(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 51/08

(11) 공개번호 10-2004-0055784
(43) 공개일자 2004년06월26일

(21) 출원번호 10-2004-7005539
(22) 출원일자 2004년04월14일
번역문 제출일자 2004년04월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/033904
(87) 국제공개번호 wo 2003/033030
(86) 국제출원출원일자 2002년10월21일
(87) 국제공개일자 2003년04월24일

(30) 우선권주장 60/344,511 2001년10월19일 미국(US)

(71) 출원인 토마스 제퍼슨 유니버시티
미합중국 펜실베니아 19107 필라델피아 월너트 스트리트 1020

(72) 발명자 타커마드허칼매튜엘.
미국,뉴저지08003,체리힐,레이크뷰드라이브44

(74) 대리인 특허법인씨엔에스

심사청구 : 없음

(54) 종양의 영상 및 치료용 피에이씨에이피 조성물 및 방법

요약

PACAP, 또는 유사체의 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트를 포함하는 화합물로 VPAC 수용체를 발현하는 종양이 영상화되거나 치료될 수 있다.

색인어

종양, 검출, 영상제, 치료제, 킬레이트제

명세서

기술분야

관련 출원에 대한 교차 참고문헌

본 출원은 본 명세서에 참고문헌으로 편입되고 2001, 10, 19 일에 제출된 미국 가특허출원 일련번호 60/344,511의 권리를 주장한다.

본 발명의 분야

본 발명은 일반적으로 핵의학의 분야 및 분자 종양 영상 혹은 치료제에 관한 것으로, 보다 상세하게 VPAC 수용체를 발현하는 종양의 영상 혹은 치료용 방사표지제에 관한 것이다.

배경기술

암은 해마다 수백만명의 생명을 빼앗아가는 위협적인 세포 증식성 질병이다. 유방암 단독으로, 미국에서 50,000명 이상의 여성이 해마다 고통받고 있다. 유방 종양은 통상적으로 초음파, MRI 혹은 맘모그라피후 조직학에 의해 검출되고 외과 절제후 화학- 및/또는 방사 치료에 의해 처리된다. 유방 (및 기타) 암의 사망율은 종양의 초기 진단 및 치료를 통해 줄일 수 있다(Kelsey JL, *Epidemiol.* Rev. 1 :74-109,1989). 종양의 초기 검출을 위한 효과적인 방법은 종양-특이 방사성 영상제를 이용한 신티그램 촬영법이다.

다수의 방사성 종양 영상제는 변하는 성공도로 유방 종양 검출에 사용되어왔다. 예를들어, 신경 펩타이드와 같은 수용체 특이 생분자는 나노몰 농도로 수용체에 결합하며 치료 및 진단 분야 모두에 상당한 관심의 촛점이 되어왔다(Fischman AJ 등, *J. Nucl. Med.* 34 : 2253-2263, 1993; Hokfelt T *Neuron* 7 : 867-879, 1991).

그러나, 단지 상업적으로 이용가능한 신경 펩타이드 영상제인 ^{111}In-[DTPA-D-Phe ^{1}] 옥트레오타이드는 유방 종양 검출에 높이 성공적이지 않다(van Eijck CHJ 등. *Lancet* 343 : 640-643, 1994; McCready VR 등. *Lancet* 343 : 1994). 상기에서 van Eijck 등(1994)은 52 프라이머리 유방암에서 이 시약으로 단지 75% 양성 신티그램이 달성되었다고 보고하였다. 또한, van Eijck 등은 ^{111}In-[DTPA-D-Phe ^{1}] 옥트레오타이드를 이용한 겨드랑이의 영상은 조직학적으로-입증된 전이를 갖는 13명의 환자중 단지 4명에서 명백하지 않은, 암-함유 림프절을 검출하였다. 유방 종양 영상용 ^{111}In-[DTPA-D-Phe ^{1}] 옥트레오타이드의 낮은 효율은 그 시약에 특이적인 유방 종양 세포에서 발현되는 발암유전자 수용체의 저 밀도에 기인한다. 따라서 유방 종양 영상용 ^{111}In-[DTPA-D-Phe ^{1}] 옥트레오타이드의 유용성은 제한된다.

^{123}I-Tyr3-옥트레오타이드가 또한 방사-진단 영상용으로 사용되지만, 이 시약은 유방 종양의 영상용으로 평가되지 않는다(Krenning EP 등., *Eur. J. Nucl. Med.* 20 : 716-731, 1993). 그러나, 유방 종양을 영상화하는 것에 대한 ^{111}In-[DTPA-D-Phe ^{1}] 옥트레오타이드의 저조한 성능에 근거하여, ^{123}I-Tyr3-옥트레오타이드는 유용한 유방 종양 영상제로 기대되지 않는다.

어느 경우에, 방사-요오드화제는 일반적으로 영상제 혹은 치료제로 사용하기에 바람직하지 않다. 왜냐하면 방사-요오드화된 방사성의약품은 일반적으로 임상 부위에 제조될 수 없기때문이다. 방사-요오드화제는 특정 제한을 가질 뿐만아니라; 예를들어, ^{125}I-표지된 시약은 상대적으로 긴 반감기(약 59일) 및 방사성 핵종의 낮은 방출 에너지에 기인하여 전형적으로 영상 적용처에 사용되지 않는다. ^{123}I는 제조하기에 비싸며 그 방사성 핵종은 상업적으로 이용하기에 너무 짧은 반감기(13.3시간)을 갖는 사이클로트론-생성 방사성 핵종이기때문에 ^{123}I-표지된 시약은 바람직하지 않다. ^{131}I-표지된 시약은 퀄리티 신티그램 영상용으로는 너무 높은 방출 에너지를 갖는다.

테크네튬-99m(^{99m}Tc)는 140 KeV로 감마 방사선을 방출하고, 6시간의 물리적 반감기를 가지며 그리고 몰리브데늄-99/ ^{99m}Tc 생성기를 이용하여 부위에 쉽게 제조될 수 있기때문에 진단 영상제에 광범위하게 사용된다. ^{99m}Tc의 보다 짧은 반감기는 일반 기관에 대한 방사량을 최소화하며 그 방출 에너지는 감마 카메라에 의해 효과 적으로 검출되도록 한다. 따라서 ^{99m}Tc는 임상 핵의학 적용처에서 거의 90%로 선택되는 방사성 핵종이다.

영상제는 전형적으로 금속 킬레이트 부를 통해 ^{99m}Tc로 표지된다. 상기 ^{99m}Tc 금속 킬레이트 부는 일반적으로 또한 186Re 및 188Re와 같은 치료 방사성 핵종을 복합시킬 수 있다. 따라서, 금속 킬레이트를 포함하는 단일 시약은 진단 혹은 치료제로서 유용하게 사용될 수 있으며, 이는 어느 방사성 핵종이 사용되는지에 따라 달라질 수 있다.

미국 특허 6,395,255(M. Thakur)에는 ^{99m}Tc 킬레이터를 이용하여 혈관 활동성 장관 펩타이드(VIP)-기초 시약을 표지하는 방법이 기술되어 있다. 미국 특허 6,395,255에 기술된 킬레이터 및 표지 화학은 ^{99m}Tc 또는 레늄 방사성 핵종을 이용하여 VIP 시약을 표지하기에 적절하다. 그러나, 미국 특허 6,395,255에 기술된 VIP 시약은 단지 VIP 수용체를 발현하는 종양에만 결합한다. 특정 종양이 다른 타입의 수용체를 고 밀도로 발현하는 경우, 이러한 종양 세포에 의해 발현되는 보다 광범위한 범위의 수용체에 결합할 수 있는 영상제 혹은 치료체가 이로울 수 있다.

뇌하수체 아데닐레이트 사이클라아제 활성 펩타이드(PACAP)는 소의 시상하부로부터 본래 분리된 38-아미노산 펩타이드이다(Miyata A 등, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 : 567-574, 1989). 이 펩타이드는 래트 뇌하수체 전엽 세포의 모노레이어 배양시 세포내 및 세포외 cAMP의 축적을 자극한다(Gottschall PE 등, *Endocrinology* 127 : 272-277, 1990). 상기에서 Gottschall 등(1990)은 소의 시상하부에서 27-아미노산 PACAP(PACAP $_{27}$)을 분리하였으며, 그리고 PACAP $_{38}$ 및 PACAP $_{27}$ 은 동등하게 활성적이며 단일 176-아미노산 전구체로부터 유래된 것으로 결론지었다.

PACAP $_{27}$ 은 시상하부 세포에서 아데닐레이트 사이클라아제 자극에 있어서 28-아미노산 혈관 활동성 장관 펩타이드 VIP $_{28}$ 보다 10배이상 강하다(Gottschall 등, 1990). ^{125}I-PACAP $_{27}$ 은 또한 일반적인 폐막에 결합된 VIP $_{28}$ 을 대체할 수 있다. VIP $_{28}$ 에 대한 IC $_{50}$ 값은 약 15nM이며, 그리고 PACAP $_{27}$ 에 대한 IC $_{50}$ 값은 약 1.5nM이다.

PACAP $_{27}$ 은 PACAP, VIP-R1 및 VIP-R2 수용체에 고 친화적으로 결합하는 반면, VIP $_{28}$ 은 단지 VIP-R1 및 VIP-R2 수용체에만 고 친화적으로 결합한다(Zia F 등., *Cancer. Res.* 55 : 4886-4891, 1995). 집합적으로 VPAC 수용체로 간주되는 PACAP, VIP-R1 및 VIP-R2 수용체(Reubi JC, *J. Nucl. Med.* 36 : 1846-1853, 1995; Reubi JC 등., *Cancer Res.* 60 :1305-1312, 2000)는 유방 종양에서 고 밀도로 발현된다(Harmar T 등., *TiPs* 15 : 97-98, 1994; Reubi JC 등., Eur. J. Nucl. Med. 24 : 1058, 1997; Le Meuth V 등., *Amer. J. Physiol.* 260 : G265-74, 1991; Basille M 등. Brain Res. 82 : 1-2, 1994; Vertrongen P 등., *Neuropeptides* 30 : 491-496; Olians MC 등., *J. Neurochem.* 67 : 1292-1300, 1996; Lelievre V 등., *Neuropeptides* 30 : 313-322, 1996; 및 Parkman HP 등., *Regulatory Peptides* 71 : 185-190, 1998). 예를들어, VPAC 수용체를 발현하는 종양(유방 종양이외)은 난소, 자궁내막, 전립선, 방광, 폐, 식도, 결장, 췌장, 신경내분비성 및 뇌의 종양을 포함한다.

그러나, PACAP를 이용하여 표적화된 방사성의약품을 제조하는데 성공적인 경우는 거의 없었다. 참고로, 예를들어 Reubi JC 등(*Eur. J. Nucl. Med.* 24 : 1058, 1997)은 N-말단의 DTPA에 연결된 PACAP $_{27}$ 의 생물학적 활성이 100 내지 0.01미만으로 감소되었음을 보여주었다.

따라서, 특정 종양 세포에 존재하는 하나 또는 그 이상 타입의 수용체에 고 친화적으로 결합하는 PACAP와 같은 수용체-특이 생분자에 기초한 방사성 종양 영상제 혹은 치료제가 요구된다. 상기 영상제 혹은 치료제는 금속 킬레이터를 통해 진단 혹은 치료 방사성 핵종으로 이상적으로 표지되어야한다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명은 PACAP, VIP-R1 및 VIP-R2 수용체를 발현하는 유방 및 기타 종양의 영상 혹은 치료에 사용되는 방사표지 PACAP와 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트 및 유사체의 용도에 관한 것이다. PACAP, VIP-R1 및 VIP-R2 수용체는 이후 집합적으로 'VPAC 수용체'라 칭한다.

따라서, 본 발명은 유효량의 화학식 A 또는 B 영상 화합물을 종양을 갖거나 그러한 종양을 갖는 것으로 의심되는 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, VPAC 수용체를 발현하는 종양 검출 방법을 제공한다. 상기 영상 화합물의 투여후, 신티그 램 영상이 상기 대상자 몸의 적어도 일부에서 생성된다. 화학식 A 및 B는

(A) M(I)-X $_1$ -P-X $_2$

(B) X $_1$ -P-X $_2$ -M(I)

이다.

화학식 A 및 b 모두에 있어서:

M은 킬레이트제이며;

(I)는 M에 접합된 영상 방사성 핵종이며;

X $_1$ 은 0-20의 천연 혹은 합성 아미노산이며;

P는 PACAP혹은 그 유사체나 프레그먼트이며; 그리고

X $_2$ 는 0-20의 천연 혹은 합성 아미노산이다.

본 발명은 또한 유효량의 화학식 C 또는 D 치료 화합물을 종양을 갖거나 그러한 종양을 갖는 것으로 의심되는 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, 종양을 갖는 대상자내에서 VCAP 수용체를 발현하는 종양의 성장을 억제 혹은 역전(reversing)시키는 방법을 제공한다. 화학식 C 및 D는

(C) M(T)-X $_1$ -P-X $_2$

(D) X $_1$ -P-X $_2$ -M(T)

이다.

화학식 C 및 D 모두에 있어서:

M은 킬레이트제이며;

(T)는 M에 접합된 치료 방사성 핵종이며;

X_1 은 0-20의 천연 혹은 합성 아미노산이며;

P는 PACAP혹은 그 유사체나 프레그먼트이며; 그리고

X_2 는 0-20의 천연 혹은 합성 아미노산이다.

도면의 간단한 설명

도 1A 및 1B는 각각 MAG3 및 Gly-(D)Ala-Gly-Gly의 구조를 나타낸다. MAG3에서, R1=R2=R3=R4=H이다. 테트라펩타이드에서, R1=R2=R4=H 이며 R=CH3 이다.

도 2는 본 발명에 따른 영상제 ^{99m}Tc-TP 3475의 제조 및 표지의 개요도이다.

도 3은 ^{99m}Tc-TP 3475의 HPLC 용출 프로파일이다. 100% 방사성이 유지시간(Rt) 12.5분에서 단일 피크로 용출된다. TP 3475(U.V.)에 대한 Rt는 또한 12.5분이다. 이 크로마토그램에서, U.V. 피크는 주입된 TP 3475의 양이 <0.01μg이었기때문에 검출불가능하다. 자유 ^{99m}Tc는 Rt 3.2분에서 용출된다. X축은 분으로 용출 시간이다. 대각선은 증감 조성물을 나타낸다.

도 4는 ^{99m}Tc-TP 3475의 구조를 개략적으로 나타낸다.

도 5는 $PACAP_{27}$ 및 PACAP 유사체 TP 3475의 농도 증가가 휴면 주머니쥐(opossum)의 체내 항문 괄약근(IAS) 평활근 인장강도에 미치는 영향을 나타내는 도표이다. 10^{-5} M 농도에서, IAS 인장강도의 % 강하는 $PACAP_{27}$ 및 TP 3475 모두에 대하여 동일하였다.

<u>약어</u>

Aba- 4-아미노부티르산

ADP- 아데노신 5'-디포스페이트

cAMP- 시클릭 아데노신 모노포스페이트

CPTA- [4-(1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데크-1-일)메틸] 벤조산

HT-29- 인간 결장직장 종양 세포주

IC_{50} - 50% 억제 농도

%ID/g- 그램 조직당 주입 량 퍼센트

Kd- 해리 상수

LS174T- 인간 결장직장 종양 세포주

mCi- 밀리큐리

MAG3- [N-[N[N-(벤질티오)아세틸]글리실]글리실]글리신

MD MB 231- 에스트로겐-의존성 인간 유방 종양 세포주

PACAP- 시상하부 아데닐레이트 사이클라아제 활성 펩타이드

RIA- 방사면역 어세이

Rt- 유지 시간

T47- 에스트로겐-의존성 인간 유방 종양 세포주

TFA- 트리플루오로아세트산

VIP- 혈관 활동성 장관 펩타이드

아미노산 약어

본 발명의 펩타이드를 설명하는데 사용된 명명법은 통상적인 관행에 따르며 여기서 아미노기는 좌측에 카르복시기는 각 아미노산 잔기의 우측에 나타낸다. 본 발명의 선택된 특정 구체화를 나타내는 화학식에서 아미노- 및 카르복시기는 상세히 나타내지 않더라도, 특별히 달리 언급되지않는한 생리학적인 pH 값으로 여겨지는 형태로 존재하는 것으로 이해될 것이다. 아미노산 구조 화학식에서, 각 잔기는 일반적으로 하기 스케쥴에 따라 아미노산의 관용명에 상응하는 1-문자 혹은 3-문자 지정으로 나타내어진다:

A 알라닌 Ala

C 시스테인 Cys

D 아스파트산 Asp

E 글루탐산 Glu

F 페닐알라닌 Phe

G 글리신 Gly

H 히스티딘 His

I 이소루신 Ile

K 리신 Lys

L 루신 Leu

M 메티오닌 Met

N 아스파라긴 Asn

P 프롤린 Pro

Q 글루타민 Gln

R 아르기닌 Arg

S 세린 Ser

T 트레오닌 Thr

V 발린 Val

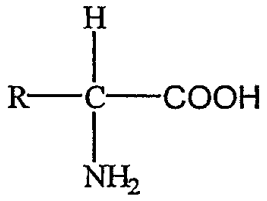
W 트립토판 Trp

Y 티로신 Tyr

정의

본 명세서에 사용된 표현 '아미노산'은 천연 및 합성 아미노산 모두, 그리고 D 및 L 아미노산 모두를 포함하는 것을 의미한다. '표준 아미노산'은 천연적으로 발생하는 펩타이드에서 공통적으로 발견되는 20 표준 L-아미노산중 어느 것을 의미한다. '비표준 아미노산'은 합성적으로 제조되거나 혹은 천연 공급원으로부터 유래된 것에 관계없이 표준 아미노산이외의 어느 아미노산을 의미한다. 본 명세서에 사용된, '합성 아미노산'은 또한 이에 한정하는 것은 아니나 염, 아미노산 유도체(아미드기와 같은), 및 치환체를 포함하는 화학적으로 변형된 아미노산을 포함한다. 본 발명의 펩타이드내에, 특히 카르복시- 혹은 아미노-말단에 함유된 아미노산은 메틸화, 아미드화, 아세틸화 혹은 이들의 생물학적 활성에 해로운 영향을 주지않고 펩타이드의 순환 반감기를 변화시킬 수 있는 다른 화학기와의 치환에 의해 변형될 수 있다. 또한, 디설파이드 결합이 본 발명의 펩타이드내에 존재하거나 부재할 수 있다.

아미노산은 하기의 일반 구조를 갖는다:



아미노산은 측쇄 R을 기초로 하여 7 그룹으로 분류된다: (1) 지방족 측쇄, (2) 히드록실(OH)기 함유 측쇄, (3) 황 원자 함유 측쇄, (4) 산성 혹은 아미드 기 함유 측쇄, (5) 염기성 기 함유 측쇄, (6) 방향족 고리 함유 측쇄, 및 (7) 측쇄가 아미노기에 융합된 이미노산인 프롤린.

'PACAP 생물학적 활성'을 갖는 화합물은 에스트로겐-의존성 (MDA MB 231) 혹은 에스트로겐-의존성 (T47D) 인간 유방암 세포에서 하기 실시예 3에 기술된 어세이시 VIP_{28}의 등가량과 같이, 적어도 약 10배 아데닐일 사이클라아제 활성을 자극하거나, 혹은 적어도 약 10배로 핵 발암유전자 발현을 증가시키는 화합물을 의미한다.

'분리된'이란 인간의 활동을 통해 천연 상태에서 변환되거나 제거된 것을 의미한다. 예를들어, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 핵산 서열 혹은 펩타이드는 '분리된' 것이 아니지만, 그 천연 상태의 동시 존재하는 물질의 일부 핵산 혹은 부분적으로 혹은 완전히 분리된 것은 '분리된' 것이다. 분리된 핵산 서열 혹은 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재하거나 예를들어 숙주 세포와 같은 비-본래적 환경에 존재할 수 있다.

펩타이드의 말단 아미노기와 관련되어 본 명세서에 사용된, '보호기'는 펩타이드 합성시 통상적으로 사용되는 다양한 아미노-말단 보호기중 어느 것을 의미한다. 이러한 보호기는 예를들어, 포밀, 아세틸, 벤조일, 트리플루오로아세틸, 숙시닐, 및 메톡시숙시닐과 같은 아실 보호기; 벤질옥시카르보닐과 같은 방향족 우레탄 보호기; 및 예를들어 테르트-부톡시카르보닐 혹은 아다만틸옥시카르보닐과 같은 지방족 우레탄 보호기를 포함한다. 적절한 보호기에 대해서 Gross and Mienhofer, eds., The Peptides, vol. 3, pp. 3-88(Academic Press, New York, 1981)를 참조바 람.

펩타이드의 말단 카르복시 기와 관련되어 본 명세서에 사용된, '보호기'는 펩타이드 합성시 통상적으로 사용되는 다양한 카르복실-말단기중 어느 것을 의미한다. 이러한 보호기는 예를들어, 테르트-부틸, 벤질 혹은 에스테르나 에테르 결합을 통해 말단 카르복실기에 연결된 다른 수용가능한 기를 포함한다.

'유사체'는 단일 혹은 다중 아미노산 치환, 결실, 첨가 혹은 복위로 특성화되나, PACAP 생물학적 활성을 보유하는 천연적으로 발생하거나 의도적으로 생성된 어느 PACAP를 포함한다. 이러한 유사체는 (a) PACAP중 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 보존성 혹은 비-보존성 아미노산으로 치환된 유사체; (b) 하나 또는 그 이상의 아미노산이 첨가된 유사체; (c) 하나 또는 그 이상의 아미노산이 그 아미노산에 일반적으로 존재하지않는 치환기를 포함하는 유사체; (d) PACAP 혹은 그 일부가 다른 펩타이드에 융합된 유사체; (e) 하나 또는 그 이상의 비표분 아미노산 잔기(즉, 천연적으로 발생하는 단백질에서 발견되는 20 표준 L-아미노산이외의 것들)가 PACAP 서열에 편입되거나 치환된 유사체; 및 (f) 하나 또는 그 이상의 비아미노산 연결기가 PACAP에 편입되거나 그 일부가 대체된 유사체를 포함한다.

'펩타이드' 와 '단백질'은 상호교환적으로 사용되며, 그리고 펩타이드 결합 혹은 변형된 펩타이드 결합(예, 펩타이드 등입체성계)에 의해 공유적으로 연결된 적어도 두개의 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 칭한다. 단백질 혹은 펩타이드를 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에 대한 제한은 없다. 본 명세서 및 첨부된 청구항에 기술된 펩타이드 및 단백질을 포함하는 아미노산은 D 또는 L 아미노산인 것 으로 이해되며 L 아미노산이 바람직하다. 본 명세서에 기술된 펩타이드 혹은 단백질을 포함하는 아미노산은 또한 포스트번역 공정과 같은 자연 공정에 의해 또는 이 기술분야에 잘 알려진 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 변형은 펩타이드 백본, 아미노산 측쇄 및 아미노 혹은 카르복실 말단을 포함하는 펩타이드내 어느 곳에서 일어날 수 있다. 동일한 타입의 변형이 주어진 펩타이드내 여러 부위에서 동

일하거나 다양한 정도로 존재할 수 있다. 또한, 주어진 펩타이드는 다수 타입의 변형을 함유할 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유결합, 헴 부의 공유결합, 뉴클레오타이드 혹은 뉴클레오타이드 유도체의 공유결합, 지질 혹은 지질 유도체의 공유결합, 포스포티딜이노시톨의 공유결합, 교차결합, 고리화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 교차결합의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질 가수분해 공정, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 설페이션, 아르기닐화 및 유비퀴틴화와 같은 단백질에 아미노산의 전이-RNA 매개 첨가를 포함한다. 참조 예, PROTEINS--STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd ED., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 and Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter 등., 'Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors', Meth Enzymol (1990) 182:626-646 and Rattan 등., 'Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging', Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62.

본 명세서에 사용된, 레퍼런스 단백질과 '실질적으로 유사한 아미노산 서열'을 갖는 펩타이드 혹은 펩타이드의 일부는 펩타이드 혹은 그 일부가 레퍼런스 단백질에 대하여 약 80%이상의 아미노산 서열 동일성 혹은 유사성을 갖는 것을 의미한다. 바람직하게, 상기 서열 동일성은 약 85%이상, 보다 바람직하게 약 90%이상, 특히 바람직하게 약 95%이상, 그리고 가장 바람직하게 약 98%이상이다. 본 명세서에 사용된, 레퍼런스 펩타이드와 관련된 '서열 동일성'은 BLAST (기본 로컬 정렬 조사 도구) 2.0.14 알고리즘을 사용하는 BLASTP 및 TBLASTN 프로그램을 이용하여 계산될 수 있으며; 이러한 계산에 사용되는 BLASTP 및 TBLASTN 설정은 하기 표 1에 나타내었다. 아미노산 서열 동일성은 BLASTP 및 TBLASTN 프로그램에 의한 '아이덴티티(Identities)'하에 보고된다. 아미노산 서열 동일성을 계산하는 기술은 Altschul 등(1990), *J. Mol. Biol.* 215 : 403-10 및 Altschul 등(1997), *Nucleic Acids Res.* 25 :3389-3402에 기술되어 있다. BLASTP 및 TBLASTN 프로그램은 BLAST 2.0.14 알고리즘을 사용한다.

표 1 - BLAST 2.0.14 알고리즘을 사용하는 BLASTP 및 TBLASTN 프로그램으로 아미노산 서열 동일성의 계산에 사용되는 설정.

기대 값	10
필터	SEG 프로그램을 이용한 저 복합 필터링*
치환 매트릭스	BLOSUM62
갭 존재 코스트	11
잔기 갭당 코스트	1
람다 비율	0.85
문자 크기	3

*SEG 프로그램은 Wootton and Federhen, *Comput. Chem.* 17 : 149-163, 1993에 기술되어 있다.

발명의 상세한 설명

PACAP, 혹은 생물학적으로 활성적인 PACAP의 유사체나 프레그먼트를 포함하는 종양-특이 진단 영상 및 치료 화합물은 VPAC 수용체를 발현하는 종양을 영상화하거나 치료하는데 유용하다. PACAP의 38- 및 27-아미노산 모두 분리되었으며, 이는 각각 $PACAP_{38}$ 및 $PACAP_{27}$ 로 알려져 있다. $PACAP_{38}$ 의 일차 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 1로 주어진다. $PACAP_{27}$ 의 일차 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 2로 주어진다. $PACAP_{38}$ 및 $PACAP_{27}$ 은 동일한 176 아미노산 PACAP 전구체 단백질로부터 유래되며, 그 서열은 SEQ ID NO: 3으로 주어진다. 본 명세서에 사용된 용어 'PACAP'는 $PACAP_{38}$ (SEQ ID NO: 1), $PACAP_{27}$ (SEQ ID NO: 2) 및 176 아미노산 PACAP 전구체 단백질(SEQ ID NO: 3)을 포함한다.

PACAP는 공지 기술에 따라 소의 시상하부에서 분리될 수 있다. 참조 예, Miyata A 등., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 : 567-574, 1989 및 Gottschall PE 등., *Endocrinology* 127 : 272-277, 1990. PACAP는 또한 생물학적 시스템 및 화학적 방법에 의한 합성을 포함한느 어느 공지 수단에 의해 합성적으로 제조될 수 있다.

펩타이드의 생물학적 합성은 이 기술분야에 잘 알려져 있으며 PACAP 핵산 서열을 암호하는 천연적으로-발생하거나 합성적인 유전자의 전사 및 번역을 포함한다. 이들 핵산은 적절한 숙주세포에서 증식 및 발현을 위해 적절한 플라스미드 발현 벡터내에 서브클론될 수 있다. 핵산 서열 및 플라스미드 발현 벡터를 구성하는 기술, 숙주세포를 형질감염

시키는 기술 및 관심있는 핵산 서열을 발현시키는 기술은 이 기술분야에 폭넓게 실행되고 있으며, 통상의 기술을 가진 당업자에게는 특정 조건 및 방법이 기술된 표준 공급원 물질에 익숙할 것이다. 예를들어, 재조합 분자의 클로닝 및 발현을 위한 일반적인 방법은 Sambrook 등., Molecular Cloning , Cold Spring Harbor Laboratories, 1982; 및 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology , Wiley and Sons, 1987에 기술되어 있다.

직접적으로 PACAP를 합성하기에 적절한 화학적 펩타이드 합성기술(수동 및 자동화된 기술 포함)이 또한 이 기술분야에 통상의 기술을 가진 자에게 잘 알려져 있다. 예를들어, PACAP는 통상적인 고체상 합성법을 이용하여 새로이 합성될 수 있다. 이러한 방법에서, 펩타이드 사슬은 그 구성 아미노산이 원하는 서열내의 성장 펩타이드에 첨가되는 일련의 결합 반응에 의해 제조된다. 예를들어, 카보벤질옥시기 또는 t-부틸옥시카보닐기와 같은 여러가지 N-보호기; 예를들어, 디시클로헥실카보디이미드 또는 카보닐디미다졸과 같은 여러가지 결합제; N-히드록시프탈이미드 또는 N-히드록시-숙신이미드의 에스테르와 같은 여러가지 활성 에스테르; 및 트리플루오로아세트산(TFA), 디옥산에 용해된 HCl, 보론 트리스-(트리플루오로아세테이트) 및 시아노겐 브로마이드와 같은 여러가지 절단제의 사용; 및 중간체의 분리 및 정제를 이용한 용액에서의 반응이 이 기술분야에 통상의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 바람직한 화학 펩타이드 합성법은 이 기술분야에 숙련자에게 잘 알려져 있는 통상적인 Merrifield 고체상 방법에 따른다. 고체상 합성법에 대한 추가적인 정보는 참고문헌, Steward and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman amp; Co., San Francisco, 1969; the review chapter by Merrifield in Advances in Enzymology 32:221-296, (Nold FF, ed.), Interscience Publishers, New York, 1969; 및 Erickson and Merrifield(1990), The Proteins 2:61-64에서 얻어질 수 있다.

본 영상 및 치료제는 또한 생물학적으로 활성적인 PACAP의 프레그먼트를 포함한다. 본 발명에 따른 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트는 예를들어, 보다 큰 천연 혹은 합성 PACAP의 화학적이나 효소적인 프레그먼트화에 의해서, 또는 상기한 바와 같은 생물학적 혹은 화학적 합성에 의해 얻어질 수 있다.

본 영상 및 치료제는 또한 생물학적으로 활성적인 PACAP의 유사체를 포함한다. 이러한 유사체를 획득하는 기술은 이 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 알려져 있으며 예를들어, 상기한 바와 같은 표준 재조합 핵산 기술, 고체상 펩타이드 합성 기술 및 화학적 합성 기술을 포함한다. 연결기가 또한 PACAP 및 다른 펩타이드의 일부를 연결하거나 재배치하는데 사용될 수 있다. 연결기는 예를들어, PACAP의 아미노-말단부와 카르복실 말단부를 연결할 수 있는 고리 화합물을 포함한다. 유사체를 생성하는 기술은 또한 미국 특허 6,030,942에 기술되어 있다(유사체는 6,030,942 특허에서 '펩토이드'로 표기됨).

PACAP 유사체는 또한 융합 펩타이드의 일부가 PACAP과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 융합 펩타이드를 포함한다. 이러한 융합 펩타이드는 예를들어, PACAP 및 그 이종성 서열이 동일한 단백질에서 함께 발현되도록 PACAP 및 이종성 펩타이드 서열을 암호하는 핵산 서열을 동일한 발현벡터내에 서브클로닝하는 것과 같이, 이 기술분야에 잘 알려진 기술에 의해 생성될 수 있다.

본 발명의 영상 및 치료 화합물은 PACAP, 또는 그것의 생물학적으로 활성적인 프레그먼트나 유사체를 금속 킬레이트제에 연결시킴으로써 형성된다. 본 명세서에 사용된, '연결'은 공유적으로 결합되는 것을 의미한다. 상기 킬레이트제는 그 다음 영상 혹은 치료 방사성 핵종과 접합된다. 상기 킬레이트제는 그 결과물인 화합물의 PACAP 생물학적으로 활성을 방해하지않는 펩타이드 구조상의 어느 지점에서 PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체와 연결될 수 있다. 바람직하게, 상기 킬레이트제는 펩타이드의 N- 혹은 C-말단에, 보다 바람직하게 펩타이드의 C-말단에서 PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체와 연결된다.

본 발명의 영상 또는 치료 화합물은 바람직하게 PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체에 연결된 하나 또는 그 이상의 천연 혹은 합성 아미노산의 '스페이서'를 포함한다. 그 다음 상기 킬레이트제는 이 스페이서에 연결될 수 있다. 상기 스페이서는 방사성 핵종 혹은 킬레이트제의 입체 장애를 최소화하며 영상 또는 치료 화합물에서 PACAP 생물학적 활성이 유지되는 것을 돕는다.

따라서, 주어진 본 발명의 영상 화합물을 위한 화학식 A 및 B, 그리고 본 발명의 치료 화합물을 위한 화학식 C 및 D에서, 임의의 스페이서는 각각 X_1 혹은 X_2를 M에 연결하는 Z_1 혹은 Z_2로 나타내어질 수 있다. 상기 임의의 스페이서를 갖는 화학식은 하기와 같이 주어진다:

(A) M(I)-Z_1-X_1-P-X_2

(B) X_1-P-X_2-Z_2-M(I)

(C) M(T)-Z_1-X_1-P-X_2

(D) X_1-P-X_2-Z_2-M(T)

이들 화학식에서 나머지 변수들은 발명의 요약에서 상술한 바와 같다.

스페이서 Z_1 혹은 Z_2 는 예를들어, 1-20 아미노산, 바람직하게 1-4 아미노산, 그리고 보다 바람직하게 1 아미노산을 포함할 수 있다. 특히 바람직한 스페이서는 'Aba'로도 알려진 4-아미노 부티르산을 포함한다. 바람직하게, 스페이서로서 사용되는 Aba는 D-형태로 존재한다.

킬레이트제는 금속 이온 혹은 다원자성 이온(예, TcO)을 복합시킬 수 있는 하나 또는 그 이상의 광범위하게 다양한 킬레이트 화합물의 잔기를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된, '킬레이트제'는 PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체에 연결될 수 있으며, 그리고 금속 원자와 접합될 수 있는 도너 원자를 함유하는 화합물이다. 상기 킬레이트제는 배위결합에 의해 금속 원자에 접합되며 '킬레이트화 복합체' 또는 '킬레이트'로 불리어지는 고리 구조를 형성한다.

본 발명에 사용하기에 적절한 킬레이트제는 NxSy 킬레이트 화합물을 포함한다. 본 명세서에 사용된, 용어 'NxSy 킬레이트 화합물'은 금속 방사성 핵종을 배위적으로 결합할 수 있으며 PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체에 연결될 수 있는 킬레이트제를 의미하며, 이 킬레이트제는 하기 형태의 코어를 갖는다: N2S2(예, 미국 특허 4,897,225; 미국 특허 5,164,176,; 또는 5,120,526에 기술된 바와 같은); N3(예, 미국 특허 4,965,392에 기술된 바와 같은); N2S3(예, 미국 특허 4,988,496에 기술된 바와 같은), N2S4(예, 미국 특허 4,988,496에 기술된 바와 같은), N3S3(예, 미국 특허 5,075,099에 기술된 바와 같은); N4(예, 미국 특허 4,963,688 및 미국 특허 5,227,474에 기술된 바와 같은) 또는 NS3. 바람직한 NxSy 킬레이트 화합물은 N2S2, N3S 또는 N4 코어를 포함한다. 예시적으로 NxSy 킬레이트 화합물은 또한 Fritzberg 등., *P.N.A.S. USA* 85:4024-29, 1988 및 Weber 등., *Bioconj. Chem.* 1:431-37, 1990에 기술되어 있다. 본 단락에 밝힌 상기 저널 기사 및 미국 특허의 발표물은 모두 본 명세서에 참고문헌으로 편입된다.

특히 바람직한 N4 킬레이트제는 메르캅토 아세틸 트리글리신 혹은 MAG3로도 알려진 [N-[N[N-(벤질티오)아세틸]글리실]글리실]글리신, 및 Vanbilloen HP 등., Nucl. Med. Biol. 22: 325-338, 1995에 기술되어 있는 테트라펩타이드 Gly-(D)Ala-Gly-Gly(SEQ ID NO:4)이다. Gly-(D)Ala-Gly-Gly는 메르캅토기가 보다 안정하고 편입하기에 용이한 아미노기로 대체된 MAG3의 유도체이다. 이러한 구조의 N4 킬레이트제를 도 1에 나타낸다.

이러한 서열의 Gly-(D)Ala-Gly-Gly는 펩타이드 합성도중 PACAP 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체의 N- 혹은 C- 말단에, 바람직하게는 C- 말단에 편입될 수 있다. 이 공정은 펩타이드상에 작용기의 블로킹 및 디블로킹, HPLC 방법에 의한 반응 혼합물 정제 및 질량 흡광분석에 의한 원하는 생성물 확인을 포함할 수 있는, 펩타이드에 킬레이트제를 별도로 연결하는 요구를 없애주기때문에 바람직하다. 상기한 바와 같이, Aba는 Gly-(D)Ala-Gly-Gly 과 PACAP 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체 사이에 스페이서로 사용될 수 있다. Aba는 부가 단계없이 펩타이드 합성도중 PACAP 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체에 연결될 수 있다. 이들 킬레이트제를 Aba와 함께 펩타이드에 연결하는 것, 및 연결된 킬레이트제를 영상 혹은 치료 방사성 핵종과 접합시키는 것은 미국 특허 6,395,255에 기술되어 있다.

NxSy 킬레이트 화합물을 단백질에 연결하는 방법은 예를들어, 미국특허 5,175,257 및 미국특허 6,171,577에 기술된 바와 같이 이 기술분야에 알려져 있다. 예를들어, NxSy 킬레이트 화합물은 단백질을 변성시키거나 아니면 해로운 영향을 주지않는 조건하에서 반응적인 화학적 반응성 '연결기'를 가지고 PACAP 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP의 프레그먼트나 유사체에 연결될 수 있다. 상기 연결기는 킬레이트제로부터 분리되거나 킬레이트제에 합쳐질 수 있다. 합쳐진 연결기를 갖는 킬레이트제는 '이작용성 킬레이트제'로 알려져 있다. 상기 연결기는 그 반응이 실질적으로 수성 용액에서 수행될 수 있도록 단백질상의 작용기와 충분히 반응적이며, 예를들어 단백질을 변성시킬지도 모르는 고온으로의 가열과 같이 강제적이지 않다.

적절한 연결기의 예는 활성 에스테르, 이소티오시아네이트, 아민, 히드라진, 말레이미드 또는 기타 Michael-타입 수용체, 티올, 및 활성화된 할라이드를 포함한다. 그중 바람직한 활성 에스테르는 N-히드록시숙신이미딜 에스테르, 설포숙신이미딜 에스테르, 티오페닐 에스테르, 2,3,5,6-테트라플루오로페닐 에스테르, 및 2,3,5,6-테트라플루오로티오페닐 에스테르이다. 후자의 세가지 활성 에스테르는 수 용해도를 증가시키는 기를 페닐 고리상의 파라(즉, 4) 혹은 오르토 위치에 포함할 수 있다. 이러한 기의 예는 CO_2H, SO_3^-, PO_3^{2-}, OPO_3^{2-}, OSO_3^-, 및 N^+R_3 이며 여기서 각 R은 H 혹은 알킬기를 나타낸다.

본 발명에 사용하기에 적절한 다른 킬레이트제는 예를들어 에틸렌디아민-N,N,N',N'-테트라아세트산(EDTA); N,N,N',N'',N''-디에틸렌-트리아민에펜타아세트산(DTPA); 1,4,7,10-테트라아조시클로도데칸-N,N'N'',N'''-테트라아세트산(DOTA); 1,4,7,10-테트라아조-시클로도데칸-N,N',N''-트리아세트산(DO3A); 1-옥사-4,7,10-트리아자시클로도데칸-N,N'N''-트리아세트산(OTTA); 트랜스(1,2)-시클로헥사노디에틸렌-트리아민-펜타아세트산(CDTPA); 1-옥사-4,7,10-트리아자시클로도데칸트리아세 트산(DOXA); 1,4,7-트리아자시클로노난트리아세트산(NOTA); 및 1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸테트라아세트산(TETA)와 같은 선형, 고리형 및 분지형 폴리아미노-폴리카르복

실산 및 이들의 포르포러스 옥시산 등가물을 포함한다.

이러한 킬레이트제는 이 기술분야에 알려진 어느 적절한 방법에 의해 PACAP에 연결될 수 있다. 예를들어, 킬레이트제는 PACAP에서 아민, 티올 혹은 히드록시기와 에스테르, 아미드 티오에스테르 또는 티오아미드 결합을 형성할 수 있는 금속 배위기중 하나를 통해 PACAP에 연결될 수 있다. 택일적으로, 킬레이트제는 예를들어, Meares 등., *JACS* 110 : 6266-6267에 기술된 바와 같이 DOTA의 고리 탄소에 부착된 CH_2-페틸-NCS기와 같이 킬레이트제에 직접적으로 부착된 작용기를 통해 PACAP에 연결될 수 있다. 상기 킬레이트제는 또한 예를들어, 비스 아민, 비스 에폭시드, 디올, 디엑시드, 이작용성 PEG와 같이 호모- 혹은 헤테로-이작용성 연결기와 간접적으로 PACAP에 연결될 수 있다. 상기한 바와 같이, 합쳐진 연결기를 갖는 킬레이트제는 '이작용성 킬레이트제'로 알려져 있다. 바람직하게, 상기 폴리아미노-폴리카르복실산 킬레이트제는 PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체에 펩타이드의 C-말단에서 연결된다.

영상 혹은 치료 방사성 핵종을 갖는 PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체에 연결된 킬레이트제를 금속화하는 적절한 방법은 예를들어, 미국 특허 5,175,257 및 미국 특허 6,171,577에 기술된 바와 같이 이 기술분야에 숙련자에게 알려져 있다. 예를들어, 영상 혹은 치료 방사성 핵종은 직접 편입, 주형 합성 및/또는 트랜스메탈레이션에 의해 본 발명의 화합물내로 편입될 수 있다.

직접 편입에 있어서, 영상 혹은 치료 방사성 핵종은 예를들어, 단지 킬레이트제-함유 화합물의 수용액을 수용액내에 용해된 금속염에 노출시키거나 혼합시키는 것과 같이 킬레이트제에 의해 쉽게 복합화될 것이다. 금속염은 어느 염일 수 있으나, 바람직하게 할로겐염과 같은 수 용해성 금속염이다. 보다 바람직하게, 이러한 염은 금속 이온과 킬레이트제의 결합을 방해하지 않는 것으로 선택된다. 상기 킬레이트제-함유 화합물은 시트레이트, 아세테이트, 포스페이트 및/또는 보레이트와 같은 완충염과 혼합되어 직접 편입용으로 최적의 pH를 생성할 수 있다.

영상 목적으로서, 영상 방사성 핵종은 ^{99m}Tc; ^{87}Y; ^{67}Ga; ^{64}Cu; 및 ^{111}In으로부터 선택된다. 바람직한 영상 방사성 핵종은 ^{99m}Tc이다. PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체, 및 영상 방사성 핵종을 포함하는 본 발명의 화합물은 '영상 화합물'이다.

치료 목적으로서, '치료 방사성 핵종'은 ^{47}Sc, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{212}Pb, ^{68}Ga, ^{90}Y, ^{111}In, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{210}At, ^{211}At, ^{177}Lu, ^{186}Re 및 ^{188}Re로부터 선택된다. 바람직한 치료 방사성 핵종은 ^{90}Y, ^{186}Re 및 ^{188}Re이다. PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체, 및 치료 방사성 핵종을 포함하는 본 발명의 화합물은 '치료 화합물'이다.

본 발명의 영상 화합물은 종양을 갖거나 가진 것으로 의심되는 대상자에서 VPAC-발현 종양을 검출하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된, '대상자'는 인간 및 인간이 아닌 포유류를 포함한다. 인간이 아닌 포유류는 소, 양, 돼지, 말, 개, 고양이, 및 설치류(예, 래트, 마우스, 기니피그 및 토끼)를 포함한다. VPAC 수용체를 발현하는 종양은 폐, 유방, 난소, 위, 췌장, 후두, 식도, 정소, 간, 이하선, 담즙관, 결장, 직장, 자궁경부, 자궁, 자궁내막, 신장, 방광, 전립선 및 갑상선의 종양; 편평상피세포 암; 선암; 소세포 암; 흑색종; 및 신경교종 및 신경모세포종과 같은 뇌 종양을 포함한다.

본 발명의 실시에 있어서, PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체를 포함하는 영상 화합물의 유효량이 어느 적절한 장관 혹은 장관외 경로의 투여로 대상자에게 투여된다. 장관외 투여가 바람직하다.

적절한 장관외 투여 방법은 혈관내 투여(예, 정맥내 볼러스 주입, 정맥내 주입, 동맥내 볼러스 주입, 동맥내 주입 및 혈관내로의 도뇨관 점적); 조직 주변 및 조직 내부 주입(예, 종양-주변 및 종양-내부 주입); 피하 인퓨젼을 포함하는 피하 주입 혹은 디포지션(삼투 펌프에 의한 것과 같은); 및 도뇨관 혹은 다른 배치 장치에 의한 것과 같은 종양 혹은 종양 주변 조직으로의 직접 적용(다공성, 비-다공성 혹은 젤라틴성 물질을 포함하는 좌약이나 임플란트, 시알래스틱 막 혹은 섬유)을 포함한다. 특히 만일 종양 혹은 의심되는 종양 부위가 피부상이나 근처인 경우에, 피하주사 혹은 인퓨젼이 종양 혹은 의심되는 종양 부위 근처에 주어지는 것이 바람직하다. 영상 화합물은 예를들어, 등장 염수, 혈장 혹은 생물학적으로 적합한 등장 완충제(예, 포스페이트, 헤페스 혹은 Tyrode의 버퍼)와 같은 통상적인 주입 매체에 서 단일 유니트 주입량으로 혈관내 주입에 의해 바람직하게 투여된다.

혈관내로 주입되는 경우, 종양 세포간의 단단한 접합, 섬유질 스트로마, 간질 압 구배, 및 결합 부위 장벽의 존재에도 불구하고 본 발명의 영상 화합물은 고형 종양내로 쉽게 내출혈하며 그리고 상대적으로 종양 덩어리내에 분포한다. 마찬가지로, 종양 주변 혹은 종양 내부로 투여되는 본 발명의 영상 화합물은 종양 덩어리내에 쉽게 분포할 것이다.

본 명세서에 사용된, '유효량'의 본 발명의 영상 화합물은 대상자에서 PACAP- 혹은 VPAC-발현 종양의 신티그램의 생성을 이루기에 충분한 양이다. 영상 화합물의 유효량은 편의상 예를들어 mCi와 같은 방사능의 형식으로 표현된다. 일반적으로, 영상 화합물의 유효량은 70kg 체중당 약 0.01-100mCi이며, 바람직하게 70kg 체중당 약 0.1-50mCi이다.

영상 화합물이 대상자에게 투여된 후, 신티그램 영상이 대상자의 적어도 일부에서 생성된다. 예를들어, 영상은 바람직하게 종양을 함유하거나 혹은 종양을 함유하는 것으로 의심되는 대상자의 몸의 일부에서 얻어진다. 신티그램 영상은 투여된 영상 화합물이 종양에 도달하고 종양세포상의 PACAP 및 VPAC 수용체에 결합하기에 충분한 시간이 지난 후 생성된다. 전형적으로, 영상 화합물은 주입 수분내에 종양에 도달하고 종양에 결합할 것이다. 그러나, 종양의 영상은 영상 화합물의 주입후 필요에 따라 여러시간이 걸릴 수 있다. 종양은 평면 신티그램, SPECT 혹은 PET를 포함하는 어느 신티그램 영상 기술로 영상화될 수 있다. 대상자의 신티그램 영상을 생성하는 기술 및 기계는 이 기술분야에 잘 알려져 있다.

방사표지된 약제가 종종 신장내에 남는다. 따라서 이러한 약제의 신장 잔류를 최소화하는 것이 바람직하며, 이는 대상자의 기관에 대해 부담되는 방사를 최소화하며 종양 대비를 증가시킬 것이다. 방사표지된 약제와 함께 아미노산(예, 리신)의 예비- 혹은 동시-투여는 방사약제의 신장 흡수를 현저히 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 영상법은 임의로 영상 화합물의 신장 흡수를 감소시키기위해 아미노산의 예비- 혹은 동시-투여를 포함한다. 상기 아미노산은 상기한 바와 같이 어느 적절한 장관 혹은 장관외 경로에 의해 투여될 수 있으며, 이는 영상 화합물에 사용되는 투여 경로와 동일하거나 다를 수 있다.

이 기술분야에 통상의 기술을 가진자는 상기 영상 화합물의 신장 흡수를 억제하기위해 본 발명의 영상 화합물과 함께 대상자에게 예비- 혹은 동시-투여되는 아미노산의 양을 쉽게 결정할 수 있다. 참조, 예, Kobayashi H 등., *Cancer Res.* 56 : 3788-3795, 1996 Bernard BF 등., J. *Nucl. Med.* 38 : 1929-1933, 1997; Behr TM 등., *Eur. J. Nucl. Med.* 25 : 201-212, 1998.

일반적으로, 본 발명의 영상 화합물과 함께 예비- 혹은 동시-투여되는 아미노산의 양은 0.1-5g/kg 체중, 바람직하게 0.4-2g/kg 체중이다. 예비- 혹은 동시-투여되는 바람직한 아미노산은 D-리신이다.

VPAC-발현 종양을 갖는 것으로 단지 의심될 뿐 그러한 종양을 실제 갖지 않는 대상자가 본 발명의 영상법을 겪을 수 있는 것으로 이해된다. 물론, 이러한 대상자는 음성 결과를 나타낸다.

본 발명의 치료 조성물은 종양을 갖는 대상자에서 VPAC-발현 종양을 치료하 는데 사용될 수 있다. 본 발명의 시행에 있어서, PACAP, 또는 생물학적으로 활성적인 PACAP 프레그먼트나 유사체를 포함하는 치료 화합물의 유효량이 상기 영상 화합물에 대하여 상술한 바와 같이 어느 적절한 장관 혹은 장관외 투여 경로에 의해 대상자에게 투여된다. 피하 혹은 종양 내부 투여가 바람직하다. 본 발명의 치료 화합물은 또한 상기 영상 화합물에 대하여 상술한 바와 같이 고형 종양내로 쉽게 내출혈되고 그리고/또는 상대적으로 종양 덩어리내에 분포한다.

치료 화합물의 유효량은 편이상 예를들어, mCi와 같은 형식으로 표현된다. 본 명세서에 사용된 본 발명의 치료 화합물은 대상자에서 VPAC-발현 종양의 성장을 억제 혹은 역전시키기에 충분한 양이다. 주어진 대상자에게 투여되는 치료 화합물의 유효량은 투여 방식, 치료되는 종양의 단계 및 심각성, 대상자의 체중 및 일반 상태, 및 처방 의사의 판단과 같은 요인에 따라 달라질 것이다.

일반적으로, 대상자에게 투여되는 치료 화합물의 유효량은 70kg 체중당 약 1-1000mCi, 바람직하게 70kg 체중당 약 10-500mCi, 보다 바람직하게 70kg 체중당 약 20-100mCi이다. 본 발명의 방법은 상기 치료 화합물의 다중 투여를 포함하는 것으로 이해된다.

본 발명의 치료 방법은 또한 임의로 상기한 바와 같이 치료 화합물의 신장 흡입을 감소시키기위해 아미노산의 예비-혹은 동시-투여를 포함한다. 상기 아미노산의 주입량 및 경로는 영상 화합물에 대하여 상술한 바와 같다. 예비- 혹은 동시-투여되기에 바람직한 아미노산은 D-리신이다.

이 기술분야에 통상의 기술을 가진 자는 예를들어, 상기 언급된 영상법을 이 용한 치료 전 및 후에 종양 크기의 직접적인 육안 관찰에 의해 VPAC-발현 종양의 성장이 억제되거나 역전되는지 쉽게 검출할 수 있다. 종양 성장의 억제나 역전은 또한 조직 덩어리의 촉진(palpation) 혹은 칼리퍼와 같은 측정 기구를 이용한 조직 덩어리의 측정과 같은 물리적 수단에 의해 치료 전 및 후에 종양 크기를 측정함으로써 검출될 수 있다.

본 발명의 영상 및 치료 화합물은 바람직하게 이 기술분야에 알려진 기술에 따라 대상자에게 투여하기전에 약학 조성물로서 배합된다. 본 발명의 약학 조성물은 적어도 무균이며 발열물질이 없는 것을 특징으로 한다. 본 명세서에 사용된 '약학 조성물'은 인간 및 가축용 배합물을 포함한다.

본 발명의 약학 배합물은 본 발명의 영상 혹은 치료 화합물 및 생리학적으로 수용가능한 캐리어 매체를 포함한다. 바람직한 생리학적으로 수용가능한 캐리어 매체는 물, 완충수, 일반 염수, 0.4% 염수, 0.3% 글리신, 히알루론산 등이다.

본 발명의 약학 조성물은 또한 통상적인 약학 부형제 및/또는 첨가체를 포함할 수 있다. 적절한 약학 부형제는 안정화

제, 항산화제, 삼투성 조절제, 버퍼, 및 pH 조절제를 포함한다. 적절한 첨가제는 생리학적으로 생체적합성 버퍼(예, 트로메타민 하이드로클로라이드), 또는 칼슘이나 소디움 염(예, 칼슘 클로라이드, 칼슘 아스코르베이트, 칼슘 글루코네이트 또는 칼슘 락테이트)의 첨가(예, 1-50몰 퍼센트)를 포함한다. 상기 약학 조성물은 필요에 따라 소량의 습윤제 혹은 에멀션화제나 pH 완충제를 함유할 수 있다. 경구 배합물은 약학 등급의 만니톨, 락토즈, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소디움 사카라이드, 셀룰로즈, 마그네슘 카보네이트 등과 같은 표준 캐리어를 포함할 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 또한 중성 혹은 염 형태로 배합된 본 발명의 치료 혹은 영상 화합물을 포함할 수 있다. 상기 영상 혹은 치료 화합물의 약학적으로 수용가능한 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산 및 타르타르산으로 형성된 것들 및 소디움, 포타슘, 암모늄, 칼슘, 수산화철, 이소프로필라민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히드티딘 및 프로카인으로부터 유도된 것들과 같은 자유 카르복실기로 형성된 것들을 포함한다.

실시예

본 발명은 하기 비-제한적인 실시예에 의해 설명된다.

실시예 1 - TP 3475의 제조

TP 3475로 불리는, PACAP $_{27}$ 의 유사체가 상기 미국 특허 6,395,255에 나타낸 기술에 따라 제조되었다. TP 3475는 PACAP $_{27}$ 의 C-말단에 Gly-(D)Ala-Gly-Gly 킬레이트제와 연결된 PACAP $_{27}$ 로 구성된다. Aba 스페이서는 상기 킬레이트제와 PACAP $_{27}$ 사이에 위치한다.

요컨대, PACAP $_{27}$ 는 표준 고체 상 합성 기술에 의해 합성되었다. C-말단 Aba 스페이서 및 Gly-(D)Ala-Gly-Gly 킬레이트 제는 연속적인 고체 상 합성 반응에 의해 PACAP $_{27}$ 의 C-말단에 적절한 아미노산 잔기의 연속 첨가로 PACAP $_{27}$ 에 연결되었다. 상기 유사체는 그것의 분자량(예측 3475.17, 발견 3475.18)에 따라서 TP 3475로 표기되었다. TP 3475의 일차 서열은 도 2에 나타내고 SEQ ID NO: 5로 주어진다.

실시예 2 - ^{99m} Tc를 이용한 TP 3475 방사표지

TP 3475는 상기 미국 특허 6,395,255의 방법에 따라 ^{99m} Tc로 금속화되었다. 이 금속화 반응은 필수적으로 하기와 같이 수행되고, ^{99m} Tc-TP 3475로 불리는 본 발명의 영상 화합물을 생성하였다.

깨끗하고 질소 플러싱된 10ml의 실리콘화된 유리 바이알에 10μℓ 아세테이트 버퍼 pH4.6(10μℓ의 0.005M HCl 및 300μℓ의 0.067M Na_3PO_4, pH 12에 용해된 $SnCl_2 2H_2O$ 100μg)에 용해된 TP 3475 10μg을 첨가하였다. 상기 바이알의 내용물은 아세톤 드라이 아이스 배쓰에 바이알을 넣음으로써 플래쉬-동결되었다. 그 다음 상기 바이알을 GeneVac 동결건조기에 넣고 2시간동안 동결 건조되고, 질소로 채워지고 밀봉된 다음 금속화 반응때까지 -20°C에 보관하였다.

금속화 반응을 위해, 상기 바이알 내용물을 주위 온도가 되도록 하고, 200μℓ 0.9% NaCl내에 담긴 10-40mCi ^{99m} Tc를 바이알에 주입하였다. 그 혼합물을 100°C에서 30분간 배양하고 반응 혼합물의 pH를 0.1M Na_2HPO_4 1ml의 첨가로 6-6.5로 증가시켰다. Na-아스코르베이트 125mg을 안정화제로 첨가하였다. 금속화된 영상 화합물 ^{99m} Tc-TP 3475의 HPLC 분석은 용매 A로서 H_2O내에 용해된 0.1% TFA 및 용매 B로서 아세토니트릴에 용해된 0.1% TFA를 이용하여 리버스 상 C-18 마이크로결합 컬럼으로 Rainin HPLC에서 수행되었다. 구배는 용매 B가 0분에서 10% 그리고 28분에서 90%가 되도록 하였다. ^{99m} Tc-TP 3475는 22°C에서 24시간동안 안정하였다. 22°C에서 수율은 Rt. 12.5분에서 단일 피크를 생성하는 HPLC에 의해 측정시 정량적이다. ^{99m} Tc-TP 3475의 HPLC 용출 프로파일은 도 3에 주어지고, ^{99m} Tc-TP 3475의 구조는 도 4에 나타낸다.

^{99m} Tc-TP 3475의 안정성이 또한 100mM 과량의 시스테인, DTPA, 및 HSA에서 37°C에서 24시간까지 평가되었다. 유사한 연구가 인간 혈청에서 수행되었다. HPLC 분석은 시험된 매체에서 ^{99m} Tc-TP 3475의 우수한 안정성을 나타내었다.

실시예 3 - TP 3475의 유방 종양에 대한 결합성 평가

^{99m} Tc-TP 3475 및 VIP28의 인간 결장 종양 세포주 LS 174T 및 HT-29, 및 인간 유방암 세포주 MDA MB 231(에스트로겐-의존성) 및 T47D(에스트로겐-의존성)에 대한 결합성을 다음과 같이 평가하였다. ^{125} I-PACAP27을 대조구로 사용한다. 세포는 조직 배양으로 성장시키며 어세이는 상기 미국 특허 6,395,255에 기술된 바와 같이 수행 한다. TP 3475 VIP $_{28}$ 및 ^{125} I-PACAP $_{27}$ 의 IC50 및 Kd 값은 표준 방법에 의해 확인된다.

작용 주입량으로서 cAMP 활성의 검출 - 에스트로겐-의존성 T47D 및 에스트로겐-의존성 MDA MB 231 세포주의 약 5 x 10^{6} 세포를 SIT 배지로 2회 세정하고 1% BSA, 1mg/ml 바시트라신, 및 100μM 이소부틸-메틸-잔틴을 함유하는 SIT 배지에 현탁시킨다. TP 3475, VIP28 및 125I-PACAP27을 농도를 증가시키면서 상기 세포에 첨가하고, 5분후 그 반응을 동량의 에탄올 첨가로 정지시킨다. 시료를 보텍싱하고 Moody TW, *Peptides* 17 : 545-555, 1995에 기술된 바와 같이 cAMP RIA에 의해 에세이될때까지 -80℃로 동결한다. 데이타는 cAMP 대 펩타이드 농도로 플롯팅된다.

c-fos 및 c-myc mRNA 핵 발암유전자 배양의 검출 - 인간 유방 종양 세포에서 TP 3475의 c-fos 및 c-myc 유전자 발현 자극에 대한 능력을 평가한다. 상기한 바와 같은 T-47D 또는 MDA MB 231 세포주의 약 5 x 10^{6} 세포를 5cm 디쉬에서 배양하고 0.5% 소 배아 혈청을 함유하는 SIT 배지로 4시간동안 처리한다. TP 3475, PACAP27 및 VIP28을 별도로 상기 배양된 세포에 첨가하고 그 세포를 60분동안 배양한다. 배양 기간후, 배지를 제거하고 Chirgwin 등., *Biochemistry* 18 : 5294-5299, 1979의 구아니디움 이소티오시아네이트 방법을 이용하여 총 RNA를 분리한다.

상기 처리된 세포로부터 분리된 총 RNA의 10μg을 0.66 M 포름알데히드-1% 아가로즈 겔에서 변성시키고 분리한다. 상기 겔을 에티디움 브로마이드로 염색하고 RNA 강도를 평가한다. 그 다음 상기 RNA를 표준 기술을 이용하여 Nytran 멤브레인 상에 밤새 블롯팅하고, 그 멤브레인을 표준 노던 블롯 하이브리드화 조건하에서 c-fos 및 c-myc에 대하여 탐침한다. c-fos 및 c-myc cDNA 프로브는 Bethesda Research Laboratories 랜덤 프라이밍 키트를 이용하여 제조자 지시에 따라 [^{32}P]dCTP로 표지된다. 하이브리드화 멤브레인을 세정하고 Kodak XAR-2 필름에 노출시키고 방사능 사진을 현상한다. 처리 및 대조구 세포에서 c-fos 및 c-myc mRNA 발현 수준을 농도계를 이용하여 정량한다.

실시예 4 - 주머니쥐 체내 항문 괄약근(IAS) 평활근 조직의 기부 인장강도에 미치는 TP 3475의 영향

Rattan S 등., *J. Pharmacol. Exper. Thera.* 263: 722-728, 1997에 기재된 어세이에 의하면, PACAP $_{27}$ 은 IAS의 기부 인장강도를 농도-의존성으로 저하시키는 것으로 알려져 있다. 이 IAS 어세이는 필수적으로 하기에 기술된 바와 같이 최대 저하가 도달할때까지 TP 3475의 농도를 증가시키면서 수행되었다. PACAP $_{27}$ 이 대조구로 사용되었다.

평활근 스트립의 제조 - 어느 성별의 성장 주머니쥐(*Didelphis virginiana*)를 복막내 펜토바르비탈(40mg/kg) 주입후 희생시켰다. 외부 및 괄약근을 포함하는 대혈관 및 외부 조직을 제거하고, 항문 도관을 열고 산소공급된 Krebs 용액을 함유하는 해부용 트레이상에 점막 측면이 위로 향하게 하여 평평하게 핀으로 고정하였다(NaCl, 118.07; KCl, 4.69; $CaCl_2$, 2.52; $MgSO_4$, 1.16; NaH_2PO_4, 1.01; $NaHCO_3$, 25; 및 글루코즈, 11.10). 점막을 제거하고, 내부 항문 도관 환형 평활근 스트립(약 2mm x 1cm)을 항문 도관의 최저부로부터 준비하였다.

등 인장강도의 측정 - IAS 평활근 스트립을 Krebs 용액을 함유하는 온도-조절된 2ml '근육 배쓰'에 옮기고, 95% O_2 - 5% CO_2 의 혼합물로 연속적으로 버블링하였다. 실크 봉합으로, 근육 스트립의 하부 말단을 근육 배쓰의 바닥부에 매고, 한편 다른 말단은 등력 변환기(모델 FTO3; Grass Instruments Co, Quincy, MA)에 부착시켰다. 등 인장강도는 Beckman Dynograph 기록기(Beckman Instruments, Schiller Park, IL)에서 기록되었다. 초기에, 1g의 인장강도가 근육 스트립에 적용되고, 그 스트립은 가끔씩 세정을 하면서 약 1시간동안 평형을 유지하도록 하였다. 안정된 인장강도를 전개하고 전기장 자극 반응에 이완되는 스트립만 사용하였다. 최적 길이 및 베이스-라인 두가지 모두 상기 언급한 Rattan S 등., 1997에 기술된 바와 같이 측정되었다.

도 5에 나타낸 결과는 10^{-5} M 농도에서 PACAP ^{27} 및 TP 3475 모두 IAS 인장강도의 동등한 저하를 일으킴을 나타낸다. 이들 데이타는 PACAP $_{27}$ 의 C-말단에 스페이서 및 킬레이트제의 첨가에 기인하여 TP 3475의 생물학적 활성이 손상되지 않았음을 나타낸다.

실시예 5 - 누드 마우스에 이식된 인간 유방 종양 세포에서 ^{99m}Tc-TP 3475의 조직 분포 및 약물 동력학

연구는 에스트로겐-의존성(T47D) 혹은 에스트로겐-의존성(MDA MB 231) 종양을 갖는 누드 마우스에서 하기와 같이 수행된다.

어느 종양의 약 5x10^{6} 생육 세포를 각 마우스의 우측 허벅다리에 이식하고, 종양이 형성되도록 한다. 각 연구 그룹은 1마이크로그램미만의 영상 화합물(1400-2500 Ci/mmol 혹은 그 이상의 특이 활성)을 함유하는 200-700μCi 주입량으로 측면 꼬리 정맥을 통해 주입되는 5 종양-생성 마우스로 구성된다. 동물들은 주입후 15분, 1시간, 2시간, 4시간 및 24시간에 희생되고, ID/g 조직의 %를 모든 동물에서 측정한다. 종양-생성 마우스의 대조군은 ^{125}I로 모노-요오드화된 PACAP $_{27}$ 로 주입된다. ^{125}I-PACAP $_{27}$ 는 대조 동물에 주입전 ^{99m}Tc-TP 3475와 동일한 특이 활성으로 조절된다. 모든 동물은 전용 컴퓨터 및 저에너지 평행 홀 시준기가 장착된 GE STARCAM 감마 카메라를 이용하여 영상화된다.

결과는 수치적으로 나타내어질 뿐만아니라 시간에 비례하여 배열된 막대 도표로 나타내어진다. 주입된 화합물에 대한 종양/근육 및 종양/혈 비율이 또한 계산된다. 주입후 15분에 희생된 동물에서, 역학 영상 연구가 15초 프래임을 이용하여 수행된다. 관심부를 이용하여 역학 커브가 종양, 심장, 간, 신장 및 방광에 대하여 플롯팅된다. 다른 데이타 포인트와 합쳐진 이들 데이타는 종양을 포함하는 각 주요 기관에서 방사능의 흡입 및 제거 프로파일의 검출을 가능하게 한다. 소변으로 배출된 방사능의 화학적 특성 및 양을 검출하기위해, 동물들을 대사 케이지내에 넣어둔 다. 소변에서의 방사능을 주기적으로 측정하고 소변 시료를 HPLC를 이용하여 분석한다.

실시예 6 - 래트에서 ^{99m}Tc-TP 3475의 혈액 클리어런스

^{99m}Tc-TP 3475의 혈액 클리어런스는 하기와 같이 Sprague-Dawley 래트에서 연구되었다. 각각 약 250그램 무게을 갖는, 3마리 Sprague-Dawley 래트는 1mCi의 ^{99m}Tc-TP 3475로 측면 꼬리 정맥을 통해 주입되고, 주입후 1, 5, 10, 15, 및 30분그리고 주입후 1, 2, 4, 6, 18 및 24시간에 연속 혈액 시료를 다른 꼬리 정맥을 통해 3중으로 뽑아내었다. 상기 혈액 시료를 칭량하고 방사능은 표준 신틸레이션 카운팅 기술을 이용하여 주입시 준비된 표준 ^{99m}Tc 용액에 대하여 산출되었다. % ID/g은 시간에 따라 플롯팅되었다.

^{99m}Tc-TP 3475의 혈액 클리어런스는 약 6분이 되는 α-t½ 및 약 90분이 되는 β-t½을 갖는 복형이었다. 이들 데이타는 주입된 ^{99m}Tc-TP 3475로부터 75%의 방사능이 약 12분내에 순환으로 제거됨을 보여준다.

실시예 7 - 종양 크기 및 ^{99m}Tc-TP 3475 특이 활성의 종양 흡수에 미치는 영향

^{99m}Tc-TP 3475 흡수에 대한 종양 크기의 영향 - 영상 화합물 흡수에 미치는 종양 크기의 영향은 하기한 바와 같이 상기 실시예 5에 기재된 종양-생성 마우스에서 조사된다. ^{99m}Tc-TP 3475 및 ^{125}I-PACAP $_{27}$ (대조구로서)를 종양-생성 마우스내에 주입한다. 종양 직경은 바니어 칼리퍼로 측정된다. 이러한 연구는 실시예 5의 조직 분포 연구에 의해 검출시 주입후 최적 영상 시간에서만 수행된다. 데이타는 %ID/g 대 절대 종양 중량으로 플롯팅된다. 이들 실험에서, 상기 화합물의 특이 활성 및 주입된 화합물의 양은 투여된 수용체-특이 펩타이드 분자가 일정한 수치를 유지하도록 일정하게 유지된다.

주입된 특이활성의 ^{99m}Tc-TP 3475가 종양 흡수에 미치는 영향 - 수용체-특이 영상 혹은 치료제의 종양 흡수는 주입된 수용체 특이 화합물의 질량에 비례하여 달라질 수 있다. 특이 활성의 형식으로 표기되는 주입된 ^{99m}Tc-TP 3475의 영향은 하기와 같이 실시예 5에 기재된 종양-생성 마우스에서 조사된다. 1000-25,000 Ci/mmol 범위내의 공지 특이 활성을 갖는 5개의 ^{99m}Tc-TP 3475 제조물이 제조된다. 5마리의 종양-생성 마우스 각각의 5 별도 그룹은 각각 0.1, 0.5, 1, 1.5 또는 2μg의 ^{99m}Tc-TP 3475를 함유하는 고정된 량의 방사능(~700μCi)으로 주입된다. 조직 분포는 주입후 24시간에 평가된다. 종양 및 다른 조직에서 상기 화합물의 흡수, 및 조직에서의 방사능 클리어런스가 비교된다.

실시예 8 - ^{99m}Tc-TP 3475의 신장 흡수 최소화

5마리의 마우스 처리 그룹은 50mg D-리신 및 1마이크로그램미만의 영상 화합물을 함유하는 200-700μCi 주입량의 ^{99m}Tc-TP 3475(1400-2500Ci/mmol 또는 그 이상의 특이 활성)로 동시-주입된다. 5마리 마우스의 대조군은 ^{99m}Tc-TP 3475만 주입된다. 처리 및 대조군의 동물들은 주입후 15분, 1시간, 2시간, 4시간 및 24시간에 희생되고 신장 조직에서의 %ID/g이 측정된다.

실시예 9 - ^{99m}Tc-TP 3475의 수용체 특이성

인간 유방 종양에서 ^{99m}Tc-TP 3478의 수용체 특이성을 검출하기위해, PACAP를 이용한 수용체 블로킹 연구를 수행하였다. T47D 이종이식을 갖는 누드 마우스에서, ^{99m}Tc-TP 3475 종양 흡수는 PACAP가 예비-주입된 경우 약 50%로 감소되었다.

또 다른 수용체 블로킹 실험이 하기와 같이 수행된다. ^{99m}Tc-TP 3475의 정맥내 주입전 30분에, 100μℓ의 PBS에 용해된 TP 3475를 최고 50μg로 상기한 바와 같은 종양-생성 마우스에 정맥내 주입한다. 동물은 실시예 5의 조직 분포 연구로부터 검출된 최적 시간에서 영상화된 다음, 정량 조직 분포 연구를 위해 희생되었다. 이들 데이타는 종양 조직 및 아마도 폐, 간 및 비장과 같은 다른 기관에서 감소된 방사 능 흡수로 나타낸 바와 같이 ^{99m}Tc-TP 3475에 대한 수용체 특이성의 검출을 가능하게 한다.

실시예 10 - 인간 종양에 대한 ^{99m}Tc-TP 3475의 결합성

편평상피세포 암; 선암; 소세포 암; 흑색종; 및 신경교종 및 신경모세포종; 및 폐, 유방, 난소, 위, 췌장, 후두, 식도, 정소, 간, 이하선, 담즙관, 결장, 직장, 자궁경부, 자궁, 자궁내막, 신장, 방광, 전립선 및 갑상선의 종양에 대한 ^{99m}Tc-

TP 3475 및 ^{99m}Tc-VIP28의 결합성을 하기와 같이 평가한다. ^{99m}Tc-VIP28은 상기 미국특허 6,395,255에 기재된 바와 같이 제조된다.

각 종양 타입의 시료를 크라이오스태트를 가지고 10-20㎛ 절편으로 자르고 현미경 슬라이드상에 고정시킨다. 슬라이드에 대한 조직의 접착성을 향상시키기위해 고정된 슬라이드를 적어도 3일간 -20℃에 보관한다. 그 다음 상기 슬라이드를 주위 온도에 이르도록 데우고, 모노요오드화된 ^{125}I-PACAP27 혹은 ^{125}I-VIP28의 존재 혹은 부재하에, 50mM Tris HCl, pH7.4; 2% BSA; 2mM EGTA; 1mM 바시트라신 및 5mm $MgCl_2$에서 30pM ^{99m}Tc-TP 3475 혹은 ^{99m}Tc-VIP28과 함께 22℃에서 90분간 배양한다.

배양후, 슬라이드를 아이스-콜드 50mM Tris HCl, pH7.4 및 0.25% BSA로 4회 세정하고 물로 1회 세정하고 드라이에어 스트림하에 건조한다. 그 다음 상기 슬라 이드를 ^{3}H Ultra 필름(Amersham, England)에 1주간 노출시킨다. 방사능 사진은 컴퓨터 보조 영상 공정 시스템으로 정량화된다. 필름은 또한 ^{125}I 방사능 사진 표준으로 노출된다. 방사-요오드화 카운터파트의 특이 결합을 억제하는 Kd 및 IC_{50} 값은 각 종양 타입에서 ^{99m}Tc-TP 3475 또는 ^{99m}Tc-VIP28에 대하여 측정된다.

실시예 11 - ^{99m}Tc-세스타-MIBI 및 In-111-DTPA-D-Phe ^{1}-옥트레오타이드와 비교된 ^{99m}Tc-TP 3475의 효율

유방 종양을 영상화하는 ^{99m}Tc-TP 3475, ^{99m}Tc-세스타-MIBI 및 ^{111}In-DTPA-D-Phe ^{1}-옥트레오타이드의 효율이 비교되었다. ^{125}I-PACAP가 대조구로 사용되었다. 수용체-특이 제제가 아님에도 불구하고 ^{99m}Tc-세스타-MIBI는 FDA에 의해 승인되고 유방 영상용으로 아마도 가장 일반적으로 사용되는 제제이다. ^{111}In-DTPA-D-Phe ^{1}-옥트레오타이드는 유방 종양 세포상의 한 타입의 수용체(SSTR 수용체)에 대해 특이적인 상업적으로 이용가능한 영상제이다.

^{111}In-DTPA-D-Phe ^{1}-옥트레오타이드 및 ^{99m}Tc-세스타-MIBI는 핵 약학으로 얻어졌다. 99mTc-TP 3475는 상기한 바와 같이 제조되었으며 그리고 125I-PACAP는 표준 기술에 의해 제조되었다. 종양-생성 마우스에서 모든 제제의 약물 동력학 및 조직 분포는 상기 실시예 5에서와 같이 검출되었다. SSTR 및 VPAC 수용체는 다르기때문에, ^{99m}Tc-TP 3475 및 ^{111}In-DTPA-D-Phe ^{1}-옥트레오타이드는 종양-생성 마우스내로 동시-주입되었다. 마우스에 동시-주입된 ^{99m}Tc-TP 3475 및 ^{111}In-DTPA-D-Phe ^{1}-옥트레오타이드는 ^{99m}Tc에 대하여 140KeV, 및 ^{111}In에 대하여 173KeV 및 247KeV와 같이, 이들 각각의 방사성 핵종에 대한 특유 에너지 윈도우를 이용하여 산출되었다(±15 또는 20%). 조직에서의 ^{111}In 카운트는 ^{99m}Tc가 완전히 감속된 경우 다시 검출되었다(예, 10-12 반감기).

99mTc-TP 3475의 24시간 종양 흡수는 24시간에서 약 0.2% ID/g이었다. 이는 125I-PACAP의 종양 흡수(0.23±0.03% I.D./g)와 거의 동등하였으며, ^{111}In-DTPA-D-Phe1-옥트레오타이드의 종양 흡수(0.09±0.01% ID/g) 및 ^{99m}Tc-세스타-MIBI의 종양 흡수(0.18±0.08% I.D/g)보다 높았다.

본 명세서에 언급된 모든 문헌들이 참고문헌으로 편입된다. 본 발명은 바람직한 구체화 및 여러가지 형태와 관련되어 기술되나, 다른 유사한 구체화가 사용되거나 이들의 형태를 벗어나지않고 본 발명의 동일한 기능을 수행하기위해 상기 기술된 구체화에 변형 및 첨가가 이루어지는 것으로 이해된다. 따라서, 본 발명은 어느 단일 구체화로 한정되지않지만, 첨부된 청구항의 서술에 따른 범주 및 범위내로 파악되어야한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(1) 유효량의 화학식 A 또는 B 영상 화합물을 종양을 갖거나 종양을 갖는 것으로 의심되는 대상자에게 투여하는 단계; 및

(2) 상기 대상자의 적어도 일부에서 신티그램 영상을 생성하는 단계

를 포함하는, 종양을 갖거나 종양을 갖는 것으로 의심되는 대상자에서 VPAC 수용체를 발현하는 종양을 검출하는 방법.

(여기서 화학식 A 및 B는

(A) $M(I)-X_1-P-X_2$

(B) X_1-P-X_2-M(I)

이며,

화학식 A 및 B 모두에 있어서:

M은 킬레이트제이며(단, 화학식 A에서, X_1 이 0이고 P가 $PACAP_{27}$ (SEQ ID NO: 2)인 경우 M은 폴리아미노-폴리카르복실산 킬레이트제가 아님);

(I)는 M에 접합된 영상 방사성 핵종이며;

X_1 은 0-20의 천연 혹은 합성 아미노산이며;

P는 PACAP, 혹은 PACAP 생물학적 활성을 나타내는 그 유사체나 프레그먼트이며; 그리고

X_2 는 0-20의 천연 혹은 합성 아미노산임)

청구항 2.
제 1항에 있어서, M은 NxSy 킬레이트 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.
제 2항에 있어서, 상기 NxSy 킬레이트 화합물은 N2S2 혹은 N3S 코어를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.
제 2항에 있어서, 상기 NxSy 킬레이트 화합물은 N4 코어를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.
제 2항에 있어서, 상기 NxSy 킬레이트 화합물은 MAG3 또는 Gly-(D)Ala-Gly-Gly를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.
제 1항에 있어서, 상기 화학식 B의 킬레이트제 M은 폴리아미노-폴리카르복실산을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.
제 1항에 있어서, I는 ^{99m}Tc; ^{87}Y; ^{67}Ga; ^{64}Cu; 및 ^{111}In으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.
제 7항에 있어서, I는 ^{99m}Tc인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.
제 1항에 있어서, 화학식 A의 영상 화합물은 X_1 과 M을 연결하는 스페이서 Z_1 을 더욱 포함하며, 그리고 화학식 B의 영상 화합물은 X_2 와 M을 연결하는 스페이서 Z_2 를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.
제 9항에 있어서, 스페이서 Z_1 및 스페이서 Z_2 는 별도로 4-아미노 부티르산을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.
제 1항에 있어서, P는 SEQ ID NO:2를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.
제 1항에 있어서, 상기 영상 화합물은 ^{99m}Tc-TP 3475인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.
제 1항에 있어서, VPAC-발현 종양은 폐; 유방; 난소; 위; 췌장; 후두; 식도; 정소; 간; 이하선; 담즙관; 결장; 직장; 자궁경부; 자궁; 자궁내막; 신장; 방광; 뇌; 전립선; 갑상선; 편평상피세포 암; 선암; 소세포 암; 흑색종; 신경교종; 및 신

경모세포종으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.
제 1항에 있어서, 상기 대상자는 인간이 아닌 포유류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.
제 1항에 있어서, 대상자에게 투여되는 영상 화합물의 유효량은 70kg 체중당 약 0.01-100mCi인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.
제 1항에 있어서, 대상자에게 투여되는 영상 화합물의 유효량은 70kg 체중당 약 0.1-50mCi인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.
제 1항에 있어서, 상기 영상 화합물의 신장 흡수가 최소화되도록 상기 영상 화합물 전에 혹은 동시에 리신을 투여하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.
유효량의 화학식 C 또는 D의 조성물을 종양을 갖거나 종양을 갖는 것으로 의심되는 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, 종양을 갖는 대상자에서 VCAP 수용체를 발현하는 종양의 성장을 억제 혹은 역전(reversing)시키는 방법.

(여기서 화학식 C 및 D는

(C) $M(T)-X_1-P-X_2$

(D) $X_1-P-X_2-M(T)$

이며,

상기 식에서:

M은 킬레이트제이며;

(T)는 M에 접합된 치료 방사성 핵종이며;

X_1 은 0-20의 천연 혹은 합성 아미노산이며;

P는 PACAP 혹은 PACAP 생물학적 활성을 나타내는 그 유사체나 프레그먼트이며; 그리고

X_2 는 0-20의 천연 혹은 합성 아미노산임)

청구항 19.
제 18항에 있어서, M은 NxSy 킬레이트 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.
제 19항에 있어서, 상기 NxSy 킬레이트 화합물은 N2S2 혹은 N3S 코어를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.
제 19항에 있어서, 상기 NxSy 킬레이트 화합물은 N4 코어를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.
제 21항에 있어서, 상기 NxSy 킬레이트 화합물은 MAG3 또는 Gly-(D)Ala-Gly-Gly를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.
제 18항에 있어서, T는 ^{47}Sc, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{212}Pb, ^{68}Ga, ^{90}Y, ^{111}In, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{210}At, ^{211}At, ^{177}Lu, ^{186}Re 및 ^{188}Re로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.
제 23항에 있어서, T는 ^{90}Y; ^{186}Re; 혹은 ^{188}Re인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.
제 18항에 있어서, 화학식 C의 치료 화합물은 X_1과 M을 연결하는 스페이서 Z_1을 더욱 포함하며, 그리고 화학식 D의 치료 화합물은 X_2와 M을 연결하는 스페이서 Z_2를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.
제 25항에 있어서, 스페이서 Z_1 및 스페이서 Z_2는 별도로 4-아미노 부티르산을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.
제 18항에 있어서, P는 SEQ ID NO: 2를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.
제 18항에 있어서, VPAC-발현 종양은 폐; 유방; 난소; 위; 췌장; 후두; 식도; 정소; 간; 이하선; 담즙관; 결장; 직장; 자궁경부; 자궁; 자궁내막; 신장; 방광; 뇌; 전립선; 갑상선; 편평상피세포 암; 선암; 소세포 암; 흑색종; 신경교종; 및 신경모세포종으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.
제 18항에 있어서, 상기 대상자는 인간이 아닌 포유류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.
제 18항에 있어서, 대상자에게 투여되는 영상 화합물의 유효량은 70kg 체중당 약 1-1000mCi인 것을 특징으로 하는 방법.

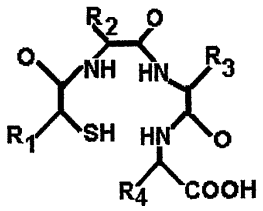
청구항 31.
제 18항에 있어서, 대상자에게 투여되는 영상 화합물의 유효량은 70kg 체중당 약 10-500mCi인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.
제 18항에 있어서, 대상자에게 투여되는 영상 화합물의 유효량은 70kg 체중당 약 20-100mCi인 것을 특징으로 하는 방법.

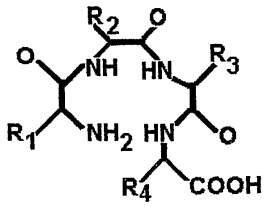
청구항 33.
제 18항에 있어서, 상기 영상 화합물의 신장 흡수가 최소화되도록 상기 영상 화합물 전에 혹은 동시에 리신을 투여하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

도면1A



도면1B



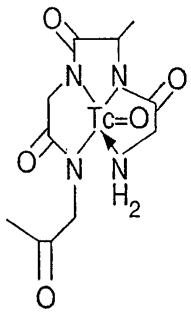
도면2

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Aba*-Gly-(D)Ala-Gly-Gly-(Resin)

(i)

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Aba*-Gly-(D)Ala-Gly-Gly

(ii)



His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Aba*-CO-NH

*4-아미노부티르산

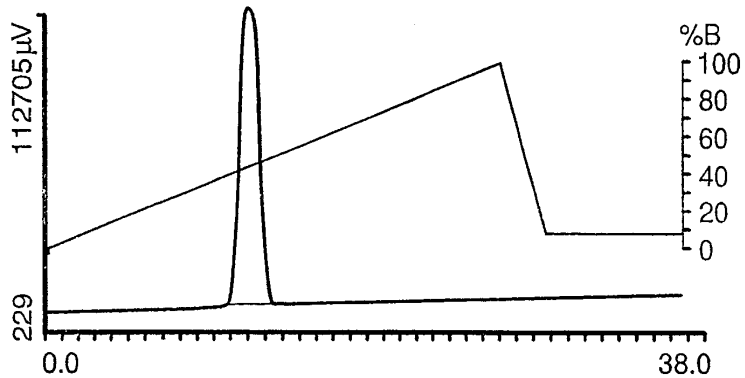
(i) TFA / 티오아니솔 / 에탄디올 / 페놀(90 : 5 : 3 : 2)

(ii) $Na^{99m}TcO_4$ / $SnCl_4$ / Na_3PO_4 (pH 12)

도면3

방법 : TP-3475
주입 량 : 200
샘플링 초기 : 0.1 Seconds

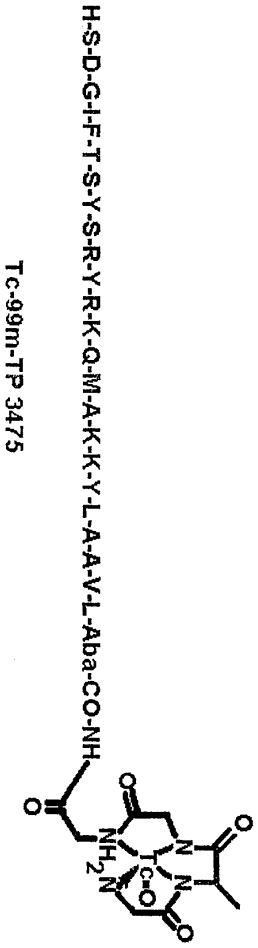
데이타 :



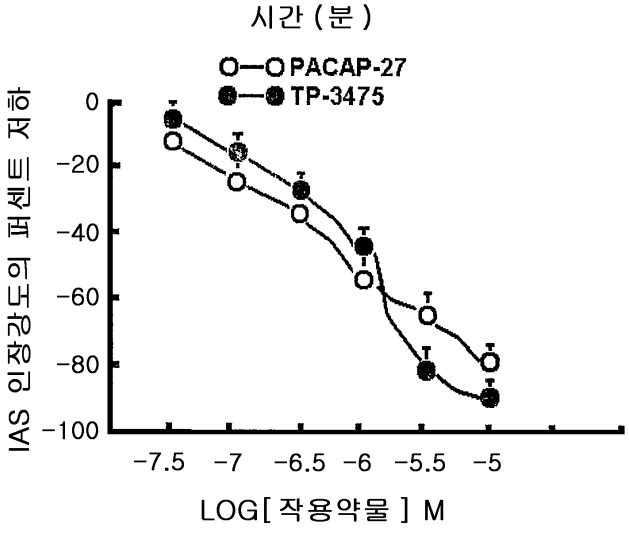
분석 : 채널 B

피크 No.	시간	타입	높이(μV)	면적(μV-sec)	면적 %
1	12.543	N	106585	3036778	100.000
총 면적				3036778	100.000

도면4



도면5



<110> THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY

<120> PACAP COMPOSITIONS AND METHODS FOR TUMOR IMAGING AND THERAPY

<130> 8321-121 PC

<150> US60/344,511

<151> 2001-10-19

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys
35

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 3
<211> 176
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Thr Met Cys Ser Gly Ala Arg Leu Ala Leu Leu Val Tyr Gly Ile
1 5 10 15

Ile Met His Ser Ser Val Tyr Ser Ser Pro Ala Ala Ala Gly Leu Arg
20 25 30

Phe Pro Gly Ile Arg Pro Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Glu Asp Gly Asn
35 40 45

Pro Leu Pro Asp Phe Gly Gly Ser Glu Pro Pro Gly Ala Gly Ser Pro
50 55 60

Ala Ser Ala Pro Arg Ala Ala Ala Ala Trp Tyr Arg Pro Ala Gly Arg
65 70 75 80

Arg Asp Val Ala His Gly Ile Leu Asn Glu Ala Tyr Arg Lys Val Leu
85 90 95

Asp Gln Leu Ser Ala Gly Lys His Leu Gln Ser Leu Val Ala Arg Gly
100 105 110

Val Gly Gly Ser Leu Gly Gly Gly Ala Gly Asp Asp Ala Glu Pro Leu
115 120 125

Ser Lys Arg His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr
130 135 140

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys
145 150 155 160

Arg Tyr Lys Gln Arg Val Lys Asn Lys Gly Arg Arg Ile Ala Tyr Leu
165 170 175

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> N4 chelating agent

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)
<223> D-form

<400> 4
Gly Ala Gly Gly
1

<210> 5
<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PACAP analog TP 3475

<220>

<221> VARIANT

<222> (28)

<223> Xaa = 4-aminobutyric acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (30)

<223> D-form

<400> 5

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Xaa Gly Ala Gly Gly
20 25 30