凍結バイアル（cryovial）（約１ｍＬ中に５００，０００個の細胞）を、３７℃の水槽中で２～３分で融解し、細胞を、５％のCO_2雰囲気で予め平衡化したＥＧＭ－ＭＶ培地を１５ｍＬ含むコラーゲンＩ（市販）で被覆したＴ－７５フラスコに播種した。細胞を、標準的な組織培養恒温器を用い、３７℃でインキュベートした。以下の方法を用いて、さらなる継代接種を３回程度行うことにより、ＨＡＥＣを継代培養した。
【０２４９】
・密集成長させたＨＡＥＣのＴ７５フラスコ（播種後、６～８日）から培地を吸引により除去し、細胞をMg^{++}またはCa^{++}を含まないダルベッコリン酸緩衝食塩水（市販）で洗浄した。
【０２５０】
・次にそれらを、Biowhittaker社が推奨するようにトリプシン処理した。
・得られた細胞懸濁液を、遠心分離によって沈殿させた。細胞濃度を測定し、４５０，０００個の細胞を含む容積の再懸濁した細胞を、コラーゲンＩ被覆Ｔ－７５フラスコ（播種密度＝６，０００細胞／cm^2）に加え、フラスコの最終容積が１５ｍＬになるように新鮮な培地を加えた。フラスコを、標準的な組織培養恒温器を用いて、３７℃、５％のCO_2雰囲気で、ガス交換できるようにキャップを緩めた状態でインキュベートした。次の日、培地を吸引して吸着していない細胞を除去し、新鮮な培地で交換した。その後、２～３日毎に培地を交換した。
【０２５１】
・結合の研究および特徴づけのために、沈殿した細胞を、１６，５６０細胞／ｍＬの濃度まで希釈し、１２，０００細胞／cm^2の播種密度になるように、８－ウェルチャンバースライド（コラーゲンＩ被覆、Becton Dickinson社製）の各ウェルに０．５ｍＬを播種した。７～１０日後、チャンバースライドに播種された細胞を用いて分析に用い、それ以上増やさなかった。
【０２５２】
Ｂ）内皮細胞マーカーの免疫蛍光の実証
氷冷メタノール中で５分間固定し、１５分間風乾させ、密集成長後（postconfluent）のＨＡＥＣ（８～１４日の培養）を、フォン－ウィルブランド因子で染色した。密集成長後

のＨＡＥＣを、４％のパラホルムアルデヒドおよび２％のスクロースのＤ－ＰＢＳ溶液で５分間固定し、次に、ＶＥ－カドヘリンを染色した。

【０２５３】

染色を、水銀ランプを備えたオリンパス社製のＩＭＴ－２顕微鏡（Chiu Technical Corp，モデルＭ－１００）を用いて、蛍光の検出に関して評価し、その際、フルオレセインフィルターセットまたはテキサスレッドフィルターセットのいずれか、もしくは、デュアルフルオレセイン／テキサスレッドフィルターセットを用いた。

【０２５４】

Ｃ）ペプチドを複合させたマイクロスフェアの調製

ＴＫＰＰＲ（実施例１で説明した調製を参照）を、赤色の蛍光カルボキシレートで改変したFluoSphere：登録商標（Molecular Probes社製）に加え、ここでFluoSphereは、２．０μｍのマイクロスフェアであり、蒸留水中、３．９×１０^{9}粒子／ｍＬで提供された。１．０ｍｇのＴＫＰＰＲを、０．５ｍＬの５０ｍＭのＭＥＳ緩衝液（２－［Ｎ－モルホリノ］エタンスルホン酸（市販）、ｐＨ６．０）と、０．２ｍＬのFluoSphere（７．８×１０^{8}個の球）とを、１．５ｍＬのエッペンドルフ社製のスナップトップのポリプロピレン遠心管に加え、室温（ＲＴ）で３０分間遠心した。次に、０．０２５ｍＬのＭＥＳ中の、２．８ｍｇのＥＤＡＣ［１－エチル－３－（３ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（市販）］を加え、その管を室温で２時間遠心した。０．００５ｍＬの１ＮのＮａＯＨと、０．０２５ｍＬのＭＥＳ中の５．７ｍｇのグリシンとを加えた後、その管を室温で３０分以上遠心した。次に、エッペンドルフ５４１７Ｒ遠心器で、１４，０００ｒｐｍ（２０，８００×ｇ）で１５分間の遠心分離を３サイクル行うことによってビーズを洗浄し、得られた上清を廃棄し、Ｄ－ＰＢＳ中で再懸濁した。０．４ｍＬのＤ－ＰＢＳ（０．０５％のＮａＮ$_{3}$を含む）中で４℃で貯蔵した（ビーズの最終濃度は約１．９５×１０^{9}／ｍＬ）。グリシン、ＧＲＧＤＳＰまたはＢＳＡのマイクロスフェアに対する複合化は、ＢＳＡを０．５ｍＬの緩衝液に３．０ｍｇ加えたことを除いては、それぞれ同様に行われた。

【０２５５】

Ｄ）ＴＫＰＰＲを複合させたビーズの結合実験

実験１

ＴＫＰＰＲ、ＧＲＧＤＳＰまたはＢＳＡで誘導体化した赤色の蛍光マイクロスフェア（上述）と、ＥＢＭ培地（Biowhittaker社製）（０．１％（ｗ／ｖ）のＢＳＡ（Sigma社製）および２０μＬ／ｍＬのアプロチニン（Sigma社製）を添加した）とを、１０μＬ／ｍＬの割合で希釈した。ビーズの最終濃度は、１．９５×１０^{7}／ｍＬであった。非複合化マイクロスフェアと、ＥＢＭ／ＢＳＡ緩衝液とを、５μＬ／ｍＬの割合で希釈し、１０μＬ／ｍＬの複合させた調製物と同じマイクロスフェア濃度（１．９５×１０^{7}／ｍＬ）にした。分析を始める前に、ビーズ懸濁液を、１５分間、音波破砕バス中で分離する。密集成長させたＨＡＥＣの８－ウェルチャンバースライドのウェルからメディウムを排出させ、１ウェルにつき０．５ｍＬのＥＢＭ／ＢＳＡ緩衝液（マイクロスフェアを含まない）を用いてリンスした。ウェル１つずつに対して、２５０μＬの以下のビーズ溶液（４．９×１０^{6}個のビーズを含む）、すなわちＴＫＰＰＲを複合させた、ＢＳＡ複合ビーズ溶液および非複合ビーズ溶液を加えた。上記スライドを、環状振盪機（orbital shaker）で３０分間インキュベートし、排液し、次に、０．５ｍＬ／ウェルのＥＢＭ／ＢＳＡ緩衝液で１回洗浄し、および、０．５ｍＬ／ウェルのＤ－ＰＢＳ（２ｍＭのＭｇＣｌ$_{2}$を含む）で２回洗浄した。ウェルを隔てる足場の外側にメタノールを塗布して接着剤を弱め、次に、足場を引き抜き、上記スライドをゲル／マウント（Gel/Mount）（Biomeda社製）またはベクタシールド水性マウント媒体（Vectashield aqueous mounting medium）と共にマウントした。

【０２５６】

上述したのと同じ顕微鏡装置を用いて、２００×の倍率で、ビーズの結合と位置を調べた。各ウェルにおける３種の異なるランダムフィールド（random field）のデジタルイメージを集めた。当該イメージを、アドビ社のフォトショップ（イメージ加工ソフトウェア、

バージョン５．０）の独立した赤または緑チャンネルに分解し、平坦化し（レイヤー情報を除去）、それぞれＴＩＦＦファイルとして保存した。次に、Micrografx Picture Publisher（バージョン７）を用いて、１００％までコントラストを強めた。最後に、Scion Image software（バージョンベータ３ｂ）を用いて、加工された画像を、白い背景上に黒く転化し、統合密度（integrated density）を、選択された全フィールドを用いて測定した。

【０２５７】

結果

統合密度は、画像分析ソフトウェアによって選択された任意単位で示される。

【０２５８】

【表３】

ビーズタイプ	結合したビーズの統合密度
ＴＫＰＰＲ	229.97
ＧＲＧＤＳＰ	28.59
ＢＳＡ	1.61
非複合化	8.11

【０２５９】

ＴＫＰＰＲ配列により、ビーズが内皮細胞を特異的に標的とすることは明白である。

実験２

各ビーズタイプに対して、マイクロスフェア濃度を４．９×１０^{6}／ｍＬに減らしたこと（１ウェルにつき加えられるマイクロスフェアの数を１．２×１０^{6}個に減らした）、および、インキュベーション用緩衝液をＤ－ＰＢＳ（０．１％のＢＳＡと１０μＬ／ｍＬのシグマプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｐ－８３４０）とを含む）に変更した以外は、詳細は実験１と同様である。インキュベーション時間は、環状振盪機を用いて１５分に減らされ、洗浄（３）は、０．１％のTween 20（Sigma社製）を含むＤ－ＰＢＳを用いて行われた。また、この実験において、冷メタノールを直接ウェルに加えることによって、細胞を固定し、同様に足場を緩くした。足場を除去した後、カバーシッピングの前に、最後のＤ－ＰＢＳリンスを行った。これらフィールドにおいて、ＴＫＰＰＲとビーズとの結合を定量し、１種のフィールドのみにおいて他のビーズタイプを定量した。手動の計測によって結合したビーズを定量した。

【０２６０】

結果

【０２６１】

【表４】

ビーズタイプ	結合したビーズの数
ＴＫＰＰＲ	74, 103, 72(平均83)
ＧＲＧＤＳＰ	2
ＢＳＡ	1
非複合化	5

【０２６２】

ＴＫＰＰＲ配列により、ビーズが内皮細胞を特異的に標的とすることは明白である。

Ｅ）ＨＡＥＣに結合したＴＫＰＰＲ－複合化ビーズの、遊離ＴＫＰＰＲペプチドの抑制

ＨＡＥＣを、８－ウェルチャンバースライド（コラーゲンＩセルウェア、Becton Dickinson社製）の各ウェルに播種し、３７℃で密集成長させた。ＴＫＰＰＲビーズ（最終濃度は４．９×１０^{6}／ｍＬ）およびグリーンコントロールビーズ（最終濃度は４．９×１０^{6}／ｍＬ）の両方を含む溶液を、プロテアーゼ阻害剤カクテル（最終希釈率は１：５０）および０、１０、２５、５０、１００、２００、または５００μＭの遊離ＴＫＰＰＲペプチドを含むＤ－ＰＢＳ中で調製した。０．２５ｍＬの各マイクロスフェア溶液を排液したチャンバースライド中のウェルに加え、室温で１５分間インキュベートした。２つのウェルに、遊離の競合ＴＫＰＰＲペプチドを含まないビーズ溶液（上述したように、非複合体およびＴＫＰＰＲビーズを混合した）を加えた。次に、上記スライドを０．５ｍＬの０．１％のTween 20を含むＤ－ＰＢＳで３回洗浄し、１分間メタノールで固定し、マウントした。これらのＴＫＰＰＲ競合の各レベルに対する画像と、６種の対照画像との平均をとり、その結合の％抑制を以下の反応式：

％抑制＝100×（対照密度－競合密度）／対照密度

を用いて計算した。

【０２６３】

ＨＡＥＣに対する競合的なＴＫＰＰＲとビーズとの結合に関して、１１種の８－ウェルスライドの全てを別々の７日に評価した。

【０２６４】

【表５】

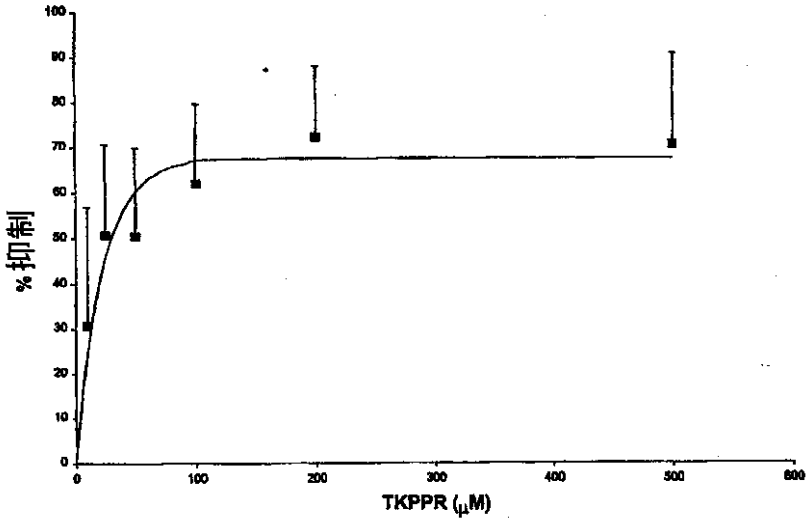
遊離 TKPPR [μM]	平均 (n=11) % 抑制	SD	%CV
10	30.8	26.1	84.7
25	50.7	20.0	39.4
50	50.5	19.5	38.6
100	62.0	17.8	28.7
200	72.2	15.9	22.0
500	70.6	20.3	28.8

【０２６５】

％抑制データによれば、ＴＫＰＰＲビーズが競合的にＨＡＥＣへ結合することがはっきり示されており、さらに以下のチャートで説明される。ＣＯＮＳＡＭソフトウェアを用いて、反応式：$\lambda = A^{*}(1 - e^{-ax})$を％抑制データに当てはめ、データに最もよく適合する曲線を得ることができた。

【０２６６】

【表６】



【０２６７】
これらの結果は、ＴＫＰＰＲペプチド配列が蛍光マイクロスフェアのＨＡＥＣに対する特異的結合を指示しうる、ということを示す。この結合は、遊離ペプチドと競合させることができる。

【０２６８】
実施例３：流動下での内皮細胞に対するＴＫＰＰＲ－ビーズ結合の評価

Ａ）カバーガラスのコラーゲン被覆

初めに、円形の直径４０ｍｍのカバーガラス（Bioptechs社製、Cat No. 40-1313- 0319）を、アセトン（ＨＰＬＣグレード、Sigma Aldrich Cat No. 27,072-5）中の２０％の３－アミノプロピルトリエトキシシラン（Pierce, Cat No. 80370ZZ）に浸し、アセトンでリンスし、風乾しすることによって誘導体化した。オートクレーブ後、誘導体化したカバーガラスを６０ｍｍの円形滅菌培養皿に置いた（１枚の培養皿につき１つのカバーガラス）。２０ｍＭ酢酸中、４１．６μｇ／ｍＬの５ｍＬのコラーゲンＩ溶液（Becton Dickinson, Cat No. 40236）（ＮａＯＨでｐＨ６．７に調節）を各カバーガラス含有培養皿に加えた。１５分後、０．２５ｍＬの１１．５ｍｇ／ｍＬビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（Pierce, Cat No. 21580ZZ）を各培養皿に加え、ボルテックス混合した。１０５分間インキュベーションした後、培養皿を排液し、５ｍＬの滅菌ＴＢＳ（２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、１４０ｍＭのＮａＣｌ）を各培養皿に加えた。

【０２６９】
Ｂ）細胞培養

直径４０ｍｍのコラーゲンＩ被覆カバーガラス（Bioptechs, Butler, PA, Cat No. 40-1313-0319）上に、１ｃｍ^{2}につき１２，０００個の細胞を播種した。

【０２７０】
Ｃ）流動下での、内皮細胞に対するＴＫＰＰＲビーズの結合

オリンパス社製のＩＭＴ－２倒立顕微鏡にマウントしたBioptechs社製のＦＣＳ２パラレルプレートフローセルに、密集成長させたＨＡＥＣを含むカバーガラスをマウントした。一般的に、長さ２０ｍｍの潅流エリアにより幅１４ｍｍが得られ、０．２５ｍｍだけガラスプレートと離れたシリコンガスケットを用いた。フローセルの温度は、チャンバーコントローラーを用いて３７℃に維持された。初めのうちは、カバーガラスを普通培地で潅流した。その後、フローセルを、Ｄ－ＰＢＳ（０．７５ｍＭのＣａＣｌ$_2$およびＭｇＣｌ$_2$、ならびに０．１％のＢＳＡを含む）と、１．９５×１０６／ｍＬの各ビーズタイプとからなるビーズ溶液で潅流した。速度調節した潅流は、シリンジポンプ（Harvard Equipment 社製、モデル番号９０１）を用いてなされた。潅流長さ、同様に、いずれのＤ－ＰＢＳでの洗浄を、指示どおりに変化させた。壁剪断応力Ｔ（ダイン／ｃｍ^2）を、以下の反応式（Lawrence et al., Blood 75:227-237, 1990）を用いて計算した。

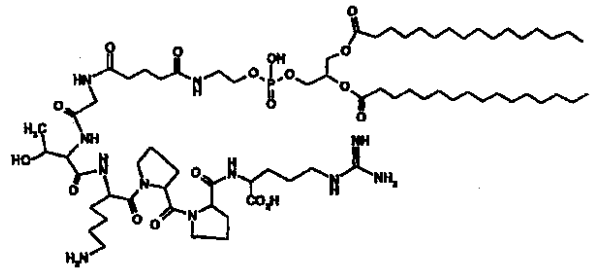
【０２７１】
【数１】

$$T = \frac{3\mu Q}{2ba^2}$$

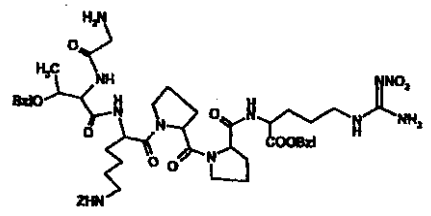
【０２７２】
式中、μは、粘度係数（ポアズ）（０．００７、水の粘度を推定値として用いた）、Ｑは、体積流量（ｃｍ^2／ｓ）であり、ｂは、流路幅（ｃｍ）（我々の場合、１．４ｃｍ）、および、ａは、流路高さの半分（ｃｍ）（特に指示がない限り、１．２５×１０$^{-2}$ｃｍ）である。
【０２７３】
マイクロスフェアを含まない同じ溶液を用いた連続洗浄の潅流長さと可変長を増した後、ＴＫＰＰＲを複合させた赤色の蛍光ビーズ、および、グリシンを複合させた緑色の蛍光ビーズのビーズ結合が等しい数であることがモニターされた。
【０２７４】
結果
赤色のＴＫＰＰＲビーズは、１．５３ダイン／ｃｍ^2（１．９１ｍＬ／分）で、優先的にＨＡＥＣに結合した。結合したＴＫＰＰＲビーズの数は、結合したグリシン（緑色）ビーズの数より顕著に多かった。
【０２７５】
【表７】

ビーズ	1.53ダイン/cm^2 での結合
TKPPR	86
グリシン	10

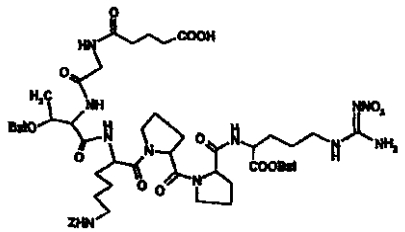
【０２７６】
実施例４：ＤＰＰＥ－ＧＬＵ－ＧＴＫＰＰＲ－ＯＨの調製
【０２７７】
【化３２】



【０２７８】
Ａ）Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌの調製
【０２７９】
【化３３】

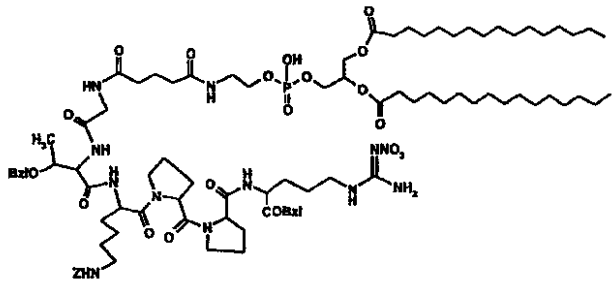


【０２８０】
Ｂｏｃ－グリシン（市販）（３６８ｍｇ、２．１ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（２０ｍＬ）に、Ｔｈｒ（Ｏｂｎ）－Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ（実施例１で調製された）（２．１ｇ、２ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を５分間攪拌した。この混合物を５℃に冷却し、ＨＡＴＵ（７９８ｍｇ、２．１ｍｍｏｌ）を加え、続いてジイソプロピルエチルアミン（１．０５ｇ、８．４ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を室温で４時間攪拌した後、真空中で溶媒を除去し、残部を酢酸エチルに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム、重硫酸ナトリウムで洗浄し、最後に水で洗浄した。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、カップリングした生成物を得た。これを、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーで、溶離液として５％のメタノールの酢酸エチル溶液を用いて精製した（２５ｇ）。純粋な物質を含む分画を合わせ、溶媒を除去し、純粋な生成物を得た。（１．９ｇ、収率８６％）。この保護されたヘキサペプチドの溶液（１．１１ｇ、１ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（１．５ｍＬ）を、ＴＦＡ（１．５ｍＬ）に加え、その混合物を室温で１時間攪拌した。ＴＦＡと塩化メチレンとを真空中で除去し、残部を無水エーテルと１５分間攪拌した。沈殿した固体を回収し、乾燥し、１．０５ｇの表題の化合物を得た。
【０２８１】
収率：９４．５％
ＨＰＬＣ：１００％
保持時間：１５．９６分
カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８（４．６×２５０ｍｍ）
溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む
溶離条件：２０％のアセトニトリルで始め、３０分で１００％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける
流速：１．０ｍＬ／分
検出：ＵＶ２５４ｎｍ
^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。
【０２８２】
Ｂ）Ｎ－グルタロイル－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌの調製
【０２８３】
【化３４】



【０２８４】
Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ（１３ｇ、１ｍｍｏｌ）のピリジン溶液（５．０ｍＬ）に、グルタル酸無水物（１１０ｍｇ、１．０ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を１６時間攪拌した。ピリジンを真空中で除去し、残部を酢酸エチルに溶解し、水、１０％の塩酸、最後に水で洗浄した。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、１．２ｇの所望の物質を得た。
【０２８５】
収率：９５．６％
ＨＰＬＣ：９７．７％
保持時間：１８．４０分
カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８（４．６×２５０ｍｍ）
溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む

溶離条件：２０％のアセトニトリルで始め、３０分で１００％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける
流速：１．０ｍＬ／分
検出：ＵＶ２５４ｎｍ
^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。
【０２８６】
Ｃ）ＤＰＰＥ－グルタロイル－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌの調製
【０２８７】
【化３５】



【０２８８】
ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（市販）（２４２ｍｇ、０．３５ｍｍｏｌ）の塩化メチレン懸濁液（１．０ｍＬ）に、ＴＦＡ（２００ｌ）を加え、このようにして得られた透明溶液を蒸発させ、真空中で３０分間乾燥させた。次にこれを無水塩化メチレン（２．０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－グルタロイル－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ（３９４ｍｇ、０．３５ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（３．０ｍＬ）に加えた。その混合物を１０分間攪拌した後、ＨＡＴＵ（１４２ｍｇ、０．３７ｍｍｏｌ）、続いてジイソプロピルエチルアミン（１０５ｍｇ）を加え、室温で６時間攪拌し続けた。真空中で溶媒を除去し、残部を酢酸エチルに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム、重硫酸ナトリウムで洗浄し、最後にブラインで洗浄した。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、カップリングした生成物を得た。これをシリカゲル（１０ｇ）のカラムクロマトグラフィーで、溶離液として塩化メチレン中の１０％のメタノールを用いて精製した。純粋な物質を含む分画を合わせ、溶媒を除去し、４５５ｍｇの純粋な生成物を得た。収率は７３％であった。
【０２８９】
ＨＰＬＣ：１００％
保持時間：１４．２５分
カラム：ＹＭＣ、Ｃ－４（４．６×２５０ｍｍ）
溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む
溶離条件：８０％のアセトニトリルで始め、２０分で１００％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける
流速：１．０ｍＬ／分
検出：ＵＶ２５４ｎｍ
【０２９０】
【表８】

元素分析：

	C	H	N	O	P
計算値	59.53	8.20	9.06	21.55	1.67
実測値	59.72	7.93	8.58		

【０２９１】

^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

Ｄ）ＤＰＰＥ－グルタロイル－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ－ＯＨ（ＤＰＰＥ－ＧＬＵ－ＧＴＫＰＰＲ）の調製

前述の工程Ｃ）で調製された化合物（２２０ｍｇ、０．１２２ｍｍｏｌ）のメタノール（１５ｍＬ）、酢酸エチル（５．０ｍＬ）および酢酸（２．０ｍＬ）の溶液に、Ｐｄ（ＯＨ）$_2$（Degussaタイプ、８０ｍｇ）を加え、その混合物を５０ｐｓｉで４８時間水素化した。上記触媒をろ過して除き、残部を無水エーテルで粉砕し、粗生成物を得た。これをさらに、分取用ＨＰＬＣにおいて、Ｃ－４カラムを用い、水－アセトニトリル勾配（２０分で８０～１００％のアセトニトリル）を用いて精製した。純粋な化合物を含む分画を合わせ、凍結乾燥し、１３０ｍｇの所望のＤＰＰＥ－ＧＬＵ－ＧＴＫＰＰＲを得た。

【０２９２】

収率：７４％

ＨＰＬＣ：１００％

保持時間：８．８分

カラム：ＹＭＣ、Ｃ－４（４．６×２５０ｍｍ）

溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む

溶離条件：８０％のアセトニトリルおよび２０％の水での均一濃度溶離

流速：１．０ｍＬ／分

検出：ＵＶ２２０ｎｍ

【０２９３】

【表９】

元素分析：

	C	H	N	O	P
計算値	51.53	7.95	8.93	23.12	1.80
実測値	51.04	8.07	8.91		

【０２９４】

^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

同じ方法で、Ｇ－ＴＫＰＰＲを、以下のリン脂質、すなわちアミド結合の代わりにエステル結合でＤＰＰＧ、ジパルミトイルホスファチジルグリセロールを複合化させ、または、ＤＰＰＡ、ジパルミトイルホスファチジン酸を複合化させた。

【０２９５】

実施例５：超音波検査法のための、ＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲを含むガス充填マイクロバブル組成物の調製

一連のリン脂質水性懸濁液を以下の組成で調製した。

【０２９６】

Ａ．５０ｍｇのＤＰＰＳ、２．５ｍｇのＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲ、１．５ｇのグリセロールおよび５ｇのプロピレングリコール；

Ｂ．５０ｍｇのＤＰＰＧ、１５０ｍｇのＰｌｕｒｏｎｉｃ：登録商標Ｆ６８、２．５ｍｇのＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲおよび４ｇのグリセロール；

Ｃ．１０ｍｇのＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００、３０ｍｇのＤＡＰＣ、１０ｍｇのＤＳＰＧ、２．５ｍｇのＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲ、３ｇのグリセロールおよび３ｇのプロピレングリコール；

Ｄ．４０ｍｇのＤＳＰＣ、１０ｍｇのＤＰＰＡ、２．５ｍｇのＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲおよび３ｇのラクトース；

Ｅ．１００ｍｇの水素化大豆レシチン／ジセチルホスフェート（モル比９：１）、２ｍｇのＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲおよび１．２ｇのマルトース；

Ｆ．１００ｍｇの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ン酸（ＤＰＰＡ）／ステアリン酸（モル比８：１：１）、２ｍｇのＤＰＰＥ－

Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲおよび１．２ｇのラクトース；
Ｇ．４０ｍｇのＤＰＰＣ、１０ｍｇのＤＰＰＳ、２ｍｇのＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲおよび３ｇのＰＥＧ４０００；
Ｈ．４０ｍｇのＤＰＰＳ、１０ｍｇのＤＳＰＣ、２ｍｇのＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲおよび３ｇのＰＥＧ４０００；
Ｉ．２５ｍｇのＤＳＰＣ、２５ｍｇのＤＰＰＧ、１ｍｇのＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲ、５ｍｇのパルミチン酸および３ｇのＰＥＧ４０００；
Ｊ．３０ｍｇのＤＳＰＣ、１０ｍｇのＤＰＰＡ、１０ｍｇのＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００、１ｍｇのＤＰＰＥ　Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲおよび３ｇのＰＥＧ４０００。

【０２９７】

各組成（Ａ～Ｄ）の成分を、７０℃に加熱することによって２０ｍＬの蒸留水に分散させ、次に、０．２μｍのポリカーボネート膜（Nuclepore：登録商標）を通して３回押出した。得られた懸濁液を以下の方法に従って処理し、ガスマイクロバブルを発生させた。

【０２９８】

・懸濁液Ａ：
懸濁液Ａは、高速機械攪拌で、Polytron：登録商標（１２，０００ｒｐｍおよび２分）を用いて、C_4F_{10}ガス下でホモジナイズした；
・懸濁液Ｂ：
５ｍＬの懸濁液を２つのシリンジシステムを用いて強く攪拌した（各シリンジの容積は１０ｍＬであり、１つのシリンジは５ｍＬの懸濁液を含み、他方は０．５ｍＬのC_4F_{10}で充填した）。上記２つのシリンジは、三方ストップコックで連結され、上記２つのシリンジを力強く対向して汲み上げた（各シリンジに対し２０回）。

【０２９９】

・懸濁液Ｃ：
１ｍＬの懸濁液を、気密隔壁キャップで密閉した２ｍＬのバイアルに入れた。バイアル上部の空気相を排気し、C_4F_{10}を充填した。次にサンプルバイアルを、ボルテックス器（vortexer）（Mini-Bead Beater：登録商標、Biospec Products社製）を用いて、３０００ｒｐｍで２分間、ボルテックスした。

【０３００】

・懸濁液Ｄ：
懸濁液Ｄを－４５℃で凍結し、２０ｍｂａｒの減圧下で凍結乾燥した。簡単に説明すると、１ｇの得られた粉末をバイアルに導入し、真空下に置き（空気を除去して）、次にC_3F_8に晒し、最後に１０ｍＬの水を用いて再生した。

【０３０１】

・懸濁液Ｅ：
リポソーム（５０ｍｇ／ｍｌ）を、ＲＥＶ方法（F. Szoka et al. PNAS USA 75(1978)4194)によって蒸留水中で調製した。１μｍのポリカーボネートフィルターを通して押出した後、２ｍＬの調製物を、８ｍＬの１５％マルトース蒸留水溶液と混合した。得られた溶液を－３０℃で凍結し、０．１トルで凍結乾燥した。その後、過フルオロプロパン（C_3F_8）で大気圧に戻した。次に、得られた粉末を１０ｍＬの水を用いて再生した。

【０３０２】

・懸濁液Ｆ：
マルトースの代わりにラクトースを用いた以外は、懸濁液Ｅと同じである。
・懸濁液Ｇ～Ｊ：
初めに、脂質を第３ブタノール（２５ｍＬ）に溶解した。次にその溶液を－４５℃で凍結し、２０ｍｂａｒの減圧下で凍結乾燥した。簡単に説明すると、１ｇの得られた粉末をバイアルに導入し、真空下に置き（空気を除去して）、次に、C_3F_8（懸濁液Ｇ）、C_4F_{10}（懸濁液Ｈ）、C_4F_{10}またはC_3F_8／空気混合物（懸濁液Ｉ）、SF_6（懸濁液Ｊ）に晒し、最後に１０ｍＬの水を用いて再生した。懸濁液（Ｉ）中の気体の混合は、以下の割合、すなわちC_4F_{10}またはC_3F_8を３５、５０、６６％で、残りを空気で構成した。

【０３０３】
これらの懸濁液全ては、再生または攪拌後、乳白色で不透明になった。得られたガスマイクロバブルをコールターマルチサイザー(Coulter Multisizer)を用いて計測した。懸濁液のタイプおよび活性化方法により、１～１５μｍの範囲で様々なサイズを有し、１ｍＬにつき10^7～10^9の範囲で様々な濃度を有する、ガスマイクロバブルが観察された。
【０３０４】
実施例６：超音波検査法のための、ＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲを含まないガス充填マイクロバブル組成物の調製
全ての脂質調製物に関してＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲを加えないこと以外は、実施例５の組成物を上述したように正確に再現することができる。コールターマルチサイザー分析により、似たような結果のバブル濃度が得られる。
【０３０５】
実施例７：静置培養における、実施例５のガス充填マイクロバブル組成物とＨＡＥＣとの相互作用の評価
Ａ）細胞培養
$1cm^2$につき１２，０００細胞で、８－ウェルのコラーゲンＩ被覆チャンバースライド（Becton Dickinson社製）に、または、４８－ウェルのコラーゲンＩ被覆マイクロタイタープレート（Becton Dickinson社製）上に、細胞を播種した。
【０３０６】
Ｂ）免疫蛍光
実施例２で説明したように、密集成長させたＨＡＥＣ（８～１４日の培養）を固定し、ＶＷＦおよびＶＥ－カドヘリンで染色することができる。
【０３０７】
Ｃ）静置培養における、ＴＫＰＰＲを複合させたバブルの結合
実施例５および実施例６の組成物のバイアルを、５ｍＬの滅菌食塩水で再生し、２０ゲージの１．５インチ針を用いてインジェクションする。次に、３０秒間手動で強く攪拌することによってバブルをバイアル内で形成する。１～５ｍＬのバブル調合物を各バイアルから取り、使用の１時間以内に、３倍容積のＤ－ＰＢＳ（カルシウムまたはマグネシウムを含まない）で希釈する。使用の前に迅速に、希釈したバブル溶液を、０．２％のＢＳＡを含み、競合化合物含有または非含有のＤ－ＰＢＳを同容積で用いて再び希釈する。
【０３０８】
密集成長させたＨＡＥＣを含むチャンバースライドから培地を排液し、上述で調製された最終的なバブル溶液の１種で即座に交換した。プラスチックウェルで形成されたスライドの足場上に液体が凸レンズ状にわずかに盛り上がるように、わずかにウェルを溢れさせる。バブル溶液を替わりのウェルだけに加え、液体の混合を最小化する。ウェルをパラフィルム片で密閉し、スライドを２０分間インキュベートし、倒置することによって（Klibanov A. L., Advanced drug Delivery Reviews, 37, 1999, 139-157に従う）、バブルを上昇させ、細胞と接触させ、その後、溶液を排液する。各ウェルを０．５ｍＬのＤ－ＰＢＳで２回洗浄し、排液の前にその都度おだやかに攪拌することによって、弱く結合したバブルを除去する。洗浄後、追加のＤ－ＰＢＳ（０．５ｍＬ）をウェルに加えることによって、顕微鏡で評価するまで細胞を液体中に浸された状態を維持する。
【０３０９】
緩衝液で数回洗浄した後でも、実施例５の組成物からのバブルを大量に内皮細胞に結合させたままにする。洗浄後、ＨＡＥＣへ付着した、ターゲティング成分を含まない実施例５の組成物は、除去され得る。
【０３１０】
この結合は、１０～１００μｍの遊離ＴＫＰＰＲペプチドでブロックされる。
実施例５の組成物のバブルと遊離ＴＫＰＰＲとによる結合の競合を、複数の場合において評価する。
【０３１１】

％抑制データにより、ＴＫＰＰＲ－バブルが競合的にＨＡＥＣへ結合することがはっきり示される。これらのデータは、すでに実施例２で説明されたデータと類似する。

【０３１２】

また遊離タフトシン（ＴＫＰＲ）も、実施例５のＴＫＰＰＲ－バブル組成物がＨＡＥＣに結合することを抑制するが、遊離ＴＫＰＰＲよりも効果は低い。

実施例８：流動下での実施例５のガス充填マイクロバブル組成物とＨＡＥＣとの相互作用の評価

細胞を、１ｃｍ^{2}につき１２，０００細胞で、直径４０ｍｍのカバーガラス上に播種し、実施例３に記載のように成長させる。さらすためのプロトコルは、バブル含有溶液をビーズ懸濁液で置き換え、フローチャンバーを逆にすることによって最初のバブルの結合を達成し、実施例７で説明したようにバブルが細胞と接触するようにしたこと以外は、実施例３と同じ方法である。

【０３１３】

潅流溶液を、１容量の再生した実施例５の組成物と、９容量のＤ－ＰＢＳ（０．７５（ｍＭ）のＭｇＳＯ$_4$およびＣａＣｌ$_2$を含む）との配合で希釈することによって調製する。

【０３１４】

結合した実施例５の組成物のバブルの数は、与えられた流速から１．５３ダイン／ｃｍ^{2}の剪断応力を生じる流速までの数分間、時間に応じて増加するが、その結合能力または結合飽和度は測定されない。１．５３ダイン／ｃｍ^{2}において、バブル（実施例６のターゲティング成分、ＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲを含まない）は、結合しない。しかしながら、低い流速（例えば、１．５３ダイン／ｃｍ^2）で一旦結合すると、多数の結合バブルを除去しなくとも、ＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲを含むバブルに関する剪断応力は６．１ダイン／ｃｍ^{2}に増加する。

【０３１５】

実施例９：静置培養における、実施例５のガス充填マイクロバブル組成物とＲＡＥＣとの相互作用の評価

Biowhittaker社製のウサギの大動脈の内皮細胞（ＲＡＥＣ）（Cat No. AC-7018, lot 9CC086、注文による分離）を、ドライアイス上で凍結させ、融解するまで液体窒素中で保存する。ＥＧＭ－ＭＶの代わりにＥＧＭ２－ＭＶ培地（Biowhittaker社製、 Cat No. CC-3202）を用いた以外はまったくＨＡＥＣと同様に（上述したとおり）、ＲＡＥＣを培養し、バブル結合分析に用いる。

【０３１６】

ＴＫＰＰＲバブルは、ウサギの大動脈の内皮細胞によく結合したが、結合に関する細胞間のばらつきは、この研究で用いられた全てのＨＡＥＣより大きい。それにもかかわらず、データによれば、実施例５の組成物のバブルは、ＨＡＥＣへの結合と似たような方法でＲＡＥＣと結合可能であり、遊離ＴＫＰＰＲにより抑制され得ることが示される。

【０３１７】

実施例１０：静置培養における、ＫＢ細胞での実施例５のガス充填マイクロバブル組成物の相互作用の評価

ＴＫＰＰＲとバブルとの結合が内皮細胞に特異的であるかどうかを決定するために、結合分析をＫＢ細胞（ヒト類表皮ガン細胞系）を用いて行う。ヒト類表皮ガン細胞系（ＫＢ細胞系、ATCC 17-CCL, Batch F-12909）を、Gibco Life Technologies社製の最小必須培地（処方９６－０３７３ＤＪ）を用いて、３７℃で、５％のＣＯ$_2$雰囲気の湿潤恒温器（humid incubator）を用いて、単分子層として培養する。

【０３１８】

実施例８で上述したように、バブル結合を測定した。

データによれば、ＴＫＰＰＲ－バブルが優先的に内皮細胞に結合することが示される。

【０３１９】

実施例１１：静置条件下の、ＨＡＥＣによるＴＮＦα（腫瘍壊死因子α）の活性化、および、実施例５のＴＫＰＰＲ－バブル組成物の結合

ＨＡＥＣの活性化がＴＫＰＰＲ－バブル結合を強め得るかどうかを決定するために、結合分析の前に、細胞を、０、１、５、または１０ｎｇ／ｍＬのＴＮＦαで４時間処理する。次に、実施例８ですでに説明した方法で、処理した各ウェルのバブル結合を未処理のウェルと比較する。

【０３２０】

データによれば、実施例５の組成物のバブルは、刺激された内皮細胞と、刺激されていない内皮細胞とを区別できることが示される。

実施例１２：ＶＥＧＦおよび可溶性ＫＤＲ／Ｆｃキメラによる静置培養における、実施例５の組成物のバブルのＨＡＥＣへの結合の抑制

Ａ）細胞培養

実施例２で説明したように、細胞を、１ｃｍ^{2}につき１２，０００細胞で、４８－ウェルのコラーゲンＩ被覆マイクロタイタープレート（Becton Dickinson社製）に播種する。

【０３２１】

Ｂ）静置培養における、バブル結合の抑制

実施例７の方法を用いて、ＶＥＧＦ$_{165}$（Oncogene Research Products社製）と、可溶性ヒトＫＤＲ／Ｆｃキメラ（R&D Sytems社製）とを用いたバブル結合の抑制を行う。

【０３２２】

ＶＥＧＦは効果的にバブル結合を抑制する。また可溶性ＫＤＲ／Ｆｃキメラも有効に抑制する。

ＶＥＧＦとＫＤＲ／Ｆｃとの双方を用いた抑制の結果を組み合わせると、上記バブルはＶＥＧＦ受容体とＨＡＥＣ上で相互作用し、さらに、ＫＤＲ上でも相互作用する可能性があり、ＫＤＲに結合するＮＰ－１とも相互作用する可能性が高いことが示される。

【０３２３】

実施例１３：超音波検査法のための、１０％のＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲを含む、ガス充填マイクロバブル組成物の調製

全ての脂質調製物に５ｍｇ（２．５ｍｇではなく）のＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲを加えた以外は、上述したように実施例５の組成物を正確に再現し、１０％のＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲを含むバブル組成物を得た。コールターマルチサイザー分析により、似たような結果のバブル濃度を得た。

【０３２４】

実施例１４：静置状態での、１％および５％のＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲを含むガス充填マイクロバブル組成物とＨＡＥＣとの相互作用の評価

Ａ）細胞培養

細胞を、１ｃｍ^{2}につき１２，０００細胞で、８－ウェルのコラーゲンＩ被覆チャンバースライド（Becton Dickinson社製）へ、または４８－ウェルのコラーゲンＩ被覆マイクロタイタープレート（Becton Dickinson社製）上に、播種した。

【０３２５】

Ｂ）免疫蛍光

実施例２で説明したように、密集成長させたＨＡＥＣ（８～１４日の培養）を固定し、ＶＷＦおよびＶＥ－カドヘリンで染色した。

【０３２６】

Ｃ）静置培養における、ＴＫＰＰＲを複合させたバブルの結合

０．５ｍｇ（２．５ｍｇではなく）のＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲを加えた以外は、上述したように実施例５の組成物Ｉを正確に再現し、１％のＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲを含む組成物を得た。実施例５の組成物Ｉ（５％のＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲ）のバイアルと同様に、この組成物のバイアルを５ｍＬの滅菌食塩水で再生し、２０ゲージの１．５インチ針を用いてインジェクションした。次に３０秒間手動で強く攪拌することによってバブルをバイアル内で形成した。各バイアルから１～５ｍＬのバブル調合物を取り、使用の１時間以内に、３倍容積のＤ－ＰＢＳ（カルシウムまたはマグネシウムを含まない）で希釈した。使用の前に迅速に、希釈したバブル溶液を、０．２％のＢＳＡを含み、競合化合物含有または

非含有のＤ－ＰＢＳを同容積で再び希釈した。

【０３２７】

密集成長させたＨＡＥＣを含むチャンバースライドから培地を排液し、上述で調製された最終的なバブル溶液の１種で即座に交換した。プラスチックウェルで形成されたスライドの足場上に液体が凸レンズ状にわずかに盛り上がるように、わずかにウェルを溢れさせた。バブル溶液を替わりのウェルだけに加え、液体の混合を最小化し、ウェルをパラフィルム片で密閉し、スライドを２０分間インキュベートし、倒置することによって、バブルを上昇させ、細胞と接触させ、その後、溶液を排液した。各ウェルを０．５ｍＬのＤ－ＰＢＳで２回洗浄し、排液の前にその都度おだやかに攪拌することによって、弱く結合したバブルを除去した。洗浄後、追加のＤ－ＰＢＳ（０．５ｍＬ）をウェルに加えることによって、顕微鏡で評価するまで細胞を液体中に浸された状態を維持した。

【０３２８】

結果

緩衝液で数回洗浄した後でも、実施例５の組成物Ｉ（５％のＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲ）からのバブルを大量に内皮細胞に結合させたままにした。洗浄後、ＨＡＥＣへ付着した、ターゲティング成分を含まない実施例５の組成物は、除去された。

【０３２９】

【表１０】

組成物	バブル結合
実施例５の組成物Ｉ（標的化する成分なし）	203
実施例５の組成物Ｉ	7053

【０３３０】

この結合は、１０～１００Ｍの遊離ＴＫＰＰＲペプチドでブロックされた。

【０３３１】

【表１１】

組成物	競合なし	10 μmol の TKPPR	100 μmol の TKPPR
1% 組成物	555 ± 83	96 ± 37	5 ± 1
5% 組成物	726 ± 17	865 ± 35	62 ± 38

【０３３２】

試験された組成物を並べて比較したところ、バブルの手動計測により、５％の組成物を用いると、３１％超のバブルが結合した。加えて、１％の組成物を用いると、１０μｍの遊離ＴＫＰＰＲで８２．７％のバブル結合を抑制することができたが、５％の組成物を用いると、１０μｍの遊離ＴＫＰＰＲ（１９％超のバブルが結合）では抑制されなかった。

【０３３３】

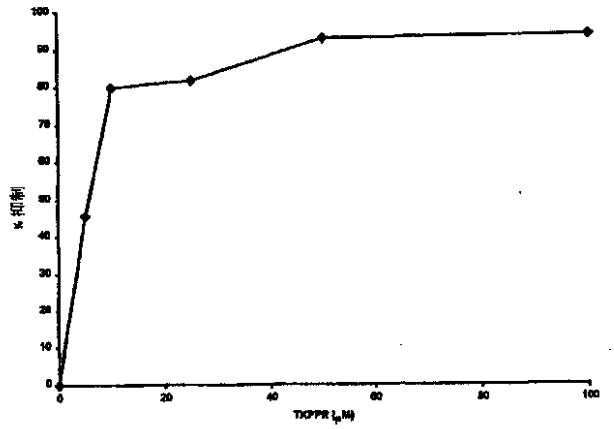
１％のバブル組成物と遊離ＴＫＰＰＲとの結合の競合を、複数の場合において評価した。

【０３３４】

【表１２】

遊離 TKPPR [μM]	平均 %抑制
5	45.7
10	79.6
25	82.0
50	92.7
100	93.7

【０３３５】
％抑制データによれば、ＴＫＰＰＲ－バブルは競合的にＨＡＥＣへ結合することをはっきり示しており、以下のチャートでさらに説明される。これらのデータは、すでに実施例２で説明されたデータと類似する。
【０３３６】
【表１３】



【０３３７】
実施例１５：流動下での、５％ＴＫＰＰＲガス充填マイクロバブル組成物（実施例５の組成物Ｉ）とＨＡＥＣとの相互作用の評価
実施例３に記載のように、細胞を、１ｃｍ^{2}につき１２，０００細胞で、直径４０ｍｍのカバーガラス上に播種し、成長させた。実施例３と同じ方法でさらし、ただし、バブル含有溶液をビーズ懸濁液で置き換え、フローチャンバーを逆にすることによって最初のバブルの結合を達成し、ただし実施例７で説明したようにバブルが細胞と接触するようにしたことを除く。
【０３３８】
潅流溶液を、１容量の再生した実施例５および実施例６の組成物Ｅを、９容量のＤ－ＰＢＳ（０．７５（ｍＭ）の$MgSO_4$および$CaCl_2$を含む）の配合で希釈することによって調製した。
【０３３９】
結果
結合したバブル（実施例５の組成物Ｉ）の数は、与えられた流速から１．５３ダイン／ｃｍ^{2}の剪断応力を生じる流速までの数分間、時間に応じて増加するが、その結合能力または結合飽和度は測定されなかった。１．５３ダイン／ｃｍ^{2}において、バブル（ターゲティング成分、ＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲを含まない）は、結合しなかった。３．０６ダイン／ｃｍ^{2}において、５％のバブル（実施例５の組成物Ｉ）は、結合しなかった。しかしながら、低い流速（例えば、１．５３ダイン／ｃｍ^2）で結合すると、多数の結合バブルを脱ローディングしなくとも、ＤＰＰＥ－Ｇｌｙｕ－ＧＴＫＰＰＲを含むバブルに関する剪断応力は６．１ダイン／ｃｍ^{2}に増加した。

【０３４０】
実施例１６：静置培養における、５％ＴＫＰＰＲガス充填マイクロバブル組成物（実施例５の組成物Ｉ）とＲＡＥＣとの相互作用の評価
Biowhittaker社製のウサギの大動脈の内皮細胞（ＲＡＥＣ）（Cat No. AC-7018, lot 9CC086、注文による分離）を、ドライアイス上で凍結させて、融解するまで液体窒素中で保存した。ＥＧＭ：－ＭＶの代わりにＥＧＭ２－ＭＶ培地（Biowhittaker社製、Cat No. CC-3202）を用いた以外はまったくＨＡＥＣと同様に（上述したとおり）、ＲＡＥＣを培養し、バブル結合分析に用いた。
【０３４１】
【表１４】

遊離 TKPPR (μM)	HAECバブル結合	RAECバブル結合
0	1425	751
100	58	21

【０３４２】
ＴＫＰＰＲバブルは、ウサギの大動脈の内皮細胞によく結合したが、結合に関する細胞間のばらつきは、この研究で用いられた全てのＨＡＥＣより大きかった。バブルの結合が最も少ないＲＡＥＣ培養物の細胞は、より大きい細胞や過剰成長した細胞（elongated cell）になりやすく、この傾向は、通常の内皮細胞より顕著であった。従って、結合の不均一性は非内皮細胞での培養物の汚染によるものであったかもしれない。それにもかかわらず、これらのデータによれば、５％の実施例５の組成物Ｉのバブルは、ＨＡＥＣへの結合と似たような方法でＲＡＥＣに結合可能であり、遊離ＴＫＰＰＲにより抑制されることが示される。
【０３４３】
実施例１７：静置培養における、５％ＴＫＰＰＲガス充填マイクロバブル組成物（実施例５の組成物Ｉ）とＫＢ細胞との相互作用の評価
ＴＫＰＰＲとバブルとの結合が内皮細胞に特異的かどうかを決定するために、ＫＢ細胞（ヒト類表皮ガン細胞系）を用いて、結合分析を行った。ヒト類表皮ガン細胞（ＫＢ細胞系、ATCC 17-CCL, Batch F-12909）を、Gibco Life Technologies社製の最小必須培地（処方９６－０３７３ＤＪ）で、３７℃で、５％のCO_2雰囲気の湿潤恒温器を用いて、単分子層として培養した。
【０３４４】
実施例７で上述したように、バブル結合を測定した。
【０３４５】
【表１５】

HAEC バブル結合	KB 細胞バブル結合
1118 ± 148	56 ± 10

【０３４６】
これらのデータによれば、ＴＫＰＰＲ－バブルが結合が優先的に内皮細胞に結合することが示される。
実施例１８：静置条件下の、ＨＡＥＣによるＴＮＦα（腫瘍壊死因子α）活性化および５％ＴＫＰＰＲバブル（実施例５の組成物Ｉ）の結合
ＨＡＥＣの活性化がＴＫＰＰＲ－バブルの結合を強め得るかどうかを決定するために、結合分析の前に、細胞を０、１、５、または１０ｎｇ／ｍＬのＴＮＦαで、４時間で処理した。次に、実施例６ですでに説明した方法で、処理した各ウェルのバブル結合を未処理のウェルと比較した。
【０３４７】

結果

【０３４８】

【表１６】

TNFα (ng/mL)	TKPPR-バブル結合
0	950
1	1,525
5	1,360
10	1,025

【０３４９】

ＴＮＦαは、１ｎｇ／ｍＬでバブル結合を強め、この効果は５ｎｇ／ｍＬのＴＮＦαで減少し、１０ｎｇ／ｍＬで処理した後ほとんどなくなった。これらのデータによれば、実施例５の組成物Ｉのバブルは、刺激された内皮細胞と、刺激されていない内皮細胞とを区別できることが示される。

【０３５０】

実施例１９：ＶＥＧＦおよび可溶性ＫＤＲ／Ｆｃキメラによる静置培養における、５％ＴＫＰＰＲバブル（実施例５の組成物Ｉ）のＨＡＥＣへの結合の抑制

Ａ）細胞培養

実施例２で説明したように、細胞を、１ｃｍ^{2}につき１２，０００細胞で、４８－ウェルのコラーゲンＩ被覆マイクロタイタープレート（Becton Dickinson社製）に、播種した。

【０３５１】

Ｂ）静置培養における、バブル結合の抑制

$VEGF_{165}$（Oncogene Research Products社製）、および、可溶性ヒトＫＤＲ／Ｆｃキメラ（R&D Sytems社製）によるバブル結合の抑制は、実施例６の方法を用いて、以下に示す濃度で実行された。

【０３５２】

結果

【０３５３】

【表１７】

VEGF 添加 (ng/ml)	バブル結合
0*	1246 ± 167
6.25	1184 ± 172
12.5	599 ± 6
25	342 ± 22
50	226 ± 39
75	190 ± 45

* 同じ対照

【０３５４】

ＶＥＧＦは、約１２．５ｎｇ／ｍＬ（０．３ｎＭ）での最大抑制の半分でバブル結合を効果的に抑制した。また可溶性ＫＤＲ／Ｆｃキメラも非常に効果的に抑制した。

【０３５５】

【表１８】

KDR/Fc添加 (ng/ml)	バブル結合
0*	1246±167
125	1030±12
250	786±76
500	342±78
1000	75±5
2500	84±3

* 同じ対照

【０３５６】
最大結合の５０％抑制は、約４５０ｎｇ／ｍＬ（１．４ｎＭ）で生じた。
ＶＥＧＦとＫＤＲ／Ｆｃとの双方を用いた抑制の結果を組み合わせると、上記バブルはＶＥＧＦ受容体とＨＡＥＣ上で相互作用し、さらに、ＫＤＲ上でも相互作用する可能性があり、ＫＤＲに結合するＮＰ－１とも相互作用する可能性が高いことが示された。
【０３５７】
実施例２０：静置培養における、ＤＰＰＥ－ＧＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－１１４）を含むマイクロバブル組成物のＨＡＥＣへの結合における標的化用分子密度の影響
実施例７で説明したように組成物中の総リン脂質の％として１％、５％、および１０％のＢＲＵ－１１４（実施例５の組成物Ｉ）を含むマイクロバブル組成物を用いて、組成物を再生し、分析を行った。
【０３５８】
結果：
以下の表で示すように、５％のＢＲＵ－１１４組成物のバブルが、１％または１０％の組成物のいずれよりも多くＨＡＥＣに結合した。加えて、５％の組成物および１０％の組成物は、バブルのＨＡＥＣへの結合を効果的にブロックするのに、より高濃度の遊離ＴＫＰＰＲペプチドを必要とした。しかしながら、１０％の組成物のバブルのＨＡＥＣへの結合は５％の組成物より少なく、１０％の組成物のバブルは遊離ＴＫＰＰＲペプチドによる抑制に対して最も耐性であった。これらのデータによれば、標的化のためのバブル結合は、組成物中の標的化用の分子濃度により影響を受け、５％のリン脂質により結合現象および結合強度の最適なバランスが得られる（遊離リガンドによる抑制に対する耐性によって測定された）ことが示される。
【０３５９】
【表１９】

表．ＨＡＥＣに対するバブル結合－結合頻度および結合強度に関する、組成物中の標的化する分子％の作用。％は、組成物中の総リン脂質中のＢＲＵ－１１４の％を示す。

処理	バブル結合 1%	バブル結合 5%	バブル結合 10%
なし	1640	2782	1858
10 microM TKPPR	10	1345	1093
50 microM TKPPR	5	440	857
100 microM TKPPR	4	12	399
200 microM TKPPR	4	13	66

【０３６０】

実施例２１：静置培養における、実施例５の組成物Ｉ（ＢＲＵ－１１４）のＨＡＥＣへの結合を抑制する、直鎖および環状ＣＴＫＰＰＲＣ（ＢＲＵ－３０５およびＢＲＵ－３０６）の能力の評価

実施例７で説明したように、組成物中の総リン脂質の％として２％のＢＲＵ－１１４（実施例５の組成物Ｉ）を含むマイクロバブル組成物を用いて分析を行った。

【０３６１】

直鎖および環状ＣＴＫＰＰＲＣ（ＢＲＵ－３０５およびＢＲＵ－３０６）の合成：

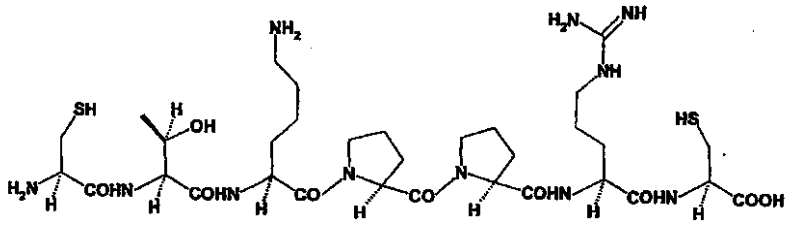
実験：

固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）の一般的な方法

直鎖状のペプチドＣＴＫＰＰＲＣを、Advanced ChemTech社製の自動４９６ペプチドシンセサイザーによる確立された自動方法で、Ｗａｎｇレジン（０．６ｍｍｏｌ／ｇ）、Ｆｍｏｃ－保護アミノ酸、および、ＮＭＰ中でのＤＣＩ媒介のＨＯＢｔエステル活性化により合成した。この研究で用いられた側鎖を保護したアミノ酸は、Ｆｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨおよびＦｍｏｃ－Ｔｈｒ（Ｂｕｔ）－ＯＨであった。Ｗａｎｇレジン上のペプチド配列は、ＳＳＰＳ方法による段階的方法で、０．５ｍｍｏｌスケールで一般的に合成した。固体支持体として、Ｆｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨが予め配合されたＷａｎｇレジンを用いた。ＮＭＰ中（１０ｍＬ／ｇ樹脂）の４倍超過量の各アミノ酸と、ＤＩＣ－ＨＯＢｔ試薬とを用いて、アミノ酸カップリングを行った。ＤＭＦ中の２５％のピペリジン（１０ｍＬ／ｇ樹脂）を用いて、３分間、Ｆｍｏｃ基を開裂し、続いて、ＤＭＦ中の２５％のピペリジン（１０ｍＬ／ｇ樹脂）を用いて、１０分間、２回目の処理を行った。ペプチド合成が完了した後、樹脂を開裂カクテル「試薬Ｂ」（ＴＦＡ：水：フェノール：トリイソプロピルシラン、８８：５：５：２）（１０ｍＬ／ｇ樹脂）で４時間処理した。吸引して揮発成分を蒸発させた後、このようにして得られたペーストをエーテルで粉砕することにより、固形物を得て、遠心分離によってエーテルで洗浄し（３×２０ｍＬ）、次に真空下で乾燥し、オフホワイトの固体として所望のペプチドを得て、このペプチドを含む水溶液を、アセトニトリル（２％）－ＴＦＡ水溶液（０．１％）で平衡化した逆相Ｃ１８分取用カラム（ＹＭＣ、１０×２５０ｍｍ、１０μ、１２０Å）にロードした。次に、当該カラムを水－アセトニトリル溶媒混合物を用いて、６０分で１０％のアセトニトリルから５０％のアセトニトリルへの直線的な勾配により溶離させ（流速１０ｍＬ／分）、分画（５ｍＬサイズ）を回収した。各分画を分析用逆相Ｃ－１８カラムで分析し、９９％を超える純度で生産物を含む分画を貯蔵し、凍結乾燥し、無色のふわふわした固体として純粋なペプチドを得た。

【０３６２】
直鎖状のＣＴＫＰＰＲＣ（１）：
【０３６３】
【化３６】

BRU-305

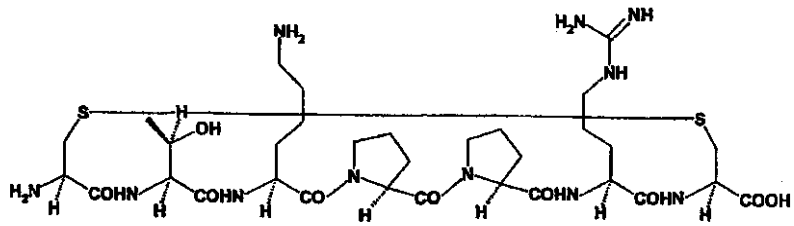


H-Cys-Thr-Lys-Pro-Pro-Arg-Cys-OH

(CTKPPRC)

【０３６４】
上述した一般的な方法に続いて、直鎖状のペプチドＣＴＫＰＰＲＣ（１）を合成し、収率４５％で、無色のふわふわした固体を得た。
ＭＳ（ＥＳ$^{+}$）：８０４．３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$；４０２．９（二価）；２６８．９（三価）。
【０３６５】
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（D_2O）：δ１．１５（ｄ，３Ｈ，Ｔｈｒ－CH_3），１．３０～１．４５（ｍ，２Ｈ），１．５３～１．６７（ｍ，５Ｈ），１．７０～２．０５（ｍ，９Ｈ），２．２４～２．３８（ｍ，２Ｈ），２．８３～２．９５（ｍ，４Ｈ），２．９８～３．１２（ｍ，Ｈ），３．１８（ｔ，２Ｈ），３．５２～３．６４（ｍ，２Ｈ），３．２１～３．８１（ｍ，２Ｈ），４．０５（ｑ，１Ｈ），４．２７（ｍ，３Ｈ），４．３８（ｍ，１Ｈ），４．４８（ｍ，１Ｈ），４．６２（ｔ，１Ｈ）および４．６９（ｔ，１Ｈ）。
【０３６６】
ＨＰＬＣ：保持時間１７．０３分；分析：＞９９％（エリア％）；カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８；０．４６×２５ｃｍ；溶媒：水（０．１％のＴＦＡ）－アセトニトリル（０．１％のＴＦＡ）、初期条件：２％のアセトニトリル；４７分の、４５％のアセトニトリルへの直線的な勾配での溶離；流速：１ｍＬ／分；検出：２２０ｎｍ。
【０３６７】
環状ジスルフィドＣＴＫＰＰＲＣ（２）：
【０３６８】
【化３７】

BRU-306



H-Cys-Thr-Lys-Pro-Pro-Arg-Cys-OH

(CTKPPRC)

【０３６９】

環状ジスルフィドＣＴＫＰＰＲＣ（２）を、相当する直鎖状ペプチドから水－ＤＭＳＯ（５％）中での空気酸化により調製した。約２０ｍｇの直鎖状のペプチド１を水－ＤＭＳＯ（５％）（２００ｍＬ、１ｍｇ／１０ｍＬ水）に溶解し、溶液のｐＨをNH_4OH（１．０Ｎ）を用いて８．５に調節した。その溶液を広口ビーカーにあけ、２４時間室温で攪拌した。希ＨＣｌで中和した後、その溶液を、５％のアセトニトリル水溶液（０．１％のＴＦＡ）で予め平衡化した逆相Ｃ１８分取用カラム（ＹＭＣ　ＯＤＳ、２０×２５０ｍｍ、１０μ、２０Å）上にローディングした。アセトニトリルと水（いずれも０．１％のＴＦＡを含む）との直線的な勾配で、すなわち１０％のアセトニトリルから始めて６０分で５０％のアセトニトリルまで勾配をつけて、カラムから化合物を溶離させた。分画（１０ｍＬサイズ）をＹＭＣ　ＯＤＳ分析用逆相Ｃ－１８カラム（１０ｌ．Ｌ、１２０Ａ）で分析し、９９％を超える純度で生産物を含む分画を貯蔵し、凍結乾燥し、ふわふわした無色の固体として表題の化合物２を得た（１５ｍｇ、収率７５％）。

【０３７０】

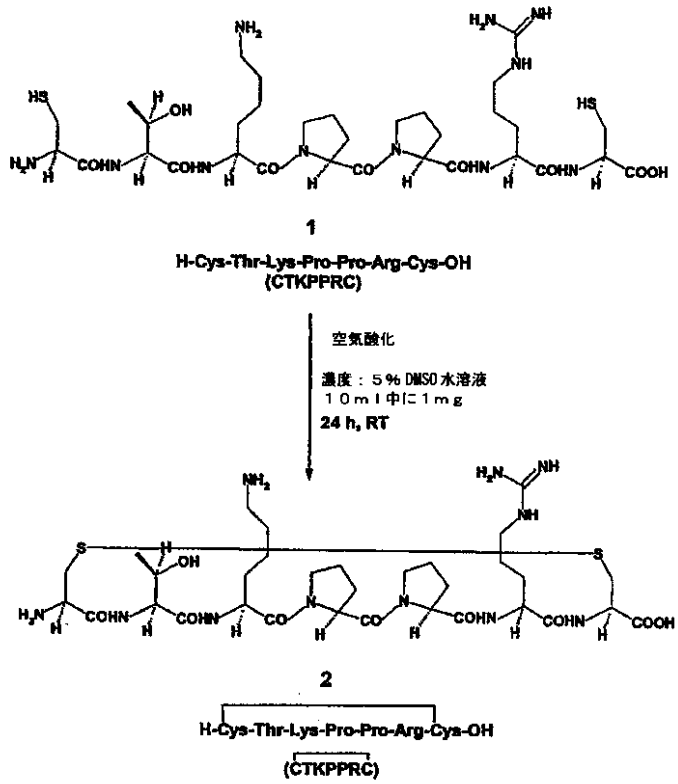
ＭＳ（ES^+）：８０２．３（Ｍ＋Ｈ）$^+$；４０１．７（２荷）；２６８．２（３荷）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（D_2O）：δ１．１８（ｄ，３Ｈ，Ｔｈｒ－CH_3），１．３１～１．４８（ｍ，２Ｈ），１．５１～１．６８（ｍ，７Ｈ），１．７１～２．０４（ｍ，８Ｈ），２．１８～２．３５（ｍ，３Ｈ），２．８３～２．９４（ｍ，２Ｈ），３．０５（ｍ，１Ｈ），３．１５（ｍ，２Ｈ），３．２６（ｍ，２Ｈ），３．４２～３．６１（ｍ，５Ｈ），４．２１（ｍ，２Ｈ），４．３０（ｍ，３Ｈ），４．４５（ｍ，２Ｈ）および４．５１（ｍ，１Ｈ）。

【０３７１】

ＨＰＬＣ：保持時間１４．９０分；分析：＞９９％（エリア％）；カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８；０．４６×２５ｃｍ；溶媒：水（０．１％のＴＦＡ）－アセトニトリル（０．１％のＴＦＡ）、初期条件：２％のアセトニトリル；３０分での３２％のアセトニトリルへの直線的な勾配での溶離；流速：１ｍＬ／分；検出：２２０ｎｍ。

【０３７２】

【化３８】



【０３７３】

結果

以下の表で示すように、直鎖状ＣＴＫＰＰＲＣ（ＢＲＵ－３０５）または環状ＣＴＫＰＰＲＣ（ＢＲＵ－３０６）を含む組成物は、その組成物中にＢＲＵ－１１４を含むマイクロバブルのＨＡＥＣへの結合をブロックする能力を持たなかった。このデータにより、ＴＫＰＰＲと内皮細胞受容体との特異的な相互作用の証拠がさらに提供された。

【０３７４】

【表２０】

表．バブルのＨＡＥＣへの結合－結合頻度に関する、直鎖状ＣＴＫＰＰＲＣ（ＢＲＵ－３０５）、環状ＣＴＫＰＰＲＣ（ＢＲＵ－３０６）、およびＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－９５）との競合の効果。結合は、競合するペプチドが存在しない場合の対照結合に対する％として示される。

処理	バブル結合　％
なし	100
25 microM TKPPR	16
50 microM BRU-305	97
100 microM BRU-305	78
200 microM BRU-305	88
50 microM BRU-306	97
100 microM BRU-306	71
200 microM BRU-306	99

【０３７５】

実施例２２：静置培養における、実施例５の組成物Ｉ（ＢＲＵ１１４）のＨＡＥＣへの結合を抑制する、タフトシン（ＴＫＰＲ）の能力の評価

実施例７で説明したように、組成物中の総リン脂質の％として１％のＢＲＵ－１１４（実施例５の組成物Ｉ）を含むマイクロバブル組成物を用いて、組成物を再生し、分析を行った。

【０３７６】

結果：

以下の表で示すように、その組成物中にＢＲＵ－１１４を含むマイクロバブル（実施例５の組成物Ｉ）のＨＡＥＣへの結合の抑制に関して、ＴＫＰＲ（タフトシン）は、ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－９５）より効果が低い。

【０３７７】

【表２１】

表．バブルのＨＡＥＣへの結合－結合頻度に関する、ＴＫＰＲ（タフトシン）およびＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－９５）との競合の効果。結合は、総バブル結合の平均として示される（２回反復して測定した）。

処理	バブル結合
None	737
5 microM TKPPR	790
10 microM TKPPR	528
25 microM TKPPR	106
50 microM TKPPR	56
100 microM TKPPR	17
5 microM TKPR	1152
10 microM TKPR	976
25 microM TKPR	1171
50 microM TKPR	904
100 microM TKPR	556

【０３７８】

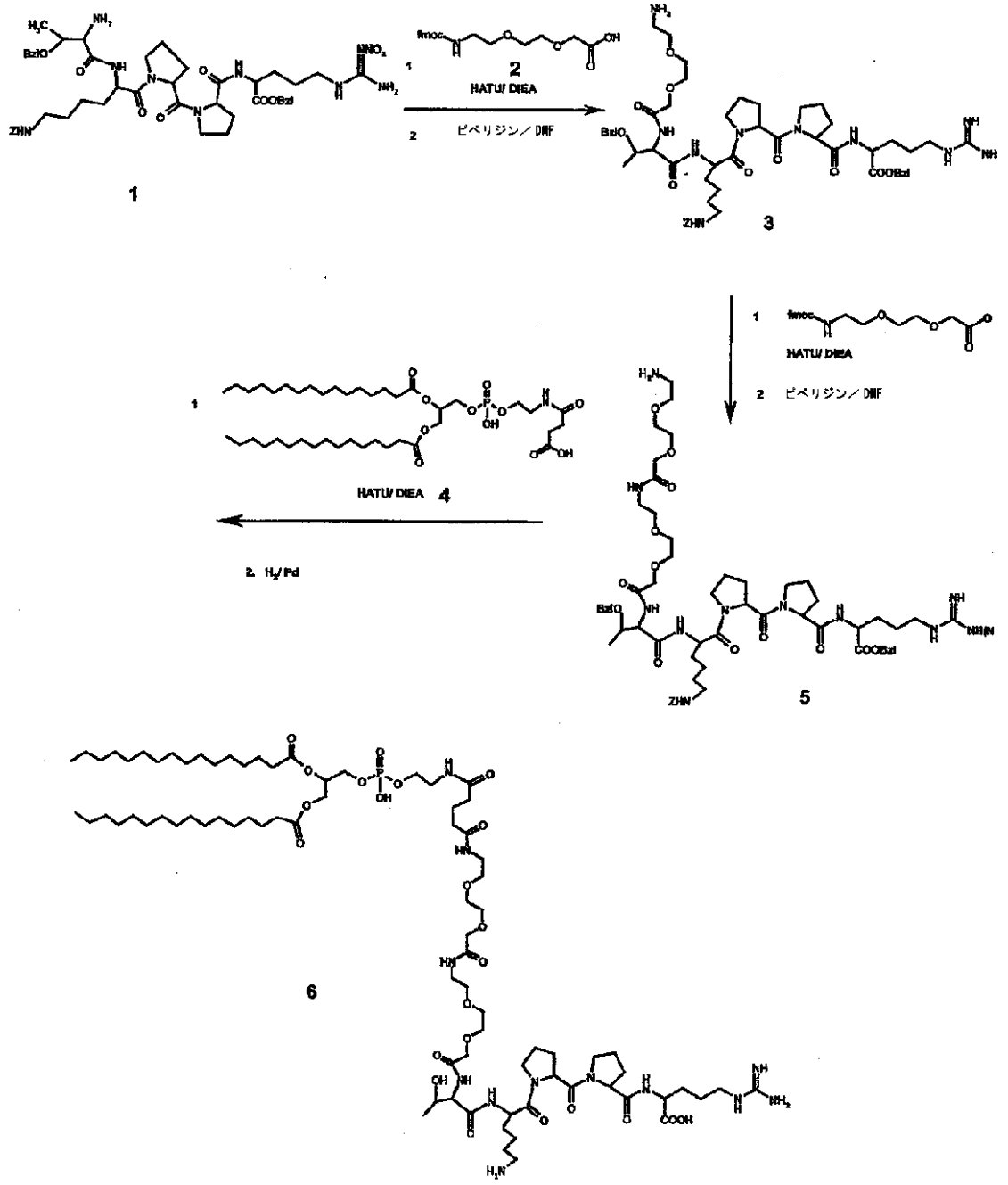
実施例２３：ＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＤＩ（アミノジオキサオクタノイル）－ＴＫＰＰＲ－ＯＨ（ＢＲＵ－２９２）の合成

合成スキーム：

【０３７９】

【化３９】

フローシート



【０３８０】

実験：アミノジオキサオクタノイル－Ｔｈｒ（ＯＢｎｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ（３）の調製

Ｆｍｏｃ－アミノジオキサオクタン酸（２）（４００ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（２０ｍＬ）に、Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ（１．０７ｇ、１ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を５分間攪拌した。この混合物を５℃に冷却し、ＨＡＴＵ（４００ｍｇ、１．１ｍｍｏｌ）を加え、続いてジイソプロピルエチルアミン（２８２ｍｇ、２．２ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を室温で４時間攪拌した後、真空中で溶媒を除去し、残部を酢酸エチル（５０ｍＬ）に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム（３×２５ｍＬ）、重硫酸ナトリウム（２×２５ｍＬ）で洗浄し、最後に水（２５ｍＬ）で洗浄した。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、カップリング

した生成物を無色のガラス状の固体として得た（１．３５ｇ）。これをシリカゲル（３０ｇ）のカラムクロマトグラフィーで、溶離液として塩化メチレン中の５～１０％のメタノールを用いて精製した。原料を含む分画をあわせ、溶媒を除去し、純粋な生成物を得た（１．０１ｇ、収率８２％）。この保護されたペプチド（９５０ｍｇ、０．７２ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（１．５ｍＬ）に、アセトニトリル中の２０％のピペリジン（２０ｍＬ）を加え、その混合物を、室温で１時間攪拌した。溶媒を除去し、残部をヘキサンで粉砕し（３×５０ｍＬ）、乾燥した。これをシリカゲル（１５ｇ）のカラムクロマトグラフィーで、溶離液として塩化メチレン中の５～１０％のメタノールを用いて精製した。原料を含む分画をあわせ、溶媒を除去し、純粋な生成物を得た（６９０ｍｇ、収率８７％）。

【０３８１】

ＨＰＬＣ：保持時間１５．７４、カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８（４．６×２５０ｍｍ）；溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む：溶離条件：２０％のアセトニトリルで始め、３０分で１００％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける；流速：１．０ｍＬ／分；検出、ＵＶ２５４ｎｍ。

【０３８２】

^{1}Ｈ－ＮＭＲ：（ＤＭＳＯ）δ１．１０（ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ，３Ｈ，CH_3），１．２１～２．２０（ｍ，１８Ｈ，CH_2），２．９５（ｂｓ，２Ｈ，CH_2），３．１２（ｂｓ，２Ｈ，CH_2），３．５０～３．７５（ｍ，４Ｈ，NCH_2），４．１０～４．５５（ｍ，６Ｈ，OCH_2，ＮＣＨ，ＮＨＣＨ，H_2NCH），４．９９（ｓ，２Ｈ，ベンジルのCH_2），５．１０（ｄｄ，２Ｈ，ベンジルのCH_2），７．２８～７．４２（ｍ，１５Ｈ，ＡｒＨ），７．９５～８．５０（ｍ，６Ｈ，ＮＨ）

マススペクトル：１１０２．６（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$。

【０３８３】

ジ（アミノジオキサオクタノイル）－Ｔｈｒ（ＯＢｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ（４）の調製

Ｆｍｏｃ－アミノジオキサオクタン酸（２）（１５６ｍｇ、０．４ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（１０ｍＬ）に、アミノジオキサオクター－Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）Ｏｂｚｌ（４００ｍｇ、０．３６ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を５分間攪拌した。この混合物を５℃に冷却し、ＨＡＴＵ（１６０ｍｇ、０．４ｍｍｏｌ）を加え、続いてジイソプロピルエチルアミン（１３１ｍｇ、０．１ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合物を室温で６時間攪拌した後、真空中で溶媒を除去し、残部を酢酸エチル（５０ｍＬ）に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム（３×２５ｍＬ）、重硫酸ナトリウム（２×２５ｍＬ）で洗浄し、最後に水で洗浄した（２５ｍＬ）。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、カップリングした生成物を無色のガラス状の固体として得た（５１０ｍｇ）。これをシリカゲルのカラムクロマトグラフィーで、溶離液として塩化メチレン中の５％のメタノールを用いて精製した（２０ｇ）。原料を含む分画をあわせ、溶媒を除去し、純粋な生成物を得た（４２５ｍｇ、収率７９．５％）。この保護されたペプチドの溶液（４００ｍｇ、２７ｍｍｏｌ）に、アセトニトリル中の２０％のピペリジン（２０ｍＬ）を加え、その混合物を室温で１時間攪拌した。溶媒を除去し、残部をヘキサンで粉砕し（３×５０ｍＬ）乾燥した。これをシリカゲル（１５ｇ）のカラムクロマトグラフィーで、溶離液として塩化メチレン中の５～１０％のメタノールを用いて精製した。原料を含む分画をあわせ、溶媒を除去し、純粋な生成物を得た（３１０ｍｇ、収率９１％）。

【０３８４】

ＨＰＬＣ：保持時間１６．６６、カラム：ＹＭＣ、Ｃ－１８（４．６×２５０ｍｍ）；溶媒：水－アセトニトリル、双方とも０．１％のＴＦＡを含む、溶離条件：２０％のアセトニトリルで始め、３０分で１００％のアセトニトリルまで直線的に勾配をつける；流速：１．０ｍＬ／分；検出：ＵＶ２５４ｎｍ。

【０３８５】

^{1}Ｈ－ＮＭＲ：（ＤＭＳＯ）δ１．１０（ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ，３Ｈ，CH_3），１．２１～２．２０（ｍ，１８Ｈ，CH_2），２．９５（ｂｓ，２Ｈ，CH_2），３．１２（ｂｓ，

２Ｈ，CH_2），３．５０～３．７５（ｍ，４Ｈ，NCH_2），４．１０～４．５５（ｍ，６Ｈ，OCH_2，ＮＣＨ，ＮＨＣＨ，H_2NCH），４．９９（ｓ，２Ｈ，ベンジルのCH_2），５．１０（ｄｄ，２Ｈ，ベンジルのCH_2），７．２８～７．４２（ｍ，１５Ｈ，ＡｒＨ），７．９５～８．５０（ｍ，６Ｈ，ＮＨ）。

【０３８６】

マススペクトル：１２４７．４（Ｍ＋Ｈ）$^+$。

ＤＰＰＥ－グルタロイル－ジ（アミノジオキサオクタノイル）－Ｔｈｒ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ－ＯＨ（６）の調製

Ｎ－グルタロイル－ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（４）（１６２ｍｇ、０．２ｍｍｏｌ）の塩化メチレン懸濁液（１．０ｍＬ）にＴＦＡ（２００μＬ）を加え、このようにして得られた透明溶液を蒸発させ、真空中で３０分乾燥した。次にこれを無水塩化メチレン（２．０ｍＬ）に再溶解し、ジ（アミノジオキサオクタ）－Ｔｈｒ（Ｏｂｚｌ）－Ｌｙｓ（Ｚ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（NO_2）ＯＢｚｌ－（２４８ｍｇ、０．２ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（３．０ｍＬ）に加えた。ＨＡＴＵ（７７ｍｇ、０．２ｍｍｏｌ）、続いてジイソプロピルエチルアミン（５２ｍｇ、０．４ｍｍｏｌ）を加え、その反応混合物を室温で６時間攪拌した。真空中で溶媒を除去し、残部を酢酸エチル（５０ｍＬ）に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム（３×２５ｍＬ）、重硫酸ナトリウム（２×３０ｍＬ）で洗浄し、最後にブラインで洗浄した（３０ｍＬ）。その有機層を乾燥し、溶媒を除去し、カップリングした生成物を無色のガラス状の固体として得た（３９５ｍｇ）。これをシリカゲル（１０ｇ）のカラムクロマトグラフィーで、溶離液として塩化メチレン中の１０％のメタノールを用いて精製した。原料を含む分画をあわせ、溶媒を除去し、カップリングした生成物を得た（３１５ｍｇ、収率７３％）。この生成物（２０４ｍｇ、０．１ｍｍｏｌ）のメタノール溶液（１５ｍＬ）、酢酸エチル（５．０ｍＬ）および酢酸（２．０ｍＬ）に、Ｐｄ（ＯＨ）$_2$（Deguzzaタイプ、８０ｍｇ）を加え、その混合物を５０ｐｓｉで４８時間水素化した。上記触媒をろ過して除き、溶媒を除去し、粗生成物をガラス状の固体として得た。これを無水エーテルで粉砕し、生成物を白色粉末として得た。さらにこの粗生成物を、Ｃ－４カラムを用いた分取用ＨＰＬＣで、溶離液として７５％のアセトニトリル水溶液を用いて精製した。化合物を含む分画を得て、凍結乾燥し、生成物６を無色のふわふわした固体固形として得た（６６ｍｇ、収率３９．５％）。

【０３８７】

ＨＰＬＣ：保持時間８．８分、カラム：ＹＭＣ、Ｃ－４（４．６×２５０ｍｍ）；溶媒：水－アセトニトリル、いずれも０．１％のＴＦＡを含む：溶離条件：８０％のアセトニトリル／２０％の水での均一濃度溶離；流速：１．０ｍＬ／分；検出：ＵＶ２２０ｎｍ。

【０３８８】

^{1}Ｈ－ＮＭＲ：（ＤＭＳＯ）δ０．８６（ｔ，６Ｈ，CH_3），１．０３（ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ，３Ｈ，CH_3），１．２４（ｂｓ，４８Ｈ，CH_2），１．２５～２．２０（ｍ，３０Ｈ，CH_2），２．２５（ｂｓ，１Ｈ，CH_2），２．９５（ｂｓ，２Ｈ，CH_2），３．２０～３．３５（ｍ，２４Ｈ，CH_2），３．４０～３．８５（ｍ，４Ｈ，NCH_2），３．９５～４．５５（ｍ，１５Ｈ，CH_2，ＮＣＨ，ＮＨＣＨ，ＣＨＣＯＯＨ）），５．１０（ｂｓ，１Ｈ，ＣＨ），７．５５～８．２０（ｍ，５Ｈ，ＮＨ）。

【０３８９】

マススペクトル：１６７６．２（Ｍ＋Ｈ）$^+$。

元素分析：測定値：Ｃ，５１．５８；Ｈ，８．２２；Ｎ，８．６１％。$C_{80}H_{147}N_{12}O_{23}P.2CF_3COOH.3H_2O$の計算値：Ｃ，５１．５２；Ｈ，７．９８；Ｎ，８．５８；Ｏ，２４．５１；Ｆ，５．８２；Ｐ，１．５８％。

【０３９０】

実施例２４：静置培養における、実施例５の組成物Ｉ（ＢＲＵ－１１４）のＨＡＥＣへの結合に関するリンカーの影響

実施例７で説明したように、１％のＢＲＵ－２９２（実施例２３の組成物）（ＢＲＵ－１１４（実施例５の組成物Ｉ）より長いリン脂質（B_{1a}）とターゲティング成分（Ａ）との

間のリンカーを有する）、および１％のＢＲＵ－１１４を含むマイクロバブル組成物を用いて、組成物を再生し、分析を行った。

【０３９１】

結果：

以下の表で示すように、２．５μＭの遊離ＴＫＰＰＲペプチドの存在下で、１％のＢＲＵ－１１４組成物および１％のＢＲＵ－２９２組成物のバブルのＨＡＥＣへの結合は類似していた。しかしながら、競合するペプチドの濃度が５０μＭに増加するにつれて、ＢＲＵ－２９２を含むバブルの結合はＢＲＵ－１１４を配合されたものよりも強くなったようにみえるが、これは、前者は２５μＭのＴＫＰＰＲにより本質的に変化しなかったが、同じ処理によりＢＲＵ－１１４含有バブルの結合は最もブロックされたためである。従って、標的化用分子全体の脂質成分と標的化用成分との間のスペーサーがより長いと、結合は強められる。

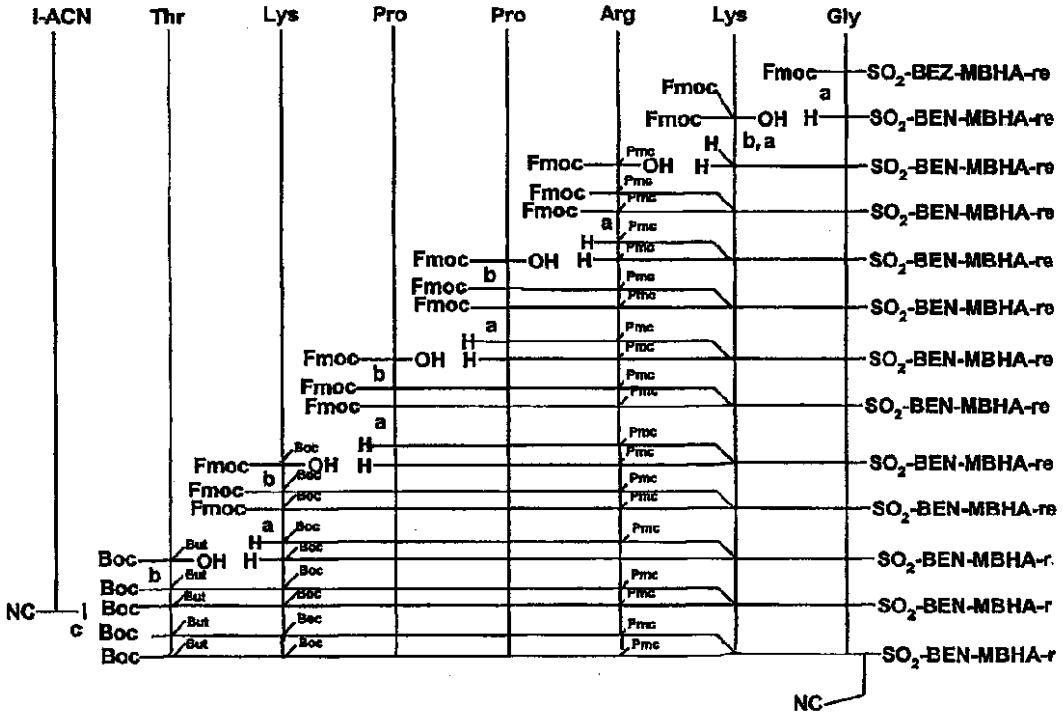
【０３９２】

【表２２】

表．バブルのＨＡＥＣへの結合－結合頻度および結合強度に関する、標的化する分子のスペーサー長さの効果。値は、２回の測定値の平均である。

処理	BRU-114配合物に結合したバブル	BRU-292配合物に結合したバブル
2.5 microM TKPPR	1237	888
10 microM TKPPR	535	833
25 microM TKPPR	75	718
50 microM TKPPR	9	462

【表２３】



a = 25% Pip/DMF; b = HATU, DIEA, DMF; c = NMP, DIEA

【０３９３】

実施例２５：超音波検査法のための、ＤＰＰＥ－Ｇｌｕ－ＧＴＫＰＰＲを含む気体充填微小中空球組成物の調製

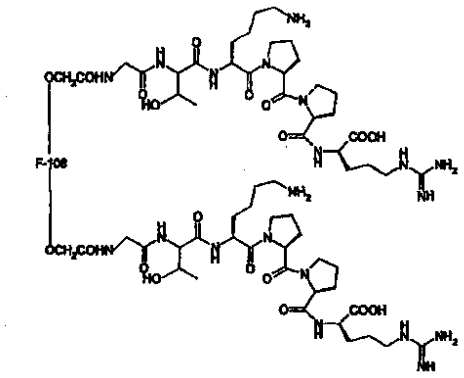
欧州特許第０４５８７４５号の特許の実施例３で説明されたように、８０ｍｇのＤＰＰＥ－ＧＬＵ－ＧＴＫＰＰＲと、０．８ｇの５０／５０ＤＬラクチド／グリコリドコポリマー（Boehringer社製）と、４ｍＬのオクタンと、２００ｍＬのテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）とを用いて、微小中空球を調製した。

【０３９４】

実施例２６：Ｆ－１０８－（$OCH_2CONHGTKPPR)_2$の調製

【０３９５】

【化４０】



【０３９６】

Ａ）Ｆ－１０８（OCH_2COOH）$_2$

$HOOCCH_2O$－Ｆ１０８－OCH_2COOH

ポロキサマーＦ－１０８（ＯＨ）$_2$（市販のコポリマー）の１４．０ｇ（１．０ｍｍｏｌ）のＴＨＦ溶液（２５０ｍＬ）に、ＮａＨの０．１ｇ（４．２ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を室温で４時間攪拌した。ｔ－ブチルブロモアセテートの１．２ｇ（６．０ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を４５℃で２４時間攪拌した。過剰なＮａＨをｔ－ブタノールを加えて破壊した。ＴＨＦを除去し、生成物をイソプロパノールで結晶化した。トリフルオロ酢酸（２５ｍＬ）を１０．２ｇ（０．７２ｍｍｏｌ）のｔ－ブチルエステルに加え、その混合物を室温で２４時間攪拌した。エーテルを加え、得られた沈殿をエチルアルコールで再結晶化した。ジカルボン酸（５０ｍｇ）を２ｍＬの水に溶解し、指示薬としてメチルオレンジを用いて、０．１Ｎのテトラメチルアンモニウム水酸化物に対して滴定した。その結果によれば、７４％置換されたことが示された。^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

【０３９７】

Ｂ）Ｆ－１０８（OCH_2COCl）$_2$

$ClOCCH_2O$－Ｆ１０８－OCH_2COCl

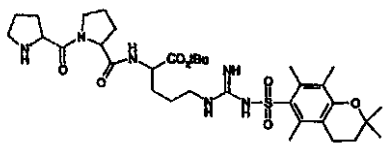
Ｆ－１０８（OCH_2COOH）$_2$（０．２８ｇ、０．０２ｍｍｏｌ）のCCl_4溶液（７．０ｍＬ）に、塩化チオニル（０．３ｍＬ、４．０ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を２時間還流した。溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残部を乾燥エーテル（５０．０ｍＬ）で処理し、沈殿した固体をろ過し、エーテルで洗浄し、真空下で乾燥し、さらに精製しないで次の段階で用いた。収率は０．２２ｇ（７８％）であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

【０３９８】

Ｃ）H_2N－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕ

【０３９９】

【化４１】



【０４００】

Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ（市販）１．０ｇ（０．００２３ｍｏｌ）の塩化メチレン溶液にＨＡＴＵの０．９５ｇ（０．００２５ｍｏｌ）を加え、その混合物を０℃に冷却した。ジイソプロピルエチルアミン（ethyarnine）の０．４３ｇ（０．６ｍＬ、０．００３３ｍｏｌ）を加え、その混合物を０℃で５分間攪拌した。アルギニン（Ｐｍｃ）ｔ－ブチルエステルの１．０ｇ（０．００２ｍｏｌ）を加え、その混合物を０℃で３０分間、および、室温で５時間、攪拌した。次に、塩化メチレンを除去し、残部を炭酸水素ナトリウム溶液

で処理し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水で洗浄し、乾燥した（Na_2SO_4）。酢酸エチル溶液を蒸発させ、得られた油を真空下で乾燥し、泡状の固体を得た。

【０４０１】

Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕの１．７ｇ（１．８６ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（５０ｍＬ）に溶解し、ピペリジン（２ｍＬ）で処理し、その混合物を室温で４時間攪拌した。溶媒を除去し、残部をクロマトグラフィーで塩化メチレン－メタノール（８：２）を用いて精製した。

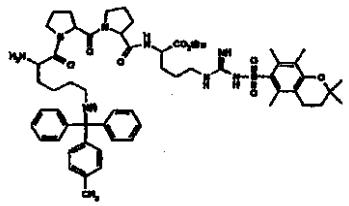
【０４０２】

^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

Ｄ）H_2N－Ｋ（Ｍｔｔ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕ

【０４０３】

【化４２】



【０４０４】

Ｎ－Ｆｍｏｃ－Ｎ－（４－メチルトリチル）－Ｌ－リシン（市販）の２．１２ｇ（０．００５６ｍｏｌ）とＨＡＴＵの３．５ｇ（０．００５６ｍｏｌ）との塩化メチレン溶液（２５ｍＬ）に、ジイソプロピルエチルアミンの０．９ｇ（１．２ｍＬ、０．００７ｍｏｌ）を加え、その混合物を０℃で１０分間攪拌した。次に、Ｈ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）ｔ－ブチルエステルの３．０ｇ（０．００４３４ｍｏｌ）を加え、その混合物を室温で６時間攪拌した。塩化メチレンを除去し、残部を炭酸水素ナトリウムの飽和溶液で処理した。次に、これを酢酸エチルで抽出し、水で洗浄し、乾燥した（Na_2SO_4）。酢酸エチル溶液を蒸発させ、残部を真空下で乾燥し、泡状の固体を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで、塩化メチレン－メタノール（９５：５）を用いて精製した。生成物を含む分画を回収し、蒸発させ、泡状の固体を得た。

【０４０５】

テトラペプチドのアセトニトリル溶液（２０ｍＬ）に、ピペリジン（５ｍＬ）を加え、４時間攪拌した。アセトニトリルと過量のピペリジンとを除去し、残部をシリカゲルカラムでクロマトグラフィー処理した（CH_2Cl_2：CH_3OH、９５：５）。収率：２．２ｇ（８６％）。

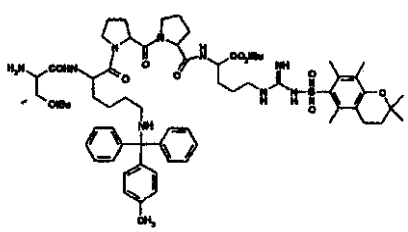
【０４０６】

^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

Ｅ）H_2N－Ｔ（ｔＢｕ）－Ｋ（Ｍｔｔ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕ

【０４０７】

【化４３】



【０４０８】

Ｆｍｏｃ－スレオニンｔ－Ｂｕ（市販）の１．０ｇ（０．００２７５ｍｏｌ）およびＨＡＴＵの１．０４５ｇ（０．００２７５ｍｏｌ）の塩化メチレン冷却溶液（０℃）に、ジイ

ソプロピルエチルアミンの０．３９ｇ（０．５４ｍＬ、０．００３ｍｏｌ）を加え、その混合物を０℃で５分間攪拌した。次に、テトラペプチドＤ）２．２ｇ（０．００２ｍｏｌ）を加え、その混合物を０℃で３０分間、および、室温で１２時間攪拌した。次に、塩化メチレンを除去し、残部を炭酸水素ナトリウムの飽和溶液で処理し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水で洗浄し、乾燥した（Na_2SO_4）。酢酸エチルを除去し、油を得て、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（CH_2Cl_2：CH_3OH、９５：５）。化合物を含む分画を回収し、蒸発させ、油を得て、これを真空下で乾燥し、泡状の固体を得た。

【０４０９】

Ｆｍｏｃ－Ｔ（ｔＢｕ）－Ｋ（Ｍｔｔ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕとピペリジンのアセトニトリル溶液とを反応させ、その混合物を室温で４時間攪拌した。溶媒を除去し、残部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（CH_2Cl_2：CH_3OH、９５：５）。生成物を含む分画を回収し、蒸発させ、油を得て、これを真空下で乾燥し、固体を得た。収率：１．６ｇ（９０％）。

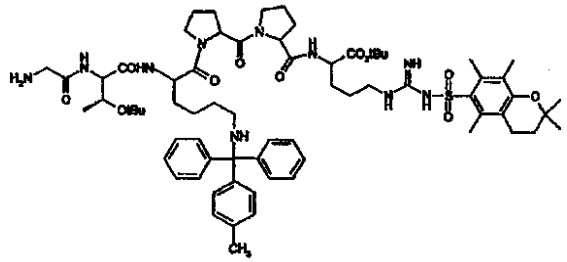
【０４１０】

^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

Ｆ）H_2N－Ｇ－Ｔ（ｔＢｕ）－Ｋ（Ｍｔｔ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕ

【０４１１】

【化４４】



【０４１２】

H_2N－Ｔ（ｔＢｕ）－Ｋ（Ｍｔｔ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕの１．６ｇ（０．００１２ｍｏｌ）およびＨＡＴＵの０．５７ｇ（０．００１５ｍｏｌ）の塩化メチレン（１０．０ｍＬ）の冷却溶液（０℃）に、ジイソプロピルエチルアミンの０．３９ｇ（０．５４ｍＬ、０．００３ｍｏｌ）を加え、その混合物を０℃で１０分間攪拌した。Ｆｍｏｃ－グリシンの０．４４ｇ（０．００１５ｍｏｌ）を反応混合物に加え、室温で１２時間攪拌した。塩化メチレンを除去し、残部を炭酸水素ナトリウムの飽和溶液で処理し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水で洗浄し、乾燥した（Na_2SO_4）。酢酸エチルを除去し、油を得て、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（CH_2Cl_2：CH_3OH、９５：５）。化合物を含む分画を回収し、蒸発させ、油を得て、これを真空下で乾燥し、泡状の固体を得た。収率：１．６５ｇ（８４％）。

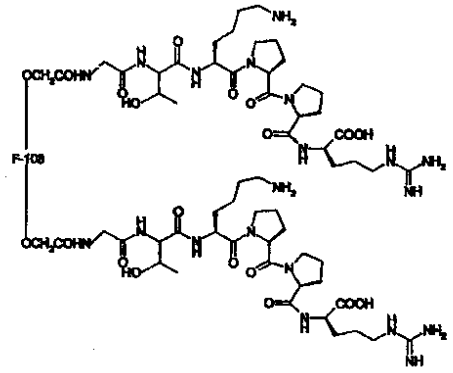
【０４１３】

^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

Ｇ）Ｆ－１０８［OCH_2CONH－Ｇ－Ｔ（ｔＢｕ）－Ｋ（Ｍｔｔ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｒ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕ］$_2$

【０４１４】

【化４５】



【０４１５】
H_2N－Ｇ－Ｔ（ｔＢｕ）－Ｋ（Ｍｔｔ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｒ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢｕの０．１４ｇ（０．００９ｍｍｏｌ）の塩化メチレン溶液（２．０ｍＬ）に、Ｆ－１０８（$OCH_2COCI)_2$Ｂ）の３０ｍｇ（０．０２３ｍｍｏｌ）およびジイソプロピルエチルアミンの３０ｍｇ（４０μＬ、０．２３ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を室温で２４時間撹拌した。塩化メチレンを除去し、残部をエーテルで処理した。沈殿した固体をろ過し、真空下で乾燥した。得られた固体を水（７．０ｍＬ）に溶解し、水で２４時間透析した。次に、ポリマーを含む溶液を凍結乾燥し、白色固体を得た。収率：０．１３ｇ。

【０４１６】
Ｆ－１０８［OCH_2CONH－Ｇ－Ｔ（ｔＢｕ）－Ｋ（Ｍｔｔ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｒ（Ｐｍｃ）－ＯｔＢＵ］$_2$の０．１２ｇ（０．００７４ｍｍｏｌ）に、フェノールの２５．０ｍｇと、トリイソプロピルシランの０．１ｍＬと、トリフルオロ酢酸（１．０ｍＬ）とを加えた。反応混合物を室温で１２時間撹拌した。ＴＦＡを真空下で除去し、残部を真空下で乾燥した。得られた濃縮ペーストをエーテルで粉砕し、そのエーテル溶液をデカンテーションした。残基を真空下で乾燥し、ＴＦＡ塩を白色固体として得た。ＴＦＡ塩を水（１．０ｍＬ）に溶解し、２ＮのNH_4OH（ｐＨ＝１０）で塩基性にした。得られた溶液を水で２４時間透析した。得られた溶液を凍結乾燥し、Ｆ－１０８－（OCH_2COHＮＧＴＫＰＰＲ）$_2$を白色固体として得た。収率：９２ｍｇ（７７％）。

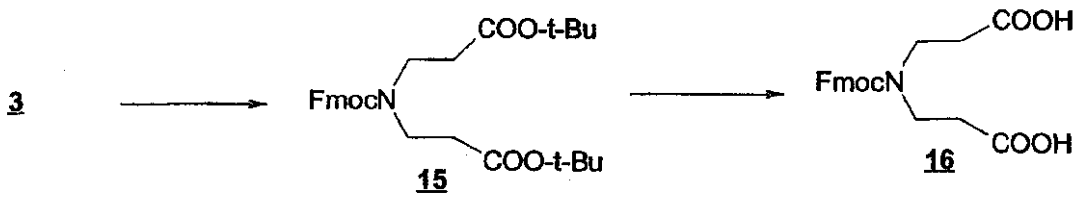
【０４１７】
^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＲＭＳスペクトルは、その構造と一致する。

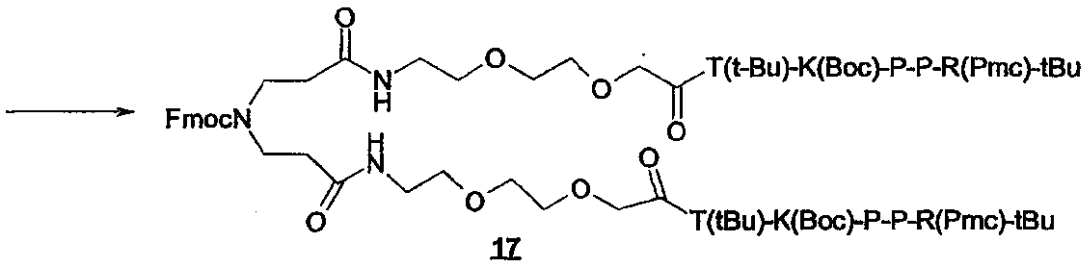
実施例２７：ＴＫＰＰＲ二量体（ＢＲＵ－３１７）の合成

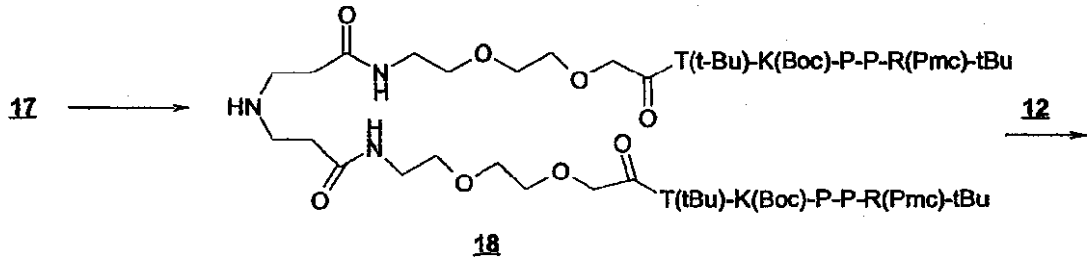
合成スキーム：

【０４１８】

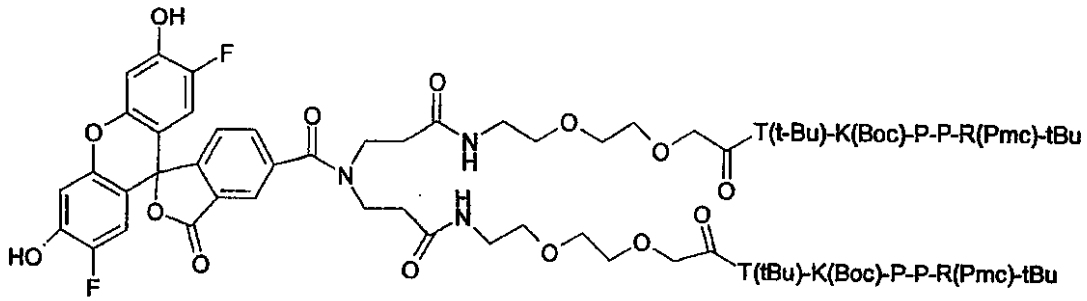
【化４６】


3
COO-t-Bu
FmocN
COO-t-Bu
15
COOH
FmocN
COOH
16


FmocN
T(t-Bu)-K(Boc)-P-P-R(Pmc)-tBu
T(tBu)-K(Boc)-P-P-R(Pmc)-tBu
17

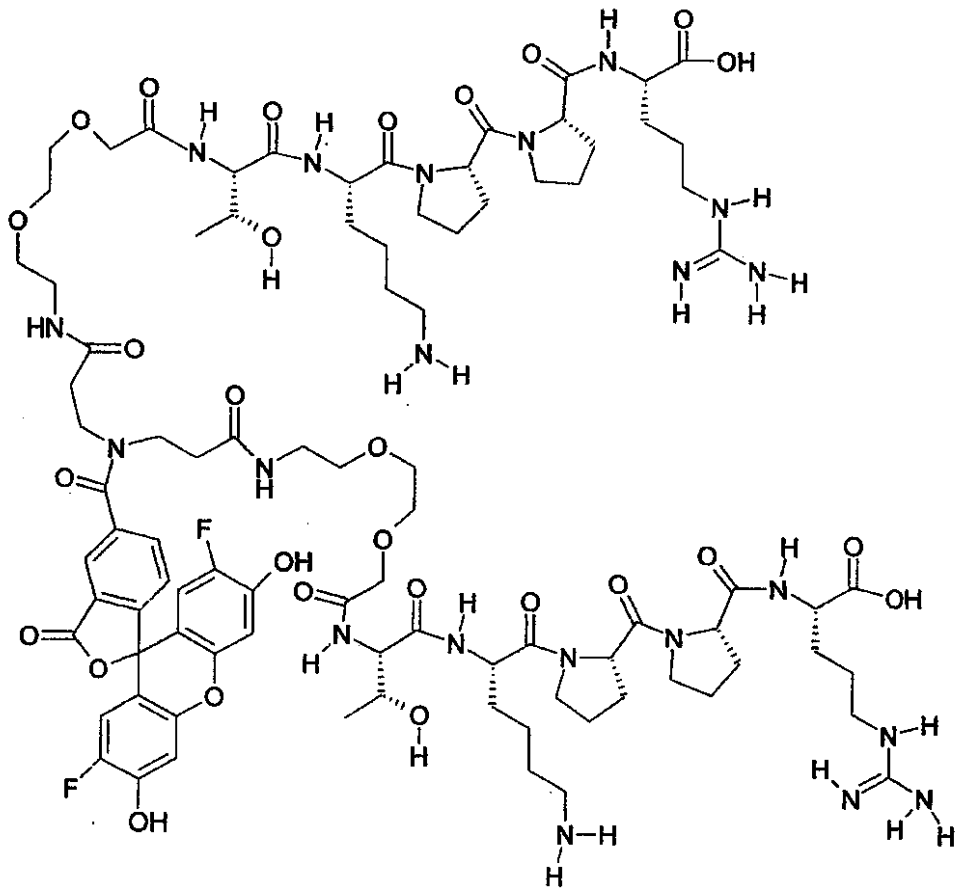

17
HN
T(t-Bu)-K(Boc)-P-P-R(Pmc)-tBu
T(tBu)-K(Boc)-P-P-R(Pmc)-tBu
18
12

【０４１９】
【化４７】



19

BRU - 317



BRU - 317

【０４２０】

実験

Ｆｍｏｃアミン１５：

アミン3（２．７３ｇ、１０ｍｏｌ）をＴＨＦ／水の混合物（４０：１０）に溶解し、アイスバスで冷却した。Ｆｍｏｃ－ＮＨＳエステル（５．１ｇ、１５ｍｍｏｌ）を固体として加え、続いて固体炭酸水素ナトリウム（１．３４ｇ、１５ｍｍｏｌ）を加えた。その反応混合物を室温で２０時間攪拌した。その溶液を１００ｍＬのＥｔＯＡｃで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム（２×５０ｍＬ）、水（１×１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。溶媒を蒸発させ、続いて、フラッシュシリカゲル（２００．０ｇ）で粗生成物をクロマトグラフィー処理し、生成物を無色のペーストとして得た（６：４＝ヘキサン：ＥｔＯＡｃ）。収率：３．２ｇ（６５％）。R_f：０．３８（１：１のＥｔＯＡｃ／

ヘキサン）。^{1}H－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）δ（２Ｓ，１８Ｈ，メチル），２．２５（ｔ，２Ｈ，－ＣＯＣＨ$_2$），２．５（ｔ，２Ｈ，ＣＯＣＨ$_2$），３．４（ｔ，２Ｈ，Ｎ－ＣＨ$_2$），３．５（ｔ，２Ｈ，Ｎ－ＣＨ$_2$），４．２５（ｔ，１Ｈ，Ａｒ－ＣＨ），４．５（ｄ，２Ｈ，Ｏ－ＣＨ$_2$），７．２５（ｍ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ），７．４（ｍ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ），７．６（ｄ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ）および７．７５（ｄ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ）。ＭＳ　ｍ／ｚ　５１８．３［Ｍ＋Ｎａ］。

【０４２１】

二酸（Bisacid）１６：

Ｆｍｏｃアミノエステル１５（３．０ｇ、６ｍｍｏｌ）をＴＦＡ／アニソール（２２ｍＬ、２０：２、ｖ／ｖ）に溶解し、室温で２時間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部を無水エーテル（２０ｍＬ）で粉砕した。沈殿した固体をろ過し、エーテルで洗浄した。次に固体をアセトニトリルで再結晶化し、無色の固体を得た。収率：１．５ｇ（６５％）。融点：＞２００℃（ｄｅｃ．）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ３．０（ｔ，２Ｈ，ＣＯ－ＣＨ$_2$），３．１５（ｔ，２Ｈ，ＣＯ－ＣＨ$_2$），４．１（ｔ，２Ｈ，Ｎ－ＣＨ$_2$），４．１５（ｔ，２Ｈ，Ｎ－ＣＨ$_2$），５．０５（ｔ，１Ｈ，Ａｒ$_2$－ＣＨ），５．１（２Ｈ，Ｏ－ＣＨ$_2$），８．０５（ｔ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ），８．１（ｔ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ），８．４５（ｄ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ）および８．５（ｄ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ）。ＭＳ　ｍ／ｚ　３８４．１［Ｍ＋Ｈ］。

【０４２２】

ビスアミド１７：

二酸１６（０．１３ｇ、０．３４ｍｍｏｌ）をＴＨＦ／ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（２：１、３ｍＬ）に溶解し、アイスバスで冷却した。ＨＡＴＵ（０．３８ｇ、１ｍｍｏｌ）を加え、続いてＤＩＥＡ（０．２６ｇ、２ｍｍｏｌ）を加え、０℃で３０分間攪拌した。アミン９（０．８４ｇ、０．６９ｍｍｏｌ）のＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$溶液（２ｍＬ）を加え、その反応混合物を室温にし、２０時間攪拌した。その溶液を５０ｍＬの酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム（２×５０ｍＬ）と水で洗浄し、乾燥した。溶媒を減圧下で除去し、残部をフラッシュシリカゲル（１５０．０ｇ）でクロマトグラフィー処理した。クロロホルム中の１０％のメタノールで溶離することによって、所望の生成物を溶離した。化合物を含む分画を貯蔵し、減圧下で蒸発させ、生成物を無色の発泡体として得た。収率：０．８２ｇ（８６％）。Ｒ$_f$：０．７５（８：２のＣＨＣｌ$_3$：ＭｅＯＨ）。ＭＳ　ｍ／ｚ　２７９１．４［Ｍ＋Ｈ］。ＨＰＬＣ：ｔ$_R$：２５．２３分（Ｃ８，ＲＰ，Zorbaxカラム；２５０×４．６ｍｍ；溶媒Ａ：０．１％のＴＦＡを含む水、および、溶媒Ｂ：０．１％のＴＦＡを含むＡＣＮ；溶離速度：１ｍｌ／分；検出：２２０ｎｍ）。

【０４２３】

アミン１８：

Ｆｍｏｃ－アミン１７（０．４９ｇ、０／．１７５ｍｍｏｌ）を１０％のピペリジンのＡＣＮ溶液に溶解し（５ｍＬ、Ｖ／ｖ）、室温で３０分間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部をフラッシュシリカゲル（５０．０ｇ）でクロマトグラフィー処理した。２０％のメタノールのクロロホルム溶液で溶離し、所望のアミンを溶離させ、溶媒を蒸発させ、無色の発泡体とした。収率：０．２２ｇ、５０％。Ｒｆ：０．３７５（３：１、クロロホルム：メタノール）。ＭＳ　ｍ／ｚ　２５６８．６［Ｍ＋Ｈ］。ＨＰＬＣ：ｔ$_R$：２２．７７分（Zorbax　Ｃ８　ＲＰカラム；２５０×４．６ｍｍ；溶媒Ａ：０．１％のＴＦＡを含む水；溶媒Ｂ：０．１％のＴＦＡを含むＡＣＮ；溶離速度：１ｍｌ／分；検出：２２０ｎｍ）。

【０４２４】

ＢＲＵ－３１７：

アミン１８（０．２２ｇ、０．０８５ｍｍｏｌ）を乾燥ＤＩＶＩＦ（０．２５ｍＬ）に溶解し、オレゴングリーンＮ－ヒドロキシスクシンイミジルエステル（０．０４３３ｇ、０．０８５ｍｍｏｌ）とＤＭＡＰ（１１ｍｇ、０．０９ｍｍｏｌ）とで処理し、２０時間攪拌し、次に、４５℃まで温め、その温度を７２時間維持した。次に、その反応混合物を水

で希釈し、沈殿した固体をろ過し、水で洗浄した。明るいオレンジ色の固体を乾燥し、６ｍＬのＴＦＡとアニソール（ｖ／ｖ－５：１）で６時間デブロック（deblock）した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部を１０ｍＬの無水エーテルで希釈した。分離した固体をろ過して除き、エーテル（３×１０ｍｌ）で洗浄した。次に、沈殿を分取用ＨＰＬＣカラムで精製した［ＹＭＣ、Ｃ－１８　ＲＰカラム；２５０×３０ｍｍ；Ｓ－１０Ｐμ；１２０Å；溶離速度：３０ｍＬ／分；溶媒Ａ：０．１％のＴＦＡを含む水；溶媒Ｂ：０．１％のＴＦＡを含むＡＣＮ；検出：２３０ｎｍ；６０分で１０～７０％のＢ］。t_R：２０．３２分［ＹＭＣ、Ｃ－１８　ＲＰ分析カラム；２５０×４．６ｍｍ；溶離速度：１ｍＬ／分；検出：２３０ｎｍ；３５分で１０～３５％のＢ］。D_2Oにおける^1H－ＮＭＲにより、予想の特徴的なピークが確認され、また、オレゴングリーンの１プロトンの比率が、２つのスレオニン単位に対して１：６であることも示され、予想の構造であることが確認された。ＭＳ　ｍ／ｚ　１００３．３［Ｍ＋２Ｈ］／２，６６９．４［Ｍ＋３Ｈ］／３，５０２．１［Ｍ＋４Ｈ］／４。分析：計算値：$C_{91}H_{131}F_2N_{21}O_{28}$，５$CF_3COOH$，９$H_2O$　Ｃ，４４．３；Ｈ，５．７；Ｆ，１１．８およびＮ，１０．７。測定値：Ｃ，４４．７；Ｈ，５．５５；Ｆ，１１．４１およびＮ，１０．８４。

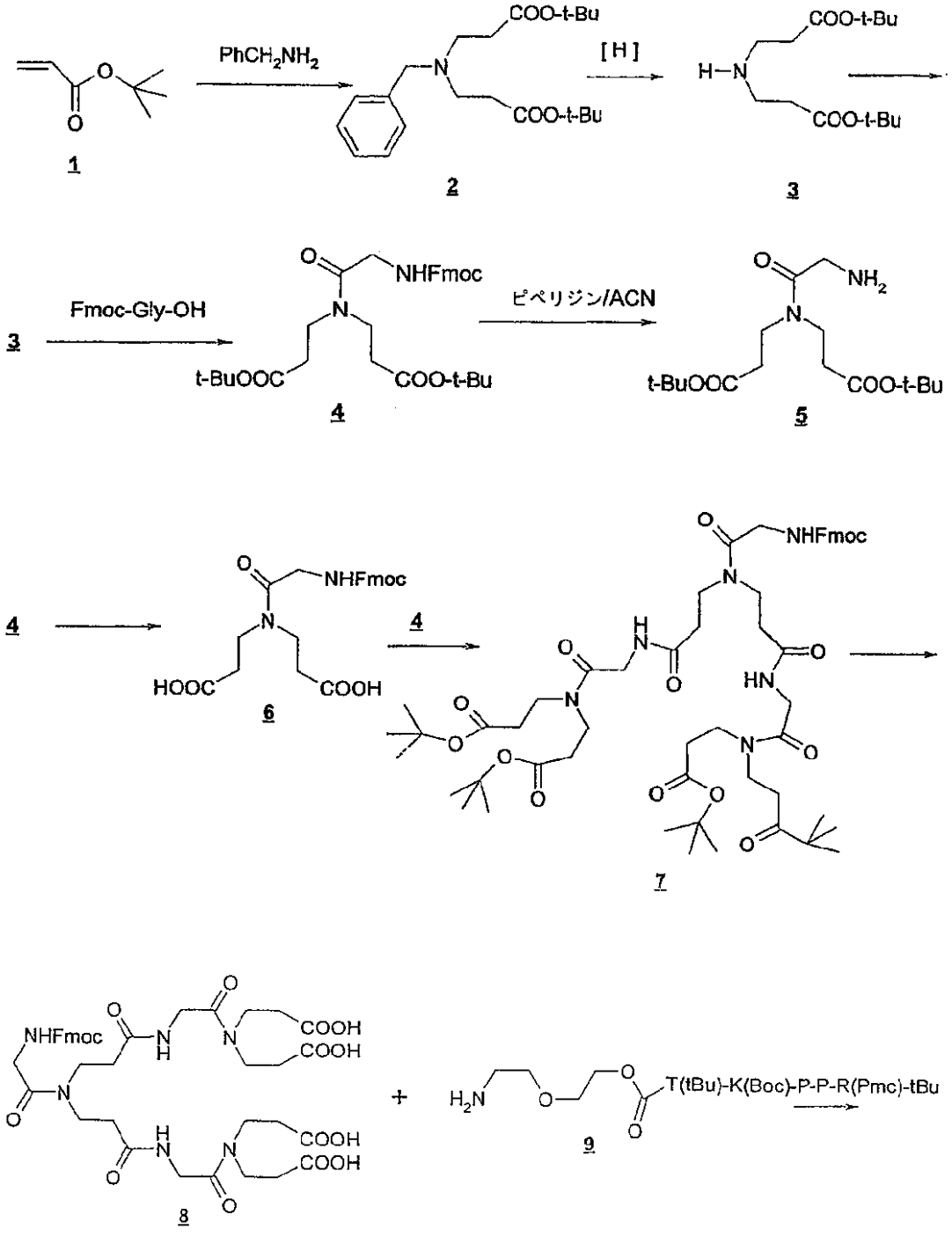
【０４２５】

実施例２８：ＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）の合成

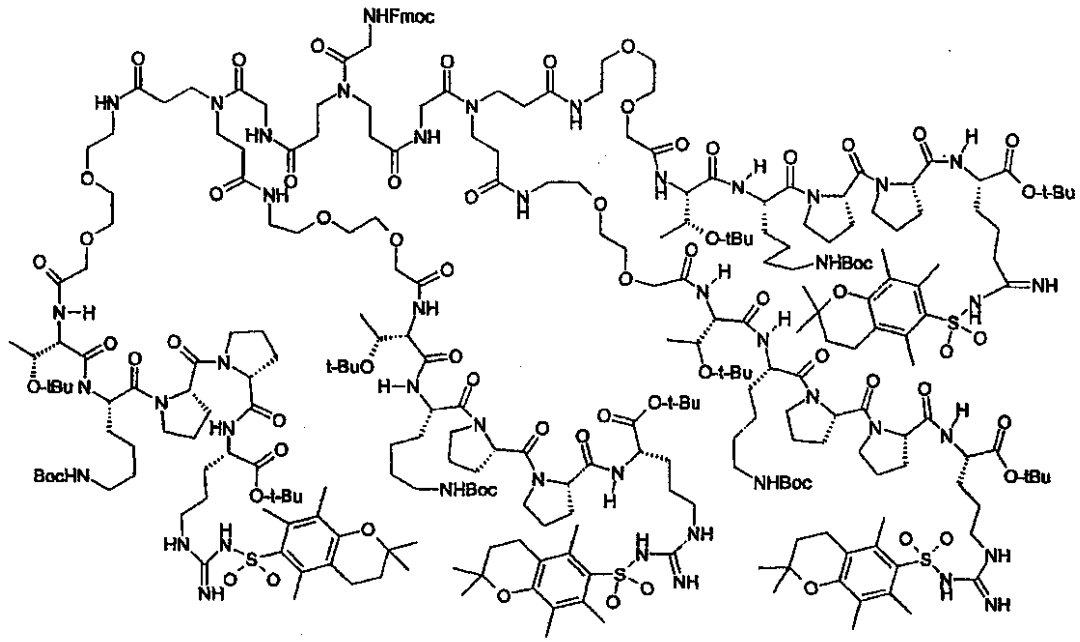
合成スキーム：

【０４２６】

【化４８】


PhCH2NH2
COO-t-Bu
[H]
1
2
3
Fmoc-Gly-OH
NHFmoc
ピペリジン/ACN
NH2
t-BuOOC
4
5
HOOC
6
7
8
9
T(tBu)-K(Boc)-P-P-R(Pmc)-tBu

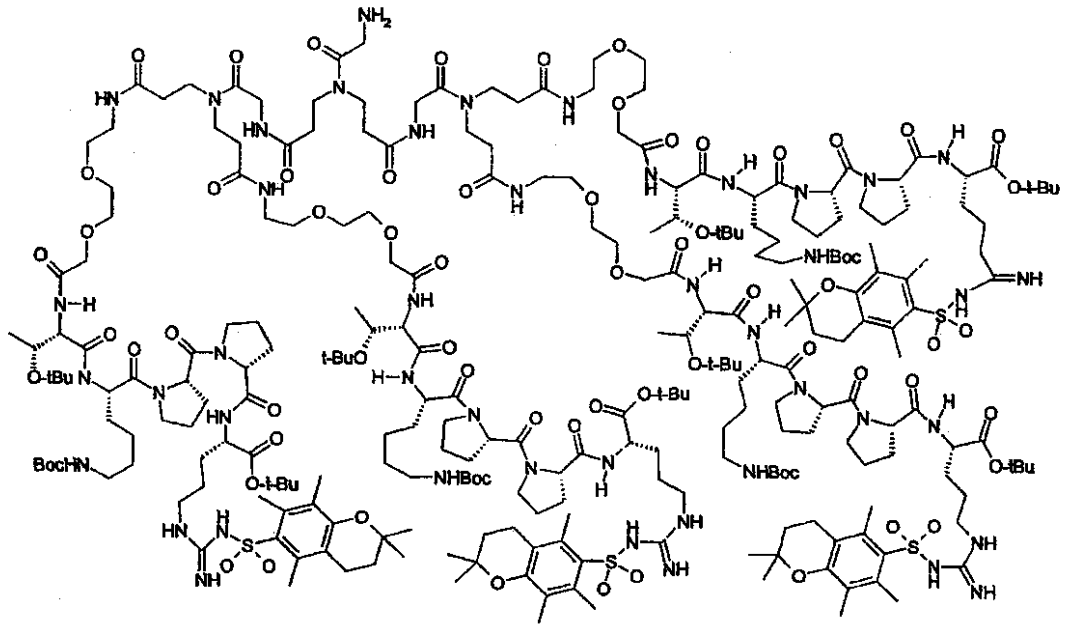
【０４２７】
【化４９】



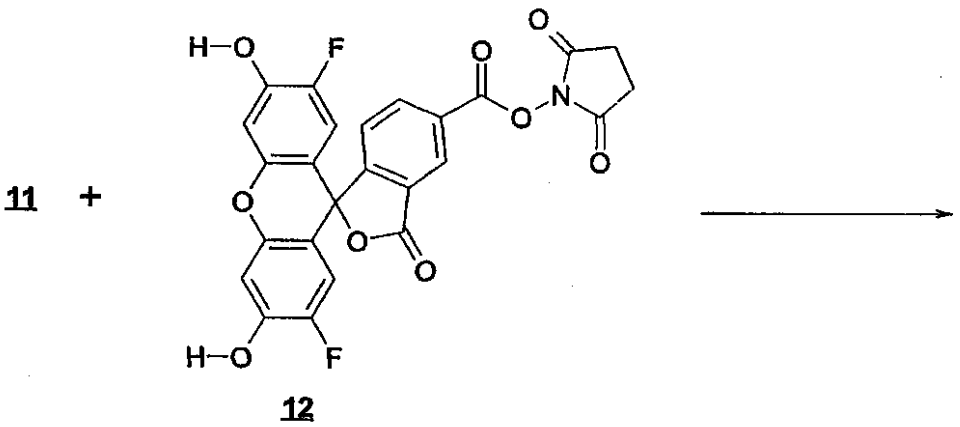
10

ピペリジン（アセトニトリル中）

【０４２８】
【化５０】

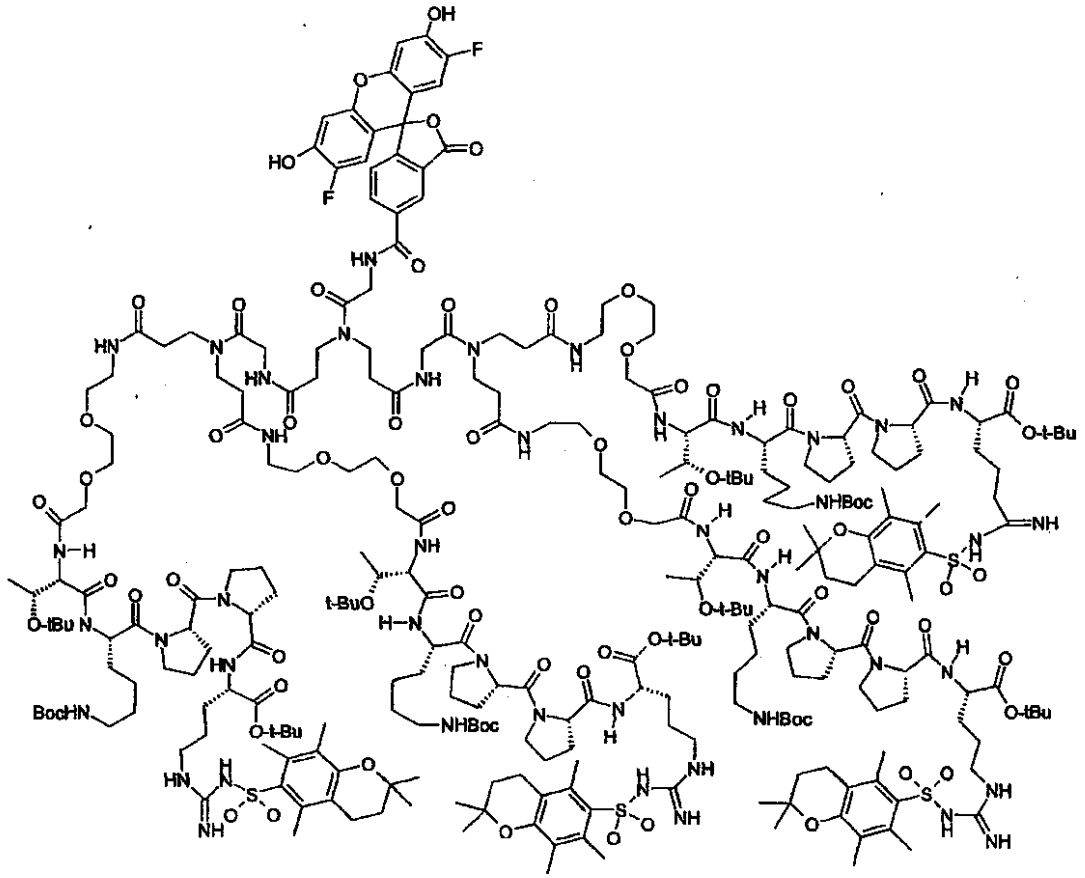


11

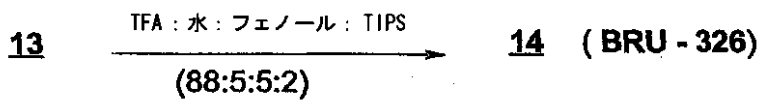


12

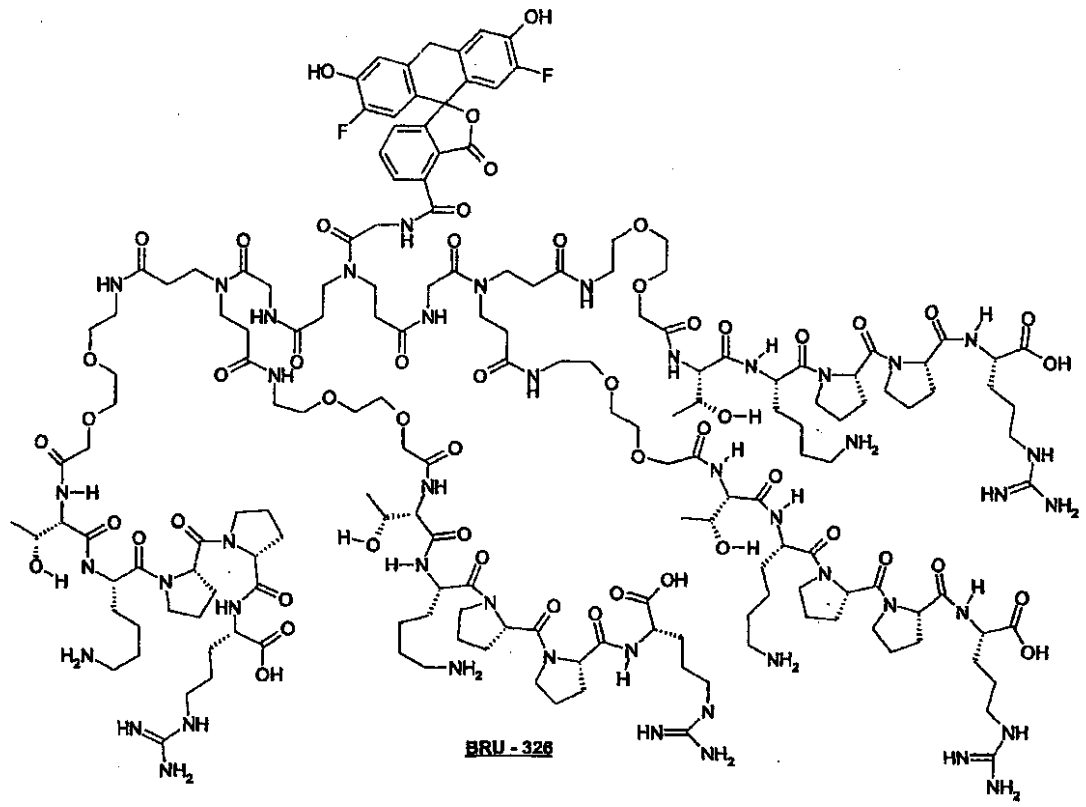
【０４２９】
【化５１】



13



【０４３０】
【化５２】



【０４３１】

実験：

一般的な方法：

全てのアミノ酸は、Advanced ChemTech社、NovaBiochem社および／またはNeosystem社などの商業的源から購入した。用いられた全ての溶媒は、ＨＰＬＣグレードのものであり、VWR Scientific社から購入した。ＮＭＲスペクトルは、Varian Unity Inova－500 MHz instrumentを用いて得られ、マススペクトルは、Agilent LCMSID 1100を用いて得た。カラムクロマトグラフィーには、Merck社製のシリカゲル（４００メッシュ）を用いた。元素分析は、Quantitative Technologies社が行った。

【０４３２】

考察中で用いられた略語を以下に記す。

Ｐｍｃ：２，２，４，６，７－ペンタメチルジヒドロベンゾフラン－５－スルホニル、

Ｂｏｃ：ｔ－ブチルオキシカルボニル、

ｔ－Ｂｕ－ｔ－ブチル、

Ｆｍｏｃ：フルオレニルメチルオキシカルボニル、

ＡＣＮ：アセトニトリル、

ＥｔＯＡＣ：酢酸エチル、

ＭｅＯＨ：メタノール。

【０４３３】

化合物２の調製：

ベンジルアミン（１０．７ｇ、０．１ｍｏｌ）とｔ－ブチルアクリレート（２７．０ｇ、０．２１ｍｏｌ）との混合物を、ＴＬＣでベンジルアミンがなくなるまで窒素下で８０℃に加熱した（３時間）。粗反応混合物をシリカゲルカラム（８００．０ｇ）上にローディングし、４．０Ｌのヘキサンで洗浄し、次に、１０％の酢酸エチルのヘキサン溶液で溶離した。生成物を含む分画を貯蔵し、蒸発させ、所望の化合物を無色の油として得た。R_f：０．８１（１：１、ヘキサン／ＥＡ）。収率：２３．０ｇ（６３％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（$CDCl_3$）δ１．４５（ｓ，９Ｈ，ｔ－Ｂｕ），２．４（ｔ，４Ｈ，－$COCH_2$）、２．７５（ｔ，４Ｈ，－Ｎ－CH_2），３．６（ｓ，２Ｈ，Ｎ－CH_2－Ａｒ）および７．２

５（ｍ，５Ｈ，Ａｒ－Ｈ）。ＭＳ　ｍ／ｚ　３６４．２［Ｍ＋Ｈ］。

【０４３４】

化合物３の調製：

アミン2（２．１２ｇ、５．８４ｍｍｏｌ）のＴＨＦ溶液（２５ｍＬ）を、炭素上のＰｄ（ＯＨ）$_2$（炭素は水の重量の５０％、Ｐｄの含量は２０％；０．４ｇ）の存在下で、ＴＬＣ上でアミンがなくなりはじめるまで水素化した（６時間）。その反応混合物をセライトでろ過し、ろ過物を減圧下で濃縮し、アミンを無色の油として得た。収率：１．５２ｇ（９５．５％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）δ１．５（ｓ，１８Ｈ，ｔ－Ｂｕ），２．１（ｍ，１Ｈ，Ｎ－Ｈ），２．４５（ｔ，３Ｈ，－ＣＯＣＨ$_2$）および２．８（ｔ，４Ｈ，－Ｎ－ＣＨ$_2$）。ＭＳ　ｍ／ｚ　２７４．５［Ｍ＋Ｈ］。

【０４３５】

化合物４：

Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ（４．５ｇ、１５ｍｍｏｌ）の乾燥ジクロロメタン溶液（２５ｍＬ）をＨＡＴＵ（６．８８ｇ、１８．０ｍｍｏｌ）で処理し、続いてＤＩＥＡ（５．１６ｇ、４０ｍｍｏｌ）で処理し、０℃で２０分間攪拌した。この活性化酸アミン３（３．７８ｇ、１３．８５ｍｍｏｌ）にジクロロメタン（２５ｍＬ）を加え、室温で２０時間攪拌した。次に、その反応混合物を酢酸エチル（１５０ｍＬ）で希釈し、飽和炭酸ナトリウム溶液（３×１００ｍＬ）、水（３×１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。その溶液をろ過し、減圧下で濃縮しペーストを得た。粗ペーストをフラッシュシリカゲル（５００ｇ）でクロマトグラフィー処理した。カラムを２５％の酢酸エチルのヘキサン溶液（４Ｌ）で洗浄して早く移動する不純物を除去し、次に、６：４の酢酸エチル：ヘキサンで溶離し続け、無色の粘性の油として生成物を得た。収率：７．０ｇ（９１．５％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）δ１．５（ｓ，１８Ｈ，ｔ－Ｂｕメチル），２．５（ｍ，４Ｈ，－ＣＯＣＨ$_2$），３．６（ｍ，６Ｈ，－Ｎ－ＣＨ$_2$），４．２５（ｔ，１Ｈ，Ａｒ$_2$－ＣＨ），４．４（ｄ，２Ｈ，－Ｏ－ＣＨ$_2$）および５．８（ｂｓ，１Ｈ，－ＮＨ）。ＭＳ　ｍ／ｚ　５６３．３［Ｍ＋Ｈ］。

【０４３６】

化合物５：

Ｆｍｏｃ－アミン－4（３．５ｇ、６．３４ｍｍｏｌ）の１０％のピペリジン（アセトニトリル中）溶液（ｖ／ｖ、ｍｌ）を室温で３０分間攪拌し、その際、ＴＬＣ上で出発原料はなくなった。その反応混合物を減圧下で濃縮し、残部をフラッシュシリカゲルカラム（２００．０ｇ）で精製した。１％のＭｅＯＨのクロロホルム溶液で溶離することによって殆どの不純物を除去し、５％のＭｅＯＨのクロロホルム溶液で溶離し続け、生成物を無色の固体として得た。融点：５７～５８℃。収率：１．５６ｇ（７４．６％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）１．４（ｓ，１８Ｈ，メチル），１．７（ｂｓ，２Ｈ，－ＮＨ$_2$），２．５（ｍ，４Ｈ，－ＣＯＣＨ$_2$），３．５～３．６（ｍ，６Ｈ，－ＮＣＨ$_2$）。ＭＳ　ｍ／ｚ　３３１．２［Ｍ＋Ｈ］。

【０４３７】

化合物６：

Ｆｍｏｃ－アミン4（３．５ｇ、６．３４ｍｍｏｌ）をＴＦＡ：アニソール（１０：２、ｖ／ｖ、２４ｍＬ）に溶解し、室温で６時間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部を乾燥エーテル（５０ｍＬ）で粉砕した。沈殿した固体をろ過して除去し、乾燥エーテル（３×２５ｍＬ）で洗浄した。上記固体をアセトニトリルで再結晶化し、二価酸を結晶質固体として得た。収率：１．８８ｇ（６７％）。融点：１７２～１７３℃。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ２．４（ｍ，４Ｈ，－ＣＨ$_2$－ＣＯＯＨ），３．３（ｍ，６Ｈ，－Ｎ－ＣＨ$_2$），３．７５（ｔ，１Ｈ，Ａｒ$_2$－ＣＨ），４．１（ｔ，２Ｈ，－０－ＣＨ$_2$），７．１５（ｔ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ），７．２（ｔ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ），７．５５（ｄ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ）および７．７５（ｄ，２Ｈ，Ａｒ－Ｈ）。ＭＳ　ｍ／ｚ　４４１．１［Ｍ＋Ｈ］。

【０４３８】

化合物７：
Ｆｍｏｃ－アミノ酸６（０．３１４ｇ、０．７１ｍｍｏｌ）の乾燥ジクロロメタンおよびＴＨＦ（１０ｍＬ、７：３、ｖ／ｖ）の溶液をアイスバスで冷却し、ＨＡＴＵ（０．６５ｇ、１．７１ｍｍｏｌ）で処理し、続いてＤＩＥＡ（０．２６ｇ、２ｍｍｏｌ）で処理し、窒素下で０℃で３０分間攪拌した。アミン５（０．４９５ｇ、１．５ｍｍｏｌ）の乾燥ジクロロメタン溶液（５ｍＬ）を上記活性化酸に加え、続いてＤＩＥＡ（０．２６ｇ、２ｍｍｏｌ）を加え、その反応混合物を室温で２０時間攪拌した。その反応混合物を２００ｍＬのＥｔＯＡｃで希釈し、有機層を飽和炭酸ナトリウム（２×１００ｍＬ）、水（２×１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。その溶液をろ過し、減圧下で蒸発させ、粗生成物を茶色のペーストとして得た。そのペーストをフラッシュシリカゲルカラム上にローディングし、クロマトグラフィー処理した（１２５．０ｇ）。全ての生成物がカラムから溶離するまで、カラムを、初めに７００ｍＬのクロロホルムで洗浄し、続いて２％のメタノールのクロロホルム溶液で洗浄した。化合物を含む分画を貯蔵し、減圧下で蒸発させ、テトラエステル７を無色のペーストとして得た。収率：０．６７ｇ（８８．７％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）δ１．４（ｓ，３６Ｈ，メチル），２．５（ｍ，１２Ｈ，－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$），３．５～３．７（ｍ，－Ｎ－ＣＨ$_{2}$），４．２～４．４（３ｍ，６Ｈ，－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－Ｎ－），５．７５（ｂｍ，１Ｈ，ＮＨ－Ｆｍｏｃ）および７．２５～７．７５（ｍ，８Ｈ，Ａｒ－Ｈ）。ＭＳ　ｍ／ｚ　１０６５．４［Ｍ＋Ｈ］。

【０４３９】
四酸８：
テトラエステル７（０．６７ｇ、０．６３ｍｍｏｌ）をＴＦＡ／アニソール（１２ｍＬ、１０：２、ｖ／ｖ）に溶解し、室温で２０時間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部を乾燥エーテル（５０ｍＬ）で粉砕した。分離した固体をエーテル（３×２５ｍＬ）で洗浄し、次に、アセトニトリルで再結晶化した。収率：０．２４ｇ（４５％）。融点：１３５～１３６℃。ＨＰＬＣ：ｔ$_{R}$－２７．２２分［ＹＭＣ－ＲＰ　Ｃ－１８カラム；２５×０．４６ｃｍ；溶離速度：１ｍＬ／分；溶媒Ａ－水（０．１％のＴＦＡ）および溶媒Ｂ－ＡＣＮ（０．１％のＴＦＡ）；５０分で５０～１００％のＢ］。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ２．６（ｍ，１２Ｈ，－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$），３．６（ｍ，１２Ｈ，－Ｎ－ＣＨ$_{2}$），４．１（ｍ，６Ｈ，－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－Ｎ），４．４（ｍ，－ＯＣＨ$_{2}$およびＡｒ$_{2}$－ＣＨ）および７．４～８．０（ｍ，８Ｈ，Ａｒ－Ｈ）。ＭＳ　ｍ／ｚ　８４１．２［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４０】
アミン９：
ａ）Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ：
市販のＦｍｏｃ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－ＯＨ（１．９６ｇ、４．４４ｍｍｏｌ）溶液を乾燥ジクロロメタン（２５ｍＬ）に溶解し、アイスバスで冷却した。ＨＡＴＵ（２．１ｇ、５．４ｍｍｏｌ）を加え、続いてＤＩＥＡ（０．７７４ｇ、６ｍｍｏｌ）を加えた。その反応混合物を１０分間攪拌し、次に、上記活性化酸にＨ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ（２．２ｇ、４．４４ｍｍｏｌ）を固体として加え、続いてＤＩＥＡ（０．７７４ｇ、６ｍｍｏｌ）を加えた。その溶液を室温にし、室温で２０時間攪拌した。その混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液（１００ｍＬ）に注ぎ、５分間攪拌した。有機層を分離し、水（２×１００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。溶媒を蒸発させ、生成物を無色の発泡体として得た。収率：４．１５ｇ（１００％）。ＭＳ　ｍ／ｚ　９１３．４［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４１】
ｂ）Ｈ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ：
Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ（４．１５ｇ、４．４ｍｍｏｌ）の１０％のピペリジン（アセトニトリル中）溶液（ｖ／ｖ、５０ｍＬ）を室温で３０分間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部をフラッシュシリカゲル（３６０．０ｇ）でクロマトグラフィー処理した。全ての早く移動する不純物カラムを１０％のメタ

ノールのクロロホルム溶液で洗浄することによって除去した。０．１％のＴＥＡを含む２０％のメタノールのクロロホルム溶液で溶離し続け、所望のアミンを溶離させた。そのアミンを含む分画を貯蔵し、蒸発させアミンを無色の発泡体として得た。R_f：０．１２５（２０％のメタノールのクロロホルム溶液）。収率：３．０ｇ（９８％）。ＭＳ　ｍ／ｚ　６９１．４［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４２】

ｃ）Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ：

Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ（２．１１ｇ、４．５ｍｍｏｌ）の乾燥CH_2Cl_2溶液（２５ｍＬ）をアイスバスで冷却し、ＨＡＴＵ（１．９ｇ、５ｍｍｏｌ）とＤＩＥＡ（０．７１ｇ、５．５ｍｍｏｌ）で処理し、１０分間攪拌した。Ｈ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ（３．０ｇ、４．３４ｍｍｏｌ）を加え、続いてＤＩＥＡ（０．７１ｇ、５．５ｍｍｏｌ）を活性化した酸に加え、室温で２０時間攪拌した。その反応混合物を２００ｍＬの酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸ナトリウム（２×２００ｍＬ）で洗浄し、続いて水（２×２００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。減圧下で溶媒を蒸発させ、オフホワイトの発泡体を得て、これをさらに精製しないで次の段階に用いた。収率：５．１ｇ（１００％）。ＭＳ　ｍ／ｚ　１１４１．８［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４３】

ｄ）Ｈ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ：

Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ（５．１ｇ、４．３４ｍｍｏｌ）を１０％のピペリジン（アセトニトリル中）（５０ｍＬ、ｖ／ｖ）に溶解し、室温で３０分間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、ペーストを得て、そのペーストをフラッシュシリカゲルカラム（２５０．０ｇ）上にローディングし、クロマトグラフィー処理した。９：１のクロロホルム：メタノールで溶離することによって生成物を無色の発泡体として得た。収率：３．５５ｇ（８９％）。R_f：０．２（ＭｅＯＨ：$CHCl_3$－１：９）。ＭＳ　ｍ／ｚ　９２０．０［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４４】

ｅ）Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔ－Ｂ．ｕ）－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ：

Ｈ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ（３．５５ｇ、３．８６ｍｍｍｏｌ）を、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔ－Ｂｕ）－ＯＨ（１．６ｇ、４ｍｍｏｌ）から調製された活性化した酸の溶液、ならびに、ＨＡＴＵ（１．９ｇ、５ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（１．２９ｇ、１０ｍｍｏｌ）の乾燥CH_2Cl_2溶液（２５ｍＬ）に加え、室温で２０時間攪拌した。次に、その反応混合物を酢酸エチル（２００ｍＬ）で希釈し、飽和炭酸ナトリウム（２×２００ｍＬ）、水（２×２００ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。その溶液をろ過し、溶媒を減圧下で除去することにより、ペーストを残留させた。そのペーストをフラッシュシリカゲル（４００ｇ）でクロマトグラフィー処理した。２％のメタノールのクロロホルム溶液で溶離することによって、生成物を無色の発泡体として得た。収率：３．５ｇ（７０％）。融点：１３５～１３８℃。ＭＳ　ｍ／ｚ　１２９８．２［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４５】

ｆ）Ｈ－Ｔｈｒ（ｔ－Ｂｕ）－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ：

完全に保護されたＴＫＰＰＲ（０．４ｇ、０．３ｍｍｏｌ）を１０％のピペリジンのＡＣＮ溶液（１０ｍＬ、ｖ／ｖ）に室温で３０分間溶解した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部をフラッシュシリカゲル（５０．０ｇ）でクロマトグラフィー処理した。１０％のメタノールのクロロホルム溶液で溶離することによって、アミンを無色の発泡体として溶離させた。収率：０．１１ｇ（３４％）。ＭＳ　ｍ／ｚ　１０７６．７［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４６】

ｇ）Ｆｍｏｃ－$HN-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CO$－Ｔｈｒ（ｔ－Ｂｕ）－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ：

市販のＦｍｏｃ－８－アミノ－３，６－ジオキサオクタン酸（０．５５ｇ、０．４２５ｍｍｏｌ）をＨＡＴＵ（０．１９ｇ、０．５ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．０６５ｇ、０．５ｍｍｏｌ）の２ｍＬの乾燥ジクロロメタン溶液で０℃で１０分間活性化し、次にＨ－Ｔｈｒ（ｔ－Ｂｕ）－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（Ｐｍｃ）－ｔ－Ｂｕ（０．４ｇ、０．３７ｍｍｏｌ）の乾燥ジクロロメタン溶液（２ｍＬ）を加え、室温で２０時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残部をフラッシュシリカゲル（５０．０ｇ）でクロマトグラフィー処理した。５％のメタノールのクロロホルム溶液で溶離することによって、オフホワイトの発泡体として生成物を溶離させた。収率：０．３４６ｇ（６５％）。R_f：０．７５（ＭｅＯＨ：$CHCl_3$－１：９）－ ＭＳ ｍ／ｚ １４４３．６［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４７】

アミン９：

上記保護されたアミン（０．３４ｇ、０．２４ｍｍｏｌ）を１０％のピペリジンのＡＣＮ溶液（５ｍＬ、ｖ／ｖ）に溶解し、室温で３０分間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部を乾燥エーテル（１０ｍＬ）で粉砕した。固体をろ過し、乾燥エーテル（３×１０ｍＬ）で洗浄した。その固体を２０ｍＬの酢酸エチルに再び溶解し、水（２×２０ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。上記生成物を、２５．０ｇのフラッシュシリカゲルでクロマトグラフィー処理し、２５％のメタノールのクロロホルム溶液で溶離することによって、無色の発泡体として生成物を溶離させた。収率：０．２２６ｇ（５６％）。R_f：０．３８（８５：１５、$CHCl_3$：ＭｅＯＨ）。ＭＳ ｍ／ｚ １２２１．５［Ｍ＋Ｈ］。

【０４４８】

テトラアミド１０：

四価酸８（０．１８９ｇ、０．２２５ｍｍｏｌ）の溶液を無水ＴＨＦ（２ｍＬ）に溶解し、０℃に冷却した。ＨＡＴＵ（０．５１ｇ、１．３５ｍｍｏｌ）を加え、続いて２ｍＬの無水ジクロロメタンを加えた。ＤＩＥＡ（０．１９４ｇ、１．５ｍｍｏｌ）を加え、その溶液を０℃で３０分間攪拌した。アミン９（１．１１ｇ、０．９１ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．１９４ｇ、１．５ｍｍｏｌ）のジクロロメタン溶液（２ｍｌ）を加え、その反応混合物を室温にし、２０時間攪拌した。次に、その混合物を１０ｍＬの飽和炭酸水素ナトリウム溶液で急冷し、次に、３０ｍＬのＥｔＯＡｃで希釈した。有機層を分離し、水（２×５０ｍＬ）と飽和炭酸水素ナトリウム（２×５０ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。溶媒を蒸発させ、茶色のゴム状物質を得て、そのゴム状の生成物をフラッシュシリカゲルカラム（２００．０ｇ）上にローディングし、クロマトグラフィー処理した。カラムを、５％、１０％および１５％のメタノールのクロロホルム溶液を各２０００ｍＬで溶離させた。最後に、生成物を２０％のメタノールのクロロホルム溶液で溶離した。生成物を含む分画を貯蔵し、蒸発させ、テトラアミドをオフホワイトの発泡体として得た。収率：０．６１ｇ（４８％）。R_f：０．５６（７：３、$CHCl_3$：ＭｅＯＨ）。ＭＳ ｍ／ｚ ２８２７．２［Ｍ＋Ｈ／２］，１８８５．７［Ｍ＋３Ｈ／３］，１４１４．７，［Ｍ＋４Ｈ／４］，１１１１．９［Ｍ＋５Ｈ／５］。

【０４４９】

アミン１１：

完全に保護されたアミン１０（０．１９８ｇ、０．０３５ｍｍｏｌ）を１０％のピペリジンのＡＣＮ溶液（５ｍＬ）に溶解し、室温で３０分間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部を５０ｍＬのジクロロメタンに溶解し、水（５×５０ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。溶媒を約５ｍＬまで蒸発させ、次に２０ｍｌの無水エーテルで希釈し、氷中で冷却した。分離した固体をろ過し、無水エーテルで洗浄した。次に固体を高真空下で室温で２時間乾燥し、アミンを無色の発泡体として得た。収率：０．１５ｇ（７６％）。さらなる精製を行わず、上記アミンを即座に次の段階に用いた。ＮＭＲによれば、Ｆｍｏｃ基を示すシグナルが消滅したことを示した。ＭＳ ｍ／ｚ ２７１７．４［Ｍ＋２Ｈ］／２，１８１１．６［Ｍ＋３Ｈ］／３，１３５９．０［Ｍ＋４Ｈ］／４，１

０８７．２［Ｍ＋５Ｈ］／５。

【０４５０】

ＢＲＵ－３２６：

アミン１１（０．１５ｇ、０．０２６７ｍｍｏｌ）を無水ＤＭＦ（０．２ｍＬ）に溶解し、市販のオレゴングリーンＮ－ヒドロキシスクシンイミジルエステル（０．０３４ｇ、０．０６７ｍｍｏｌ）とＤＭＡＰ（０．００８ｇ、０．０６７ｍｍｏｌ）で処理し、室温で５０時間攪拌した。その時間の最後に、溶媒を高真空下で室温で除去し、次に５ｍｌの氷水で処理し、粉砕した。沈殿した固体をろ過し、徹底的に水で洗浄した。その固体をＤＭＦに再び溶解し、数回共に蒸発させ（co-evaporate）、存在するいかなる水分をも除去する。ラベルを有する上記粗アミドをＴＦＡ：アニソール：水（１０ｍｌ、９５：５：１、ｖ／ｖ／ｖ）に溶解し、室温で６時間攪拌した。全ての揮発成分を真空下で除去し、残部を無水エーテル（１０ｍＬ）で粉砕した。光を遮蔽して、明るい黄色の固体をろ過し、エーテル（３×１０ｍＬ）で洗浄し、真空下で乾燥した。次に固体を分取用ＨＰＬＣで精製した。条件：カラム－ＹＭＣ－ＲＰ、Ｃ－１８；２５０ｍｍ×３０ｍｍ；Ｓ－１０Ｐμ；１２０Å；溶離速度－２５ｍｌ／分；溶媒Ａ－０．１％のＴＦＡを含む水、および、溶媒Ｂ－０．１％のＴＦＡを含むアセトニトリル；２４０分で２０～１００％のＢ。主要なピークを含む分画を回収し、貯蔵し、凍結乾燥した。収率：４７．５ｍｇ（４５％）。D_2Oにおける^1H－ＮＭＲは、すべての予想の特徴的なアミノ酸およびオレゴングリーンのピークを示した。オレゴングリーンの１プロトンの整数比率は、予想通り正確に分子中の４つのスレオニン単位に対して１：１２であることがわかった。さらなる分析によって予想の生成物が確認された。t_R：１８．１９分（ＹＭＣ　ＲＰ　Ｃ－１８カラム；２５０×４．６ｍｍ；Ｓ－１０Ｐμ；１２０Å；３０分で１０～４０％のＢ；溶離速度：１ｍＬ／分；モニター波長：２３０ｎｍ。分析：計算値：$C_{173}H_{270}F_2N_{46}O_{55}$，１２$CF_3COOH$，９$H_2O$，Ｃ，４３．４７；Ｈ，５．５６；Ｆ，１３．２６およびＮ，１１．８４。測定値；Ｃ，４３．１７；Ｈ，５．４０，Ｆ，１２．８６，Ｎ，１１．７８。ＭＳ　ｍ／ｚ　７８３．３［Ｍ＋５Ｈ］／５，６５２．９［Ｍ＋６Ｈ］／６，５５９．７［Ｍ＋７Ｈ］／７および４９０．０［Ｍ＋８Ｈ］／８。

【０４５１】

実験：

実施例２９：Ｃ末端にトリオキサオレゴングリーンを有するリシンコア上のＴＫＰＰＲ二量体および四量体（ＢＲＵ－３３７およびＢＲＵ－３４６）の合成

固相法（安全に捕捉できる樹脂（safety catch resin）を用いた）を用いて、放射状に分岐したリシンデンドライトの小さい不活性コア分子を合成し、その上に、多数の（生理活性な）マーカーを含むＴＫＰＰＲペプチドを固定した。不活性リシンコアを、固相支持体に固定し、分岐したリシンコア上に直接所望のペプチド（二価または四価または八価）を合成した。このようにして、最終的な多価のリガンドは、中心のリシンコアから放射するペプチド鎖の先端に、マーカーを有する。

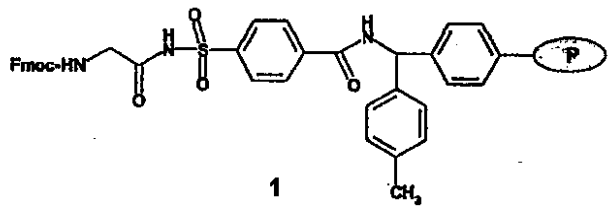
【０４５２】

カップリング剤としてＨＡＴＵを用いてＦｍｏｃ－固相ペプチドカップリング方法に従って、Ｃ末端にマーカーとしてオレゴングリーンを有する、ＢＲＵ－３３７、二量体－ＴＫＰＰＲ（１５）、および、ＢＲＵ－３４６、四量体－ＴＫＰＰＲ（１６）の合成を、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－スルファミルベンゾイル－ＭＢＨＡ（１）樹脂から開始し、合成フローチャートで示す［フローチャート中の番号は、文中で示された化合物（ペプチド）の番号を指す］。第一段階として、市販の４－スルファミルベンゾイルＭＢＨＡ樹脂を、ＰｙＢｏｐ－ＤＩＥＡの存在下で、－２０℃で、ＤＭＦ中で、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨと反応させ、出発原料であるＦｍｏｃ－Ｇｌｙ－スルファミルベンゾイル－ＭＢＨＡ（１）樹脂を得た。Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－スルファミルベンゾイル－ＭＢＨＡ（１）樹脂のＦｍｏｃ基を除去した後、ペプチド配列ＴＫＰＰＲをローディングし、その後、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｆｍｏｃ）－ＯＨをＧｌｙ－スルファミルベンゾイル－ＭＢＨＡ樹脂に付着させた。各アミンカップリングにおける、６当量の各アミノ酸とカップリング試薬ＨＡＴＵとを用いたロー

ディング工程（二量体構造に対して、６当量）で、標準的なＦｍｏｃ方法が用いられた。最後のアミノ酸であるスレオニン（Ｔｈｒ）をｂｏｃ誘導体としてローディングすることによって、ペプチドが樹脂上にあるとき、または、ペプチドが樹脂から求核体で置き換えられた後のいずれの場合においてもＦｍｏｃが除去されることを防ぐ。ローディング工程が完了した後、ＮＭＰ中のＤＩＥＡ（５当量）の存在下でヨードアセトニトリル（Ｉ－ＡＣＮ）（２０当量）と反応させることによって、スルファミルアミド窒素を活性化した。ＴＴＤＡ－ＯＧ（１４）での求核体置換反応を行った後（スキーム１を参照）、単離された保護されたペプチドを次に試薬「Ｂ」（ＴＦＡ：水：フェノール：トリイソプロピルシラン；８８：５：５：２）で処理し、保護基を除去した。次に、粗ペプチドを半分取用（semi-preparative）（Ｃ１８）カラムで精製し、純粋な二量体ペプチドを単離した。ＭＳ、^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＰＬＣのような分析データにより、単離生成物の構造と均一性が確認された。レポーター成分、オレゴングリーンを含む二量体ＴＫＰＰＲ、１５の調製に関する合成段階を、以下の合成フローチャートとスキーム１に示す。

【０４５３】

【化５３】



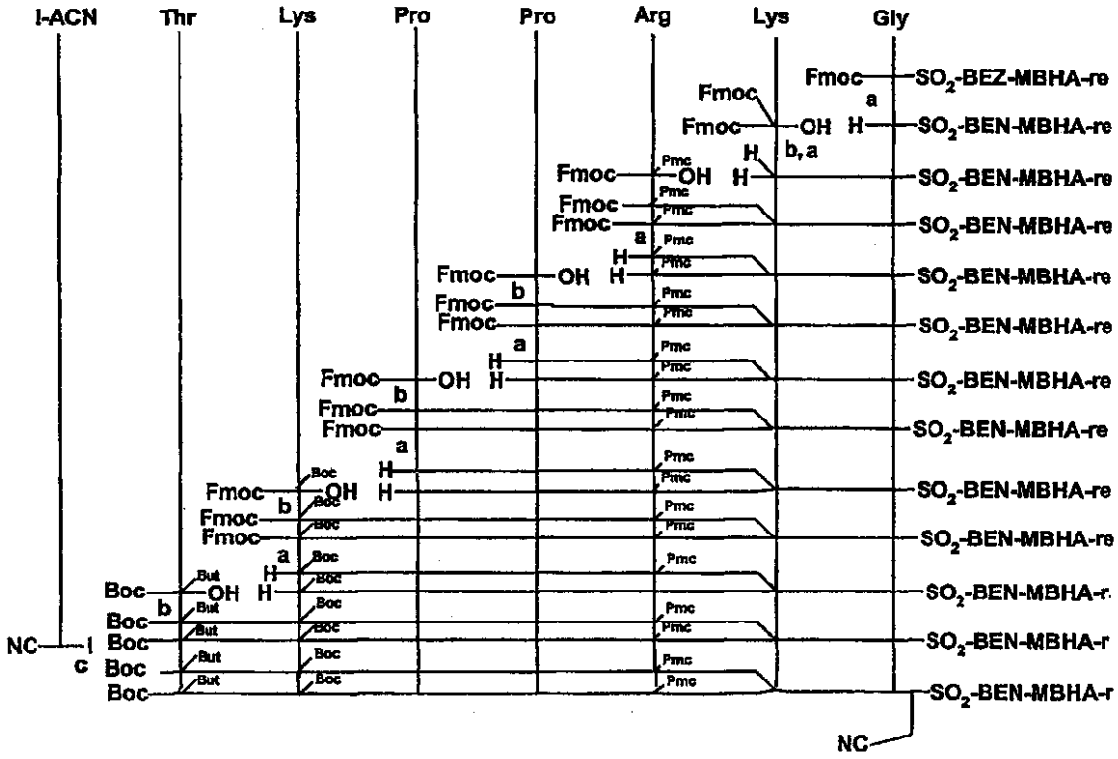
【０４５４】

合成フローチャート

二量体構造を調製するための、ＴＫＰＰＲのＦｍｏｃ－Ｇｌｙ－４－スルファミルベンゾイル－ＭＢＨＡ樹脂へのローディングである。

【０４５５】

【表２３】



a = 25% Plp/DMF; b = HATU, DIEA, DMF; c = NMP, DIEA

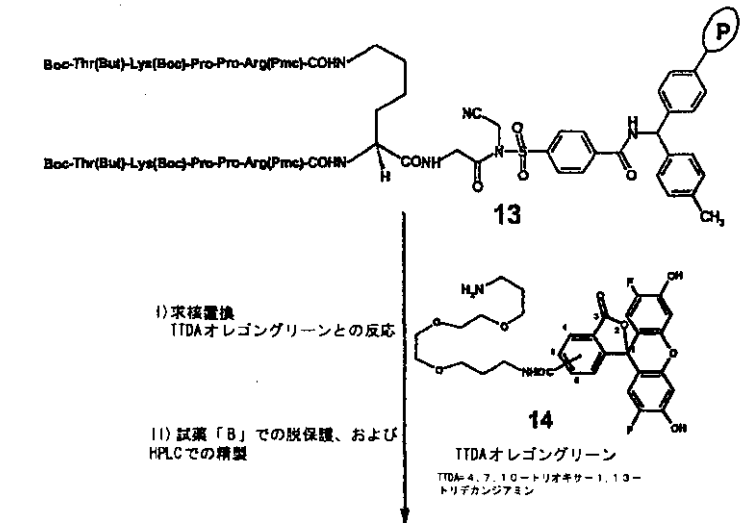
【０４５６】

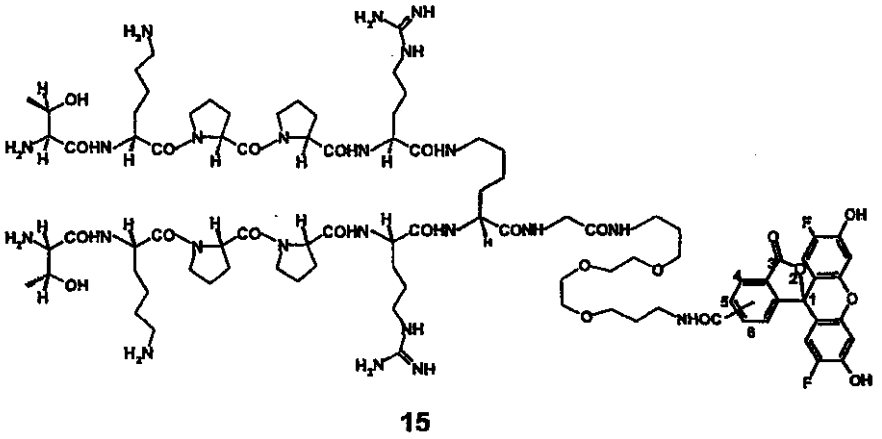
スキーム１

求核置換および脱保護反応である。

【０４５７】

【化５４】





15

Thr-Lys-Pro-Pro-Arg-Lys(Arg-Pro-Pro-Lys-Thr)-Gly-TTDA-OG

TTDA=４，７，１０－トリオキサー１，１３－トリデカンジアミン

【０４５８】

同様に、ＢＲＵ－３４６（１６）の四量体および八量体構造（示さず）も、多価数を増やすため分岐化に必要な適切な工程でアミノ酸、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｆｍｏｃ）－ＯＨを用いた二量体生成物合成において説明されたのと同じ方法に従って製造された。

【０４５９】

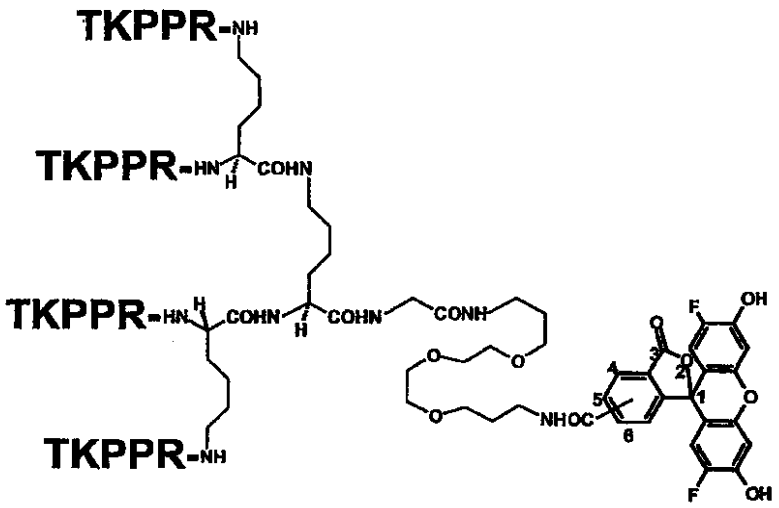
四量体ＢＲＵ－３４６（１６）：

【０４６０】

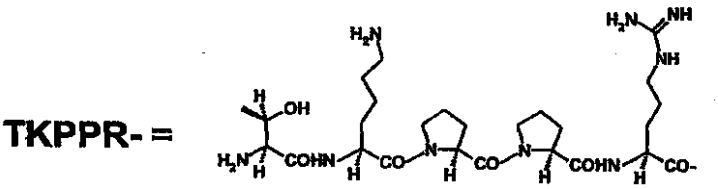
【化５５】

TKPPR-K(RPPKT)-K[K(RPPKT)TKPPR]-G-Z-OG

（四量体）



16



Z=TTDA=４，７，１０－トリオキサー１，１３－トリデカンジアミン

OG=オレゴングリーン

【０４６１】

上述の四量体ＢＲＵ－３４６（１６）を、単離し、ＨＰＬＣで精製し、ＭＳ、^{1}Ｈ－ＮＭＲおよびＨＰＬＣでその純度と均一性を分析した。

結果：

以下でより詳細を説明するが、生理活性なＴＫＰＰＲ　単位と分岐コア（実施例２８で合成）との間にリンカー／スペーサーを有するＢＲＵ－３２６、類似の四量体ＴＫＰＰＲと比較した場合に、ＢＲＵ－３３７およびＢＲＵ－３４６（１５および１６）は、同じ結合特徴を示さなかった。ＢＲＵ－３３７とＢＲＵ－３４６（１５および１６）において、ＴＫＰＰＲ単位は、不活性リシンコアに直接付着し、レポーター成分であるオレゴングリーンのみ結合部分から遠く離れたままである。不活性リシンコアに近い結合単位ＴＫＰＰＲの位置は、これらの化合物の結合親和性を減少させるのに重要な役割をはたした可能性がある。すなわちその点において、結合単位と不活性リシンコアとの間にスペーサーを有するリシンコア上に類似の多量体ＴＫＰＰＲを合成することによって、結合特性が高められたはずである。

【０４６２】

実験：

一般的な方法：

合成のための出発原料は、Aldrich Chemical社、Fluka Chemical社およびAdvanced Chemtech社（Louisville KY）から購入した。反応、クロマトグラフィー精製およびＨＰＬＣ分析のための溶媒は、E. Merck Omniグレードであり、VWR社から購入した。Ｎ－メチルピロ

リジノン（ＮＭＰ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、メタノール（ＭｅＯＨ）は、Fisher Scientific社から購入し、これらの品質はペプチド合成グレードまたはバイオグレードであった。ピペリジン（配列解析グレード）は、Fisher Scientific社またはAldrich Chemical社から購入した（再蒸留したもの、９９＋％）。トリフルオロ酢酸（分光分析グレードまたは配列解析グレード）は、Aldrich Chemical社またはFluka Chemical社から購入した。アニソール（９９％）、ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）は、Aldrich Chemical社から購入した。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）およびベンゾトリアゾール－１－イル－オキシ－tis－ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（ＰｙＢｏｐ）は、PerSeptive Biosystems社から購入した。ＮＭＲスペクトルデータは、Varian Instruments Innova 500 instrumentを用いて得た。マススペクトルデータは、アジレント社のＬＣ－ＭＳＤ（１１００）シングルクワッドマススペクトロメーターで、精製物質のエレクトロスプレーイオン化およびループインジェクションを用いて得られた。分析ＨＰＬＣデータは、一般的に、Shimadzu社のＬＣ－６Ａデュアルポンプグラージェントシステム（２５０ｍｍ×４．６ｍｍのＹＭＣ、Ｃ－１８カラム（１２０Åの孔サイズ、１０μの粒径）を用いた）を用いて、かつ、溶媒Ａおよび溶媒Ｂとしてそれぞれ０．１％のＴＦＡ水溶液および０．１％のＴＦＡのアセトニトリル溶液を用いた勾配系または均一濃度溶離系を用いて得られた。化合物の検出は、２２０ｎｍのＵＶを用いてなされた。

【０４６３】

固相合成－一般的な方法

Ｆｍｏｃ基の開裂

第一のＦｍｏｃ基の開裂を、２０％のピペリジンのＤＭＦ溶液（１０ｍＬ／ｇ樹脂）を用いて５分間行い、続いて２０％のピペリジンのＤＭＦ溶液を用いて１０分間第二の処理を行った。さらに、ペプチド鎖伸長の間に全てのＦｍｏｃ基の開裂を２５％のピペリジンのＤＭＦ溶液を用いて１０分間行い、続いて、２５％のピペリジンのＤＭＦ溶液を用いて２０分間第二の処理を行った。

【０４６４】

活性化およびカップリング方法

Ｆｍｏｃアミノ酸（６当量の多量体構造に対して４当量）、ＨＡＴＵ［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］（４または６当量）およびジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ、６または８当量）を、ＤＭＦ（１０ｍＬ）に溶解した。その透明溶液を、ペプチドが結合した樹脂を含む固相反応容器に移した。４時間攪拌した後、洗浄方法を適用し、次に、ブロモフェノールブルー試験のために樹脂サンプルを除去した。陽性反応がわずかであった数ケースに対してダブルカップリングを行った。

【０４６５】

洗浄方法

各アミノ酸カップリングまたはＦｍｏｃ基の除去の後、樹脂を１５ｍＬ／ｇ（樹脂）の以下の溶媒、すなわちＤＭＦ（３×１５ｍＬ／ｇ）、ジクロロメタン（３×１５ｍＬ／ｇ）およびＤＭＦ（３×１５ｍＬ／ｇ）で洗浄した。合成終了後、かつ、樹脂からのペプチド開裂の前に、酸を含まないジクロロメタン（３×１５ｍＬ／ｇ）での追加の洗浄を行った。

【０４６６】

ヨードアセトニトリルでの活性化

Ｎ－アシルスルホンアミド（２００ｍｇ）が結合した樹脂をＮＭＰ（３×３．０ｍＬ）で洗浄した。その膨潤樹脂にＮＭＰ（２ｍＬ）、ＤＩＥＡ（５当量）を加えた。使用前に塩基性アルミナのプラグ（alumina basic plug）でろ過した後、ヨードアセトニトリル（２０当量）をその反応混合物加え、反応フラスコを光から遮蔽した。上記樹脂を２４時間攪拌し、ろ過し、ＮＭＰ（３×３ｍＬ）とCH_2Cl_2（３×３ｍＬ）またはＴＨＦ（３×３

ｍＬ）とで洗浄した。

【０４６７】

ＴＴＤＡ－オレゴングリーンでの求核置換反応

上記樹脂（１５０ｍｇ、活性ペプチドを含む）を含むフラスコにＤＭＦ（２ｍＬ）、ＤＩＥＡ（２当量）およびＴＴＤＡ－オレゴングリーン（１４）（１．１当量）を加え、その反応混合物を２４時間攪拌した。ろ過して上記樹脂を除去し、樹脂をCH_2Cl_2（２ｍＬ）で洗浄し、合わせたろ過物を真空下で濃縮し、予想の生成物を濃厚なペーストとして得て、さらに精製しないでこれを脱保護工程に用いた。

【０４６８】

ペプチドの脱保護

樹脂からの求核体換後に得られたペプチドを、開裂カクテル「試薬Ｂ」（ＴＦＡ：水：フェノール：トリイソプロピルシラン、８８：５：５：２）（１０ｍＬ／ｇ樹脂）で４時間処理した。吸引して揮発成分を蒸発させた後、そのペーストをエーテルで粉砕し、固体を得て、これを遠心分離によってエーテルで洗浄し（３×２０ｍＬ）、次に真空下で乾燥し、所望のペプチドをオレンジ色の固体として得た。

【０４６９】

逆相（Ｃ１８）ＨＰＬＣによるペプチド精製

上記ペプチドを含む水溶液を、アセトニトリル（２％）－ＴＦＡ水溶液（０．１％）で平衡化した逆相Ｃ１８分取用カラム（ＹＭＣ、１０×２５０ｍｍ、１０μ、１２０Å）上にローディングした。次に、当該カラムを、水－アセトニトリル溶媒混合物を用いて、１０％のアセトニトリルから始めて直線的な勾配で６０分で５０％のアセトニトリルにして溶離し（流速：１０ｍＬ／分）、分画（５ｍＬサイズ）を回収した。各分画を分析用逆相Ｃ－１８カラムで分析し、９９％を超える純度で生産物を含む分画を貯蔵し、凍結乾燥し、純粋な多量体化合物をオレンジ色のふわふわした固体として得た。

【０４７０】

Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－スルファミルベンゾイル－ＭＢＨＡ（１）

５０ｍＬの固相反応フラスコに、４－スルファミルベンゾイルＭＢＨＡ樹脂（１．０ｇ、０．７５ｍｍｏｌ／ｇ）（ＤＭＦで膨潤させた）、ＤＭＦ（１０ｍＬ）、ＤＩＥＡ（０．７２ｍＬ、３．７５ｍｍｏｌ）およびＦｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ（２．２５ｍｍｏｌ）を加えた。その反応混合物を１０分間振盪し、続いて－２０℃に冷却した。２０分後、固体のＰｙＢｏｐ（２．２５ｍｍｏｌ）を加え、その混合物を８時間振盪した。次に、８時間のカップリング後、その反応混合物を、一晩、連続攪拌して室温にした。樹脂をろ過により溶液から分離し、$CHCl_3$（５×２０ｍＬ）で徹底的に洗浄し、真空下で室温で２４時間乾燥した。少量の樹脂をピペリジンで処理することによって放出されたピペリジン－ジベンゾフルベン付加物を分光分析することによって、樹脂へのＦｍｏｃ－Ｇｌｙのローディングを概算した。それにより、上記ローディングは０．５２ｍｍｏｌ／ｇであることがわかった。

【０４７１】

二量体：ＴＫＰＰＲＫ（ＲＰＰＫＴ）Ｇ－Ｚ－ＯＧ（１５）

上述した固相ペプチド合成の一般的方法に従って、合成フローチャートで示したように、二量体ＴＫＰＰＲ構造（０．２５ｍｍｏｌスケール）をＦｍｏｃ－Ｇｌｙ－スルファミルベンゾイル－ＭＢＨＡ（１）樹脂上に構築した。ローディング工程が完了した後、スルファミルアミド窒素を、ＤＩＥＡ（５当量）のＮＭＰ溶液の存在下で、ヨードアセトニトリル（Ｉ－ＡＣＮ）（２０当量）と反応させることにより活性化した。ＴＴＤＡ－ＯＧ（１４）での求核体置換反応を行った後（スキーム１を参照）、分離された保護されたペプチドを次に試薬「Ｂ」（ＴＦＡ：水：フェノール：トリイソプロピルシラン、８８：５：５：２）で処理し、保護基を除去した。次に、粗ペプチドを半分取用（Ｃ１８）カラムで精製し、純粋な二量体ペプチド１５を、オレンジ色のふわふわした固体として分離した（収率２０％）。

【０４７２】

ＭＳ（ＥＳ$^{+}$）：９８０．５（２荷）；６５４．１（３荷）；４９０．７（４荷）および３９２．８（５荷）。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（D_2O）：δ１．１５（ｄ，６Ｈ，Ｔｈｒ－CH_3），１．３２～２．０５（ｍ，２８Ｈ），２．１４～２．２５（ｍ，３Ｈ），２．７９～２．９１（ｍ，３Ｈ），２．９６～３．２０（ｍ，６Ｈ），３．３７～３．８５（ｍ，１８Ｈ），３．９５～４．２１（ｍ，４Ｈ），４．２８～４．３８（ｍ，２Ｈ），４．５２～４．６５（ｍ，３Ｈ），６．６５～６．８５（２ｄ，３Ｈ），７．３５（ｄ，１Ｈ），８．０５（ｄ，１Ｈ）および８．４５（ｓ，２Ｈ）。

【０４７３】

ＨＰＬＣ：保持時間１６．２３分；分析：＞９９％（エリア％）；カラム：ＹＭＣ，Ｃ１８；０．４６×２５ｃｍ；溶媒：水（０．１％のＴＦＡ）－アセトニトリル（０．１％のＴＦＡ）、初期条件：３５％のアセトニトリル；５０分で８５％のアセトニトリルへの直線的な勾配での溶離；流速：１ｍＬ／分；検出：２２０ｎｍ。

【０４７４】

四量体：ＴＫＰＰＲ－Ｋ（ＲＰＰＫＴ）－Ｋ［Ｋ（ＲＰＰＫＴ）ＴＫＰＰＲ］－Ｇ－Ｚ－ＯＧ（１６）

二量体１５の調製で用いられた方法により、四量体１６を、オレンジ色の固体固形として分離した（収率１５％）。

【０４７５】

ＭＳ（ＥＳ$^{+}$）：１１２５．６（３荷）；８４４．５（４荷）；６７５．９（５荷）および５６３．５（６荷）。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（D_2O）：δ１．２０（ｄ，６Ｈ，Ｔｈｒ－CH_3），１．３５～２．１０（ｍ，５０Ｈ），２．１８～２．３５（ｍ，５Ｈ），２．８２～２．９５（ｍ，６Ｈ），２．９６～３．２５（ｍ，１０Ｈ），３．３７～３．８５（ｍ，２４Ｈ），４．０５～４．２５（ｍ，７Ｈ），４．２８～４．３８（ｍ，３Ｈ），４．５５～４．６８（ｍ，５Ｈ），６．６７～６．９５（２ｄ，３Ｈ），７．４５（ｄ，１Ｈ），８．１５（ｄ，１Ｈ）および８．５５（ｓ，２Ｈ）。

【０４７６】

ＨＰＬＣ：保持時間１４．７３分；分析：＞９８％（エリア％）；カラム：ＹＭＣ，Ｃ１８；０．４６×ｃｍ；溶媒：水（０．１％のＴＦＡ）－アセトニトリル（０．１％のＴＦＡ）、初期条件：２％のアセトニトリル；２５分で５２％のアセトニトリルへの直線的な勾配での溶離；流速：ｍＬ／分；検出：２２０ｎｍ。

【０４７７】

Ｎ－（３－｛２－［２－（３－アミノプロポキシ）エトキシ］エトキシ｝プロピル）（１１，１６－ジフルオロ－１２，１５－ジヒドロキシ－３－オキソスピロ［ヒドロイソベンゾフラン－１，９’－キサンテン－５／６－イル］カルボキサミド（１４）（ＴＴＤＡ－オレゴングリーン）

ｉ）４，７，１０－トリオキサ－１，１３－トリデカンジアミン（ＴＴＤＡ）の２－クロロトリチル塩化物ＰＳ樹脂への付着

２５０ｍＬの固相ペプチド合成容器を、２－クロロトリチル塩化物ＰＳ（ポリスチレン）樹脂（置換レベル＝１．１２ｍｍｏｌ／ｇ、１０ｇ、トータル１１．２ｍｍｏｌ）で充填し、当該樹脂を徹底的に膨潤させ（１時間、～１５０ｍＬのCH_2Cl_2）、次に、CH_2Cl_2（５×７５ｍＬ）で洗浄した。その樹脂を、３０分間容器をかき混ぜながら、最少量のCH_2Cl_2（５０ｍＬ）中の４，７，１０－トリオキサ－１，１３－トリデカンジアミン（２４．６４ｇ、１１１．８ｍｍｏｌ、１０当量）で処理した。その反応混合物にメタノール（２０ｍＬ）を加えて未反応の２－クロロトリチル基を消去（quench）し、追加５分間攪拌を続けた。溶媒を除去した後、上記樹脂をCH_2Cl_2（５×７５ｍＬ）で徹底的に洗浄し、真空中で乾燥した。初めに、ＤＩＣ／ＨＯＢｔカップリング方法を用いて、樹脂上で、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨのＴＴＤＡの末端のアミノ基へのカップリングにより、続いて、少量の樹脂をピペリジンで処理することによって放出されたピペリジン－ジベ

ンゾフルベン付加物を分光分析することによって、ＴＴＤＡの樹脂上へのローディングを概算した。それにより、上記ローディングは、０．６８ｍｍｏｌ／ｇであることがわかった。

【０４７８】

ii）ＴＴＤＡ－２－クロロトリチル樹脂でのオレゴングリーンのカップリング

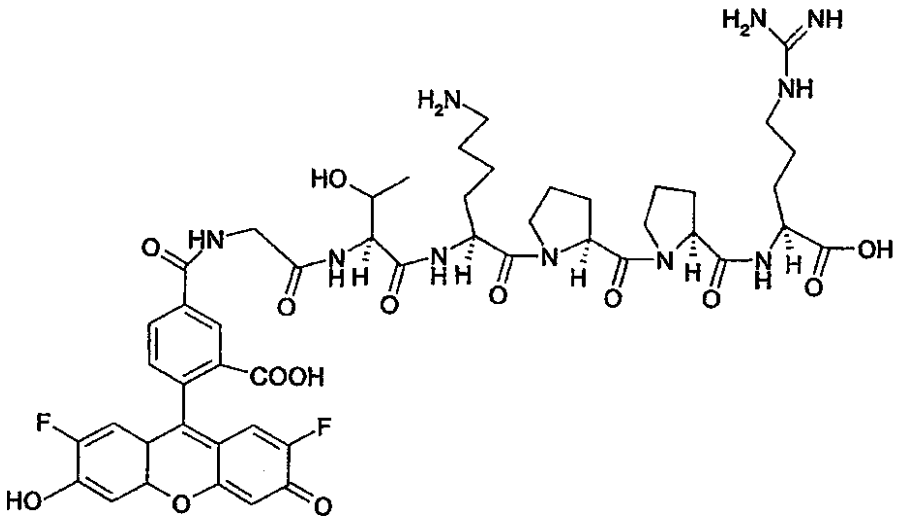
オレゴングリーン（２．０ｇ、４．８５ｍｍｏｌ）、ＥＤＡＣ（１－［３－（ジメチルアミノ－プロピル）－３－エチルカルボジイミド・ＨＣｌ］（１．１２ｇ、５．８２ｍｍｏｌ）およびＮ－ヒドロキシスクシンイミド（０．６７ｇ、５．８２ｍｍｏｌ）の乾燥ＤＭＦ溶液の混合物を室温で４時間攪拌した。次に、その反応混合物を、Ｎ－（１３－アミノ－４，７，１０－トリオキサトリデカニル）－２－クロロトリチル塩化物ＰＳ樹脂（５．５８ｇ、３．３２ｍｍｏｌ、膨潤前であり、ＤＭＦで洗浄した）に移し、ペプチド合成容器中で２４時間かき混ぜた。上記樹脂をろ過し、ＤＭＦ（３×５ｍＬ）とCH_2Cl_2（３×５ｍＬ）で洗浄し、次に、ＴＦＡ／ジクロロメタン（１：１、ｖ／ｖ）で４時間処理し、カップリングした生成物を樹脂から開裂させた。開裂反応で得られたろ過物をペーストになるまで蒸発させ、そのペーストをエーテルで粉砕した。これより、オレンジ色の沈殿が得られ、その沈殿を遠心分離によって回収し、エーテルで洗浄し、乾燥した。その固体を水に溶解し、５％のアセトニトリル水溶液（０．１％のＴＦＡ）で予め平衡化した逆相Ｃ１８分取用カラム（ＹＭＣ　ＯＤＳ、３０×２５０ｍｍ、１０μ、１２０Å）にローディングした。アセトニトリルと水（いずれも０．１％のＴＦＡを含む）との直線的な勾配で、すなわち１０％のアセトニトリルから始めて６０分で５０％のアセトニトリルまで勾配をつけて、カラムから化合物を溶離させた。分画（１５ｍＬ　サイズ）をＹＭＣ　ＯＤＳ分析用逆相Ｃ－１８カラム（１０μ、１２０Å）で分析し、９９％を超える純度で生産物を含む分画を貯蔵し、凍結乾燥し、表題の化合物１４（０．９８ｇ、収率４８％）をふわふわしたオレンジ色の固体を得た。ＨＰＬＣ：保持時間：１７．０８分；分析：＞９９％（エリア％）；カラム：ＹＭＣ　ＯＤＳ　Ｃ－１８；０．４６×２５ｃｍ；溶離：水（０．１％のＴＦＡ）－アセトニトリル（０．１％のＴＦＡ）、初期条件：２０％のアセトニトリル；２０分で４０％のアセトニトリルへの直線的な勾配での溶離；流速：ｍＬ／分；検出：λ＝２２０ｎｍでのＵＶ；^{1}Ｈ－ＮＭＲ（D_2O；異性体の混合物について）δ８．４２（ｓ，１Ｈ），８．０２（ｄ：６－異性体について），７．７８（ｄ，１Ｈ），７．４２（ｓ：６－異性体について），７．１２（ｄ，１Ｈ），６．５２（ｄ，２Ｈ），６．４２（ｄ，２Ｈ），３．５５（ｍ，１２Ｈ），３．４１（ｍ，２Ｈ），２．９８（ｔ，２Ｈ）および１．７５（ｍ，４Ｈ）ｐｐｍ；ＭＳ（ＥＳＩ$^+$）ｍ／ｚ　６１５．２（Ｍ＋Ｈ）$^+$。

【０４７９】

実施例３０：オレゴングリーンを複合させたＴＫＰＰＲ単量体（ＢＲＵ－２３９）の合成

【０４８０】

【化５６】



BRU 239（オレゴングリーン（5-異性体）-GTKPPR-OH）

【０４８１】

Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（ｐｍｃ）－Ｗａｎｇレジン（２５０ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ）を２０％（ｖ／ｖ）ピペリジンのＤＭＦ溶液（１０ｍＬ）で処理し、１０分間振盪した。それをろ過し、このプロセスを繰り返した。次に、その樹脂をＤＭＦ（２０ｍＬ×３）で洗浄し、オレゴングリーンスクシンイミジルエステル（５－異性体、２０ｍｇ、０．０３９ｍｍｏｌ）のＤＭＦ溶液（５ｍＬ）を加え、反応容器をアルミニウム箔で覆い、４８時間振盪した。その樹脂をＤＭＦ（２０ｍＬ×３）、CH_2Cl_2（２０ｍＬ×３）で洗浄し、N_2を１５分間吹き付けることによって乾燥した。１０ｍＬの試薬Ｂ（ＴＦＡ／H_2O／フェノール／トリイソプロピルシラン、８．６ｍＬ／０．５ｍＬ／０．５ｇ／０．２ｍＬ）を加え、反応容器を４時間振盪した。それをろ過し、その樹脂をリンスした。ろ過物を蒸発させた。エーテルを加え、生成物を沈殿させた。固体生成物を遠心分離によってエーテルで３回洗浄し、デカンテーションした。粗原料の半分を、分取用ＨＰＬＣで、ＹＭＣ、Ｃ－１８カラム、８分で０～８％、次に１２０分で８～４８％のCH_3CN／H_2O（０．１％のＴＦＡ）の勾配を用いて精製した。所望の生成物を含む分画を得て、凍結乾燥した。１２ｍｇの純粋な化合物を薄い黄色の固体として得た。

【０４８２】

マススペクトル：１０４９．５（Ｍ＋Ｈ）$^+$；５２５．３（２荷イオン）。

ＨＰＬＣ：ＹＭＣ、Ｃ－１８（０．４６×２５）、２２０ｎｍのＵＶ、４０分で１０～９０％のCH_3CN／H_2O（０．１％のＴＦＡ）、t_R：１３．６分。

【０４８３】

実施例３１：ＴＫＰＰＲ単量体または多量体の、ＨＵＶＥＣまたはＨＡＥＣ中のＶＥＧＩＦによりＫＤＲ／Ｆｌｋ－１受容体のホスホチロシン活性化を抑制する能力の評価

ＴＫＰＰＲ単量体または多量体を含む様々な組成物の、ＶＥＧＦによってＫＤＲ／Ｆｌｋ－１受容体のホスホチロシン活性化を抑制する能力は、ＨＵＶＥＣを用いて評価された。培養ＨＵＶＥＣ細胞の９個の１００ｍｍの密集成長させた培養皿を、いかなる添加剤も含まない基本培地（ＥＢＭ）中で一晩、血清除去した。明朝、プレートを以下の３つのグループに分けた。

【０４８４】

１．３個のプレートにおいて、その培地を何も添加しない新鮮なＥＢＭ培地で交換した。

２．３個のプレートにおいて、その培地を５ｎｇ／ｍＬの$VEGF_{165}$（Peptrotech社製）を含む新鮮なＥＢＭ培地で交換した。

【０４８５】

３．３個のプレートにおいて、その培地を５ｎｇ／ｍＬのＶＥＧＦ$_{165}$および２５０ｎＭのＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）を含む新鮮なＥＢＭ培地で交換した。

【０４８６】

３７℃で５分後、上記培養皿を全て排液し、即座にＣａおよびＭｇを含む冷Ｄ－ＰＢＳ（Life Technologies社製）で３回洗浄した。Triton X-100リシスバッファー（２０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０、１３７ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１％のTriton X-100、２ｍＭのＥＤＴＡ、さらに、１ｍＭのＰＭＳＦ、１０ｇ／ｍｌのロイペプチンおよびアプロチニン、１ｍＭのナトリウムオルトバナデート、５０ｍＭのナトリウムピロホスフェート、１００ｍＭのナトリウムフッ化物を添加した）を用いて、各処理グループから溶解物を調製した。各グループからプールした溶解物をタンパク質Ａのビーズ（Sigma社製）を用いて予め透明にし（preclear）、次に、抗ＫＤＲ抗体（Santa Cruz Biotech社製、Ｓｃ－５０４）と共に一晩インキュベートした。免疫複合体を新しいタンパク質Ａビーズを加えることによって沈殿させた。遠心分離後、各グループからのビーズをＴＢＳＴで３回洗浄し、排液し、４０μＬのメルカプトエタノール（Bio-Rad社製）を含むLaemmliサンプル緩衝液中で５分間煮沸した。各サンプルの半分を７．５％のゲルを用いたＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動し、標準的な方法でＰＶＤＦ膜にトランスファーした。抗マウスＨＲＰ二次抗体を用いた方法に従い、ＥＣＬウェスタンブロッティングキット（Amersham社製）を用いて、ブロットを１：２００に希釈したＰＹ２０抗体（Transduction Labs製）を用いてホスホ－チロシンに対してプロービングした。ブロットをＰＹ２０でプロービングした後、Amersham社が推奨するようにそれをはがし、抗ウサギＨＲＰ二次抗体を用いた方法に従い、ＥＣＬウェスタンブロッティングキット（Amersham社製）を用いて、Ｓｃ－３１５抗体（１：２００に希釈）（Santa Cruz Biotech社製）で総ＫＤＲに対して再プロービングした。各処理グループにおけるリン酸化（活性）ＫＤＲの強度をＰＹ２０ブロットから測定し、次に、抗ＫＤＲ（ｓｃ－３１５）での再プロービングで決定されたＫＤＲの存在の総量に標準化した。その結果を図１に示す。

【０４８７】

結果：

ＶＥＧＦを含まない場合、リン酸化ＫＤＲを検出できなかった。ＶＥＧＦを添加した場合、ブロット上に強いリン酸化ＫＤＲのバンドが生じた。ＶＥＧＦおよびＢＲＵ－３２６（１μＭ）をＨＵＶＥＣに同時に加えた場合、弱いリン酸化ＫＤＲのバンドしか見えず、これは、ＢＲＵ－３２６によるＫＤＲ活性化が約６０％抑制されたことに一致する（図１を参照）。他の実験において、２００μＭのＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－９５）は、ＫＤＲを活性化するＶＥＧＦの能力を持たなかった（示さず）。

【０４８８】

実施例３２：ＴＫＰＰＲ単量体および多量体の、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦのＮＰ－１／Ｆｃへの結合を抑制する能力の評価

ＴＫＰＰＲ単量体または多量体を含む様々な組成物の、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦのＮＰ－１への結合を抑制する能力をＮＰ－１／Ｆｃを用いて評価した。ＮＰ－１／Ｆｃ（R&D sytems社製）で被覆したマイクロタイタープレートを用いて、放射性リガンドとして^{125}Ｉ－ＶＥＧＦ$_{165}$（Amersham Pharmacia Biotech社製、Cat. No. IM274、特異活性：１０００～２５００Ｃｉ／ｍｍｏｌ）を用いて、競合結合分析を行った。ハンクス液（ＨＢＳＳ）、２５ｍＭのＨＥＰＥＳおよび０．１％のＢＳＡを含み、ｐＨ７．４の分析用緩衝液を用い、全ての実験に関して、１ウェルあたりの分析容量は７５μｌであった。プレート（Nunc MaxiSorp、白色の不透明なマイクロタイタープレート［C-bottom, 437796］）を、シールテープ（Dynex,VWR Cat. No. 62402-931）で覆った後、ウェルを３μｇ／ｍＬのＮＰ－１／ＦｃのＤ－ＰＢＳ溶液／０．１％のアジ化ナトリウムを含む溶液（７５μｌ）で、４℃で一晩インキュベーションすることによって被覆した。次の日、分析を始める前に、全てのウェル、さらにＮＰ－１／Ｆｃを含まないコントロールウェルを、ブロッキング緩衝液（０．０５％（ｖ／ｖ）のTween-20を含む１％のＢＳＡのＤ－ＰＢＳ溶液）で２時間ブロックし、次にＰＢＳＴ（Ｄ－ＰＢＳ／０．０５％（ｖ／ｖ）のTween-20）で４回洗浄した

。全てのポイントは、３回反復したウェルから得て、ＮＰ－１／Ｆｃで被覆したウェルにおける反復の各セットに関して、受容体が存在しない比較セットを含めた。競合結合に関して、一連の非標識競合物濃度を、分析用緩衝液中の２５０ｐＭの^{125}Ｉ－ＶＥＧＦ$_{165}$の溶液で調製した。マイクロタイター様式に合わせた１．２ｍＬのポリプロピレン管（Costar社製、Cat．No．29442-602）に溶液を加え、この管から、さらに希釈しないで、マルチチャンネルピペッターを用いてマイクロタイターウェルに移した。適切な溶液を加えた後、マイクロタイタープレートを４℃で２時間インキュベートした。インキュベーションに続いて、プレートを０．０５％のTween-20および０．１％のＢＳＡを含むＤ－ＰＢＳで５回手動で洗浄した。プレートをブロットし、乾燥し、２５μｌの脱イオン水と１００μｌのシンチレーションフルイド（Optiphase SuperMix, Wallac）とを各ウェルに加えた。プレートをプレートシェーカー（Hyperion社製、Cat．No．4030- 100F）を用いて３～５分間かき混ぜ、次に、マイクロプレートシンチレーションカウンター（Wallac Microbeta Trilux社製）を用いて計測した。放射ラベルの結合量の定量化を補助するために、２００から０．０４ｐＭへ連続的に希釈した^{125}Ｉ－ＶＥＧＦ$_{165}$標準ウェルのセットが各実験で用いられた。ＶＥＧＦ$_{165}$（Cat．No．100-20）はPeprotech社から購入した。

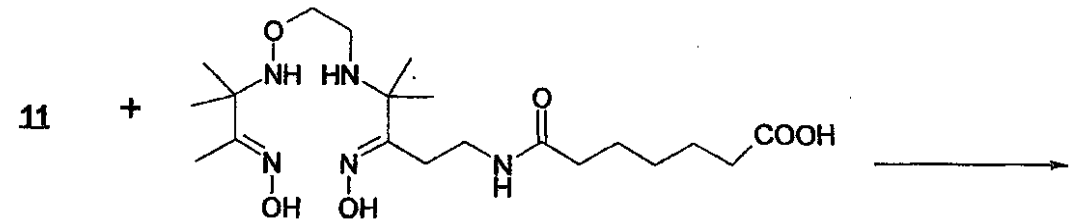
【０４８９】

結果：

以下に列挙した競合化合物の増加する濃度が分析に加えられた場合、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦ$_{165}$のＮＰ－１／Ｆｃへの結合の抑制の量は変動し、すなわち、抑制が起こらなかった１μＭ（ネガティブコントロールペプチド）から、ＩＣ$_{50}$の５００ｐＭまで（非標識ＶＥＧＦ$_{165}$）変動した。タフトシン（ＴＫＰＲ）は、ＴＫＰＰＲより５～６倍効果が低い結合阻害剤であった。オレゴングリーン（ＯＧ）、フルオレセイン誘導体をＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－２３９）に加えても、ペプチドの効力に対する有意な効果がほとんどなかった。しかしながら、多量体形態のＴＫＰＰＲは単量体ＴＫＰＰＲよりかなり効果的であり、効力は化合物の価に伴い増加する。従って、二量体ＴＫＰＰＲ（ＯＧ－（ＴＫＰＰＲ）$_2$、ＢＲＵ－３１７）は、単量体より１０～１４倍効果的であり、四量体ＴＫＰＰＲ（ＯＧ－（ＴＫＰＰＲ）$_4$、ＢＲＵ－３２６）は単量体より２３０～３３０倍効果的であった。しかしながら、そのスレオニン残基ではなくアルギニン残基を介してペプチドを足場に付着させて製造された四量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－３４６）は、もとの四量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－３２６）よりかなり効果が低かったが、ＴＫＰＰＲ単量体よりはまだ効果的であった。従って、ＴＫＰＰＲ多量体の活性は、どの程度ペプチドが会合してその多量体形態を形成するかに依存すると考えられる。

【０４９０】

【表２４】



【０４９１】

【表２５】

OG-TKPPR	30 μM	BRU-239
TKPPR	43 μM	BRU-95
タフトシン (TKPR)	280 μM	-
TPATSVRG (ネガティブ対照)	1mMで不活性	BRU-170

【０４９２】

ＮＰ－１／ＦｃをＫＤＲ－Ｆｃで置き換えてなされた同等の分析によれば、上記で列挙したＢＲＵ－３２６などのＴＫＰＰＲ誘導化合物のいずれも、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦ$_{165}$のＫＤＲへの結合を、試験された最も高い濃度でも抑制できなかったことを示した。これは、これらの化合物はＮＰ－１に選択的であることを示す。

【０４９３】

実施例３３：ＴＫＰＰＲ単量体およびＴＫＰＰＲ多量体の、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦのヒト臍静脈の内皮細胞（ＨＵＶＥＣＳ）への結合を抑制する能力の評価

ＴＫＰＰＲ単量体およびＴＫＰＰＲ多量体を含む組成物の、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦの内皮細胞への結合を抑制する能力を、ＨＵＶＥＣを用いて評価した。ＨＵＶＥＣを用いた競合的な結合分析を、Bikfalvi等（J. Cell. Physiol. 149:50-59,1991）（これらの全内容はいずれも、参照として本明細書に含まれる）で説明されたようにして行い、その際、ＨＵＶＥＣはClonetics社から購入し、Clonetics社が推奨するようにＥＧＭ－ＭＶ培地（BioWhittaker社製）で培養した。ＴＫＰＰＲ四量体化合物（ＢＲＵ－３２６）およびＴＫＰＰＲ単量体化合物（ＢＲＵ－９５）を評価した。

【０４９４】

結果：

ＴＫＰＰＲ四量体および単量体ＴＫＰＰＲを、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦのＨＵＶＥＣへの結合の競合物として試験した際、いずれもＨＵＶＥＣ上のＶＥＧＦ受容体への結合を抑制することができたが、四量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－３２６）は、単量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－９５、IC_{50}＝２５０μｍ）よりも効果的であった（IC_{50}＝１０μＭ）。図２を参照。殆ど全ての^{125}Ｉ－ＶＥＧＦの結合を非標識ＶＥＧＦで抑制することができたが、いずれの形態のＴＫＰＰＲによる抑制に影響されない他のＶＥＧＦ受容体の存在と一致して、単量体または四量体ＴＫＰＰＲでは一部ブロックすることができないようである。

【０４９５】

実施例３４：ＴＫＰＰＲ単量体および多量体の、ＮＰ－１およびＫＤＲのＶＥＧＦ受容体への結合の能力の、蛍光偏光法（ＦＰ）による評価

ＴＫＰＰＲ単量体または多量体を含む様々な組成物の、ＮＰ－１／ＦｃおよびＫＤＲ－Ｆｃへの結合の能力を、ＦＰにより評価した。様々なオレゴングリーン（ＯＧ）で標識した化合物（ＴＫＰＰＲ単量体または多量体およびニューロピリン－１／ＦｃとＫＤＲ－Ｆｃとに関連した化合物（いずれもR&D Systems社製）を含む）の結合研究を、３７℃でＤ－ＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）中で行った。Jolley Research and Consulting社のＦＰＭ－１蛍光偏光法アナライザーを用いて、受容体タンパク質でリガンドを滴定することによって（５～２０ｎＭ）、各基質のＦＰ値（ｍＰ）を測定した。この実験のそれぞれにおいて、観察された偏光値を受容体濃度に対してプロットした。リガンドを標識したトレーサーの受容体タンパク質への１００％結合に対するｍＰ値を、売主により提供されるソフトウェアを用いて計算した。この値の半分が５０％結合におけるｍＰ値に相当し、相当するＮｐｎ－１濃度はリガンドの解離定数（K_d）を表す。

【０４９６】

結果：

蛍光標識したＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）は、ＮＰ－１に強く結合した（それぞれの実験においてK_d＝２５～５０ｎＭ）（図３）が、ＫＤＲ－Ｆｃには結合しなかった

（図４）。ＴＫＰＰＲ二量体（ＢＲＵ－３１７）のＮＰ－１への結合はＦＰによりほとんど検出可能されなかった（図３）。ＮＰ－１への結合は、非標識ＴＫＰＰＲ単量体（IC_{50}＝８０μＭ）およびＶＥＧＦ$_{165}$（IC_{50}＝２００ｎＭ）により競合されるが、ＶＥＧＦ$_{121}$は２５０ｎＭまでは効果がなかった。ＯＧ－ＴＫＰＰＲ単量体（ＢＲＵ－２３９）のＮＰ－１／Ｆｃへの結合は検出できなかった。また、ＴＫＰＰＲのＣ末端アミノ酸を介して異なる足場へ連結した四量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－３４６）のＮＰ－１への結合も検出できなかった。この結果は、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦを用いた放射性リガンド結合データに一致するが、ＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）のＮＰ－１／Ｆｃへの直接結合を示すこともデータに加えられる。

【０４９７】

実施例３５：静置培養における、ＶＥＧＦ$_{165}$およびＶＥＧＦ$_{121}$の、実施例５の組成物Ｉ（ＢＲＵ－１１４）のＨＡＥＣへの結合を抑制する能力の比較

実施例７で説明したように、２％のＢＲＵ－１１４（組成物中の総リン脂質の％として）を含むマイクロバブル組成物を用いて、分析を行った。

【０４９８】

結果：

以下の表で示すように、ＶＥＧＦ$_{121}$は、その組成にＢＲＵ－１１４を含むマイクロバブルのＨＡＥＣへの結合を抑制する能力をほとんど有していなかった。しかしながら、ＶＥＧＦ$_{165}$は、バブル結合を効果的にブロックした。ＶＥＧＦ$_{121}$は、ＮＰ－１と相互作用することが知られていないが、その代わり、Ｆｌｔ－１とＫＤＲとに特異的に結合する。一方で、ＶＥＧＦ$_{121}$非存在下でヘパリン－結合ドメインを含むＶＥＧＦ$_{165}$は、ＮＰ－１を含む殆どのＶＥＧＦ受容体と結合することが知られている。従って、これらの結果は、ＫＤＲ－ＦｃおよびＮＰ－１／Ｆｃで示されたＦＰと放射性リガンド結合データを組み合わせると、内皮細胞上のＴＫＰＰＲに関する結合標的はＮＰ－１であり、ＫＤＲではないことを強く示す。

【０４９９】

【表２６】

表．バブルのＨＡＥＣへの結合－ＶＥＧＦ$_{165}$およびＶＥＧＦ$_{121}$の結合頻度に関する競合の効果。結合は、総バブル結合の平均として示される（２回反復して測定した）。

処理	バブル結合
なし	953
25 ng/ml VEGF165	144
100 ng/ml VEGF165	94
200 ng/ml VEGF165	70
100 ng/ml VEGF121	878
200 ng/ml VEGF121	849
400 ng/ml VEGF121	778

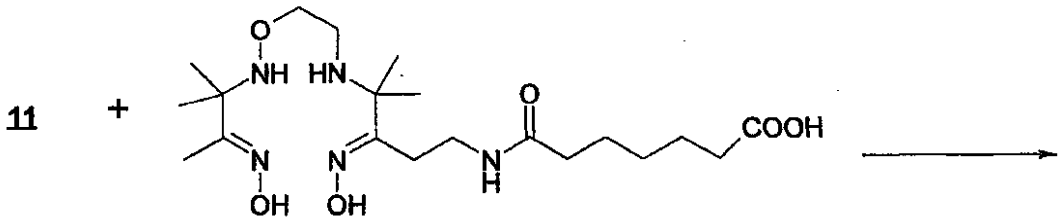
【０５００】

実施例３６：オキサ－ＰｎＡＯ金属キレート化用の基を複合させたＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３６３）の合成

合成スキーム：

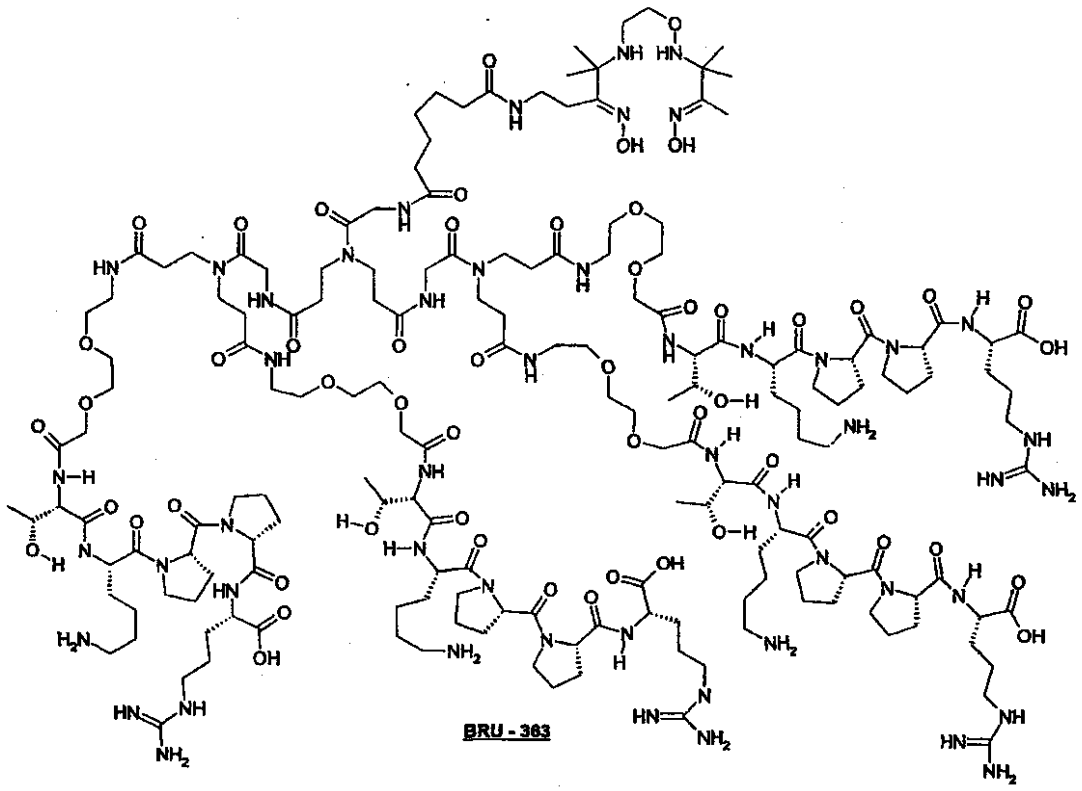
【０５０１】

【化５７】



【０５０２】

【化５８】



【０５０３】

実験：

ＢＲＵ－３６３：

オキサ－ＰｎＡＯ酸（ＢＲＵ－３５１*、０．４４ｇ、０，０７８７ｍｍｏｌ）溶液を２００ｍＬのＮＭＰに溶解し、アイスバスで冷却した。ＨＡＴＵ（３８ｍｇ、０．０１ｍｍｏｌ）を加え、続いてＤＩＥＡ（２６．０ｍｇ、０．０２ｍｍｏｌ）を加え、その溶液を０℃で３０分間攪拌した。次に、アミン１１（０．１６８ｇ、０．０３０９ｍｍｏｌ）を固体として加え、続いてＤＩＥＡ（１３．０ｍｇ、０．１ｍｍｏｌ）を加え、その反応混合物を室温で２０時間攪拌した。その混合物を水（１０ｍＬ）で希釈し、ジクロロメタン（３×２０ｍＬ）で抽出した。有機層をあわせ、飽和炭酸水素ナトリウム（３×２０ｍＬ）、水（３×２０ｍＬ）で洗浄し、乾燥した（硫酸ナトリウム）。乾燥剤をろ過した後、溶媒を蒸発させ、無色のゴム状物質を得て、その粗生成物を、室温で、高真空下（＜０．１ｍｍ）で２０時間乾燥した。上記乾燥生成物を１０ｍｌの試薬Ｂ（８８：５：５：２、ＴＦＡ：水：フェノール：トリイソプロピルシラン）に溶解し、室温で５時間攪拌した。全ての揮発成分を減圧下で除去し、残部を無水エーテル（１０ｍｌ）で粉砕した。沈殿し

た固体をろ過して除き、エーテル（３×１０ｍｌ）で洗浄し、乾燥した。次に、上記固体を分取用ＨＰＬＣカラムで精製した［ＹＭＣ　Ｃ１８ＲＰカラム；２５０ｎ×３０ｍｍ；Ｓ－１０Ｐｍ；１２０Å；溶離速度：２５ｍｌ／分；検出－２２０ｎｍ；溶媒Ａ：０．１％のＴＦＡを含む水；溶媒Ｂ－０．１％のＴＦＡを含むＡＣＮ；１２０分で２～６２％のＢ］。主要なピークを含む分画（純度＞９５％）を貯蔵し、凍結乾燥し、無色のふわふわした固体として生成物を得た。収率：０．０４３ｇ（２５％）；t_R：２７．１３分（ＹＭＣ　ＲＰ　Ｃ－１８カラム；２５０×４．６ｍｍ；溶離速度：１ｍＬ／分；検出－２２０ｎｍ；３０分で５～６０％のＢ；純度＞９８％）。D_2Oでの^1H－ＮＭＲによれば、分子の予想の特徴的なピーク全て、および、１セットのＰｎＡＯコア上のｇｅｍジメチル（米国特許第６，０９３，３８２号を参照、これらの全内容はいずれも、参照することによって本明細書に含まれる）と、認められた４つのスレオニン単位との整数比率（１：２）が示された。ＭＳ　ｍ／ｚ　９８７．２［Ｍ＋４Ｈ］／４，７８９．９［Ｍ＋５Ｈ］／５，６５８．５［Ｍ＋６Ｈ］／６，５６４．６［Ｍ＋７Ｈ］／７。

【０５０４】

実施例３７：本発明の^{99m}Ｔｃ放射性医薬品の調製（^{99m}Ｔｃ－オキサＰｎＡＯ（ＴＫＰＰＲ）$_4$）

^{99m}Ｔｃに関して以下で説明するように、上述の実施例（ＢＲＵ－３６３）のＴＫＰＰＲ－金属キレート化剤複合体は放射性金属と錯体を形成し得る。第一スズのＤＴＰＡ溶液は、$SnCl_2 \cdot 2H_2O$（１１．９ｍｇ、０．０５８ｍｍｏｌ）を１．２ｍＬのＮ２でパージした０．１ＮのＨＣｌに溶解することによって調製する。これに、２５ｍＬのN_2でパージした水およびNa_2ＤＴＰＡ（５２４ｍｇ、１．０５ｍｍｏｌ）を加え、その溶液の最終容積を５０ｍＬにする。オキサＰｎＡＯ（ＴＫＰＰＲ）$_4$リガンド（１ｍｇ）を、１ｍＬの０．１Ｍホスフェート緩衝液（ｐＨ８．１）に溶解する。この溶液の４００μＬのアリコートを、１００μＬ（１０～２０ｍＣｉ）の$^{99m}TcO_4^-$と混合し、続いて７５Ｌの第一スズＤＴＰＡ溶液と混合する。室温で１５分後、その反応混合物のアリコートを、ＹＭＣ塩基性Ｓ－５ＨＰＬＣカラム［２５０×４．６ｍｍ］に注入し、以下の勾配を１．０ｍＬ／分の流速で用い、^{99m}Ｔｃ－オキサＰｎＡＯ（ＴＫＰＰＲ）$_4$錯体からキレートされていないリガンドを分離する。放射活性とＵＶ（A_{220}）との双方のトレースをモニターする。

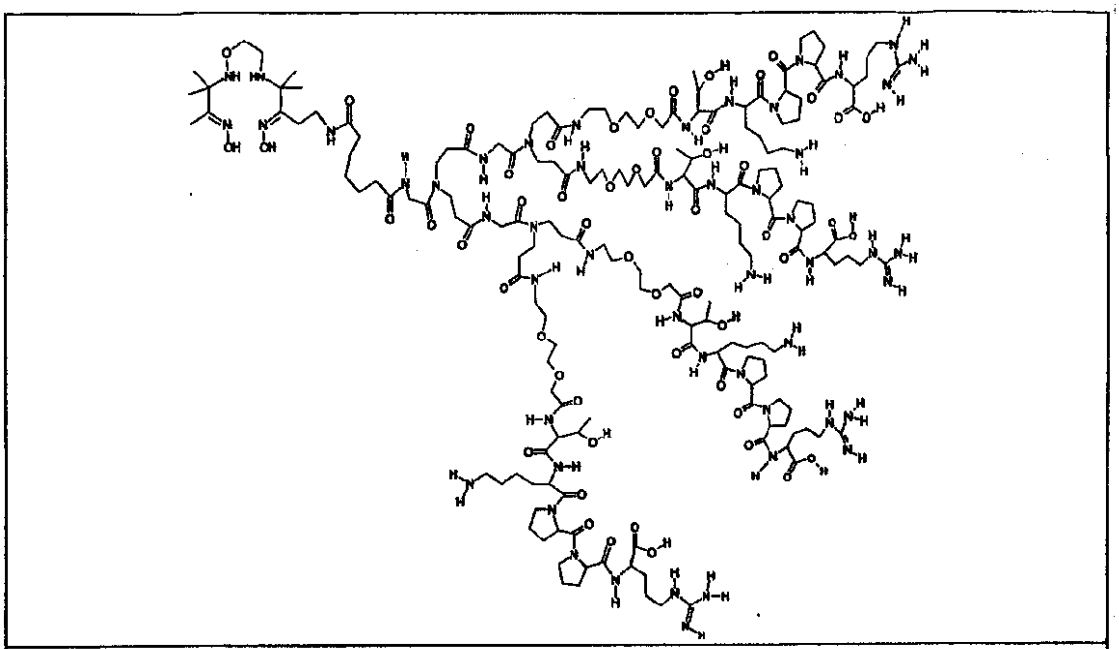
【０５０５】

ｔ＝０分、１００％のH_2O（０．１％のＴＦＡ）
５分、１００％のH_2O（０．１％のＴＦＡ）
３０分、７０％のH_2O（０．１％のＴＦＡ）／３０％のＡＣＮ
５０分、７０％のH_2O（０．１％のＴＦＡ）／３０％のＡＣＮ
５２分、１００％のH_2O（０．１％のＴＦＡ）

ＨＰＬＣから得られた所望の放射性錯体を含む分画を単離し、乾燥状態に近くなるまで蒸発させ、次に、その後の試験のために、生理食塩水または生理学的に許容できる緩衝液［例えばダルベッコホスフェート緩衝食塩水（Ｄ－ＰＢＳ、Na_2HPO_4：８．１ｍＭ、KH_2PO_4：１．５ｍＭ、ＫＣｌ：２．７ｍＭ、ＮａＣｌ：１３７ｍＭ、ｐＨ７．５）］に溶解する。

【０５０６】

【化５９】



オキサ PnAO(TKPPR)$_4$リガンドの構造

【０５０７】

上述した発明を図や実施例により詳細に説明し、好ましい実施形態または特定の実施形態のみを開示したが、多数の改変、置き換え、および代替が、上記請求項に記載される本発明の骨子や範囲を逸脱しない範囲で全て可能であることは言うまでもない。

【図面の簡単な説明】

【図１】　ＨＵＶＥＣのＶＥＧＦによるＫＤＲの活性化（リン酸化）は、ＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）によりブロックされる。指示された処理の後（レーン１：ＶＥＧＦなし、レーン２：ＶＥＧＦ、レーン３：ＶＥＧＦおよびＢＲＵ－３２６）、ＫＤＲを免疫沈降反応させ、初めに抗ホスホチロシンで免疫ブロットし（上のパネル）、次に抗ＫＤＲで免疫ブロットした（下のパネル）。ＶＥＧＦ単独の添加は、ブロット上に強いリン酸化ＫＤＲのバンドを生じたが、ＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）とＫＤＲとを同時に加えた場合、リン酸化ＫＤＲの弱いバンドしか検出されず、これは、ＢＲＵ－３２６によるＫＤＲ活性化の約６０％の抑制に一致した。

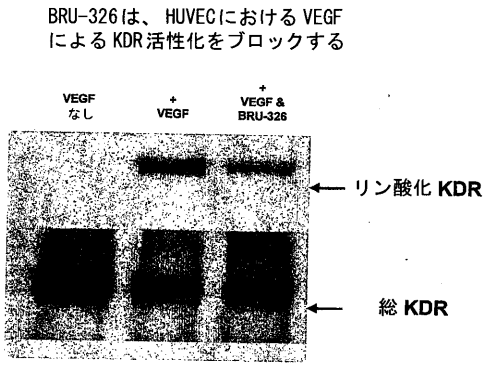
【図２】　^{125}Ｉ－ＶＥＧＦとＨＵＶＥＣとの結合は、ＴＫＰＰＲ単量体および多量体によって抑制される。非標識ＶＥＧＦ（●）、四量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－３２６）、および単量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－９５、▲）の、増加する濃度に対する競合の効果である。ＴＫＰＰＲ四量体とＴＫＰＰＲ単量体の双方は、ＨＵＶＥＣの受容体への結合した^{125}Ｉ－ＶＥＧＦに結合することを抑制できたが、四量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－３２６）は、単量体ＴＫＰＰＲ（ＢＲＵ－９５、IC_{50}＝２５０μＭ）より効果的であった（IC_{50}＝１０μＭ）。

【図３】　ＴＫＰＰＲ誘導体とＮＰ－１／Ｆｃとの結合の蛍光偏光法評価。表示のオレゴングリーンで標識した誘導体を、ＮＰ－１濃度を増加させてインキュベートし、偏光を測定した。蛍光標識したＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）は、ＮＰ－１に強く結合した（それぞれの実験においてK_d＝２５～５０ｎＭ）。ＴＫＰＰＲ二量体（ＢＲＵ－３１７）の結合は、蛍光偏光法（ＦＰ）でもほとんど検出できなかった。ＮＰ－１への結合は、非標識遊離ＴＫＰＰＲ単量体（IC_{50}＝８０μＭ）およびＶＥＧＦ（CI_{50}＝２００ｎＭ）で競合させることができた。ＯＧ－ＴＫＰＰＲ単量体（ＢＲＵ－２３９）とＮＰ－１／Ｆｃとの結合は、検出できなかった。またＴＫＰＰＲのＣ末端アミノ酸を介して異なる足場に連結した四量体（ＢＲＵ－３４６）の結合も検出できなかった。これらの結果は、^{125}Ｉ－ＶＥＧＦを用いた放射性リガンド結合データと一致するが、ＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）のＮＰ－１／Ｆｃへの直接結合を示すことによって、そのデータに加えら

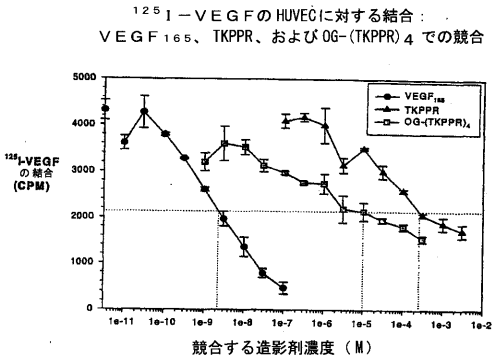
れる。

【図４】　ＴＫＰＰＲ誘導体とＫＤＲ－Ｆｃとの結合のＦＰ評価。ＯＧで標識されたＴＫＰＰＲ単量体（ＢＲＵ－２３９）および四量体（ＢＲＵ－３２６）を、増加する濃度のＫＤＲ－Ｆｃと共にインキュベートし、偏光を測定した。蛍光標識したＴＫＰＰＲ四量体（ＢＲＵ－３２６）または蛍光標識した単量体（ＢＲＵ－２３９）のいずれもＫＤＲ－Ｆｃに結合しなかった。

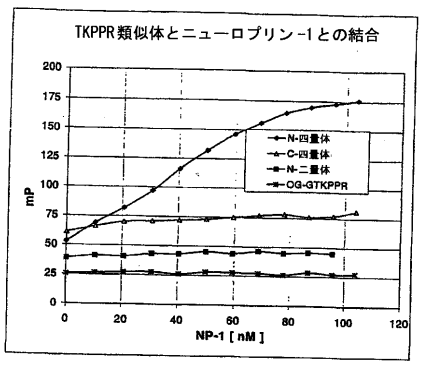
【図１】



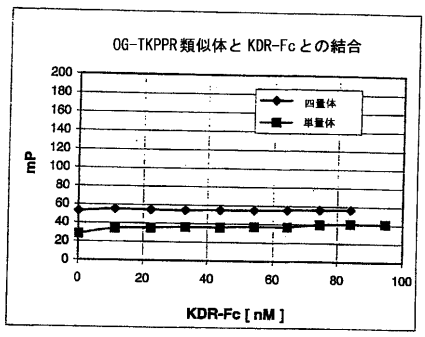
【図２】



【図３】



【図４】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61K 49/00	***(2006.01)***	A61K	49/00	C
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00	

(72)発明者 フォン・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０８０５７，ムーアスタウン，オールドショー・アベニュー６０４
(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０８６４８，ローレンスヴィル，エルドリッジ・アベニュー１９０
(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０８５３０，ランバートヴィル，ミル・ロード ３３
(72)発明者 ピライ，ラドハクリシュナ
アメリカ合衆国ニュージャージー州０８５１２，クランベリー，ウォルナット・コート １２
(72)発明者 ラマリンガム，コンデアディアー
アメリカ合衆国ニュージャージー州０８８１０，デイトン，リバティー・ドライブ ４６
(72)発明者 トウィードル，マイケル・エフ
アメリカ合衆国ニュージャージー州０８５４０，プリンストン，ライブラリー・プレイス ７２
(72)発明者 リンダー，カレン
アメリカ合衆国ニュージャージー州０８５２８－０４６５，キングストン，ベイスン・ストリート，ピー・オー・ボックス ４６５
(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０８８１０，デイトン，リバティー・ドライブ ３０
(72)発明者 ラジュ，ナタラジャン
アメリカ合衆国ニュージャージー州０８８２４，ケンドール・パーク，ニュー・ロード ４１
(72)発明者 ヤン，フェン
スイス国ジェーデーーランシー １２１２，ゴテリュ，セアッシュ・デ・チャンプス，７
(72)発明者 シュナイダー，マイケル
スイス国トロワネ，ルット・ダ・アヌシー ３４

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第９９／０５１６２８（WO，Ａ１）
特表平０９－５００１４０（ＪＰ，Ａ）
特表平０９－５０５０６１（ＪＰ，Ａ）
特表平１１－５０５８５２（ＪＰ，Ａ）
特表平１０－５０２９３１（ＪＰ，Ａ）
特表平０９－５０９４１９（ＪＰ，Ａ）
Bioconjugate Chem., 1999, Vol. 10, No. 5, pp.832-837

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09
C07K 7/06
C07K 19/00
C12Q 1/02
CA/REGISTRY(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed

WPI