

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6689836号
(P6689836)

(45) 発行日 令和2年4月28日 (2020.4.28)

(24) 登録日 令和2年4月10日 (2020.4.10)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 239/16 (2006.01)

C O 7 C 239/16 C S P

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04

C O 7 C 309/65 (2006.01)

C O 7 C 309/65

C O 7 F 7/00 (2006.01)

C O 7 F 7/00 A

G O 1 T 1/161 (2006.01)

G O 1 T 1/161 A

請求項の数 12 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-521145 (P2017-521145)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月16日 (2015.10.16)
 (65) 公表番号 特表2018-502824 (P2018-502824A)
 (43) 公表日 平成30年2月1日 (2018.2.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2015/050640
 (87) 国際公開番号 W02016/058056
 (87) 国際公開日 平成28年4月21日 (2016.4.21)
 審査請求日 平成30年10月11日 (2018.10.11)
 (31) 優先権主張番号 2014904138
 (32) 優先日 平成26年10月16日 (2014.10.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 504348389
 ザ ユニバーシティー オブ メルボルン
 THE UNIVERSITY OF M
 ELBOURNE
 オーストラリア国 3010 ビクトリア
 ザ ユニバーシティー オブ メルボル
 ン
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

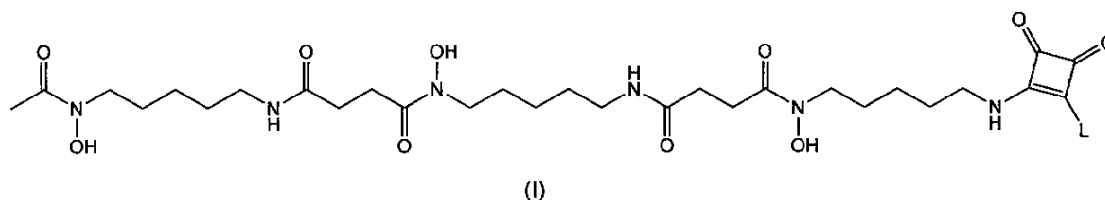
(54) 【発明の名称】 新規なイメージング組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) :

【化 1】



10

(式中、L はアジド、ハロゲン、シアナート及びOR から選択される脱離基であり、R は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロアルキル、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケン、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキン、アリール、-p-トルエンスルホニル、-ベンゼンスルホニルおよび -m-ニトロベンゼンスルホニルから選択される)

の化合物またはその薬学的に許容される塩の放射性核種錯体。

【請求項 2】

R が、 $C_1 \sim C_6$ アルキルである、請求項 1 に記載の放射性核種錯体。

【請求項 3】

20

R が、メチルまたはエチルである、請求項 2 に記載の放射性核種錯体。

【請求項 4】

L が、O - p - トルエンスルホニル、O - メタンスルホニル、O - トリフルオロメタン
スルホニル、O - ベンゼンスルホニルおよび O - m - ニトロベンゼンスルホニルから選択
される、請求項 1 に記載の放射性核種錯体。

【請求項 5】

放射性核種が、ジルコニウム、ガリウム、ルテチウム、ホルミウム、スカンジウム、チ
タン、インジウムおよびニオブの放射性同位体から選択される、請求項 1 から 4 のいずれ
か一項に記載の放射性核種錯体。

【請求項 6】

前記放射性核種が、ジルコニウムの放射性同位体、ガリウムの放射性同位体またはイン
ジウムの放射性同位体である、請求項 5 に記載の放射性核種錯体。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の放射性核種錯体にコンジュゲートされた標的分子
を含む、前記放射性核種錯体で標識されたコンジュゲート体。

【請求項 8】

前記標的分子が、ポリペプチドである、請求項 7 に記載のコンジュゲート体。

【請求項 9】

患者をイメージングするための薬剤の製造における、請求項 7 または 8 に記載のコンジュ
ゲート体の使用。

【請求項 10】

前記標的分子が、前記コンジュゲート体を *in vivo* での所望の部位に標的させる
役割を果たす、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記所望の部位が腫瘍である、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

細胞または *in vitro* 生検サンプルをイメージングするための薬剤の製造におけ
る、請求項 7 または 8 に記載のコンジュゲート体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、適切な金属中心に結合したときにイメージング剤として、特に腫瘍のイメー
ジングにとって有用であるヒドロキسام酸系化合物に関する。本発明は、その化合物を含
む組成物およびその化合物を使用して患者をイメージングする方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

ジルコニウム - 89 (^{89}Zr) は、医用イメージング装置に使用される陽電子放出核
種である。それは、特に、癌の検出のための陽電子放出断層撮影法 (PET) およびイメ
ージングに使用される。それは、医用イメージングに使用される他の放射性核種 (^{18}F
など) より半減期が長い ($t_{1/2} = 79.3$ 時間)。例えば、 ^{18}F の $t_{1/2}$ は 110 分であり、このことは、これを使用するには、これが組み込まれる作用剤を調製するた
めに、サイクロترون施設に近接していることと、迅速で収率の高い合成技術とが必要で
あることを意味する。 ^{89}Zr は、これらの同様の問題に直面せず、このため、 ^{89}Zr
は、医用イメージング装置において使用するのに特に魅力的なものになっている。

【0003】

デスフェリオキサミン (DFO) は、鉄過剰症を処置するために 1960 年代後半から
使用されてきた細菌のシデロフォアである。DFO 中の 3 つのヒドロキسام酸基が Fe^{3+}
イオンと配位結合を形成し、このため、DFO は実質的に Fe^{3+} イオンをキレート化
する六座配位子になっている。 ^{89}Zr の配位構造が理由で、DFO は PET イメージ
ング用途における ^{89}Zr のキレーターとしても使用されてきた (非特許文献 1)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

他の D F O 系の放射性同位体キレーターも P E T イメージング用途で使用するために調製されてきた。これらには、N - スクシニル - デスフェリオキサミン - テトラフルオロフェノールエステル (N - s u c - D F O - T F P エステル)、p - イソチオシアナトベンジル - デスフェリオキサミン (D F O - B z - N C S、別称 D F O - P h - N C S) およびデスフェリオキサミン - マレイミド (D F O - マレイミド) が含まれる。これらのキレーターは全て、抗体または抗体断片にコンジュゲートされて、イメージング剤に、イメージングされるべき腫瘍を標的させる手段を提供することができる。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、これらのキレーターには複数の不利点がある。N - s u c - D F O - T F P エステルの合成は、テトラフルオロフェノールエステルがデスフェリオキサミン (D F O) のヒドロキサマート基の 1 つと反応するのを防ぐために、 $F e^{3+}$ の添加を必要とする。合成 (N - s u c - D F O - T F P エステルを抗体にカップリングさせるステップを含む) が完了すると、次に $F e^{3+}$ を除去する必要がある。これは、100 倍モル過剰の E D T A を pH 4 . 2 ~ 4 . 5 で使用して実現される。これらの条件は、pH 感受性抗体に有害となり得る。

【 0 0 0 6 】

D F O - B z - N C S に関して、この化合物を振盪も適切な混合もせず、あまりに急速に抗体溶液に添加すると、D F O - B z - N C S は抗体の凝集体の形成を引き起こす。さらに、放射標識されかつ抗体にコンジュゲートされたキレーターは、長期間保管された場合に安定性が懸念され、塩化物イオンを含有する緩衝液は、錯体から放射性核種を脱離させるため、回避される必要がある。

【 0 0 0 7 】

D F O - マレイミドはチオール基へのマイケル付加によって抗体にコンジュゲートする。これには 2 つの主な問題がある。第 1 に、チオールへのマイケル付加によって異性体の混合物が生じる可能性がある。異性体は生物システムと異なる方法で相互作用する場合があるため、これは不利点である。第 2 の問題は、チオール基へのマイケル付加は可逆的であることである。これは D F O - マレイミド - ラジオヌリド (r a d i o n u l i d e) 錯体が抗体から分離して、身体全体に錯体が分布するリスクを増加させる。これはイメージングの選択性を低減させるだけでなく、錯体中の放射性核種から放出される放射線が他の器官と相互作用するため、毒性副作用の可能性も増加させる。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 H o l l a n d , J . P . e t a l (2 0 1 2) N a t u r e 1 0 : 1 5 8 6

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

したがって、これらの欠点のない、放射性同位体と一緒に使用するための新規な作用剤を開発する必要がある。

【 0 0 1 0 】

本明細書中のいずれの従来技術の記載も、この従来技術がいずれかの管轄において共通一般知識の一部を形成すること、またはこの従来技術が当業者によって理解され、有意義であると考えられ、および / または他の従来技術と組み合わせられると当然期待され得ることを承認または示唆するものではない。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明者らは、下記の式 (I) :

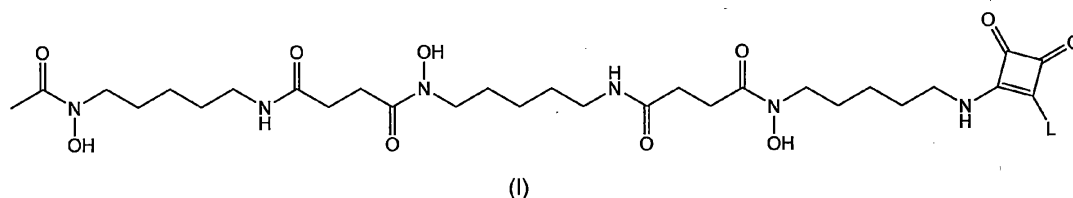
10

20

30

40

【化 1】



(式中、Lは脱離基である)

の化合物(本明細書では「DFO-スクアルアミド(DFO-squaramide)」または「DFOsq」とも称す)、およびその生体分子とのコンジュゲート体(^{89}Zr などの放射性核種を錯体化した場合)が、有効なPETイメージング剤であることを発見した。一実施形態では、LはORである。Rは、それぞれ任意選択により置換されている $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ ヘテロアルキル、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルケン、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルキンおよびアリールから選択されてもよい。Rは、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキル(例えば、メチル、エチル、プロピルまたはブチルなどの $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル)であってもよい。Rはメチルでもエチルでもよい。Rはエチルでもよい。

10

【0012】

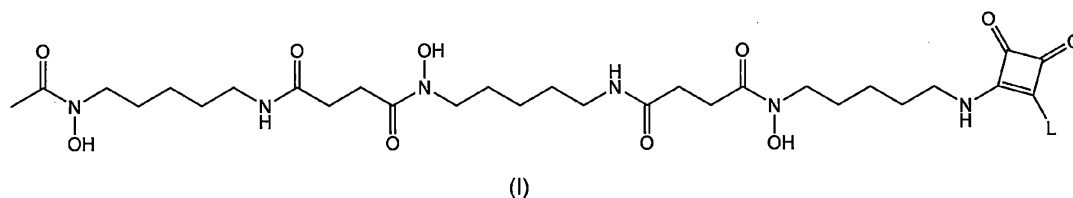
したがって、一態様において、本発明は、上記に定義した式(I)の化合物またはその薬学的に許容される塩に関する。

20

【0013】

別の態様において、本発明は、式(I)：

【化 2】



30

(式中、Lは脱離基である)

の化合物またはその薬学的に許容される塩の放射性核種錯体に関する。LはORでもよい。Rは、それぞれ任意選択により置換されている $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ ヘテロアルキル、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルケン、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルキンおよびアリールから選択されてもよい。Rは、アルキル(例えば、メチル、エチル、プロピルまたはブチルなどの $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル)であってもよい。Rはメチルでもエチルでもよい。Rはエチルでもよい。

【0014】

放射性核種は、ジルコニウム、ガリウムまたはインジウムの放射性同位体であってもよい。ジルコニウムの放射性同位体は ^{89}Zr でもよい。ガリウムの放射性同位体は ^{68}Ga でもよい。インジウムの放射性同位体は ^{111}In でもよい。放射性核種はジルコニウムの放射性同位体(例えば ^{89}Zr)でもよい。

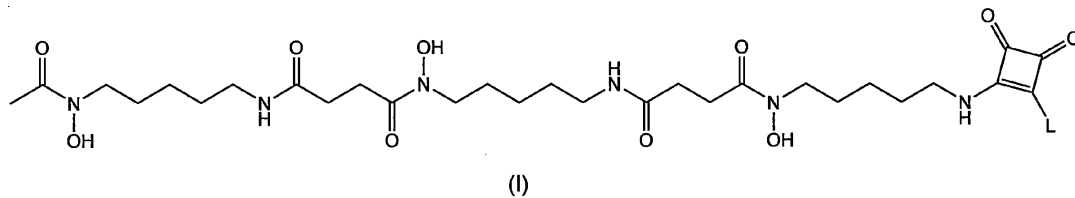
40

【0015】

別の態様において、本発明は、

- 式(I)：

【化3】



(式中、Lは脱離基である(本明細書に定義したとおり))
 の化合物またはその薬学的に許容される塩と、

- 標的分子と
 のコンジュゲート体にも関する。

【0016】

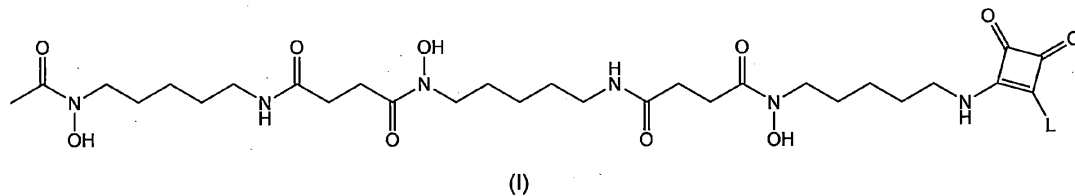
標的分子は、ポリペプチド(輸送タンパク質または抗体など)であってもよい。標的分子は、ペプチド(標的ペプチドなど)でもよい。ポリペプチドは抗体でもよい。抗体は、ハーセプチン(トラスツマブ)、リツキシマブおよびセツキシマブから選択されてもよい。

【0017】

別の態様において、本発明は、

- 式(I)：

【化4】



(式中、Lは脱離基である(本明細書に定義したとおり))
 の化合物またはその薬学的に許容される塩と、

- 標的分子と、
 - 式(I)の化合物またはその薬学的に許容される塩に錯体化された放射性核種との放射性核種で標識されたコンジュゲート体に関する。

【0018】

標的分子は、ポリペプチド(輸送タンパク質または抗体など)であってもよい。標的分子は、ペプチド(標的ペプチドなど)でもよい。ポリペプチドは抗体でもよい。抗体は、ハーセプチン(トラスツマブ)、リツキシマブおよびセツキシマブから選択されてもよい。

【0019】

放射性核種は、ジルコニウム、ガリウムまたはインジウムの放射性同位体であってもよい。ジルコニウムの放射性同位体は ^{89}Zr でもよい。ガリウムの放射性同位体は ^{68}Ga でもよい。インジウムの放射性同位体は ^{111}In でもよい。放射性核種はジルコニウムの同位体(例えば ^{89}Zr)でもよい。

【0020】

放射性核種で標識された錯体および放射性核種で標識されたコンジュゲート体は、DFO-Ph-NCs、またはDFO-Ph-NCsと標的分子とのコンジュゲート体と比較した際に改善された親和性を有する。

【0021】

別の態様において、本発明は、

- 上記に定義した放射性核種で標識されたコンジュゲート体を患者に投与するステッ

10

20

30

40

50

プと、

- 患者をイメージングするステップと
を含む、患者をイメージングする方法に関する。

【0022】

別の態様において、本発明は、

- 上記に定義した放射性核種で標識されたコンジュゲート体を細胞または *in vitro* 生検サンプルに投与するステップと、

- 細胞または *in vitro* 生検サンプルをイメージングするステップと
を含む、細胞または *in vitro* 生検サンプルをイメージングする方法に関する。

【0023】

本発明のさらなる態様および上記の段落に記載した態様のさらなる実施形態は、例として挙げられ、かつ添付の図面を参照する以下の説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】 ^{89}Zr (DFO-スクアラート-トラスツズマブ)を使用したHER2陽性腫瘍(BT474乳癌モデル)のMicro-PETイメージングである。

【図2】 ^{89}Zr (DFO-マレイミド-トラスツズマブ)を使用したHER2陽性腫瘍(LS174T結腸直腸腫瘍モデル)のMicro-PETイメージングである。

【図3】 ^{89}Zr Clを使用したHER2陽性腫瘍(LS174T結腸直腸腫瘍モデル)のMicro-PETイメージングである。

【図4】対照サンプル(即ちDFOSq無し)のラジオ-iTLCクロマトグラムである。

【図5】 ^{89}Zr DFOSq錯体のラジオ-iTLCクロマトグラム(^{89}Zr の添加から60分後)である。

【図6】対照サンプルの2つのサイズ排除HPLC UV-Visクロマトグラム(280および254nmの2つの異なる吸収波長での)および放射線クロマトグラムである。

【図7】 ^{89}Zr DFOSq錯体の2つのサイズ排除HPLC UV-Visクロマトグラムおよび放射線クロマトグラム(^{89}Zr の添加から78時間後)である。

【図8】 ^{89}Zr 標識DFOSq-cRGDFKのラジオ-iTLCクロマトグラム(^{89}Zr の添加から60分後に取得)である。

【図9】DFOSq-トランスフェリン(DFOSq-Tf)のLCMSスペクトルである。

【図10】 ^{89}Zr 標識DFOSq-Tfのラジオ-iTLCクロマトグラム(^{89}Zr の添加から20分後に取得)である。

【図11】 ^{89}Zr 標識DFOSq-Tfの2つのサイズ排除HPLC UV-Visクロマトグラムおよび放射線クロマトグラム(^{89}Zr の添加から20分後)である。

【図12】DFOSq-ハーセプチン(DFOSq-Herc)のLCMSスペクトルである。

【図13】 ^{89}Zr 標識DFOSq-Hercのラジオ-iTLCクロマトグラム(^{89}Zr の添加から25分後に取得)である。

【図14】精製した ^{89}Zr 標識DFOSq-Hercのラジオ-iTLCクロマトグラムである。

【図15】非放射性(即ち非標識の)DFOSq-Hercの2つのサイズ排除HPLC UV-Visクロマトグラムおよび放射線クロマトグラムである。

【図16】 ^{89}Zr 標識DFOSq-Hercの2つのサイズ排除HPLC UV-Visクロマトグラムおよび放射線クロマトグラム(精製から24時間後に取得)である。

【図17】 ^{89}Zr DFOSq-ハーセプチン投与後のマウス1のPET画像である。

【図18】 ^{89}Zr DFOSq-ハーセプチン投与後のマウス2のPET画像である。

【図19】DFOSq-トラスツズマブ(非標識のトラスツズマブ=148, 232)のデコンボリューションされたESI-MSである。

10

20

30

40

50

【図20】 ^{89}Zr -DFOPhNCs-トラスツズマブ反応混合物の30分後のiTLC分析である(原点は55mm、溶媒先端は150mmにある; 標識されたトラスツズマブは原点に留まり、 $>70\text{mm}$ の距離($r.f. > 0.1$)での活性は非キレート化 ^{89}Zr を表す)。

【図21】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブのPD-10精製後のSE-HPLC分析である(上: 280nmでの吸光度; 下: 放射線シグナル(mV)); ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブは約12分で溶出し、ゲンチサートは20~25分で溶出する)。

【図22-1】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブを使用したBT474腫瘍担持NOD/SCIDマウスのPETイメージングである。

10

【図22-2】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブを使用したBT474腫瘍担持NOD/SCIDマウスのPETイメージングである。

【図23】DFOSq-トラスツズマブ(非標識のトラスツズマブ=148, 232)のデコンボリューションされたESI-MSである。

【図24】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブ反応混合物の1時間後のiTLC分析である(原点は70mm、溶媒先端は160mmにある; 標識されたトラスツズマブは原点に留まり、 $>80\text{mm}$ の距離($r.f. > 0.1$)での活性は非キレート化 ^{89}Zr を表す)。

【図25】精製した ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブのSE-HPLC分析による放射線トレース(生成物保持時間約12.5分)である。

20

【図26】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブ反応混合物の1.5時間後のiTLC分析である(原点は70mm、溶媒先端は145mmにある; 標識されたトラスツズマブは原点に留まり、 $>80\text{mm}$ の距離($r.f. > 0.1$)での活性は非キレート化 ^{89}Zr を表す)。

【図27】精製した ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブのSE-HPLC分析による放射線トレース(生成物保持時間約12.5分)である。

【図28-1】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブをイメージング剤として使用したSKOV3腫瘍担持マウスのPETイメージングである。

【図28-2】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブをイメージング剤として使用したSKOV3腫瘍担持マウスのPETイメージングである。

30

【図29-1】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブをイメージング剤として使用したLS174T腫瘍担持マウスのPETイメージングである。

【図29-2】 ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブをイメージング剤として使用したLS174T腫瘍担持マウスのPETイメージングである。

【図30】DFOPhNCsの ^1H NMR分析(d_6 -DMSO、400MHz)である。

【図31】精製したDFOPhNCsの分析用HPLCトレース(214nmでの吸光度)(1.5分でのシグナル=DMSO、8.95分でのシグナル=DFOPhNCs)である。

【図32】精製したDFOPhNCsのESI-MS分析である。

40

【図33】DFOPhNCs-トラスツズマブのデコンボリューションされたESI-MS(非標識のトラスツズマブ=148, 234; 1つのDFOPhNCsが結合したトラスツズマブ=148, 987)である。

【図34a】 ^{89}Zr -DFOPhNCs-トラスツズマブ反応混合物の1時間後のiTLC分析であり、約30%の標識効率を示す(原点は60mm、溶媒先端は150mmにある; 標識されたトラスツズマブは原点に留まり、 $>70\text{mm}$ の距離($r.f. > 0.1$)での活性は非キレート化 ^{89}Zr を表す)。

【図34b】 ^{89}Zr -DFOPhNCs-トラスツズマブ反応混合物の1.5時間後のiTLC分析であり、約50%の標識効率を示す(原点は55mm、溶媒先端は135mmにある; 標識されたトラスツズマブは原点に留まり、 $>65\text{mm}$ の距離($r.f. > 0$

50

． 1) での活性は非キレート化 ^{89}Zr を表す)。

【図 3 4 c】 ^{89}Zr - DFOPhNCS - トラストズマブ反応混合物の 2 時間後の iTLC 分析であり、約 65% の標識効率を示す (原点は 60 mm、溶媒先端は 145 mm にあり；標識されたトラストズマブは原点に留まり、 > 70 mm の距離 ($r.f. > 0.1$) での活性は非キレート化 ^{89}Zr を表す)。

【図 3 5】 ^{89}Zr - DFOPhNCS - トラストズマブの PD - 10 精製後の iTLC 分析である (原点は 55 mm、溶媒先端は 150 mm にあり；標識されたトラストズマブは原点に留まり、 > 70 mm の距離 ($r.f. > 0.1$) での活性は非キレート化 ^{89}Zr を表す)。

【図 3 6】 ^{89}Zr - DFOPhNCS - トラストズマブの PD - 10 精製後の SEC - HPLC 分析である (上：280 nm での吸光度；下：放射線シグナル (mV)； ^{89}Zr - DFOPhNCS - トラストズマブは約 12 分で溶出し始め、ゲンチシンアシック (gentisic acid) は 20 ~ 25 分で溶出する)。

【図 3 7 - 1】 ^{89}Zr - DFOPhNCS - トラストズマブをイメージング剤として使用した SKOV3 腫瘍担持マウスの PET イメージングである。

【図 3 7 - 2】 ^{89}Zr - DFOPhNCS - トラストズマブをイメージング剤として使用した SKOV3 腫瘍担持マウスの PET イメージングである。

【図 3 8】 SKOV3 腫瘍担持マウスにおける ^{89}Zr - DFO - Sq / ハーセプチン vs ^{89}Zr - DFO - Ph - NCS / ハーセプチンの取込みの PET イメージング結果である。

【図 3 9】 ^{89}Zr - DFOPhNCS - cRGDFK 反応混合物の HPLC 分析である；上：280 / 254 nm での吸光度；下：放射線。

【図 4 0】 ^{89}Zr - DFOSq - cRGDFK 反応混合物の HPLC 分析である；上：254 nm での吸光度；中：280 nm での吸光度；下：放射線。

【図 4 1】 DFOPhNCS - cRGDFK / DFOSq - cRGDFK / ^{89}Zr 反応混合物の HPLC 分析である；上：280 / 254 nm での吸光度；下：放射線。

【図 4 2】 DFOSqTaur の ^1H NMR (400 MHz、 D_2O) スペクトルである。

【図 4 3】 DFOSqTaur の ESI - MS スペクトルである。[M + H]⁺ (計算値) $m/z = 764.35$ 。

【図 4 4】 DFOPhSO₃H の ^1H NMR (400 MHz、 D_2O) スペクトルである。

【図 4 5】 DFOPhSO₃H の ESI - MS スペクトルである。[M + H]⁺ (計算値) $m/z = 776.33$ 。

【図 4 6】 DFOPhSO₃H / DFOSqTaur / Zr 反応混合物の ESI - MS スペクトルである。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明者らは、式 (I) の化合物の合成 (および特に、この化合物と生体分子とのコンジュゲート体の合成) は、ヒドロキシサム酸基を保護するために Fe^{3+} イオンを使用する必要がないため、N - suc - DFO - TFP の合成より簡易で、抗体などの pH 感受性分子の存在に対する可変性が高いことを発見した。このため、抗体のコンジュゲートおよび ^{89}Zr との放射標識が容易になる。さらに、式 (I) の化合物は、塩化物を含有する緩衝液に感受性がなく、生体分子とコンジュゲートしている間に凝集体を形成せず、生体分子と可逆的な結合をしない。

【0026】

さらに、意外にも、式 (I) の化合物と標的分子との放射標識されたコンジュゲート体は、PET イメージング剤として使用される複数の既知の放射性核種キレーター (特に他の DFO 系キレーター) より、腫瘍標的および組織選択性が改善されている。

【0027】

10

20

30

40

50

この腫瘍標的および組織選択性の改善に寄与する可能性があると考えられる複数の要因があり、その要因には、放射性同位体がキレート化される強度、代謝安定性、および代謝生成物の排泄率などがある。本発明の化合物のこれらの利点は、従来技術には開示されておらず、予測することもできなかった。また、本発明の化合物の全体的な改善性能に対するそれらの利点の寄与の相対的な重要性は知られていない。

【0028】

本明細書に開示している化合物の「薬学的に許容される塩」とは、一般に当技術分野においてヒトまたは動物の組織に接触して使用するのに好適であると考えられている、過剰な毒性も発癌性もなく、好ましくは刺激作用、アレルギー応答、または他の問題もしくはは障害のない酸塩または塩基塩である。このような塩として、アミンなどの塩基性残基の無機酸塩および有機酸塩、ならびにカルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩が挙げられる。

10

【0029】

好適な薬学的に許容される塩として、以下に限定されるものではないが、塩酸、リン酸、臭化水素酸、リンゴ酸、グリコール酸、フマル酸、硫酸、スルファミン酸、スルファニル酸、ギ酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエチルスルホン酸、硝酸、安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、ステアリン酸、サリチル酸、グルタミン酸、アスコルビン酸、パモ酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、プロピオン酸、ヒドロキシマイエイク酸 (hydroxymaieic)、ヨウ化水素酸、フェニル酢酸およびアルカン酸 (例えば、酢酸、 n が 0 ~ 6 の任意の整数、即ち 0、1、2、3、4、5 または 6 である $\text{HOOC} - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$) などの酸の塩が挙げられる。同様に、薬学的に許容される陽イオンとして、以下に限定されるものではないが、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、リチウムおよびアンモニウムが挙げられる。当業者は、本明細書で提供される化合物用として、別の薬学的に許容される塩を識別するであろう。一般に、薬学的に許容される酸塩または塩基塩は、任意の従来の化学的方法により、塩基性部分または酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。簡単に言えば、このような塩は、これらの化合物の遊離酸形態または遊離塩基形態と、化学量論量の適切な塩基または酸とを、水中もしくはは有機溶媒 (例えば、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノールまたはアセトニトリル) 中で、またはこの 2 つの混合液中で反応させることによって調製することができる。

20

30

【0030】

式 (I) の化合物は、水和物、溶媒和物または非共有結合錯体 (放射性核種以外の金属との) として存在してもよいが、そうである必要はないことは明らかであろう。さらに、種々の結晶形および多形が本発明の範囲内にあり、本明細書で提供される化合物のプロドラッグも同様である。

【0031】

「プロドラッグ」とは、本明細書で提供される化合物の構造的要件を十分に満たしていてもよいが、対象または患者に投与された後に *in vivo* で修飾されて、本明細書で提供されるような放射標識されたコンジュゲート体を生成する化合物である。例えば、プロドラッグは、放射標識されたコンジュゲート体のアシル化誘導体とすることができる。プロドラッグには、哺乳動物の対象に投与されると開裂して遊離ヒドロキシル基または遊離アミン基をそれぞれ形成する任意の基に、ヒドロキシル基またはアミン基が結合する化合物が含まれる。プロドラッグの例として、以下に限定されるものではないが、放射標識されたコンジュゲート体中のアミン官能基のアセタート誘導体、ホルマート誘導体、ホスファート誘導体およびベンゾアート誘導体が挙げられる。プロドラッグは、修飾部が *in vivo* で開裂して親化合物を生成するように、化合物中に存在する官能基を修飾することによって調製することができる。

40

【0032】

「置換基」とは、本明細書で使用する場合、対象の分子中の原子に共有結合している分

50

子の部分を指す。「置換されている」という用語は、本明細書で使用する場合、指定された原子についている任意の1つまたは複数の水素が、指示された置換基群からの選択物で置き換えられており、但し、指示された原子の正常な原子価を超えず、置換によって安定な化合物、即ち、生物学的活性のために単離され、特徴づけられ、試験されることが可能な化合物が得られることを意味する。置換基がオキソ、即ち=Oであれば、その場合、原子についている2つの水素が置き換えられる。芳香族炭素原子の置換基であるオキソ基は、-CH- から -C(=O)- に転換し、芳香族性を失う。例えば、オキソで置換されたピリジル基はピリドンである。好適な置換基の例は、アルキル、ヘテロアルキル、ハロゲン（例えば、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素の各原子）、OH、=O、SH、SO₂、NH₂、NHアルキル、=NH、N₃ およびNO₂ の各基である。

10

【0033】

「任意選択により置換されている」という用語は、1つ、2つまたは3つ以上の水素原子が、アルキル、ハロゲン（例えば、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素の各原子）、OH、=O、SH、=S、SO₂、NH₂、NHアルキル、=NH、N₃ またはNO₂ の各基で、互いに独立して置き換えられている基を指す。

【0034】

本明細書で使用する場合、長さの範囲の限度を定義する表現、例えば、「1～5」は、1～5、即ち、1、2、3、4および5の任意の整数を意味する。換言すると、明示された2つの整数で定義された任意の範囲は、前記限度を定義する任意の整数および前記範囲に含まれる任意の整数を含み、かつ開示するものとする。

20

【0035】

「脱離基」という用語は、標的分子と反応すると、スクアラート部分から離れることが可能な任意の部分の部分を指す。脱離基が離れ、標的分子の基（リシン側鎖のアミノ基など）とスクアラートとの間に結合が形成される。一実施形態では、脱離基（「L」）はORである。一実施形態では、Rは、それぞれ任意選択により置換されているC₁～C₁₀アルキル、C₁～C₁₀ヘテロアルキル、C₂～C₁₀アルケンおよびC₂～C₁₀アルキンならびにアリールから選択される。一実施形態では、RはC₁～C₁₀アルキル（例えば、メチル、エチル、プロピルまたはブチルなどのC₁～C₆アルキル）である。一実施形態では、Rはメチルまたはエチルである。一実施形態では、Rはエチルである。別の実施形態では、Lはハロゲン（例えば、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素）であり、またはLはアジド基である。

30

【0036】

「アルキル」という用語は、1～10個の炭素原子を含有する飽和の直鎖または分岐鎖の炭化水素基（例えばn-オクチル基）、特に、1～6個、即ち1、2、3、4、5または6個の炭素原子を含有する飽和の直鎖または分岐鎖の炭化水素基を指す。アルキル基の具体的な例は、メチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、イソ-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソ-ペンチル、n-ヘキシルおよび2,2-ジメチルブチルである。

【0037】

「ヘテロアルキル」という用語は、酸素、窒素および硫黄から選択される1つまたは複数のヘテロ原子を含有する上記に定義したアルキル基を指す。ヘテロアルキル基の具体的な例は、メトキシ、トリフルオロメトキシ、エトキシ、n-プロピルオキシ、イソ-プロピルオキシ、ブトキシ、tert-ブチルオキシ、メトキシメチル、エトキシメチル、-CH₂CH₂OH、-CH₂OH、メトキシエチル、1-メトキシエチル、1-エトキシエチル、2-メトキシエチルまたは2-エトキシエチル、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソ-プロピルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、イソ-プロピル-エチルアミノ、メチルアミノメチル、エチルアミノメチル、ジ-イソ-プロピルアミノエチル、メチルチオ、エチルチオ、イソ-プロピルチオ、メタンスルホニル、トリフルオロメタンスルホニル、エノールエーテル、ジメチルアミノメチル、ジメチルアミノエチル、アセチル、プロピオニル、ブチリルオキシ、アセチルオキシ、メトキシカルボニル

40

50

、エトキシ・カルボニル、プロピオニルオキシ、アセチルアミノ、プロピオニルアミノ、カルボキシメチル、カルボキシエチルまたはカルボキシプロピル、N・エチル・N・メチルカルバモイルおよびN・メチルカルバモイルである。ヘテロアルキル基のさらなる例は、ニトリル、イソ・ニトリル、シアナート、チオシアナート、イソ・シアナート、イソ・チオシアナートおよびアルキルニトリルの各基である。

【0038】

「アルケニル」という用語は、2～10個の炭素原子、特に2～6個、即ち2、3、4、5または6個の炭素原子を含有する少なくとも部分的に不飽和の直鎖または分岐鎖の炭化水素基を指す。アルケニル基の具体的な例は、エテニル（ビニル）、プロペニル（アリル）、イソ・プロペニル、ブテニル、エチニル、プロピニル、ブチニル、アセチレニル、プロパルギル、イソ・プレニルおよびヘキサ・2・エニル基である。アルケニル基は1つまたは2つの二重結合を有するのが好ましい。

10

【0039】

「アルキニル」という用語は、2～10個の炭素原子、特に2～6個、即ち2、3、4、5または6個の炭素原子を含有する少なくとも部分的に不飽和の直鎖または分岐鎖の炭化水素基を指す。アルキニル基の具体的な例は、エチニル、プロピニル、ブチニル、アセチレニルおよびプロパルギルの各基である。アルキニル基は、1つまたは2つの（特に好ましくは1つの）三重結合を有するのが好ましい。

【0040】

「アリール」という用語は、6～14個の環炭素原子、好ましくは6～10個（特に6個）の環炭素原子を含有する1つまたは複数の環を含有する芳香族基を指す。その例は、フェニル、ナフチルおよびビフェニルの各基である。本発明において使用するのに好適な、置換されているアリール基の例として、p・トルエンシルホニル（Ts）、ベンゼンシルホニル（Bs）およびm・ニトロベンゼンシルホニル（Ns）が挙げられる。

20

【0041】

本発明の好ましい化合物は、RがC₁～C₁₀アルキルである（および特に、Rがエチルである）ものである。

【0042】

一実施形態では、脱離基は、OCH₂CH₃、O・p・トルエンシルホナート（OTs）、O・メタンシルホナート（OMs）、O・トリフルオロメタンシルホナート（OTf）、O・ベンゼンシルホナート（OBs）、O・m・ニトロベンゼンシルホナート（ONs）、シアナート（CN）、アジド（N₃）およびハロゲン（例えば、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素）から選択される。

30

【0043】

本明細書で使用する場合、「放射性核種錯体」という用語は、放射性核種と配位錯体を形成した、上記に定義した式（I）の化合物を指す。一般に、これは式（I）の化合物の電子供与基（ヒドロキサマート基など）と放射性核種との間の配位結合の形成の結果として生じるものである。

【0044】

本発明の化合物において、配位結合は、DFOのヒドロキサム酸基と放射性核種との間に形成されることが前提とされる。しかしながら、理論に縛られることを望むものではないが、本発明者らは、スクアラート部分のオキソ基も（DFOのヒドロキサム酸基に加えて）ドナー原子として作用し、式（I）の化合物が放射性核種に結合することができる1つまたは2つの追加の部位を供給するとも考えている。これによって八配位錯体をもたらされ、このことは、八配位構造を有する放射性核種（⁸⁹Zrなど）にとって安定性の観点から極めて好ましく、本発明の錯体について観察される安定性を説明するものであり得る。特に、このことは、放射性核種が標的組織から（骨などの他の組織へ）容易に浸出しない（このため、他のDFO系イメージング剤と比較した際にイメージングの質が改善されている）理由を説明するものであり得る。現在使用されているキレーターに対する本発明の化合物のこれらの利点は、図および実施例に例示されている。

40

50

【0045】

図1、18および22に示すように、 ^{89}Zr (DFOSq-トラスツズマブ) は極めて選択的に標的し、HER2陽性腫瘍BT474 (乳癌) の部位に集中して留まっている。これは、放射性核種 (それぞれ ^{89}Zr (DFO-マレイミド-トラスツズマブ) および ^{89}Zr Clとして投与した場合) がマウスの身体全体に顕著に分布していることを示す図2および3の結果とは対照的である。上記のように、この改善された特異性に寄与すると考えられるものの1つは、スクアラート系作用剤が強力なキレート化力を有し、これにより、身体全体へのその分布ならびに他の組織、例えば、骨 (ジルコニウムは骨に極めて高い親和性を有する)、肝臓および腎臓中の蓄積が防止されるというものである。

【0046】

^{89}Zr (DFO-PhNCs) と比較した際のジルコニウムの高い親和性は、競争試験に示されている (実施例および図39~41を参照)。吸光度および放射線スペクトルは、 ^{89}Zr が本発明のコンジュゲート体 (DFOSq-cRGDFK) とDFOPhNCs-cRGDFKとの混合物に曝露されると、 ^{89}Zr はほとんど本発明のコンジュゲート体のみに錯体化されることを示している。

【0047】

他に、特異性に寄与するものは、本発明の放射性核種で標識された化合物の代謝安定性であり得る。放射性核種を含有するが、トラスツズマブ部分を含まない代謝生成物 (「非標的代謝生成物」) は、標的能力をもたず、放射性核種を身体全体に分布させることになる。この本発明の化合物の代謝安定性は予測され得ず、容易には説明され得ない。

【0048】

本発明者らは、本発明の放射性核種で標識されたコンジュゲート体の代謝生成物が形成されとしても、その代謝生成物は排泄率が高く、非標的部位での放射性核種の蓄積が低減され得ることも推論している。これも予想外の特性となるであろう。

【0049】

本発明のコンジュゲート体のこの特異性および安定性は図28および29でも例証されており、これらは、他のHER2陽性腫瘍 (結腸直腸腫瘍モデルであるLS174T、および卵巣癌モデルであるSKOV3) についての ^{89}Zr (DFOSq-トラスツズマブ) のイメージング能力を示している。SKOV3腫瘍モデルにおいて ^{89}Zr (DFOSq-トラスツズマブ) について得られた結果 (図28) も、同じ腫瘍モデルであるが ^{89}Zr (DFO-PhNCs-トラスツズマブ) をイメージング剤として使用して得られた結果 (図37を参照) とは定性的に対照をなすものであり得、後者は、処置したマウス全体に放射性核種の顕著な分布を示している。

【0050】

本発明の放射標識されたコンジュゲート体が他のコンジュゲート体、例えば ^{89}Zr (DFO-PhNCs-トラスツズマブ) より活性が優れていることは、 ^{89}Zr (DFO-PhNCs-トラスツズマブ) を使用したSKOV3腫瘍のイメージングから得られた標準取込値 (SUV) (実施例の表7を参照) と比較した場合の、 ^{89}Zr (DFO-スクアラート-トラスツズマブ) を使用したSKOV3腫瘍のイメージングから得られたSUV (実施例の表3を参照) によっても示されている。SUVは、基本的に、投与放射能で除算し、動物の体重で除算した組織の放射能濃度 (時点tでの) である。したがって、SUVは、投与された放射能の様々な量および動物のサイズに対して標準化するものである。

【0051】

一般に、最良の画像 (および非標的器官に対して放射能毒性の少ない) は、腫瘍における放射能イメージング剤の取込み対非標的組織 (骨および肝臓など) によるこの剤の取込みの比がより高い場合に得られる。比が高いほど、画像および放射能イメージング剤の選択性が良好になる。図38のグラフは、本発明の放射標識されたコンジュゲート体 (^{89}Zr (DFOSq-トラスツズマブ)) および ^{89}Zr (DFO-PhNCs-トラスツズマブ) について、腫瘍SUV_{max}、ならびに腫瘍:バックグラウンド、腫瘍:肝臓お

10

20

30

40

50

よび腫瘍：骨のSUV比を示している。図38から、全ての実験にわたって ^{89}Zr (DFOSq-トラスツズマブ)のSUV比は、他の組織(肝臓および骨)中より標的部位に放射能が多いため、 ^{89}Zr (DFO-PhNCs-トラスツズマブ)のSUV比より高いことが見て取れる。このことは、本発明の放射標識されたコンジュゲート体が、 ^{89}Zr (DFO-PhNCs-トラスツズマブ)より選択的で安定した作用剤であることを示す。この腫瘍：バックグラウンド比の高さは有利である。

【0052】

とりわけ、本発明の放射標識されたコンジュゲート体の取込みは、腫瘍のHER2発現レベルにも依存している。ここに示すデータは、HER2発現レベルの高い腫瘍(BT474など)は、HER2発現の低い腫瘍(例えばLS174Tで、これは「よりばやけた」画像になる)よりコンジュゲート体の取込みが多い(したがって、より鮮明なPET画像が生成する)ことを示している。HER2発現レベルが変わることによって起こる、この画像の鮮明度の差は、得られるPET画像の鮮明度に影響するのは腫瘍のHER2発現レベルであり、様々な代謝生成物の存在ではないことを強く示すものである。

【0053】

本明細書で使用する場合、「放射性核種」という用語(一般に、放射性同位体または放射性同位元素とも呼ばれる)は、不安定核を有する原子である。これは放射性崩壊して、核放射線(例えば線および/または粒子もしくは粒子などの亜原子粒子)を放出する。一実施形態では、放射性核種は放射免疫治療用途にも有用なもの(例えば粒子放射体)である。放射性核種は八配位構造を有するのが好ましい。本発明において使用するのに好適な放射性核種の例として、ジルコニウム(例えば ^{89}Zr)、ガリウム(例えば ^{67}Ga および ^{68}Ga)、ルテチウム(例えば ^{176}Lu および ^{177}Lu)、ホルミウム(例えば ^{166}Ho)、スカンジウム(例えば ^{44}Sc および ^{47}Sc)、チタン(例えば ^{45}Ti)、インジウム(例えば ^{111}In および ^{115}In)、イットリウム(例えば ^{86}Y および ^{90}Y)、テルビウム、例えば(^{149}Tb 、 ^{152}Tb 、 ^{155}Tb および ^{161}Tb)、テクネチウム(例えば $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、サマリウム(例えば ^{153}Sm)およびニオブ(例えば ^{95}Nb および ^{90}Nb)の各放射性同位体が挙げられる。本発明において使用する放射性核種は、ガリウム(特に ^{67}Ga および ^{68}Ga)、インジウム(特に ^{111}In)およびジルコニウム(特に ^{89}Zr)から選択されてもよい。本発明において使用する放射性核種は、 ^{68}Ga 、 ^{111}In および ^{89}Zr から選択されてもよい。例えば、 ^{68}Ga はDFOに結合することが示されており(Ueda et al (2015) Mol Imaging Biol, vol. 17, pages 102-110を参照)、インジウムはジルコニウムと類似の配位化学構造を有する(したがって、同様に式(I)の化合物に結合すると予測される)。

【0054】

本発明の化合物は、イメージング用途、例えばMRIに使用される非放射性金属錯体化し得ることが当業者には理解される。このような金属の例はガドリニウム(例えば ^{152}Gd)である。

【0055】

上記のように、本発明は、式(I)の化合物またはその薬学的に許容される塩と標的分子とのコンジュゲート体にも関する。

【0056】

本明細書で使用する場合、「標的分子」という用語は、特定の組織または腫瘍を標的とする能力を有する生体分子または生体分子の断片を指す。標的分子は、ポリペプチド、例えば、タンパク質(例えばトランスフェリンなどの輸送タンパク質)、アルブミン(例えば血清アルブミン)または抗体(例えばトラスツズマブ、別名ハーセプチン、ラニビズマブ、ペバシズマブ、フレソリムマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、リツキシマブ、ペルツズマブおよびオファツムマブ)であってもよい。抗体は、ハーセプチン、リツキシマブおよびセツキシマブから選択されてもよい。標的分子は、ペプチド(例えば腫瘍血管新生に関与している細胞を標的するために使用される標的ペプチド、例えば環状RGD配列、

10

20

30

40

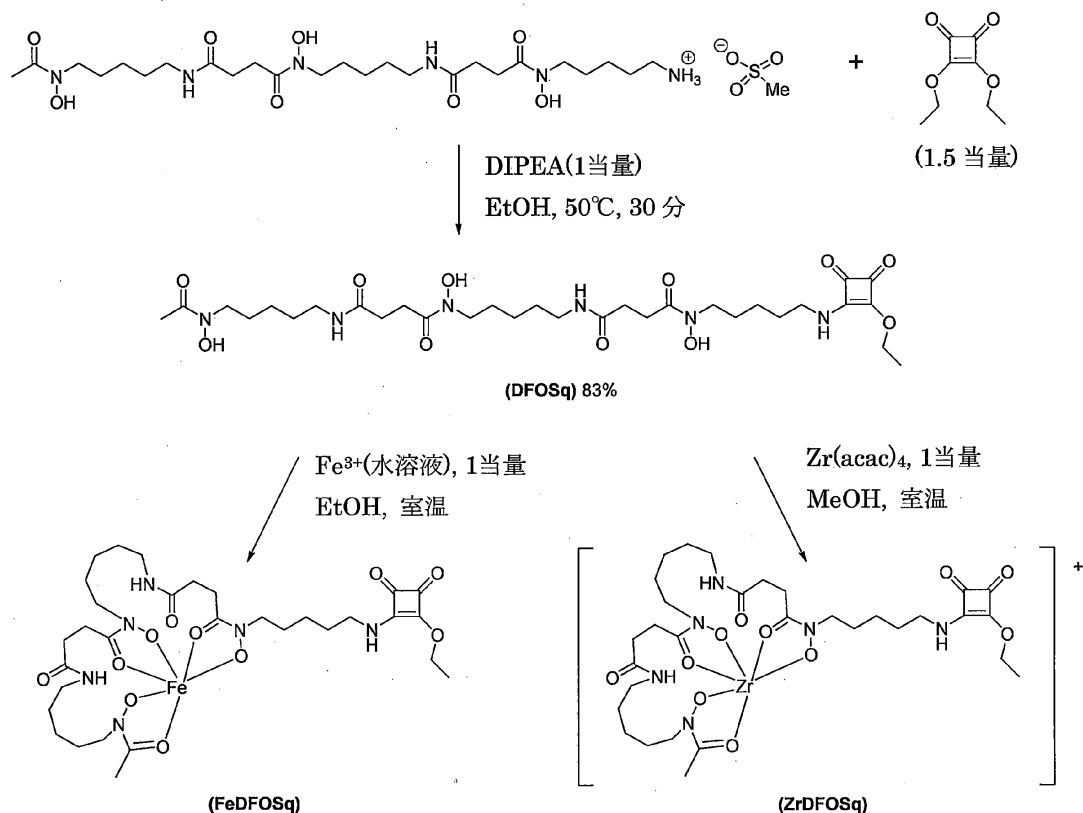
50

または別の標的ペプチド、例えばオクトレオタート、ボンベシンおよび $g l u - N (C O) N - l y s P S M A$) であってもよい。標的分子は、スクアラート部分と反応して、標的分子と式 (I) の化合物との間に共有結合を形成する官能基 (リシン残基のアミノ基など) を有する。このため、コンジュゲート体が形成される。コンジュゲート体は、式 (I) の化合物に錯体化された放射性核種も含み得る。このようにして、式 (I) の化合物またはその薬学的に許容される塩と、標的分子と、式 (I) の化合物またはその薬学的に許容される塩に錯体化された放射性核種との、放射性核種で標識されたコンジュゲート体が生成する。一実施形態では、放射性核種はジルコニウムの放射性同位体 (例えば $^{89} Z r$) である。

【 0 0 5 7 】

式 (I) の化合物と放射性核種との錯体は、当業者に公知の任意の好適な方法で合成することができる。合成法の一例を以下のスキーム 1 に示す。

【 化 5 】



スキーム 1

【 0 0 5 8 】

放射性核種錯体は、当業者に公知の任意の好適な方法で、対象の標的分子とコンジュゲート (して、放射標識されたコンジュゲート体を生成) することができる。好適な方法の一例を以下に記載する：

1 . 標的分子のホウ酸緩衝液溶液を、 $p H 9$ 、反応混合物の最終緩衝濃度が $0 . 5 M$ になるような濃度で調製する。

2 . $D F O S q$ の $4 \% D M S O$ 溶液の $M i l l i Q$ 水溶液 ($D F O S q$ が十分に溶解していることを確実にするために $D M S O$ を最初に添加すべきである) を調製する。

3 . $D F O S q$ 溶液を必要に応じて標的分子に添加し、反応混合物を室温で終夜静置すべきである (反応時間が短いと、標的分子当たりの平均キレーター量が低くなる) 。

4 . コンジュゲート体は、スピンフィルターを適切な分画分子量 (少なくとも $1 k D a$) で使用して精製することができる。初期濾過後、コンジュゲート体をスピンフィルター上で $M i l l i Q$ 中 $4 \% D M S O$ を用いて少なくとも 2 回洗浄し、過剰な全ての $D F O S$

q を除去すべきである。

5. スピンフィルターを使用しての緩衝液交換ステップにより、その後、コンジュゲート体の保管が可能になる（0.9% NaCl 溶液が D F O S q - ハーセプチンに推奨される）。

【0059】

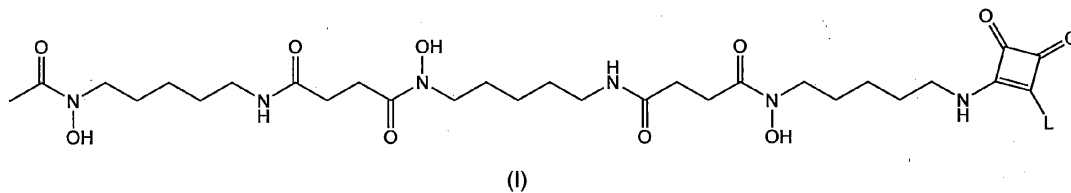
コンジュゲート体は放射性核種の非存在下でも調製され得ることも当業者には明白である。この実施形態では、コンジュゲート体が調製されてから、放射性核種がコンジュゲート体に添加される。

【0060】

本発明は、

- 式 (I) :

【化6】



(式中、L は脱離基である (本明細書に定義したとおり))

の化合物またはその薬学的に許容される塩と、

- 標的分子と、

- 式 (I) の化合物またはその薬学的に許容される塩に錯体化された放射性核種との放射性核種で標識されたコンジュゲート体、ならびに 1 種または複数種の薬学的に許容される担体物質、添加剤および / または補助剤を含む医薬組成物にも関する。

【0061】

医薬組成物には、例えば、1 種または複数種の水、緩衝液 (例えば、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、クエン酸緩衝液および酢酸緩衝液)、エタノール、油、炭水化物 (例えば、グルコース、フルクトース、マンノース、スクロースおよびマンニトール)、タンパク質、ポリペプチドもしくはアミノ酸、例えばグリシン、酸化防止剤 (例えば亜硫酸水素ナトリウム)、等張化剤 (例えば、塩化カリウムおよび塩化カルシウム)、キレート化剤、例えば E D T A もしくはグルタチオン、ビタミン類ならびに / または防腐剤を含めてもよい。

【0062】

医薬組成物は、非経口投与用に製剤されるのが好ましいであろう。「非経口」という用語は、本明細書で使用する場合、皮下、皮内、血管内 (例えば静脈内)、筋肉内、脊髄、頭蓋内、くも膜下腔内、眼内、眼周囲、眼窩内、滑液嚢内および腹腔内の各注射、ならびに任意の類似の注射または注入技術を含む。静脈内投与が好ましい。非経口製剤の好適な成分およびこのような製剤の作製方法は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」をはじめとする種々の文献に詳述されている。

【0063】

本発明の組成物は、通常の方法で非経口的に患者に投与されることになる。その後、D F O - スクアルアミドコンジュゲート錯体は、1 時間 ~ 24 時間のいずれかの時間をかけて、身体全体に分布して標的部位に向かうことができる。望ましい分布が実現したら、患者をイメージングすることになる。

【0064】

したがって、本発明は、

- 上記に定義した放射性核種で標識されたコンジュゲート体を患者に投与するステップと、

- 前記患者をイメージングするステップと

10

20

30

40

50

を含む、患者をイメージングする方法にも関する。

【0065】

本発明は、

- 本明細書に定義した放射性核種で標識されたコンジュゲート体を細胞または *in vitro* 生検サンプルに投与するステップと、

- 細胞または *in vitro* 生検サンプルをイメージングするステップと

を含む、細胞または *in vitro* 生検サンプルをイメージングする方法に関する。

【0066】

標的分子は、コンジュゲート体を、*in vivo* での所望の部位に、または細胞中もしくは生検サンプル中の所望の部位に標的させる役割を果たすのが好ましい。所望の部位は腫瘍であるのが好ましい。

10

【0067】

当然のことながら、任意の特定の患者用の特定の用量レベル、および作用剤が標的部位に到達するのにかかる時間の長さは、使用される特定の化合物の活性、年齢、体重、全体的な健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路および排泄率ならびに治療を受けている特定の障害の重症度を含む種々の要因に依存するであろう。

【0068】

「有効量」という用語は、放射性核種で標識されたコンジュゲート体を患者に投与した後に検出可能な放射線の量になる量を指す。当業者は、放射性核種で標識されたコンジュゲート体をどの程度の量で患者に投与すると、毒性の観点から問題を引き起こすことなく最適なイメージング能力を実現するかがわかるであろう。本発明の放射性核種で標識されたコンジュゲート体は、臨床医が、癌がどこにあるのか（標的、例えば受容体が腫瘍に均質に存在しているかどうかを含む）、癌がどのような処置にตอบสนองするか（これは処置の選択および最適投与量の決定を容易にする）、およびどの程度の量の処置が最終的に標的部位に到達するかを判断するのに補助することに特定の用途がある。本発明の放射性核種で標識されたコンジュゲート体は、特定の標的分子の薬物動態および生体内分布を試験する（例えば、モノクローナル抗体などの新規な生物学的治療剤の薬物開発中において）ために使用することもできる。

20

【0069】

患者として、以下に限定されるものではないが、霊長目、特にヒト、飼われている伴侶動物、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ならびに家畜、例えば、ウシ、ブタおよびヒツジを挙げることができ、投与量は本明細書に記載されている。

30

【0070】

上記のように、本発明の放射性核種で標識されたコンジュゲート体は、腫瘍（細胞の制御不能または進行性の増殖の結果として形成する）をイメージングするのに特に有用である。制御不能に増殖するこのような細胞には良性のものもあるが、「悪性」と呼ばれ、生体の死亡につながる恐れのあるものもある。悪性新生物または「癌」は、活発な細胞増殖を呈することに加えて、周辺組織に侵入し、転移する恐れがあるという点で、良性腫瘍と区別される。さらに、悪性新生物は、分化の喪失が大きく（「脱分化」が大きい）、互いに対するおよびその周辺組織に対する組織化の喪失が大きいことを特徴とする。この特性は、「退形成性」とも呼ばれている。本発明によって処置可能な新生物には、固形相の腫瘍／悪性腫瘍、即ち癌腫、局所進行性の腫瘍およびヒト軟部肉腫も含まれる。癌腫には、周辺組織に浸潤（侵入）し、転移性の癌を引き起こす（リンパ行性転移を含む）、上皮細胞由来の悪性新生物が含まれる。

40

【0071】

腺癌とは、腺組織に由来する癌腫、または認識できる腺状構造を形成する癌腫である。別の広範な分類の癌には、細胞が胎生結合組織のような原線維物質または同質の物質中に埋没している腫瘍である肉腫が含まれる。

【0072】

本発明によるイメージングに適用できる場合がある癌または腫瘍細胞の種類には、例え

50

ば、乳癌、結腸癌、肺癌および前立腺癌、消化管癌（食道癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸直腸新生物に関連するポリープ、膵癌および胆嚢癌を含む）、副腎皮質の癌、A C T H 産生腫瘍、膀胱癌、脳癌（内因性脳腫瘍、神経芽細胞腫、星細胞脳腫瘍、神経膠腫、および中枢神経系の転移性腫瘍細胞侵入を含む）、ユーイング肉腫、頭頸部癌（口腔癌および喉頭癌を含む）、腎癌（腎細胞癌を含む）、肝癌、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌を含む）、悪性の腹水、悪性の胸水、皮膚癌（悪性黒色腫、ヒト皮膚ケラチノサイトの腫瘍進行、扁平上皮癌、基底細胞癌および血管周皮腫を含む）、中皮腫、カボジ肉腫、骨癌（骨腫を含む）および肉腫（線維肉腫および骨肉腫など）、女性生殖器官の癌（子宮癌、子宮内膜癌、卵巣癌、卵胞中の卵巣（生殖細胞）癌および固形腫瘍、陰癌、外陰部の癌、および子宮頸癌を含む）、乳癌（小細胞および乳管）、陰茎癌、網膜芽細胞腫、精巣癌、甲状腺癌、絨毛性新生物ならびにウィルムス腫瘍が含まれる。

10

【0073】

本発明の放射性核種で標識されたコンジュゲート体は、抗癌活性を有する薬物と一緒に投与することも有利な場合がある。この点で好適な薬物の例として、フルオロウラシル、イミキモド、アナストロゾール、アキシチニブ、ペリノスタット、ベキサロテン、ピカルタミド、ボルテゾミブ、ブスルファン、カバジタキセル、カペシタビン、カルムスチン、シスプラチン、ダブラフェニブ、ダウノルビシン塩酸塩、ドセタキセル、ドキソルビシン、エロキサチ（e l o x a t i）、エルロチニブ、エトポシド、エキセメスタン、フルベストラント、メトトレキサート、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、イホスファミド、イリノテカン、イキサベピロン、ラナリドミド（l a n a l i d o m i d e）、レトロゾール、

20

ロムスチン、酢酸メゲストロール、テモゾロミド、ビノレルビン、ニロチニブ、タモキシフェン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ラロキシフェン、ペメトレキセド、ソラフェニブ、サリドマイド、トポテカン、ベルムラフェニブ（v e r m u r a f e n i b）およびピンクリスチンが挙げられる。

【0074】

本発明の放射性核種で標識されたコンジュゲート体は、特定の腫瘍が1種または複数種の受容体を有しているかどうか、したがって患者が特定の治療の恩恵を受けることができるかどうかを判断するためにも使用することができる。例えば、放射標識されたコンジュゲート体中にハーセプチンを標的分子として使用することにより、患者の腫瘍のHER2受容体の存在を試験することができる。腫瘍がHER2陰性である（即ちHER2受容体を有していない）場合、イメージング剤は腫瘍に「付着する」ことがなく、ハーセプチンはその患者に有用な治療になり得ないことを示す。

30

【0075】

当然のことながら、本明細書に開示され、定義されている本発明は、記載されているまたは本明細書もしくは図面から明白な2つ以上の個々の特長の、全ての選択し得る組合せに及ぶものである。これらの異なる組合せの全ては、本発明の種々の選択し得る態様を構成する。

【実施例】

【0076】

試薬および溶媒は全て、標準的な販売元から入手し、特記しない限り、受領したままの状態で使用した。

40

【0077】

^1H スペクトルおよび ^{13}C スペクトルを、Varian FT-NMR 400またはVarian FT-NMR 500（Varian, California USA）を用いて記録した。 ^1H -NMRスペクトルは、400または500 MHzで取得し、 ^{13}C -NMRスペクトルは101または125 MHzで取得した。NMRスペクトルは全て、特記しない限り25℃で記録した。報告された化学シフト（百万分率において）は、残留溶媒シグナルに関して記載されている。

【0078】

非タンパク質サンプルのESI-MSを、Agilent 6510 ESI-TOF

50

LC/MS Mass Spectrometer (Agilent, California USA) で記録した。

【0079】

分析用逆相HPLCをAgilent 1100 Seriesで行った。Agilent 6220 ESI-TOF LC/MS Mass Spectrometerを、Agilent 1200 LCシステムに連結させて(Agilent, Palo Alto, CA) 使用して、タンパク質サンプルを分析した。全てのデータが得られ、参照質量をデュアルスプレーエレクトロスプレーイオン化(ESI) 源によって補正した。データ取得はAgilent Mass Hunter AcquisitionソフトウェアバージョンB.02.01 (B2116.30) を使用して行った。イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化；乾燥ガス流量：7 L / 分；ネブライザー：35 psi；乾燥ガス温度：325 ；キャピラリー電圧(Vcap)：4000 V；フラグメンター：300 V；スキマー：65 V；OCT RFV：250 V；得られたスキャン範囲：300 ~ 3200 m/z；内部基準イオン：陽イオンモード = m/z = 121.050873 および 922.009798。

【0080】

タンパク質の脱塩およびクロマトグラフィーの分離を、Agilent Poroshell C18 2.1 x 75 mm、5 μm カラムを使用し、5% (v/v) アセトニトリルを送液してなくなるまで(0 ~ 5 分) 使用して、行った。サンプルを脱塩した後、流れをESI 源に戻し入れ、次に(5% (v/v) ~ 100% (v/v)) アセトニトリル / 0.1% ギ酸を用いて8分にわたり0.25 mL / 分で勾配溶離を行った。Mass HunterバージョンB.06.00をBioConfirmソフトウェアとともに使用し、最大エントロピータンパク質デコンボリューションアルゴリズム；質量ステップ(mass step) 1 Da；ベースライン係数3.00；不確定に設定したピーク幅を用いて分析を行った。

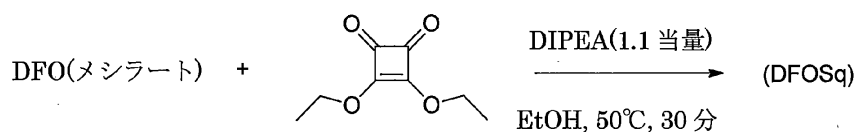
【0081】

サイズ排除HPLCを、Shimadzu SCL-10A VP/LC-10 AT VPシステムとShimadzu SPD-10A VP UV検出器とで行い、次いで放射線検出器(前置増幅器であるOrtec 925-SCINT ACE mate前置増幅器を接続したOrtecモデル276光電子増倍管ベース、BIAS supply and SCA、Bicron 1M 11/2光電子増倍管)で行った。Bio suite 125 HR SEC 5 μm 7.8 x 300 mm カラムを、流速0.6 mL / 分で、溶離液として5% イソプロパノールを含むダルベッコPBSとともに使用した。Raytest Rita-Star TLCスキャナーを使用してラジオ-iTLCを分析した。

【0082】

DFO-スクアルアミド(DFOSq)の合成

【化7】



デスフェリオキサミンBメシラート(0.20 g、0.31 mmol)とDIPEA(0.05 mL、0.3 mmol)との混合物をEtOH(6 mL)中で50 において攪拌した。1時間後、EtOH(9 mL)中3,4-ジエトキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン(0.1 mL、0.7 mmol)を添加した。50 でさらに30分攪拌してから、溶媒を減圧留去し、残渣をEtOH(3 x 10 mL)でトリチュレートした。生成物を真空乾燥して、DFOSqを白色粉末(0.17 g、83%)として得た。

【0083】

^1H NMR (d_6 -DMSO, 500 MHz) 9.61 (s, 6H), 8.77 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.58 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 4.7$ Hz, 5H), 4.64 (p, $J = 6.9$ Hz, 5H), 3.45 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 3.38 (s, 5H), 3.26 (dd, $J = 13.0, 6.6$ Hz, 1H), 3.00 (dd, $J = 12.7, 6.4$ Hz, 10H), 2.56 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 2.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 1.96 (s, 7H), 1.50 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.42 - 1.31 (m, 3H), 1.24 (ddd, $J = 20.2, 14.7, 8.0$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (d_6 -DMSO, 101 MHz) 189.39, 189.30, 182.05, 181.84, 176.93, 176.47, 172.58, 172.17, 171.97, 171.30, 170.13, 70.18, 68.77, 68.73, 47.09, 47.01, 46.79, 43.68, 43.39, 39.52, 38.42, 30.10, 29.90, 29.60, 28.82, 27.56, 26.04, 25.82, 23.50, 22.92, 20.35, 15.64; HRMS ESI $[M+H]^+$: 685.3768, ($C_{31}H_{53}N_6O_{11}$) $^+$ の計算値: 685.3767, $[M+Na]^+$: 707.3589, ($C_{31}H_{52}NaN_6O_{11}$) $^+$ の計算値: 707.3586。

10

【0084】

放射標識

Na_2CO_3 水溶液 (2 M、4.5 μL) を、 ^{89}Zr の 1 M シュウ酸 (10 MBq、10 μL) 溶液に、pH が増加して 10 になるまで添加した。次いで HEPES 緩衝液 (0.5 M、pH 7、50 μL) を添加し、この溶液を 5 分間静置した。中性 pH を確認し、次いで DFOSq の DMSO (1 μL 、0.18 μmol) 溶液を添加した。1 時間後、反応完了をラジオ - iTLC (シリカ注入ガラス繊維プレート、20 mM pH 5 クエン酸緩衝液、生成物 $R_f = 0$) および SEHPLC (BioSuite 125、5 μm HR SEC 7.8 \times 300 mm カラム、溶離液として 5% i-PrOH を含む 20 mM pH 7 ダルベッコ PBS、0.6 mL/分、生成物保持時間 21.80 分) によって確認した。

20

【0085】

ラジオ - iTLC

対照 (即ち DFOSq なし) のクロマトグラムが図 4 に示されている。これは、DFOSq が存在しない場合、ジルコニウムを含有する溶液が溶媒先端とともに動く (予測どおり) ことを示している。

30

【0086】

^{89}Zr DFOSq 錯体のクロマトグラム (^{89}Zr の添加から 60 分後) が図 5 に示されている。これは、ジルコニウムが DFOSq に錯体化されているため、この場合はジルコニウムが基線 (即ち「原点」) に保持されていることを示している。

【0087】

サイズ排除 HPLC

対照の UV - Vis クロマトグラム (280 および 254 nm の 2 つの異なる吸収波長での) および放射線クロマトグラム (検出器としてガイガー計数管を使用して取得) が図 6 に示されている。

40

【0088】

^{89}Zr DFOSq 錯体の UV - Vis クロマトグラムおよび放射線クロマトグラム (^{89}Zr の添加から 78 時間後) が図 7 に示されている。

【0089】

 ^{89}Zr DFOSq - cRGDFK の合成および分析

DFOSq (5 mg、7 μmol) の DMSO (35 μL) 溶液を pH 9 ホウ酸緩衝液 (0.5 M、965 μL) 中 cRGDFK (3 mg、5 μmol) に添加した。反応混合物を室温で 5 日間静置し、次いでセミ分取 HPLC (ProteCol C18 カラム)

50

で精製してDFOSq - cRGDFKを白色固体 (0 . 0 0 2 g、3 2 %) として得た。

【 0 0 9 0 】

HRMS ESI [M + H ⁺] : 6 0 4 . 3 1 9 6、(C ₂₇ H ₄₂ N ₉ O ₇) ⁺ の計算値 : 6 0 4 . 3 2 0 2、[M + 2 H ⁺] : 3 0 2 . 6 6 3 7、(C ₂₇ H ₄₃ N ₉ O ₇) ₂ ⁺ の計算値 : 3 0 2 . 6 6 3 8。

【 0 0 9 1 】

放射標識するため、Na₂CO₃水溶液 (2 M、4 . 5 μ L) を、⁸⁹Zrの1 M シュウ酸 (1 0 M B q、1 0 μ L) 溶液に、pHが増加して10になるまで添加した。次いでHEPES緩衝液 (0 . 5 M、pH 7、5 0 μ L) を添加し、この溶液を5分間静置した。中性pHを確認し、次いでDFOSq - cRGDFKのH₂O溶液 (1 0 μ L、0 . 0 0 8 μ m o l) を添加した。70分後、反応完了をラジオ - iTLC (シリカ注入ガラス繊維プレート、溶離液として0 . 1 M pH 6 クエン酸緩衝液、生成物R_f = 0) によって確認した。

【 0 0 9 2 】

⁸⁹Zr 標識DFOSq - cRGDFKのラジオ - iTLCクロマトグラム (⁸⁹Zr の添加から60分後に取得) が図8に示されている。

【 0 0 9 3 】

⁸⁹Zr DFOSq - トランスフェリンの合成および分析

DFOSq (0 . 1 7 m g、0 . 2 5 μ m o l) のDMSO / H₂O (1 : 1 0、2 6 μ L) 溶液をヒトホロ - トランスフェリン (1 . 0 m g、0 . 0 1 3 μ m o l) のpH 9 ホウ酸緩衝液 (0 . 5 M、9 7 4 μ L) 溶液に添加した。反応混合物を室温で17時間静置し、次いでAmicon 10 k D a 遠心分離フィルターを使用して濾過した。粗生成物をNaCl溶液 (0 . 9 % w / v、2 × 4 0 0 μ L) で洗浄し、濃縮物を回収してDFOSq - トランスフェリン (1 . 2 5 m g、0 . 0 1 2 μ m o l) を得た。生成物をLCMS (Agilent Poroshell C18 5 μ m 2 . 1 7 5 m m カラム) で分析し、その分析により、トランスフェリン (T f) と2 ~ 8 個のキレーターとの混合物および平均4 . 5 個のキレーター / タンパク質が示された (図9を参照) 。

【 0 0 9 4 】

放射標識するために、Na₂CO₃水溶液 (2 M、1 0 μ L) を、⁸⁹Zrの1 M シュウ酸 (1 . 2 M B q、2 0 μ L) 溶液に、pHが増加して10になるまで添加した。次いでHEPES緩衝液 (0 . 5 M、pH 7、3 0 μ L) を添加し、この溶液を5分間静置した。中性pHを確認し、次いでDFOSq - T f の0 . 9 % NaCl (2 μ L、1 0 0 μ g) 溶液を添加した。20分後、反応が完了し、これをラジオ - iTLC (シリカ注入ガラス繊維プレート、溶離液として0 . 1 M pH 6 クエン酸緩衝液、生成物R_f = 0) およびSEHPLC (BioSuite 125、5 μ m HR SEC 7 . 8 × 3 0 0 m m カラム、溶離液として5 % i P r O H を含む2 0 m M pH 7 ダルベッコPBS、生成物保持時間12 . 5 6 分) によって確認した。

【 0 0 9 5 】

⁸⁹Zr 標識DFOSq - T f のラジオ - iTLCクロマトグラム (⁸⁹Zr の添加から20分後に取得) が図10に示されている。

【 0 0 9 6 】

⁸⁹Zr 標識DFOSq - T f のUV - Visクロマトグラムおよび放射線クロマトグラム (⁸⁹Zr の添加から20分後) が図11に示されている。

【 0 0 9 7 】

B T 4 7 4 腫瘍担持マウスにおける⁸⁹Zr DFOSq - ハーセプチンの合成および分析 - 試験1

DFOSq (0 . 4 6 m g、0 . 6 7 μ m o l) のDMSO / H₂O (1 : 1 0、2 2 8 μ L) 溶液を臨床グレードのトラスツズマブ (5 . 0 m g、0 . 0 3 4 μ m o l) の溶液に添加し、反応混合物を周囲温度でpH 9 ホウ酸緩衝液 (0 . 5 M、総体積1 . 0 m L) に入れて静置した。16時間後、この溶液を、Amicon 5 0 k D a 遠心分離フィ

10

20

30

40

50

ルターを使用して濃縮した。次いでフィルターを使用して、粗生成物をNaCl/DMSO溶液(0.9%w/v NaCl、5%DMSO、4×400μL)で洗浄し、次いでNaCl溶液(0.9%w/v、400μL)で洗浄し、濃縮物を回収して、DFOSq-ハーセプチン(1.4mg、0.0093μmol、28%)を得た。生成物をLCMS(Agilent Poroshell C18 5μm 2.1×75mmカラム)で分析し、その分析により、ハーセプチン(Herc)と2~7個のキレーターとの混合物および平均4.5個のキレーター/抗体が示された(図12を参照)。

【0098】

放射標識するために、Na₂CO₃水溶液(2M、25μL)を、⁸⁹Zrの1Mシュウ酸(55MBq、75μL)溶液に、pHが増加して10になるまで添加した。次いでHEPES緩衝液(0.5M、pH7、100μL)を添加し、この溶液を5分間静置した。中性pHを確認し、次いでDFOSq-Hercの0.9%NaCl(4μL、225μg)溶液を添加した。25分後、反応完了をラジオ-iTLC(シリカ注入ガラス繊維プレート、溶離液として0.1M pH6クエン酸緩衝液、生成物R_f=0)によって確認した。反応混合物を、PD-10サイズ排除カラムにおいて、溶離液としてpH7のPBS(20mM、5%ゲンチジン酸ナトリウムを含む)を使用して精製した。カラム充填後、素通り画分を廃棄し、第1の画分(1.5mL、45MBq)を回収した。生成物をラジオ-iTLCおよびSEHPLC(BioSuite 125、5μm HRES EC 7.8×300mmカラム、溶離液として5% iPrOHを含む20mM pH7ダルベッコPBS、生成物保持時間12.55分)で分析した。

【0099】

⁸⁹Zr標識DFOSq-Hercのラジオ-iTLCクロマトグラム(⁸⁹Zrの添加から25分後に取得)が図13に示されている。

【0100】

精製した⁸⁹Zr標識DFOSq-Hercのラジオ-iTLCクロマトグラムが図14に示されている。

【0101】

非放射性(即ち非標識の)DFOSq-HercのUV-Visクロマトグラムおよび放射線クロマトグラムが図15に示されている。

【0102】

⁸⁹Zr標識DFOSq-HercのUV-Visクロマトグラムおよび放射線クロマトグラム(精製から24時間後に取得)が図16に示されている。

【0103】

⁸⁹Zr DFOSq-ハーセプチンを使用したマウスイメージング

5%ゲンチジン酸ナトリウム(200μL、6.0MBqずつ)を含む⁸⁹Zr DFOSq-ハーセプチンの20mM PBS(pH7)溶液を2用量調製し、BT474腫瘍担持マウスに尾静脈注射によって投与した。PET画像を、投与後22時間、46時間、94時間および8日の間隔で取得した(図17および18を参照)。

【0104】

下表(表1)に各マウスの各時点での標準取込値(SUV)を記載している。

【0105】

【表 1】

表1. ^{89}Zr DFOSq-ハーセプチンを使用したBT474 腫瘍担持マウスの腫瘍の最大標準
取込値(SUV)

投与後の時点	マウス1 SUV _{max}	マウス2 SUV _{max}
22 時間	10.76	11.62
46 時間	16.17	16.24
94 時間	21.97	25.79
8 日	31.73	37.21

10

【0106】

比較試験も行い、腫瘍イメージング剤としての本発明の化合物（特に ^{89}Zr （DFOSq-スクアラート-トラスツズマブ））の有効性を、他の2種のイメージング剤（ ^{89}Zr （DFOSq-マレイミド-トラスツズマブ）および ^{90}Zr （DFOSq-マレイミド-トラスツズマブ））と比較した。 ^{89}Zr （DFOSq-マレイミド-トラスツズマブ）は、50倍過剰のDFOSq-マレイミドを水に溶解し、これをPBS緩衝液中トラスツズマブ（ハーセプチン）に添加して調製した。未反応のDFOSq-マレイミドをスピン濾過によって除去し、精製したコンジュゲート体を、DFOSq-スクアラートについて上に記載したように ^{89}Zr （ox）₄で放射標識した。

20

【0107】

HER2陽性腫瘍を有するマウスに、5%ゲンチジン酸ナトリウム（200μL、6.0MBqずつ）を伴う、 ^{89}Zr （DFOSq-スクアラート-トラスツズマブ）、 ^{89}Zr （DFOSq-マレイミド-トラスツズマブ）または ^{89}Zr （DFOSq-マレイミド-トラスツズマブ）を含有する20mM PBS（pH7）溶液2用量を注射した。PET画像を、 ^{89}Zr （DFOSq-スクアラート-トラスツズマブ）で処置したマウスについては投与後22時間、46時間、94時間および8日の間隔で取得し、 ^{89}Zr （DFOSq-マレイミド-トラスツズマブ）で処置したマウスおよび ^{89}Zr （DFOSq-マレイミド-トラスツズマブ）で処置したマウスについては24時間で取得した（それぞれ図1、2および3を参照）。

【0108】

BT474腫瘍担持マウスにおいて ^{89}Zr DFOSq-ハーセプチンを使用したイメージング試験 - 試験2

30

トラスツズマブ（2mg）をpH9.0ホウ酸緩衝液（0.5M、355μL）に希釈し、DFOSqのDMSO（1mg/mL、45μL、5当量）溶液を添加した。この混合物を周囲温度で40時間インキュベートし、50kDa Amiconスピンフィルターを使用して精製し、4%DMSOの生理食塩水溶液（3×300μL）で洗浄し、次いで生理食塩水のみ（300μL）で洗浄した。精製したコンジュゲート体のESI-MS分析により、0~5個のキレーター-結合および平均2個のキレーター/mAbが示された。精製したDFOSq-トラスツズマブ溶液を直ちに使用して放射標識した。

【0109】

DFOSq-トラスツズマブの ^{89}Zr 放射標識

40

^{89}Zr の1Mシュウ酸（150MBq、112μL）溶液をMilliQ水（250μL）で希釈し、pHが増加して7になるまでNa₂CO₃水溶液（2M、32.5μL）を少量ずつ添加した。次いでHEPES緩衝液（0.5M、pH7、120μL）を添加し、この溶液を5分間静置した。0.9%NaCl（56μL、675μg）中DFOSq-トラスツズマブを添加した。30分後、反応完了をラジオ-TLC（シリカ注入ガラス繊維プレート、溶離液として0.1M pH6クエン酸緩衝液、生成物R_f=0）によって確認した。反応混合物を、PD-10サイズ排除カラムにおいて、溶離液としてpH7ダルベッコPBS（20mM、5%ゲンチジン酸ナトリウムを含む）を使用して精製した。カラム充填後、素通り画分を廃棄し、2つの画分（画分A：0.5mL、画分B

50

: 1.0 mL、90.2 MBq)を回収した。画分BをSE-HPLC (BioSuite 125、5 μ m HR SEC 7.8 \times 300 mmカラム、溶離液として5% iPrOHを含む20 mM pH7ダルベッコPBS、生成物保持時間約12.5分)で分析した。

【0110】

^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブ：マウスPETイメージング (BT474)

4用量 (7.5 MBqずつ)を、精製したmAb溶液から引き上げ、BT474腫瘍担持NOD/SCIDマウスに投与した。PETイメージングを24時間、48時間および96時間時点で行った。96時間で生体内分布データを取るためにマウスを処分した。

【0111】

【表2】

表2. ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブを使用したBT474 腫瘍担持マウスの腫瘍最大標準取込値 (SUV)

	マウス ID #3	マウス ID #5	マウス ID #6	マウス ID #7
24 時間	8.7	11.4	12.2	9.5
48 時間	11.6	14.4	12.9	11.0
96 時間	10.8	11.5	9.9	9.1

【0112】

SKOV3またはLS174T腫瘍担持マウスにおける ^{89}Zr -DFOSq-ハーセプチンの合成、分析およびイメージング試験

DFOSqのトラスツズマブへのコンジュゲート

トラスツズマブ (10 mg)をpH9.0ホウ酸緩衝液 (0.5 M、1.5 mL)に希釈し、DFOSqのDMSO (2 mg/mL、455 μ L、16当量)溶液を添加した。この混合物を周囲温度で終夜インキュベートし、50 kDa Amiconスピンフィルターを使用して精製し、4% DMSOの生理食塩水 (2 \times 300 μ L)溶液で洗浄し、次いで生理食塩水のみ (300 μ L)で洗浄した。精製したコンジュゲート体のESI-MS分析により、1~6個のキレーター-結合および平均3.4個のキレーター/mAbが示された。精製したDFOSq-トラスツズマブ溶液を4℃で8~9日間保管してから放射標識した。

【0113】

DFOSq-トラスツズマブの ^{89}Zr 放射標識

^{89}Zr の1 Mシュウ酸 (150 MBq、195 μ L)溶液をMilliQ水 (350 μ L)で希釈し、pHが増加して8になるまで Na_2CO_3 水溶液 (2 M、65 μ L)を少量ずつ添加した。次いでHEPES緩衝液 (0.5 M、pH7、200 μ L)を添加し、この溶液を5分間静置した。0.9% NaCl (8 μ L、675 μ g)中DFOSq-トラスツズマブを添加した。1時間後、反応完了をラジオ-iTLC (シリカ注入ガラス繊維プレート、溶離液として0.1 M pH6クエン酸緩衝液、生成物 $R_f = 0$)によって確認した。反応混合物を、PD-10サイズ排除カラムにおいて、溶離液としてpH7ダルベッコPBS (20 mM、5%ゲンチジン酸ナトリウムを含む)を使用して精製した。カラム充填後、素通り画分を廃棄し、第1の画分 (1.0 mL、54 MBq)を回収した。生成物をSE-HPLC (BioSuite 125、5 μ m HR SEC 7.8 \times 300 mmカラム、溶離液として5% iPrOHを含む20 mM pH7ダルベッコPBS、生成物保持時間約12.5分)によって分析した。

【 0 1 1 4 】

^{89}Zr の 1 M シュウ酸 (1 4 5 M B q 、 1 9 5 μL) 溶液を M i l l i Q 水 (4 0 0 μL) で希釈し、pH が増加して 1 0 になるまで Na_2CO_3 水溶液 (2 M 、 7 5 μL) を少量ずつ添加した。次いで H E P E S 緩衝液 (0 . 5 M 、 pH 7 、 2 5 0 μL) を添加し、この溶液を 5 分間静置した。0 . 9 % NaCl (8 μL 、 6 7 5 μg) 中 D F O S q - トラスツズマブを添加した。1 . 5 時間後、反応完了をラジオ - i T L C (シリカ注入ガラス繊維プレート、溶離液として 0 . 1 M pH 6 クエン酸緩衝液、生成物 $R_f = 0$) によって確認した。反応混合物を、P D - 1 0 サイズ排除カラムにおいて、溶離液として pH 7 ダルベッコ P B S (2 0 m M 、 5 % ゲンチジン酸ナトリウムを含む) を使用して精製した。カラム充填後、1 m L の素通り画分を廃棄し、第 1 の画分 (1 . 0 m L 、 4 7 M B q) を回収した。生成物を S E H P L C (B i o S u i t e 1 2 5 、 5 μm H R S E C 7 . 8 \times 3 0 0 m m カラム、溶離液として 5 % i P r O H を含む 2 0 m M pH 7 ダルベッコ P B S 、生成物保持時間約 1 2 . 5 分) によって分析した。1 1 分時点でのシグナルは、放射標識前の保管中の振動により生じた抗体の凝集によるものと推定される。

10

【 0 1 1 5 】

^{89}Zr - D F O S q - トラスツズマブ : マウス P E T イメージング (S K O V 3)

3 用量 (7 . 5 M B q ずつ) を、精製した m A b 溶液から引き上げ、S K O V 3 腫瘍担持 N O D / S C I D マウスに投与した。P E T イメージングを 2 4 時間、4 8 時間および 9 6 時間時点で行った。9 6 時間で生体内分布データを取るためにマウスを処分した。

20

【 0 1 1 6 】

【表 3】

表 3. ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブを使用した SKOV3 腫瘍担持マウスの腫瘍標準取込値 (SUV)

	マウス 1	マウス 2	マウス 4
24 時間	5.27	6.32	4.68
48 時間	6.78	7.37	5.80
96 時間	4.87	7.59	4.97

30

【 0 1 1 7 】

【表 4】

表 4. ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブを使用した SKOV3 マウスの生体内分布データ。
値は%ID/g で表す。

器官	マウス ID #1	マウス ID #2	マウス ID #4	平均	SD	SEM
血液	1.10	1.78	0.47	1.12	0.65	0.33
肺	4.17	3.30	1.96	3.14	1.11	0.56
心臓	1.32	1.67	6.38	3.12	2.83	1.41
肝臓	9.26	11.02	9.60	9.96	0.94	0.47
腎臓	3.53	4.07	3.14	3.58	0.47	0.23
筋肉	0.55	0.57	0.34	0.49	0.13	0.06
脾臓	77.40	106.48	118.20	100.69	21.00	10.50
腫瘍	15.81	18.26	12.37	15.48	2.96	1.48

10

【0118】

^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブ：マウス PET イメージング (LS174T)

3 用量 (7.5 MBq ずつ) を、精製した mAb 溶液から引き上げ、LS174T 腫瘍
担持 BALB/c ノードマウスに投与した。PET イメージングを 24 時間、48 時間お
よび 96 時間時点で行った。96 時間で生体内分布データを取るためにマウスを処分した
。

20

【0119】

【表 5】

表 5. ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブを使用した LS174T 腫瘍担持マウスの腫瘍標準取込値

	マウス 5	マウス 6	マウス 7
24 時間	3.10	3.32	3.07
48 時間	3.70	3.73	4.04
96 時間	4.72	5.32	5.65

30

【0120】

【表 6】

表 6. ^{89}Zr -DFOSq-トラスツズマブを使用した LS174T マウスの生体内分布データ。
値は%ID/g で表す。

器官	マウス ID #5	マウス ID #6	マウス ID #7			
血液	12.82	12.24	11.49	12.18	0.66	0.38
肺	7.99	7.04	7.38	7.47	0.48	0.28
心臓	4.85	4.41	4.61	4.62	0.22	0.13
肝臓	6.37	7.88	4.58	6.28	1.65	0.95
腎臓	6.24	8.78	6.06	7.03	1.52	0.88
筋肉	1.34	1.37	1.23	1.31	0.08	0.04
脾臓	17.89	5.53	6.50	9.97	6.88	3.97
腫瘍	13.11	12.47	13.67	13.08	0.60	0.35

10

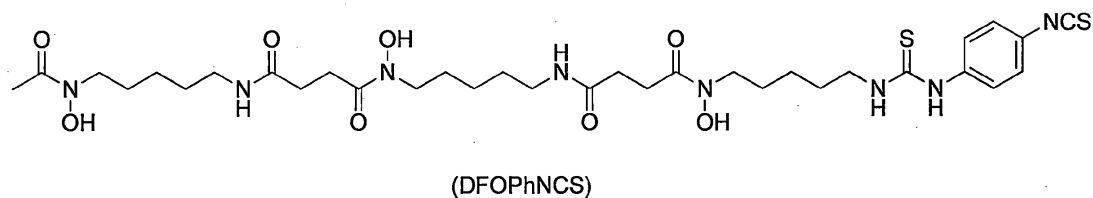
【 0 1 2 1 】

S K O V 3 腫瘍担持マウスにおける ^{89}Zr D F O - P h - N C S - ハーセプチンの合
成、分析およびイメージング試験

20

D F O P h N C S の合成

【化 8】



30

デスフェリオキサミン (203 mg、0.309 mmol) を $i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3
2 : 3 mL) 中で攪拌し、 $\text{Ph}(\text{NCS})_2$ (271 mg、1.41 mmol) の CHCl_3
(20 mL) 溶液を添加した。トリエチルアミン (100 μL 、0.717 mmol)
) を直ちに添加し、反応混合物を周囲温度で 1.5 時間攪拌した。 HCl (0.1 M、2
5 mL) を添加し、有機層を分離した。溶媒を蒸発させてベージュ色固体を得、これを CH_2Cl_2
でトリチュレートした。残留固体を濾別し、乾燥させて DFOPhNCS を白
色粉末 (207 mg、89%) として得た。ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 753.34、(
 $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2$) $^+$ の計算値 : 753.34。分析用 HPLC : 方法 A、保持
時間 8.95 分。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{dms-}d_6$) : 7.98 (s, 1H),
7.78 (s, 2H), 7.57 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 8$
.9 Hz, 2H), 3.52 - 3.39 (m, $J = 13.9$, 7.0 Hz, 8H), 3.
00 (dd, $J = 12.7$, 6.5 Hz, 4H), 2.61 - 2.54 (m, $J = 3.9$
Hz, 4H), 2.31 - 2.24 (m, $J = 10.4$, 5.4 Hz, 4H), 1.96
(s, 3H), 1.59 - 1.45 (m, $J = 22.1$, 14.6, 7.3 Hz, 8H)
, 1.42 - 1.33 (m, 4H), 1.30 - 1.16 (m, $J = 18.8$, 15.3
, 7.1 Hz, 8H)。

40

【 0 1 2 2 】

DFOPhNCS のトラスツズマブへのコンジュゲート

手順は Vosjan, M. J. W. D.; Perk, L. R.; Visser, G. W.
. M.; Budde, M.; Jurek, P.; Kiefer, G. E.; van Do

50

ngen, G. A. M. S., Nat. Protocols 2010, 5(4), 739-743のとおりに従った。

【0123】

トラスツズマブ(3.03mg)を生理食塩水(1mL)に希釈し、この溶液を0.1M Na_2CO_3 でpH9に調整した。DMSO(2.3mg/mL、20 μL)中3倍過剰のDFOPhNCsを、小分けにして継続的に緩やかに振盪させながらmAb溶液に添加した。この混合物を37℃において550rpmで30分間インキュベートし、PD-10カラムにおいて、溶離液としてゲンチジン酸(5mg/mL)/酢酸ナトリウム(0.25M)緩衝液(pH5.5)を使用して精製した。精製したDFOPhNCs-mAb溶液を-20℃で5日間保管してから放射標識した。コンジュゲート体のESI-MS分析により、0~1個のキレーター結合および平均0.2個のキレーター/mAbが示された。

10

【0124】

DFOPhNCs-トラスツズマブの ^{89}Zr 放射標識

手順はVosjan, M. J. W. D. et al(上記)のとおりに従った。

【0125】

Na_2CO_3 (2M、90 μL)を ^{89}Zr (200 μL 、55MBq)のシュウ酸(1M)溶液に添加した。この混合物を周囲温度で3分間、緩やかに振盪させながらインキュベートした。次に、HEPES緩衝液(0.5M、pH7.2、300 μL)、次いでDFOPhNCs-トラスツズマブ溶液(710 μL)、次いでHEPES緩衝液(0.5M、pH7.0、700 μL)を添加した。反応混合物を、周囲温度で頻繁に緩やかに振盪しながらインキュベートした。iTLC分析(溶離液として20mMクエン酸、pH5)を様々な時点で行い、放射標識の進行をモニターした(1時間:30%標識、1.5時間:53%標識、2時間:%標識)。

20

【0126】

2時間の反応時間後、混合物を、新たに作製した酢酸ナトリウム(0.25M)/ゲンチジン酸(5mg/mL)緩衝液、pH5~6を用いて調整したPD-10カラムを使用して精製した。精製した ^{89}Zr -DFOPhNCs-トラスツズマブ(1mL、21.8MBq)をiTLCおよびSEC-HPLCによって分析した。

【0127】

^{89}Zr -DFOPhNCs-トラスツズマブ:マウスPETイメージングSKOV3

3用量(3.5MBqずつ)を、精製したmAb溶液から引き上げ、SKOV3腫瘍担持NOD/SCIDマウスに投与した。PETイメージングを24時間、48時間および96時間時点で行った。96時間で生体内分布データを取るためにマウスを処分した。

30

【0128】

【表 7】

表 7. ^{89}Zr -DFOPhNCS-トラスツズマブを使用した SKOV3 マウスの生体内分布データ

マウス #	時間	SUV _{max}	Tmax: バック グラウンド平均	肝臓平均	Tmax: 肝臓平均	骨 平均	Tmax: 骨平均
16	24	3.53	3.41	0.39	1.34	0.17	3.09
	48	3.47	4.26	0.37	1.41	0.18	2.88
	96	2.20	4.24	0.41	1.03	0.21	2.02
28	24	5.48	3.96	0.51	1.61	0.19	4.26
	48	5.89	5.12	0.47	1.91	0.18	4.86
	96	4.19	6.09	0.42	1.89	0.21	3.72
33	24	5.30	4.07	0.53	1.48	0.17	4.70
	48	4.62	3.71	0.50	1.40	0.17	4.20
	96	3.86	5.36	0.60	1.23	0.22	3.37

【0129】

競争試験 1

DFO-cRGDFK 誘導体の合成

炭酸ナトリウム溶液を使用して、cRGDFK (100 μL 、2 mg、2 μmol) の水溶液の pH を 9 まで増加させた。DMSO (100 μL 、2 当量) 中 DFOSq の pH 9 ホウ酸緩衝液 (0.5 M、100 μL) 溶液である。反応混合物を室温で終夜静置し、次いでセミ分取 HPLC (ProteCol C18 カラム、 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 、0.1 % TFA) によって精製し、凍結乾燥して、DFOSq-cRGDFK を白色固体として得た。同様の手順を使用して DFOPhNCS-cRGDFK を DFO-Ph-NCS から調製したが、沈殿したため、精製する前にこれを遠心分離し、可溶性の物質のみを精製した。各 DFO-cRGDFK 誘導体の水溶液を等濃度で調製し、これを Fe^{3+} 滴定によって UV-Vis 分光法 (425 nm) を使用して確認した。

【0130】

競争実験

^{89}Zr (2 μL 、約 2 MBq) の 1 M シュウ酸溶液を H_2O (50 μL) で希釈し、2 M Na_2CO_3 (1 μL) を使用して中和し、次いで pH 7.4 の HEPES 緩衝液 (5 μL) で緩衝した。次いで、緩衝した Zr 溶液少量 (5 μL) を各 DFO-cRGDFK 溶液 (50 μL ずつ) に添加した。20 分後、反応完了をラジオ-iTLC で確認した。各サンプルを標準として HPLC (Phenomenex Luna カラム) に供した。DFOPhNCS-cRGDFK 配位子は 20.1 分で溶出し、Zr 錯体は 18.5 分で溶出する (図 39)。DFOSq-cRGDFK 配位子は 18.0 分で溶出し、Zr 錯体は 15.5 分で溶出する (図 40)。DFOSq-cRGDFK 配位子溶液中の未同定の不純物も 18.0 分で溶出したが、これに Zr は結合していなかった。

【0131】

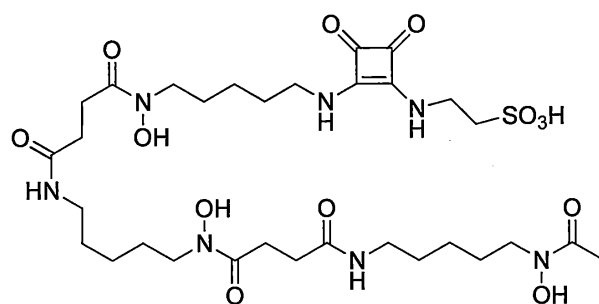
両配位子の等濃度の溶液 (40 μL ずつ) を調製し、完全に混合し、緩衝した Zr 溶液 5 μL を添加した。45 分後に反応混合物を HPLC によって分析し、その分析により、専ら ZrDFOSq-cRGDFK 錯体のみが形成されていることが示された (図 41)。

【0132】

競争試験 2

DFO-SO₃H 誘導体の合成: DFOSqTaur

【化 9】



(DFOSqTaur)

10

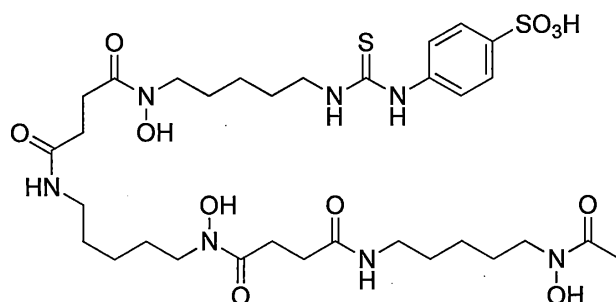
トリエチルアミン少量（５滴）をタウリン（１８ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）の H_2O 溶液に添加した。DFOSq（１００ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ）をDMSOに溶解し、タウリン溶液に添加し、反応混合物を周囲温度で終夜撹拌した。この溶媒を蒸発させ、粗製物質を緩やかに加熱しながら H_2O に溶解し、未反応のDFOSqはいずれも遠心分離で除去した。溶媒を蒸発させて白色粉末を得た。図４２および４３は、DFOSqTaurの 1H NMRおよびESI-MSスペクトルを示している。

【 0 1 3 3 】

20

DFO- SO_3H 誘導体の合成：DFOPh SO_3H

【化 10】

(DFOPhSO₃H)

30

トリエチルアミン少量（５滴）を、イソチオシアン酸４-スルホフェニルナトリウム塩一水和物（３８ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ）のMeOH溶液に添加した。DFOMesレート（１００ｍｇ、０．１５ｍｍｏｌ）をこの溶液に添加し、溶解性を高めるために H_2O （１ｍＬ）を添加した。反応混合物を周囲温度で終夜撹拌した。溶媒を蒸発によって除去し、粗製白色粉末をMeOHで４０℃において完全に洗浄して、生成物を白色粉末として得た。図４４および４５は、DFOPh SO_3H の 1H NMRおよびESI-MSスペクトルを示している。

40

【 0 1 3 4 】

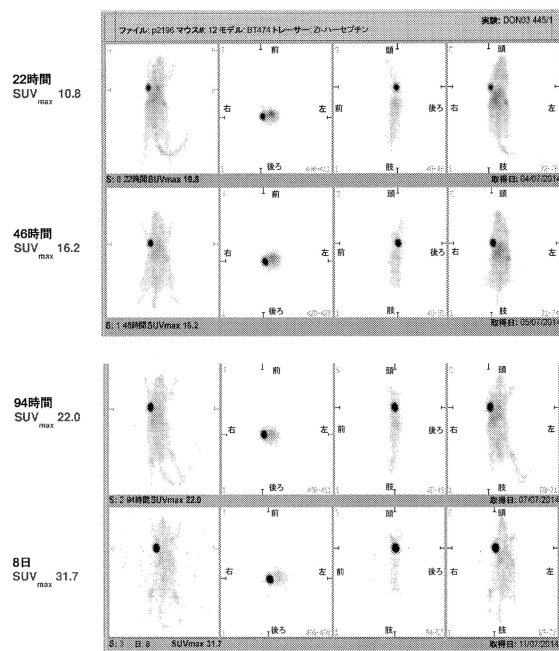
競争実験

各配位子、即ちDFOPh SO_3H およびDFOSqTaurの３ｍＭストック溶液を H_2O とMeOHとの混合液中で調製した（希釈する前に、濃度をUV-Vis H_2O 中 Fe^{3+} 滴定によって確認した、４３０nm）。両溶液（２５μLずつ）の混合物を完全に混合し、５０℃まで加熱した。ZrCl₄（THF）₂の H_2O /MeOH（３ｍＭ）中ストック溶液も調製し、この２０μLを配位子混合物に添加した。この混合物を５０℃で７時間インキュベートした。この混合物の７時間でのESI-MS分析（図４６）により、ZrDFOSqTaur錯体（図４６）、 $[M]^+m/z$ （計算値）＝８５０．２

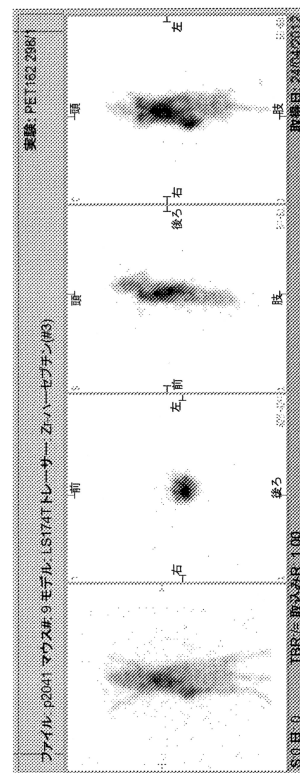
50

2 の存在が示された。

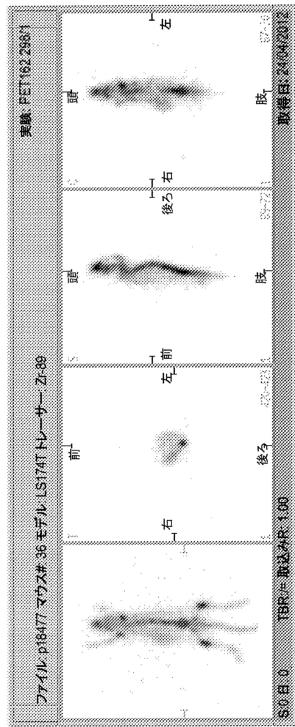
【図 1】



【図 2】

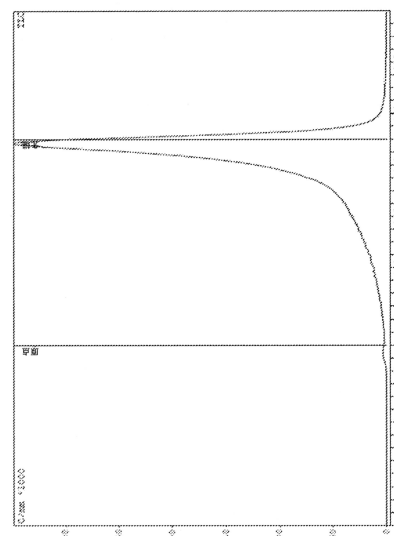


【図3】

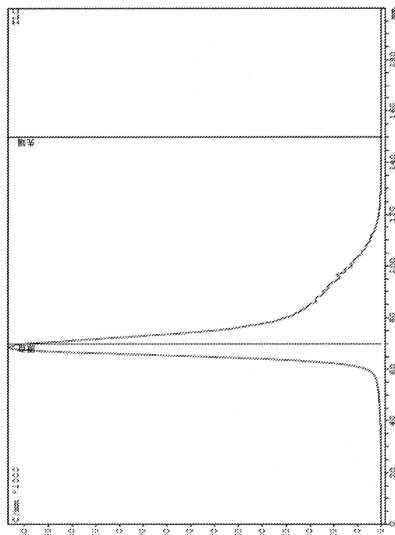


24時間

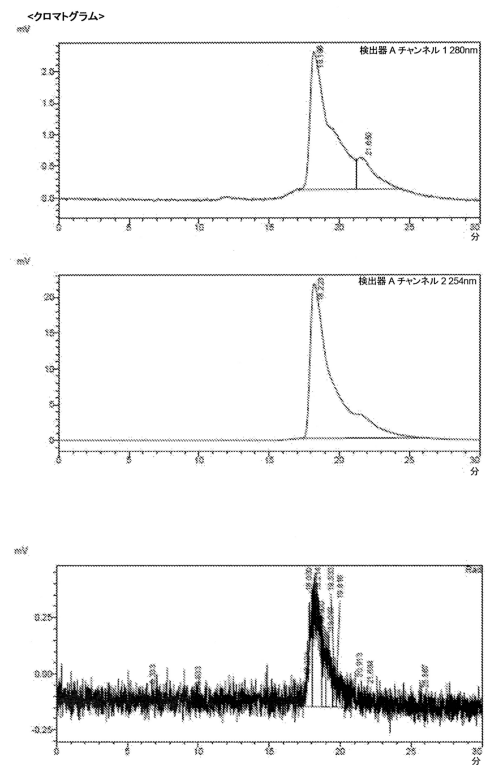
【図4】



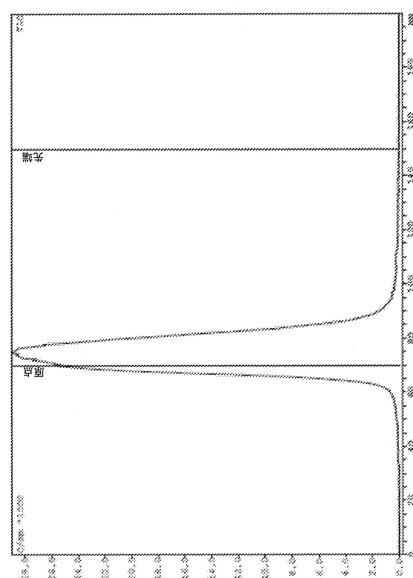
【図5】



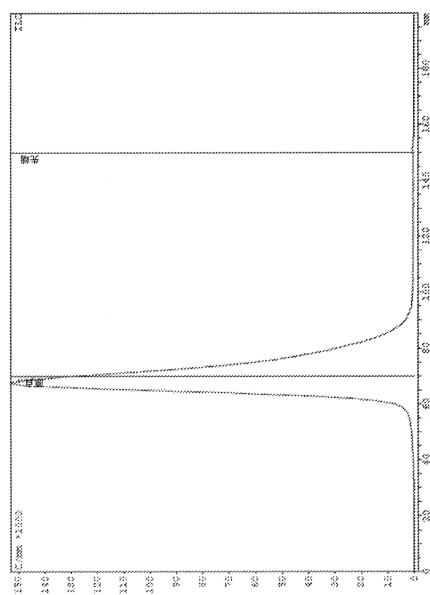
【図6】



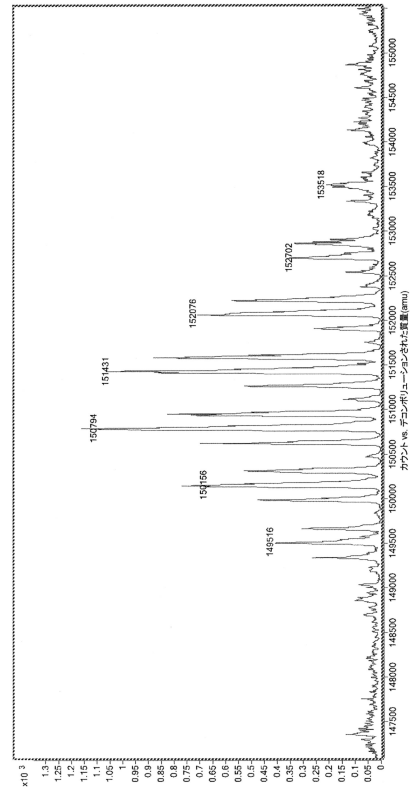
【 図 8 】



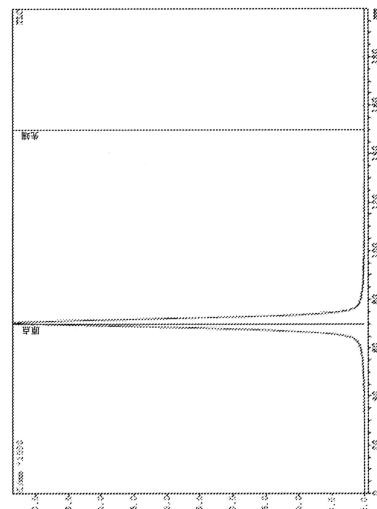
【 ㄨ 1 0 】



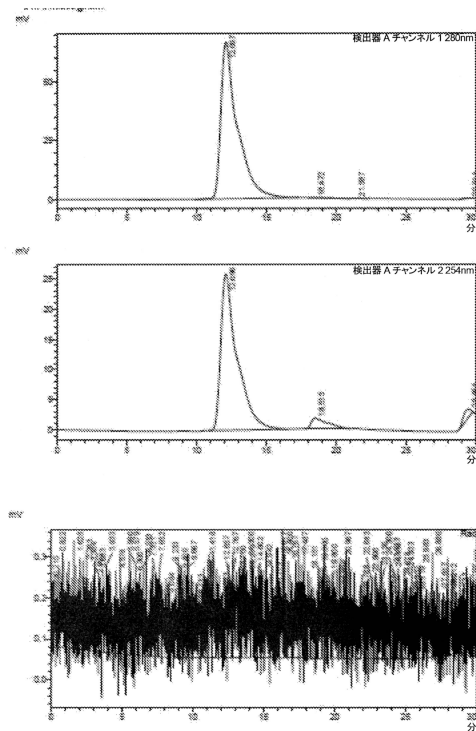
【圖 12】



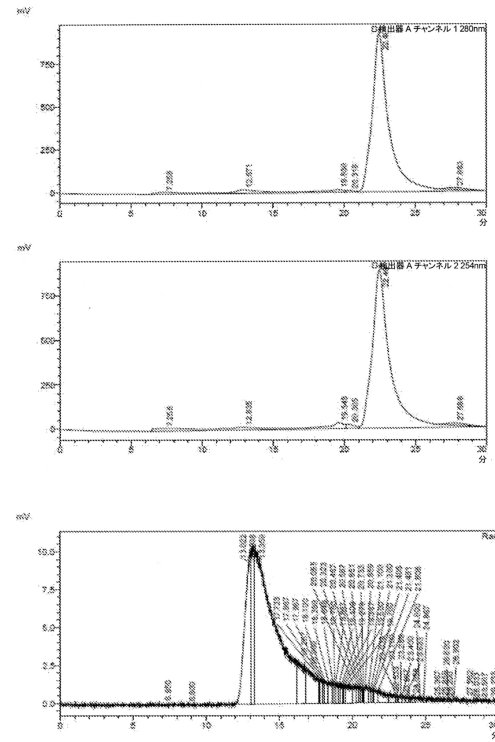
【 図 1 4 】



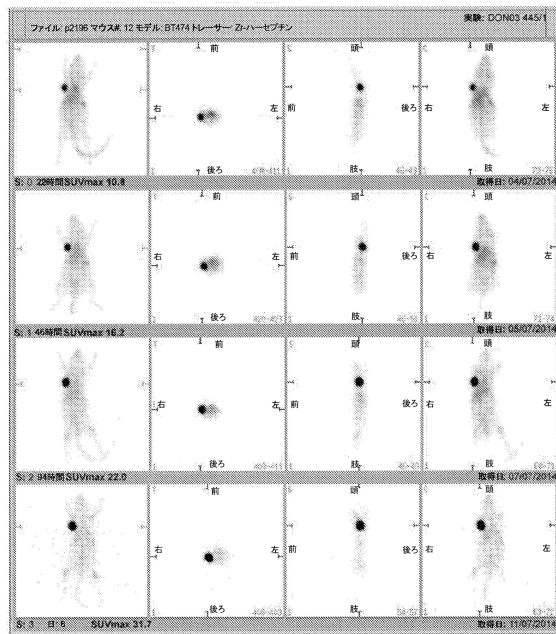
【図15】



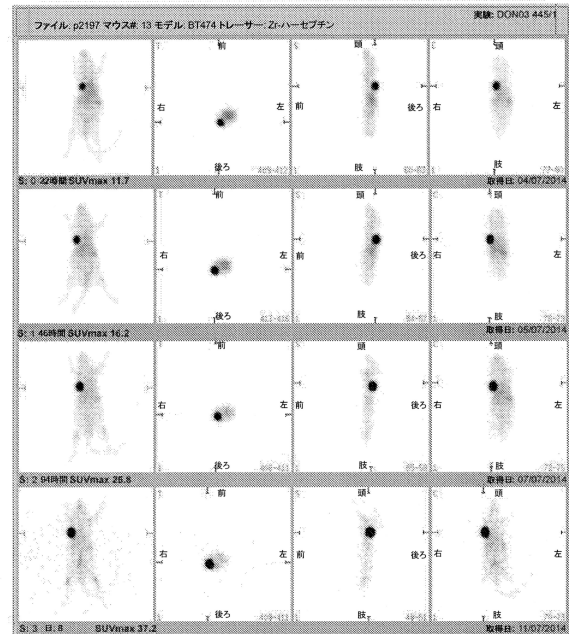
【図16】



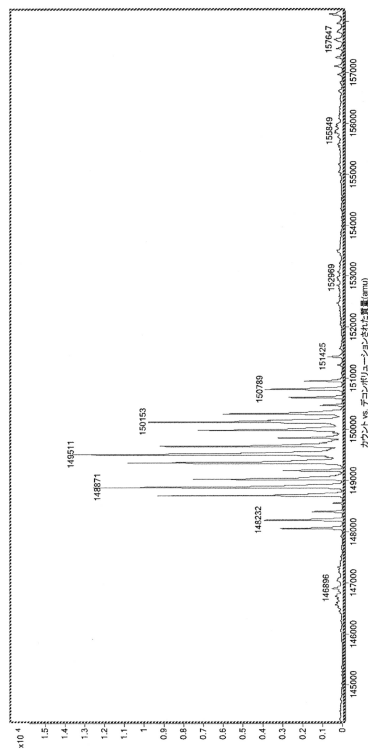
【図17】



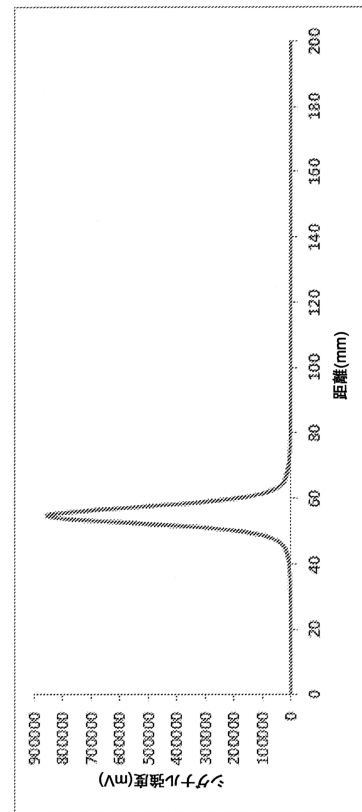
【図18】



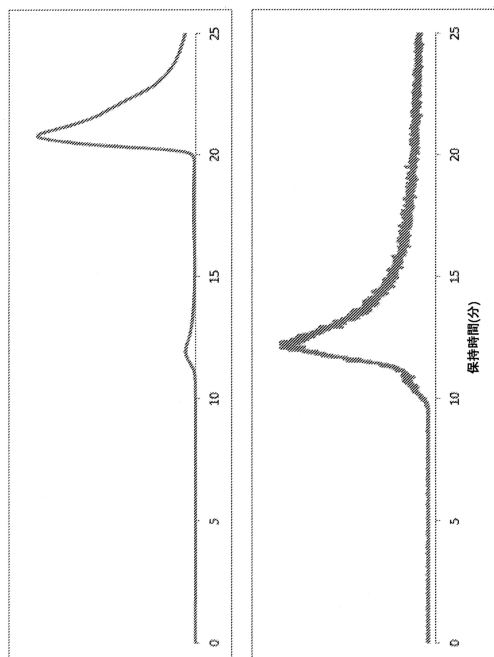
【図 19】



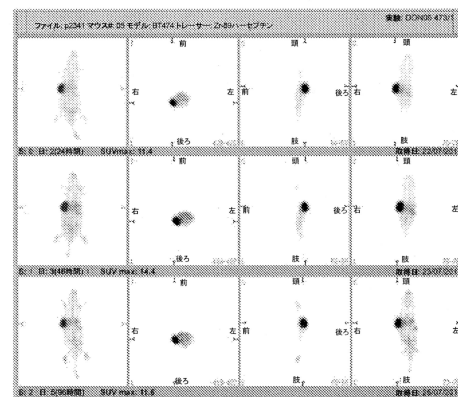
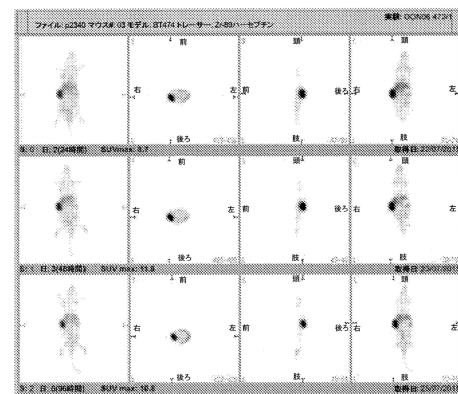
【図 20】



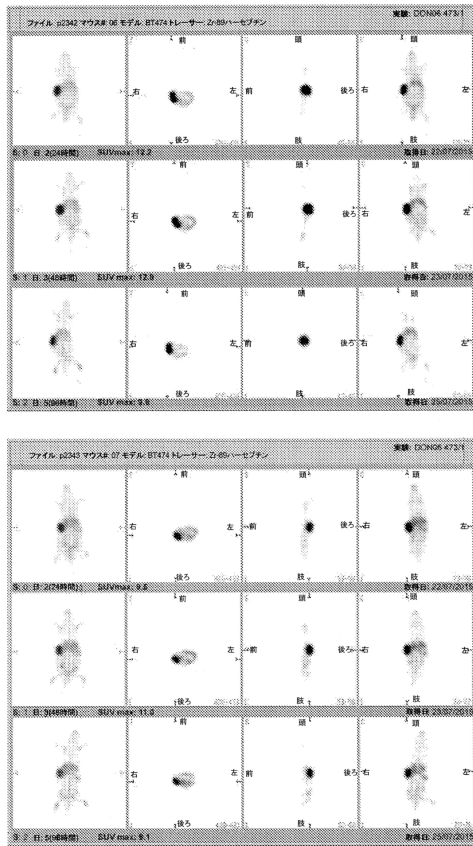
【図 21】



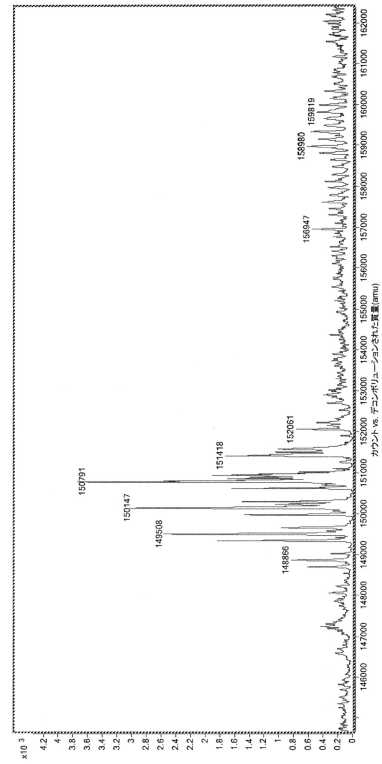
【図 22 - 1】



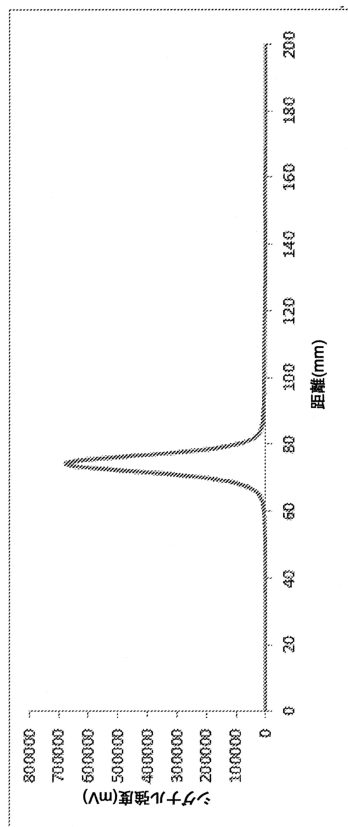
【図 22 - 2】



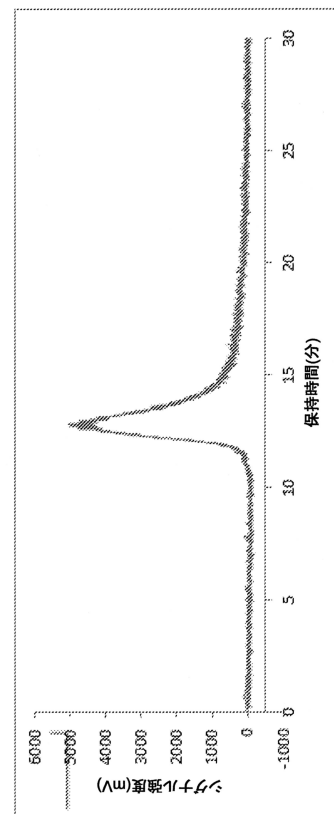
【図 23】



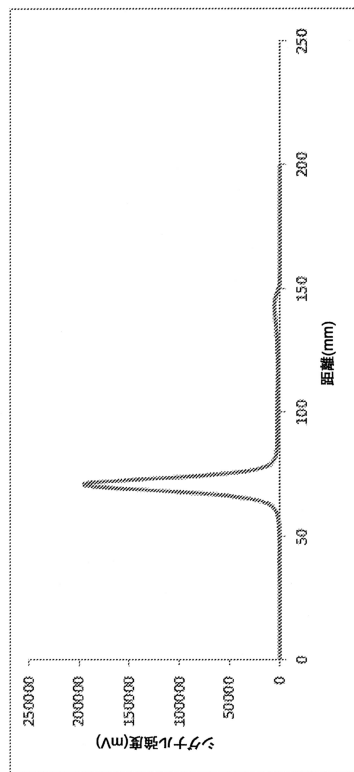
【図 24】



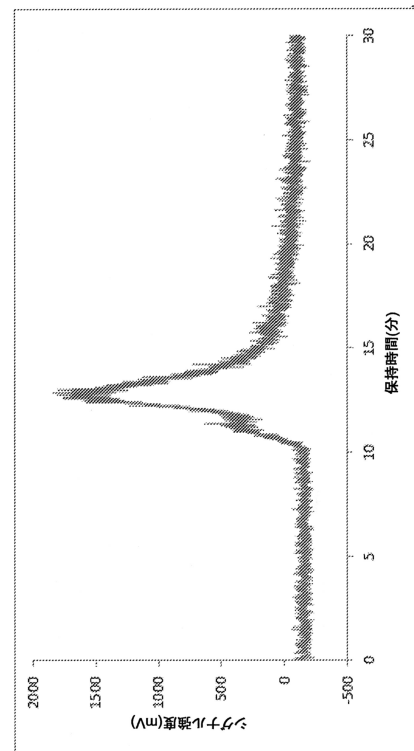
【図 25】



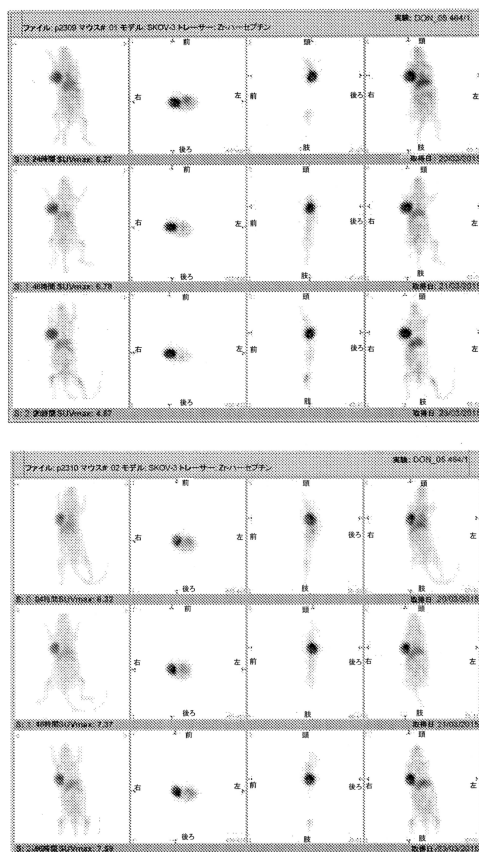
【図 26】



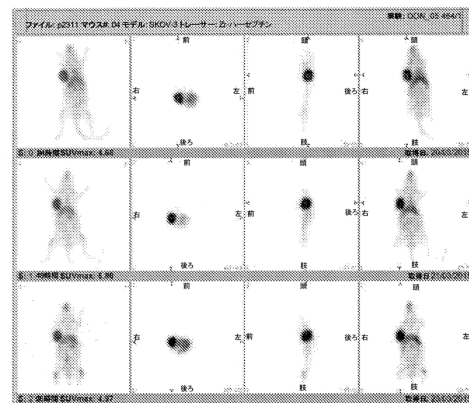
【図 27】



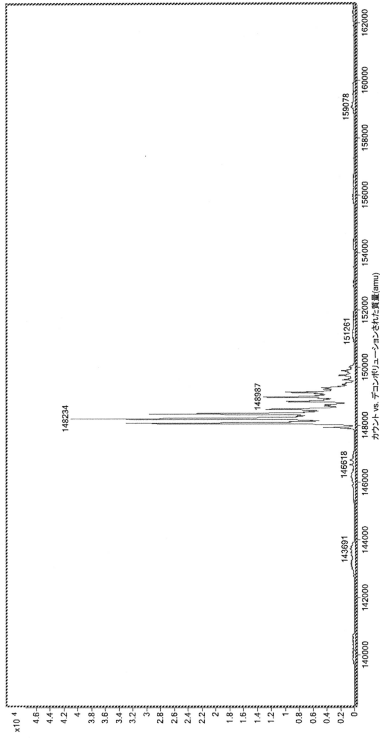
【図 28 - 1】



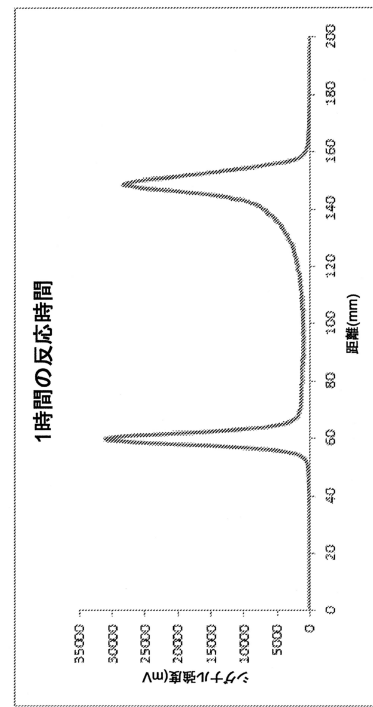
【図 28 - 2】



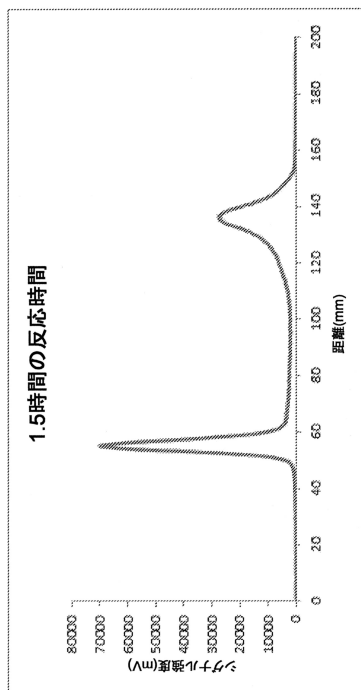
【図 3 3】



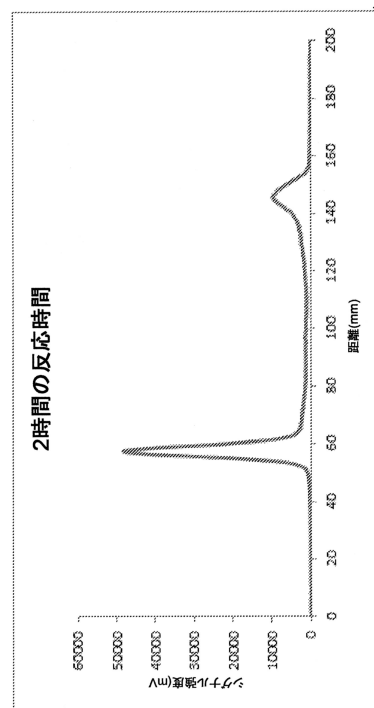
【図 3 4 a】



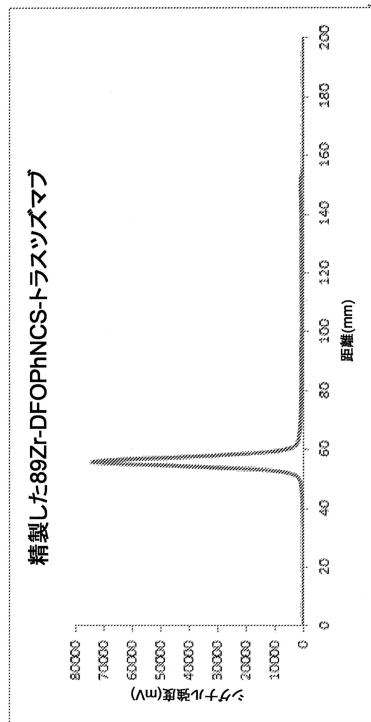
【図 3 4 b】



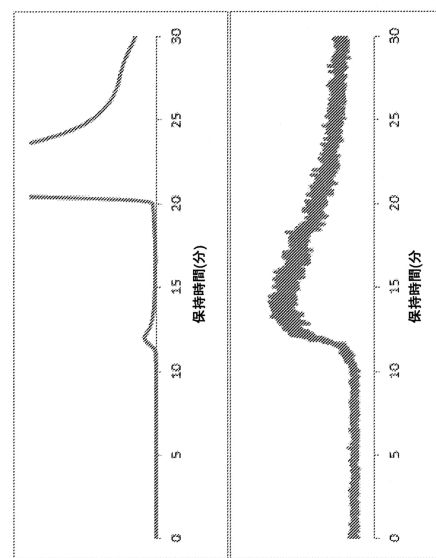
【図 3 4 c】



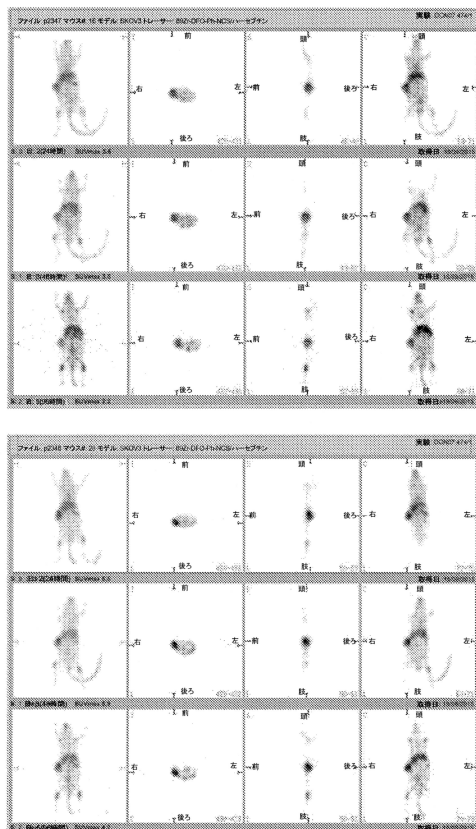
【図 35】



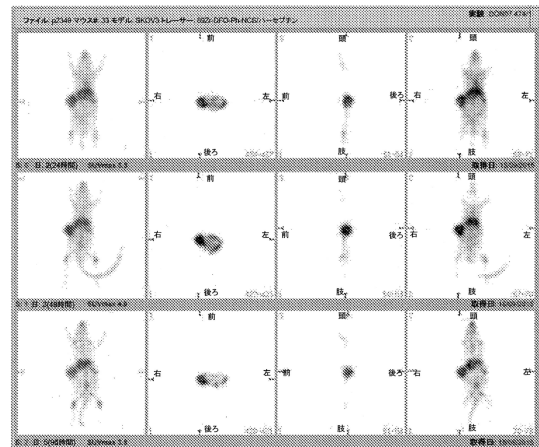
【図 36】



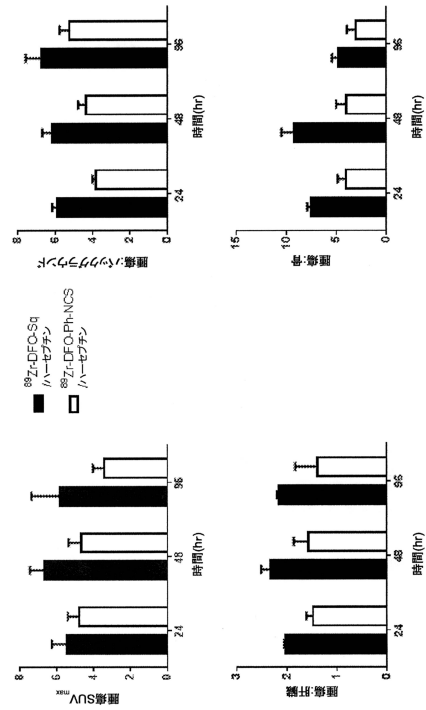
【図 37 - 1】



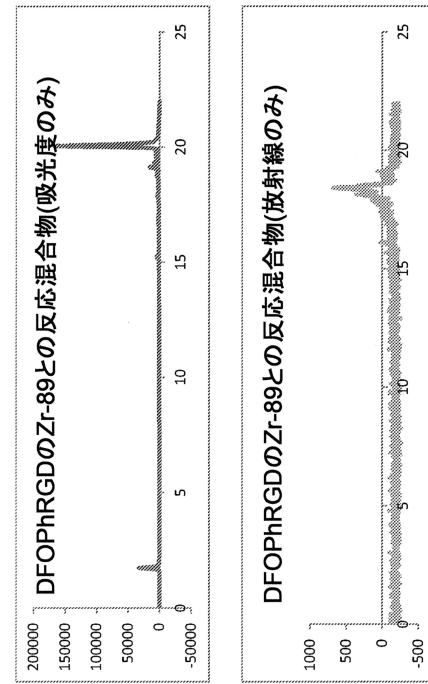
【図 37 - 2】



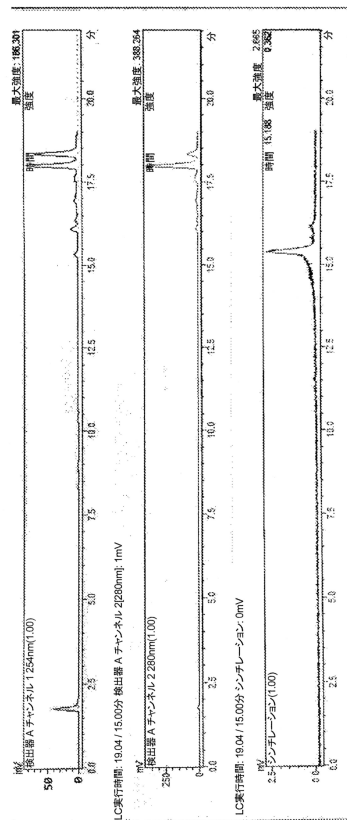
【図 38】



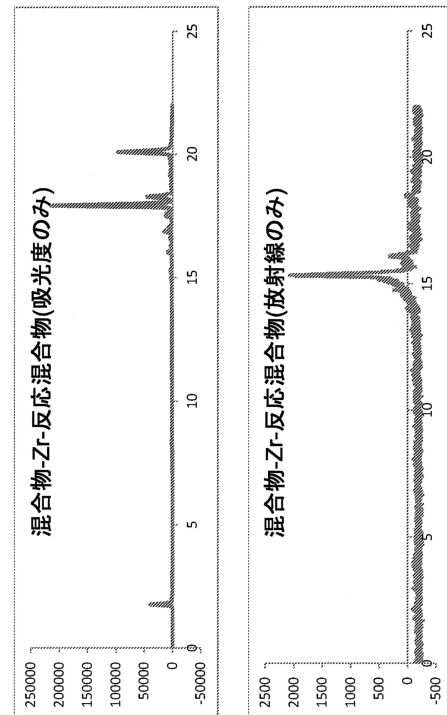
【図 39】



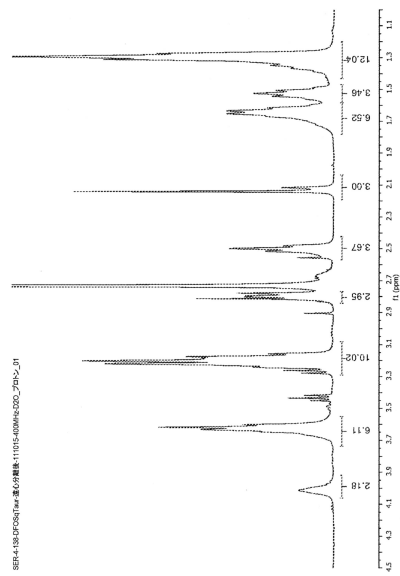
【図 40】



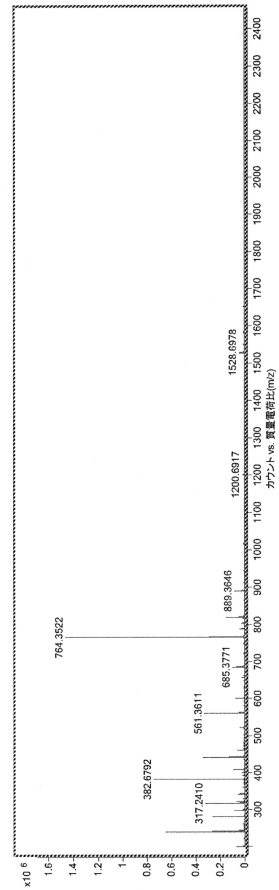
【図 41】



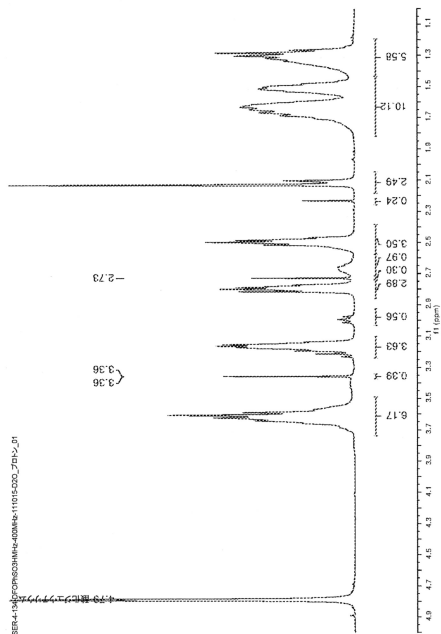
【図 4 2】



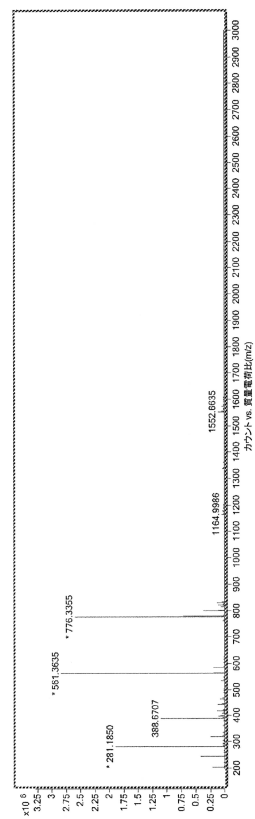
【図 4 3】



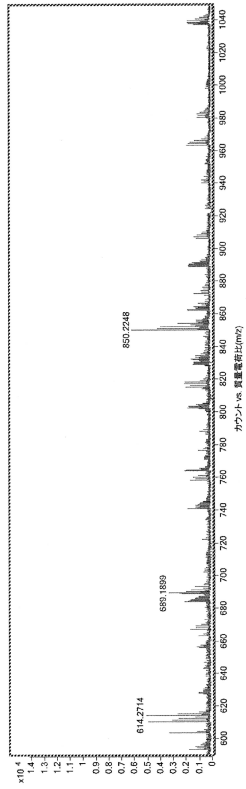
【図 4 4】



【図 4 5】



【図 46】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 51/10 (2006.01) A 6 1 K 51/10 2 0 0

(72)発明者 ポール・スティーブン・ドネリー
 オーストラリア・3 0 6 7・ヴィクトリア・ブランズウィック・イースト・エルシー・ミューズ・
 2 2

(72)発明者 ステイシー・エリン・ルッド
 オーストラリア・3 0 0 0・ヴィクトリア・メルボルン・フリンダース・ストリート・1 2 1 6 /
 2 3 8

(72)発明者 スペンサー・ジョン・ウィリアムズ
 オーストラリア・3 0 5 8・ヴィクトリア・コーバーク・プレストン・ストリート・3 2

審査官 東 裕子

(56)参考文献 特表2 0 1 3 - 5 1 0 0 9 3 (J P , A)
 特表2 0 1 0 - 5 2 2 7 2 7 (J P , A)
 PERK,Lars R. , EUR.J.NUCL.MED.MOL.IMAGING , 2 0 1 0 年 , 37 , 250-259
 ZEGLIS,Brian M. , BIOCONJUGATE CHEM. , 2 0 1 1 年 , 22 , 2048-2059
 YOGANATHAN,Sabesan , ORGANIC AND BIOMOLECULAR CHEMISTRY , 2 0 1 1 年 , 9 , 2133-2141

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 0 7 C
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)