

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年4月4日(04.04.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/065774 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 5/00 (2006.01) *C07K 7/00* (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01) *G01T 1/161* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/035786
- (22) 国際出願日: 2018年9月26日(26.09.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2017-185484 2017年9月26日(26.09.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 千葉大学
 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION)

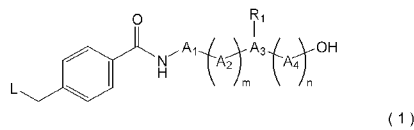
CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

- (72) 発明者: 荒野 泰 (ARANO, Yasushi); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 薬学研究院内 Chiba (JP). 上原 知也 (UEHARA, Tomoya); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 薬学研究院内 Chiba (JP). 鈴木 博元 (SUZUKI, Hiroyuki); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院 薬学研究院内 Chiba (JP).

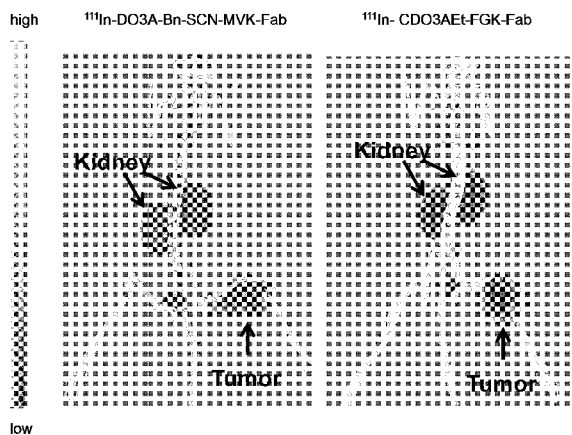
(74) 代理人: 平澤 賢一, 外 (HIRASAWA, Kenichi et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門三丁目2

(54) Title: RADIOACTIVE DRUG

(54) 発明の名称: 放射性薬剤



[図12]



(57) Abstract: The present invention relates to a compound or the like which can be labeled with a wide variety of atoms, including atoms having a relatively large atomic radius, and which can give a radioactive drug with which accumulation in the kidneys can be reduced from an early stage of administration. The present invention includes: [1] a compound or the like represented by formula (1); [2] a compound or the like obtained by bonding a target molecule recognition element to a compound described in [1]; [3] a metal complex compound or the like having one type of metal selected from the

WO 2019/065774 A1

5 番 2 号 虎ノ門 E S ビル 7 階 特許業務
 法人大谷特許事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

group consisting of radioactive metals and radioactive atom-labeled metals, and the compound or the like described in [1] or [2] which are coordinated to the metal; [4] a drug for preparing a radioactive drug, which includes the compound or the like described in [1] or [2]; [5] a use for producing a radioactive drug of the compound or the like described in [1] or [2]; [6] a radioactive drug including the metal complex compound or the like described in [3]; [7] a radiotherapeutic agent including the metal complex or the like described in [3]; and [8] a radioactive diagnostic imaging agent or the like including the metal complex compound or the like described in [3].

(57) 要約：比較的大きな原子半径を有する原子を含め多様な原子による標識が可能であり、腎臓への集積を投与早期から低減できる放射性薬剤が得られる化合物等に関する。〔1〕式(1)で表される化合物等、〔2〕上記〔1〕に記載の化合物等に、標的分子認識素子を結合させてなる化合物等、〔3〕放射性金属及び放射性原子標識金属からなる群から選ばれる1種の金属と、前記金属に配位した〔1〕又は〔2〕に記載の化合物等と、を有する金属錯体化合物等、〔4〕上記〔1〕又は〔2〕に記載の化合物等を含む、放射性薬剤の調製用薬剤、〔5〕上記〔1〕又は〔2〕に記載の化合物等の放射性薬剤の製造のための使用、〔6〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物等を含む、放射性薬剤、〔7〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物等を含む放射線治療薬及び〔8〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物等を含む放射性画像診断薬。

明 細 書

発明の名称 : 放射性薬剤

技術分野

[0001] 本発明は、新規化合物、それを含む放射性薬剤、及び当該放射性薬剤の調製用薬剤等に関する。

背景技術

[0002] 放射性同位元素(RI)標識抗体等の放射性薬剤は、抗体の高い特異性と親和性を利用して、RIを腫瘍選択的に集積することが可能である。このため、アイソトープ治療などの放射線治療や画像診断に利用されている(非特許文献1)。しかしながら放射性薬剤を生体に投与すると、標的組織への特異的な集積の他に腎臓への非特異的な集積が観察される。腎臓への放射活性の集積(以下「腎集積」ともいう)は、RI標識低分子ペプチドが腎臓に取り込まれた後、リソソームに運ばれ、代謝された後に生成する放射性代謝物が腎臓に残存することに起因する。

これに対して、特許文献1では、腎臓への集積を投与早期から低減できる放射性標識薬剤として、NOTA(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸)等のキレート試薬と結合したポリペプチド部位を有する化合物及びそれを用いた放射性薬剤が報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1 : 国際公開W02017/150549号

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : Molecular Oncology 8: 799-812, 2014

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 特許文献1の放射性薬剤によれば、ガリウム-67や、テクネチウム-99mの放射性同位元素を使用できる。しかしながら、現在、治療用の放射性同位元素

として汎用されているルテチウム-177、イットリウム-90への応用やそのコンパニオン薬剤となるインジウム-111等の比較的大きな原子半径を有する原子を含め多様な原子への応用が可能な標識薬剤は開発されていない。

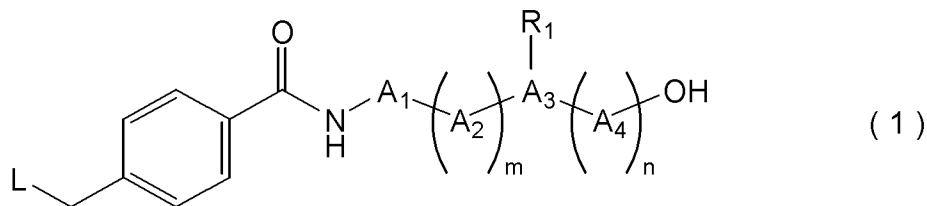
そこで本発明は、比較的大きな原子半径を有する原子を含め多様な原子による標識が可能であり、腎臓への集積を低減できる放射性薬剤が得られる化合物等に関する。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、以下の実施形態に関する。

[1] 下記式(1)で表される化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[化1]



[式中、

A_1 、 A_2 は、それぞれ独立にアミノ酸残基であり、

m は、0～3の整数であり、

A_3 は、側鎖にアミノ基又はカルボキシ基を有するアミノ酸残基であり、

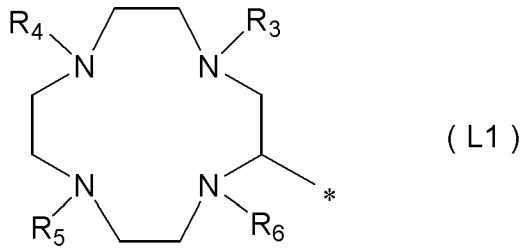
A_4 は、アミノ酸残基であり、

n は、0～3の整数であり、

R_1 は、 A_3 の側鎖のアミノ基又はカルボキシ基と結合し、標的分子認識素子又はその連結基と結合可能な官能基を有する基、又は、 A_3 の側鎖のアミノ基若しくはカルボキシ基の水素原子であり、ただし、 R_1 は、環構成原子の一つとして A_3 の側鎖のアミノ基の窒素原子を含む炭素数3～10の複素環基を形成していてもよく、

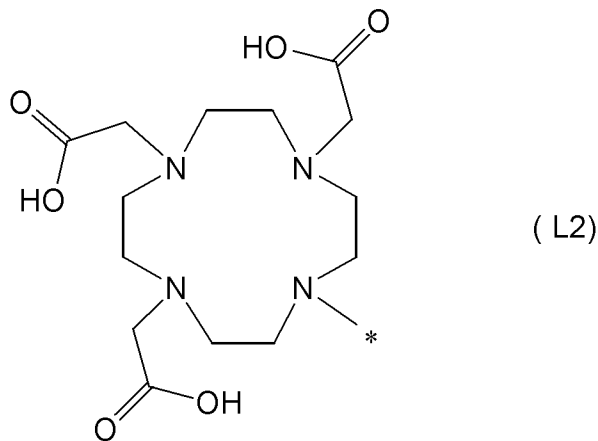
L は、式(L1)：

[化2]



(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、それぞれ独立に、水素原子、 $-CH_2COOR_{10}$ 基、又は炭素数1～8の炭化水素基であり、 R_{10} は、水素原子又は炭素数1～8の炭化水素基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、少なくとも3以上は $-CH_2COOH$ 基である。)で表される基、又は、式(L2)：

[化3]



(式中、*は結合部位である。)で表される基である。]

[2] 上記〔1〕に記載の化合物、又はその薬理的に許容可能な塩に、標的分子認識素子を結合させてなる化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

[3] 放射性金属及び放射性原子標識金属からなる群から選ばれる1種の金属と、前記金属に配位した〔1〕又は〔2〕に記載の化合物又はその薬理的に許容可能な塩と、を有する金属錯体化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

[4] 上記〔1〕又は〔2〕に記載の化合物、又はその薬理的に許容可能

な塩を含む、放射性薬剤の調製用薬剤。

〔5〕上記〔1〕又は〔2〕に記載の化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩の放射性薬剤の製造のための使用。

〔6〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩を含む、放射性薬剤。

〔7〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩の放射線治療薬。

〔8〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩の放射性画像診断薬。

〔9〕前記化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩が、放射性薬剤の調製用である、上記〔1〕又は〔2〕に記載の化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩。

〔10〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩の放射性薬剤の製造のための使用。

〔11〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩の放射線治療のための使用。

〔12〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩の放射線画像診断のための使用。

〔13〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩を投与する放射線治療方法。

〔14〕上記〔3〕に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩を投与する放射線画像診断方法。

〔15〕上記〔1〕に記載の化合物若しくはその薬理学的に許容可能な塩、又は、上記〔1〕に記載の化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩に、標的分子認識素子を結合させてなる化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩と、放射性金属及び放射性原子標識金属からなる群から選ばれる1種の金属を含む薬剤とを、別々の包装単位として含む、キット。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、比較的大きな原子半径を有する原子を含め多様な原子による標識が可能であり、腎臓への集積を低減できる放射性薬剤が得られる化合物等が提供できる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、 ^{111}In -CD03AEt-FGK(Boc)とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

[図2]図2は、 ^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK(Boc)溶液とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

[図3]図3は、 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

[図4]図4は、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK(Boc)とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

[図5]図5は、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK(Boc)とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

[図6]図6は、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) と ^{111}In -D03A-EDA-Fab (Rabbit serum IgG由来) との結果の比較を示す。

[図7]図7は、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来)、 ^{111}In -DOTA-Bn-SCN-Fab (抗c-kit IgG由来)、及び ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) の結果の比較を示す。

[図8]図8は、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) をマウスに投与後24時間までに排泄された尿中放射活性の化学形の分析結果を示す。

[図9]図9は、 ^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)をマウスに投与後6時間までに排泄された尿中放射活性の化学形の分析結果を示す。

[図10]図10は、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) をマウスに投与後24時間までに排泄された尿中放射活性の化学形の分析結果を示す。

[図11]図11は、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)をマウスに投与後24時間までに排泄された尿中放射活性の化学形の分析結果を示す。

[図12]図12は、 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液を、又

は¹¹¹In-CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液をSY皮下腫瘍モデルマウスに投与後2.5時間のSPECT/CT画像である。

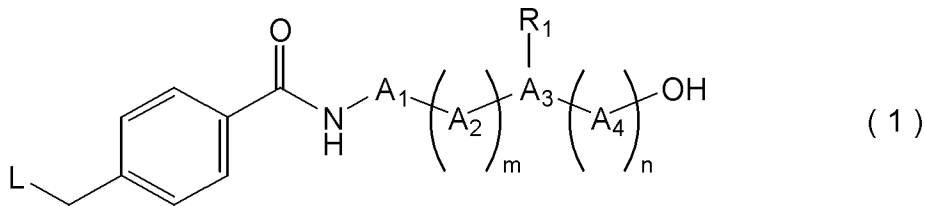
発明を実施するための形態

[0009] [化合物等]

<化合物(1)等>

本発明の化合物、又はその薬理的に許容可能な塩(以下、単に「化合物(1)等」ともいう)は、下記式(1)で表される。

[化4]



[式中、

A_1 、 A_2 は、それぞれ独立にアミノ酸残基であり、

m は、0～3の整数であり、

A_3 は、側鎖にアミノ基又はカルボキシ基を有するアミノ酸残基であり、

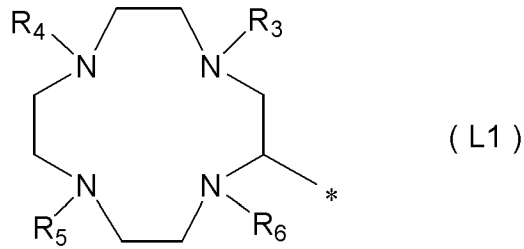
A_4 は、アミノ酸残基であり、

n は、0～3の整数であり、

R_1 は、 A_3 の側鎖のアミノ基又はカルボキシ基と結合し、標的分子認識素子又はその連結基と結合可能な官能基を有する基、又は、 A_3 の側鎖のアミノ基若しくはカルボキシ基の水素原子であり、ただし、 R_1 は、環構成原子の一つとして A_3 の側鎖のアミノ基の窒素原子を含む炭素数3～10の複素環基を形成していてもよく、

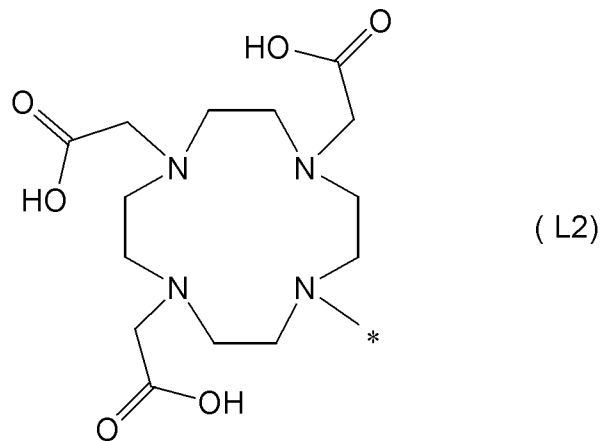
L は、式(L1)：

[化5]



(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、それぞれ独立に、水素原子、 $-CH_2COOR_{10}$ 基、又は炭素数1～8の炭化水素基であり、 R_{10} は、水素原子又は炭素数1～8の炭化水素基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、少なくとも3以上は $-CH_2COOH$ 基である。) で表される基、又は、式 (L2) :

[化6]



(式中、*は結合部位である。) で表される基である。]

本発明によれば、インジウム-111による標識が可能であり、腎臓への集積を低減できる放射性薬剤が得られる化合物等が提供できる。更に、本発明の放射性薬剤は、標的分子認識素子を有するため、標的部位に特異的に結合することができ、そのため標的部位に効率的に集積する。このような性質のため、本発明の放射性薬剤は、放射線治療において腫瘍部位に特異的に集積し、放射線画像診断においては、その感度、精度を向上させることができる。

[0010] 本発明の効果が得られる理由は定かではないが、以下のように考えられる。

放射性薬剤の投与後、当該薬剤が腎細胞に取り込まれる際に、効率よく尿排泄性の放射性代謝物を遊離することができれば、腎臓への放射活性の集積を低減することができると考えられる。そのため、放射性薬剤が腎細胞に取り込まれる際に、効率よく放射性標識元素を包摂するキレート配位子部位を遊離できるように、ポリペプチドとキレート配位子部位との間に腎刷子縁膜酵素の基質配列を導入する。そうすることで、腎細胞に取り込まれる前に、ポリペプチドとキレート配位子部位がポリペプチドから遊離され、腎臓への放射性物質の取り込みを抑制し投与早期から腎臓への集積を低減することができるものと推測される。

インジウム-111による標識を可能とするため、式(L1)又は式(L2)で表される基を、キレート配位子部位として、導入することを検討した。この場合、例えば、特許文献1に記載された化合物のように、キレート薬剤部位と、ポリペプチド部位とを連結する構造として、チオウレア構造を導入することも考えられた。しかしながら、キレート薬剤として、式(L1)又は式(L2)で示される基を有する化合物を用いた場合には、当該チオウレア構造を有する連結基を導入すると、腎刷子縁膜酵素による分解が進行しないことが、発明者らの実験から明らかになった。これに対して、式(1)で示される化合物のように特定構造の連結基を導入することで、腎刷子縁膜酵素による分解が進行し、腎臓への放射活性の集積を低減することができることが明らかになった。

[0011] 本発明の化合物(1)等は、式(1)において、 A_1 から A_4 のアミノ酸配列(ただし、 $n=0$ の場合、 A_1 から A_3 のアミノ酸配列)は、腎臓への集積を投与早期から低減する観点から、好ましくは腎刷子縁膜酵素の基質配列の一部と同一の配列である。

A_1 は、腎臓への集積を投与早期から低減する観点から、好ましくは、フェニルアラニン、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、チロシン、グリシン、アラニン又はトリプトファンの残基であり、より好ましくは、フェニルアラニン、グリシン、アラニン又はメチオニンの残基であ

り、腎臓への集積を投与早期から低減する効果をより顕著にする観点から、更に好ましくはフェニルアラニンの残基である。

[0012] A_2 は、腎臓への集積を投与早期から低減する観点から、好ましくは、グリシン、フェニルアラニン、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、チロシン、アラニン又はトリプトファンの残基であり、より好ましくは、グリシン、フェニルアラニン、アラニン、バリン又はイソロイシンの残基であり、腎臓への集積を投与早期から低減する効果をより顕著にする観点から、更に好ましくはグリシンの残基である。

なお、 m は、0～3の整数であり、好ましくは1である。

[0013] A_3 は、アミノ酸配列の側鎖に、ポリペプチド又はその連結基と結合可能な官能基を導入する観点から、側鎖にアミノ基又はカルボキシ基を有するアミノ酸残基であり、好ましくは、リシン、オルニチン、アルギニン、アスパラギン酸又はグルタミン酸の残基であり、より好ましくは、リシン、オルニチン又はアルギニンの残基であり、更に好ましくはリシンの残基である。

なお、 A_4 として、他のアミノ酸残基を有していてもよい。 A_4 としては、任意のアミノ酸が用いられる。

n は、0～3の整数であり、好ましくは0である。

[0014] R_1 は、標的分子認識素子又はその連結基と結合可能な官能基を有する基、又は、 A_2 の側鎖のアミノ基若しくはカルボキシ基の水素原子であり、 A_3 の側鎖のアミノ基又はカルボキシ基と結合する。ただし、 R_1 は、環構成原子の一つとして A_3 の側鎖のアミノ基の窒素原子を含む炭素数3～10の複素環基を形成していてもよい。

R_1 は、スペーサーとして機能し、官能基を介してポリペプチド等の標的分子認識素子を本発明の化合物に結合することができる。 R_1 は、 A_3 の側鎖のアミノ基又はカルボキシ基と結合することで、アミノ酸配列末端を化学修飾せず、本発明の化合物とポリペプチドとを結合することができる。

R_1 は、側鎖のアミノ基の窒素原子と結合していてもよいし、側鎖のカルボキシ基とエステル結合を形成していてもよい。

R_1 の標的分子認識素子又はその連結基と結合可能な官能基は、特に限定されないが、例えば、カルボキシ基又はその活性エステル；マレイミド基、アクリロイル基等のC=C結合を有する基；カルバモイル基、イソチオシアナート基、及びアミノ基からなる群から選ばれる少なくとも1種の官能基（以下「官能基a」ともいう）が挙げられる。カルボキシ基の活性エステルとしては、クロロアセチル基、ブromoアセチル基、ヨードアセチル基等が挙げられる。これらの中でも、官能基aは、C=C結合を有する基、カルバモイル基が好ましい。

R_1 の総炭素数は、特に限定されないが、例えば、好ましくは1以上、より好ましくは2以上、更に好ましくは3以上であり、そして、好ましくは20以下、より好ましくは10以下、更に好ましくは8以下である。

R_1 としては、例えば、官能基aを有する総炭素数2～20のアシル基、官能基aを有する総炭素数2～20のアルキル基、官能基aを有する総炭素数2～20のアルキルカルバモイル基、官能基aを有する総炭素数2～20のアルキルチオカルバモイル基が挙げられる。

R_1 が複素環基を形成する場合、複素環基はマレイミド基が好ましい。

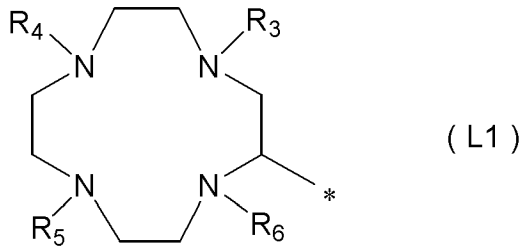
R_1 が複素環基を形成する場合、複素環基の炭素数は、好ましくは3～10、より好ましくは3～5、更に好ましくは4又は5である。

R_1 は、 A_3 の側鎖のアミノ基若しくはカルボキシ基の水素原子であってもよい。つまり、 A_3 のアミノ基若しくはカルボキシ基は、修飾されていなくてもよい。

R_1 の中でも、環構成原子の一つとして A_3 の側鎖のアミノ基の窒素原子を含む炭素数3～10の複素環基が好ましく、環構成原子の一つとして A_3 の側鎖のアミノ基の窒素原子を含むマレイミド基がより好ましい。

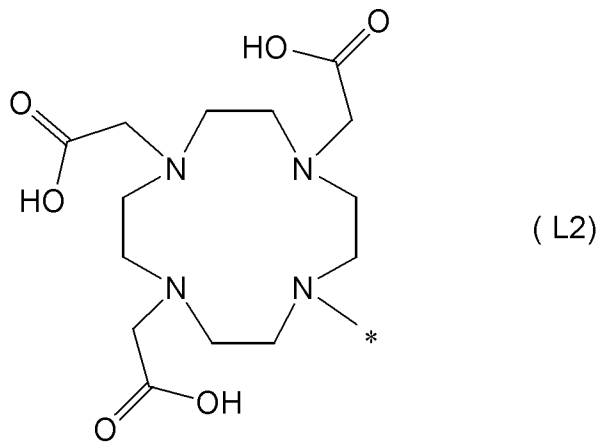
[0015] Lは、式(L1)：

[化7]



で表される基、又は、式 (L 2) :

[化8]



で表される基である。

式 (L 1) で表される基に関して、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、好ましくは3個以上4個以下が $-CH_2COOH$ 基であり、より好ましくは3個が $-CH_2COOH$ 基である。

$-CH_2COOR_{10}$ 基として、 R_{10} は、水素原子又は炭素数1~8の炭化水素基である。

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、 $-CH_2COOH$ 基以外の基は、好ましくは炭素数1~8の炭化水素基であり、より好ましくは炭素数1~4の炭化水素基である。

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、少なくとも1つの基は、腎臓への集積を低減する観点から、好ましくは炭素数3~8の炭化水素基であり、より好ましくは炭素数4~6の炭化水素基である。

当該炭化水素基は、好ましくは、脂肪族炭化水素基であり、より好ましく

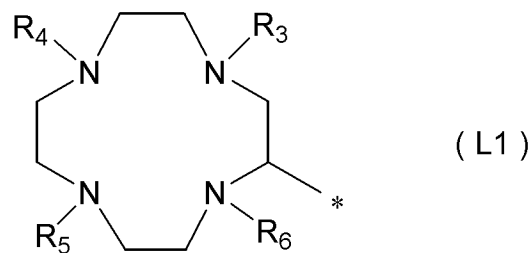
は分岐鎖脂肪族炭化水素基である。

当該炭化水素基としては、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基が挙げられる。

これらの中でも、腎臓への集積を低減する観点から、エチル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基が好ましく、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基がより好ましく、イソブチル基が更に好ましい。

これらの中でも、Lは、好ましくは、式(L1)：

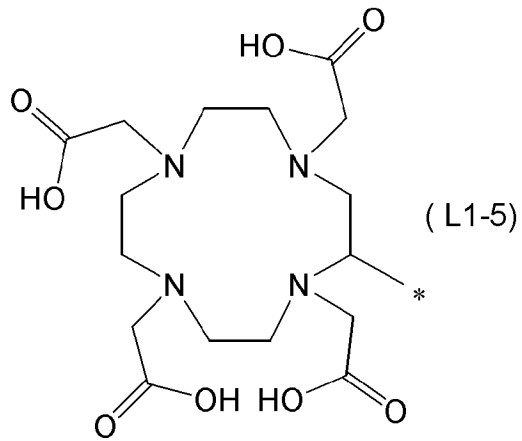
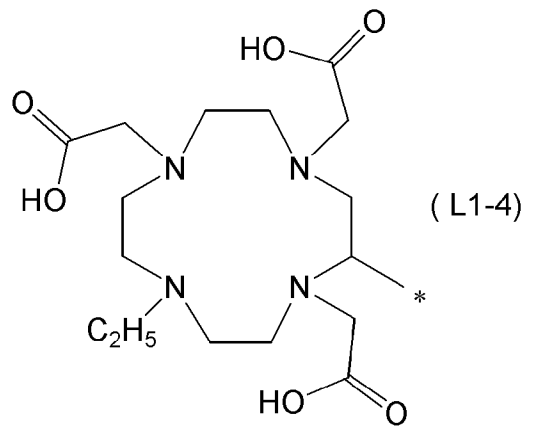
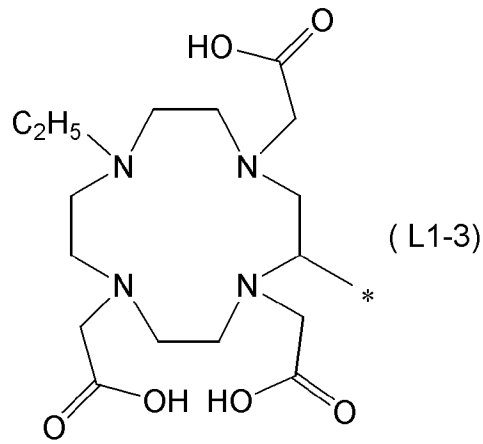
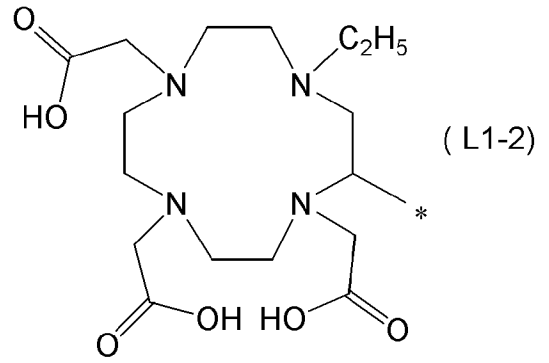
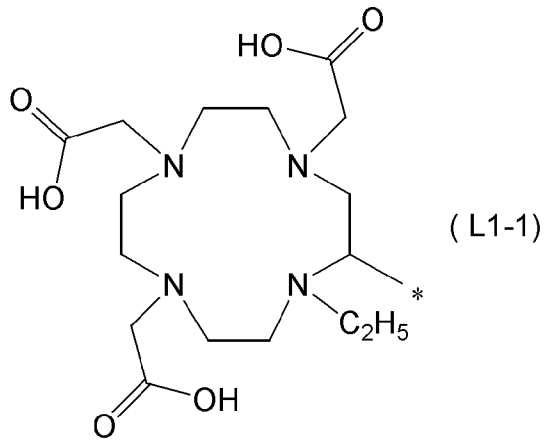
[化9]



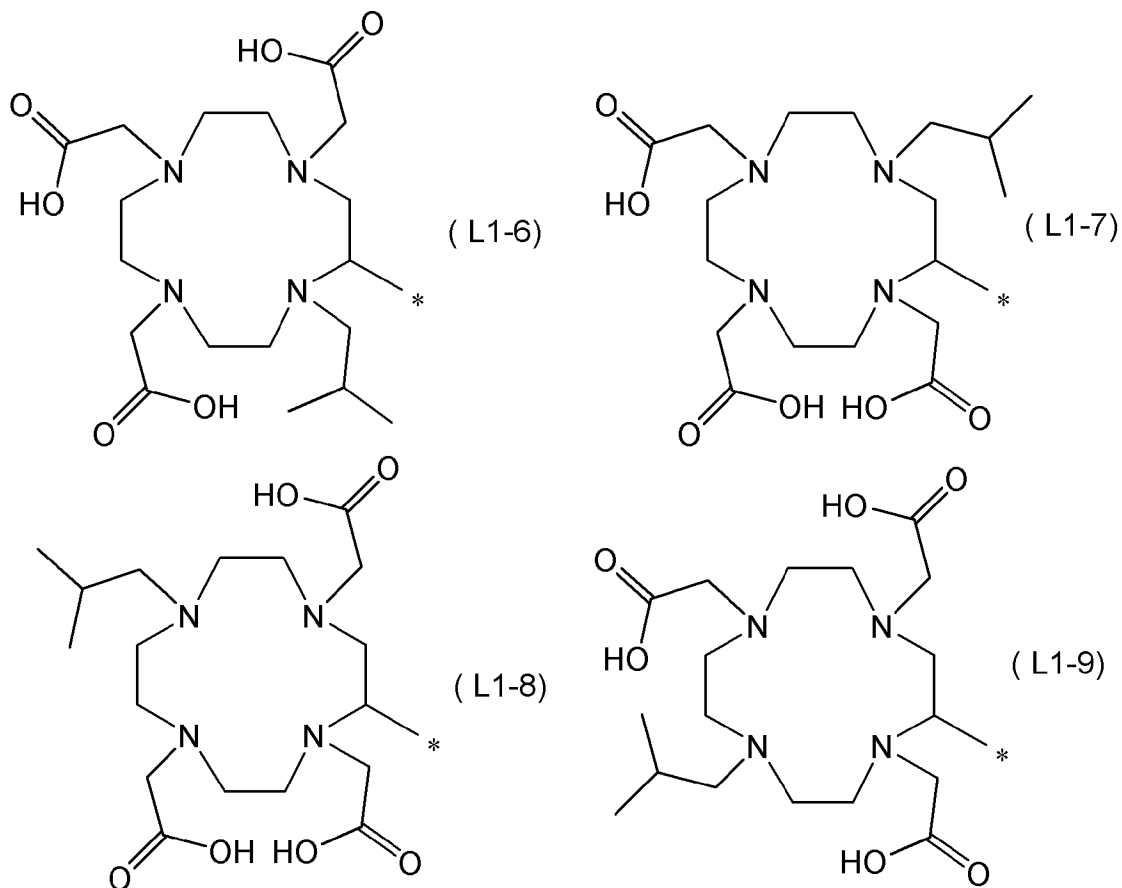
(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、 $-CH_2COOH$ 基、又は炭素数1~8の炭化水素基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、3個は $-CH_2COOH$ 基である。)で表される基である。

Lとしては、式(L1-1)、式(L1-2)、式(L1-3)、式(L1-4)、式(L1-5)、式(L1-6)、式(L1-7)、式(L1-8)、式(L1-9)及び式(L2)からなる群から選ばれる少なくとも1種が好ましい。

[化10]



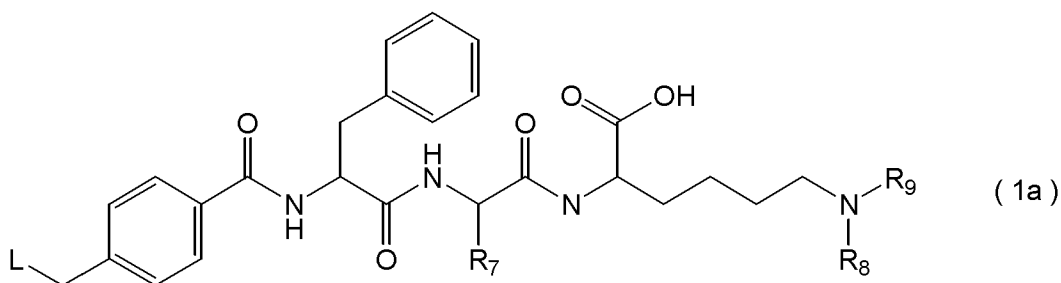
[化11]



(以上、式中、*は結合部位である。)

[0016] 以上の本発明の化合物(1)の中でも、下記式(1a)で表される化合物が好ましい。

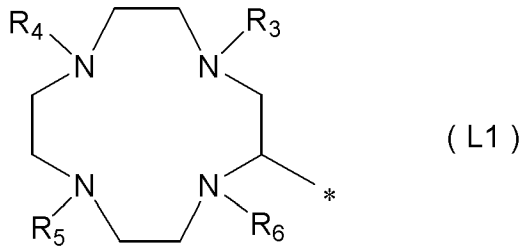
[化12]



[式中、

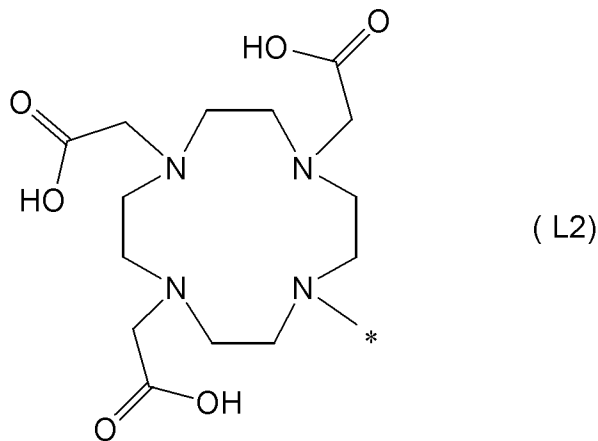
Lは、式(L1) :

[化13]



(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、それぞれ独立に、水素原子、 $-\text{CH}_2\text{COOR}_{10}$ 基、又は炭素数1～8の炭化水素基であり、 R_{10} は、水素原子又は炭素数1～8の炭化水素基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、少なくとも3個以上は $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 基である。)で表される基、又は、式(L2)：

[化14]

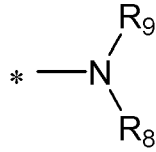


(式中、*は結合部位である。)で表される基であり、

R_7 は、水素原子又はメチル基であり、

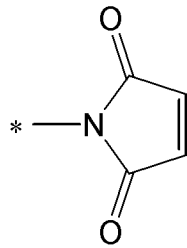
R_8 , R_9 は、それぞれ独立に、水素原子、又は、官能基aを有する総炭素数2～20のアシル基、官能基aを有する総炭素数2～20のアルキル基、官能基aを有する総炭素数2～20のアルキルカルバモイル基、若しくは官能基aを有する総炭素数2～20のアルキルチオカルバモイル基である。ただし、 R_8 及び R_9 は、隣接する窒素原子を含む複素環を形成していてもよく、その場合、式：

[化15]



で表される基は、式：

[化16]

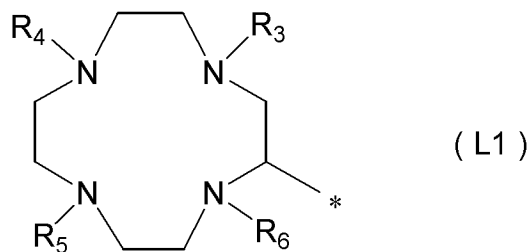


で表される基である。]

R_8 , R_9 は、好ましくは官能基 a を有する総炭素数 2 ~ 20 のアシル基であり、より好ましくはカルバモイル基を有する総炭素数 3 ~ 6 のアシル基である。カルバモイル基を有する総炭素数 3 ~ 6 のアシル基としては、例えば、式： $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_a(=\text{O})\text{NH}_2$ [式中、 a は 1 ~ 4 の整数である。] で表される基が挙げられる。

[0017] 上記式 (1 a) で表される化合物は、好ましくは、式中、 L が、式 (L 1) :

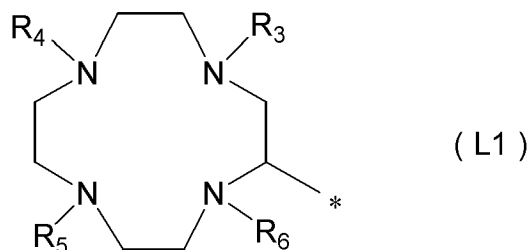
[化17]



(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、それぞれ独立に、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 基、又は炭素数 1 ~ 8 の炭化水素基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、3個が $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 基であり、1個が炭素数 1 ~ 8 の炭化水素基である。) で表される基であり、

より好ましくは、式中、Lが、式(L1)：

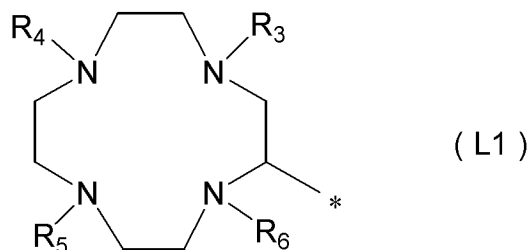
[化18]



(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、それぞれ独立に、 $-CH_2COOH$ 基、エチル基、又はブチル基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、3個が $-CH_2COOH$ 基であり、1個がエチル基、又はブチル基である。)で表される基であり、

更に好ましくは、式中、Lが、式(L1)：

[化19]



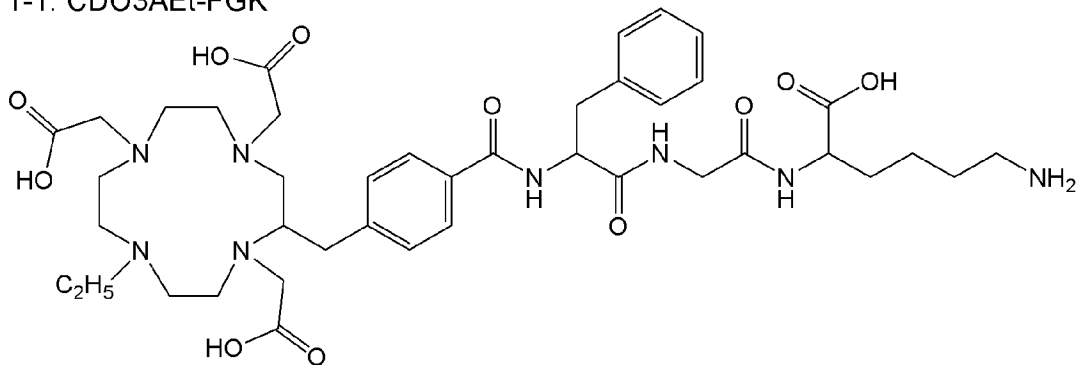
(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、それぞれ独立に、 $-CH_2COOH$ 基、イソブチル基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、3個が $-CH_2COOH$ 基であり、1個がイソブチル基である。)で表される基である。

[0018] 上記本発明の化合物(1)の好ましい具体例として、下記の化合物1-1～化合物1-6が挙げられる。

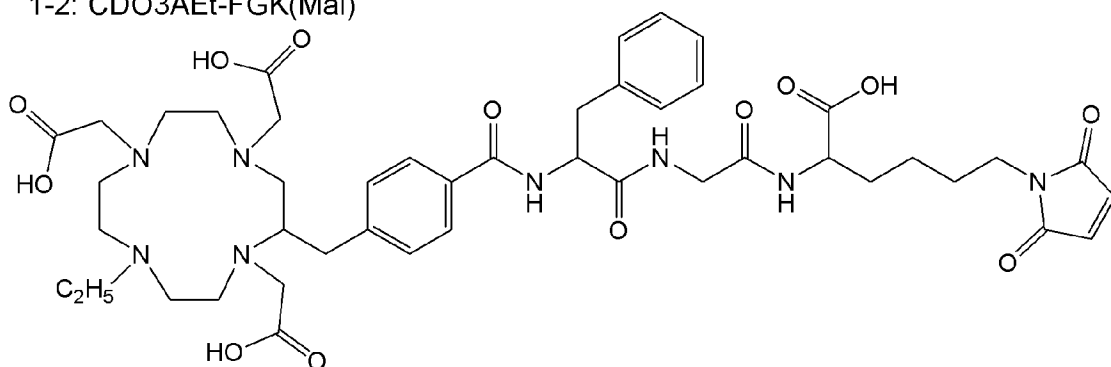
[0019]

[化20]

1-1: CDO3AEt-FGK

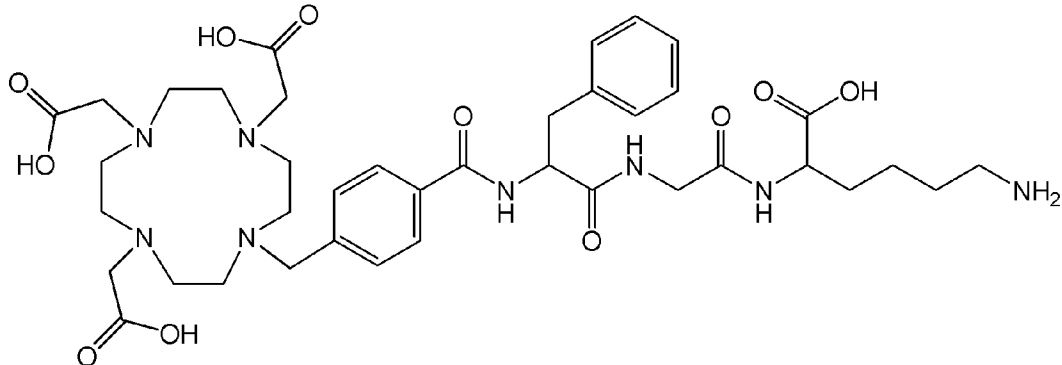


1-2: CDO3AEt-FGK(Mal)

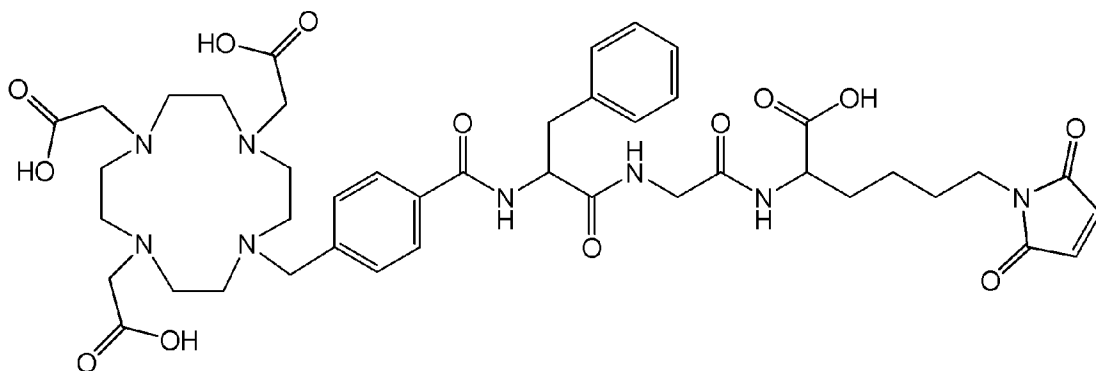


[0020] [化21]

1-3: DO3A-Bn-CO-FGK

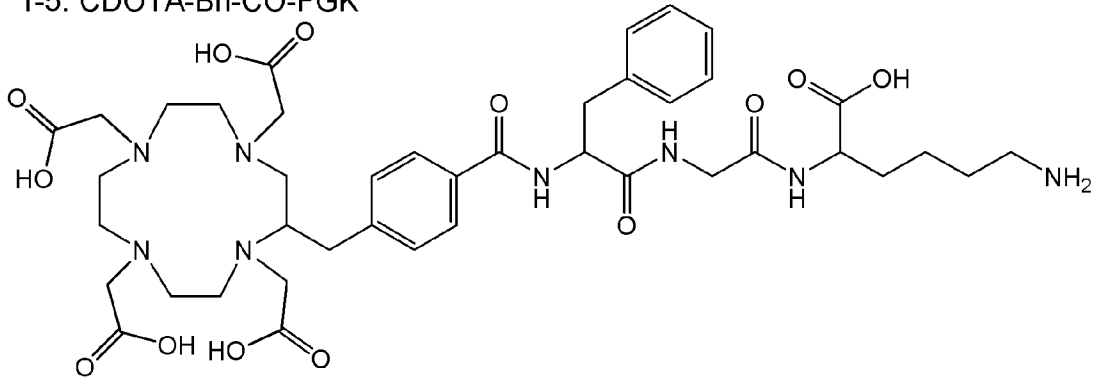


1-4: DO3A-Bn-CO-FGK(Mal)

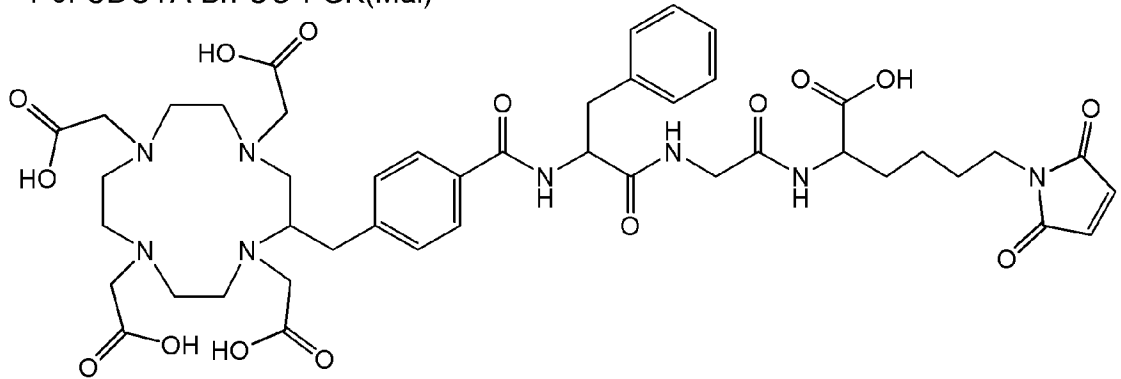


[0021] [化22]

1-5: CDOTA-Bn-CO-FGK

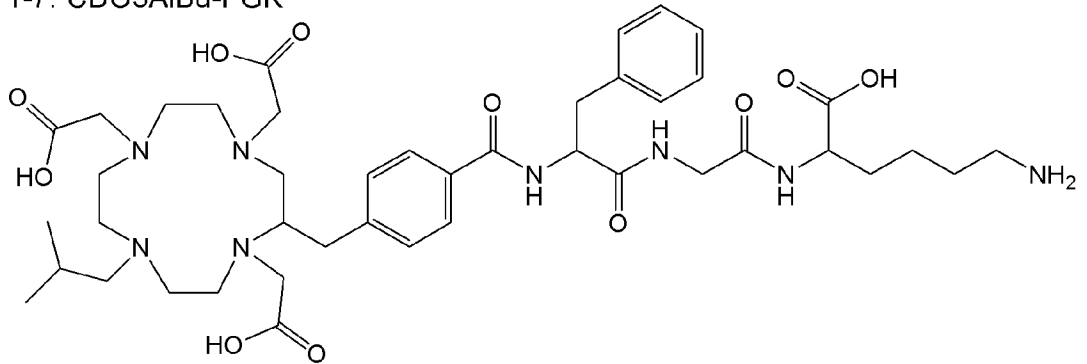


1-6: CDOTA-Bn-CO-FGK(Mal)

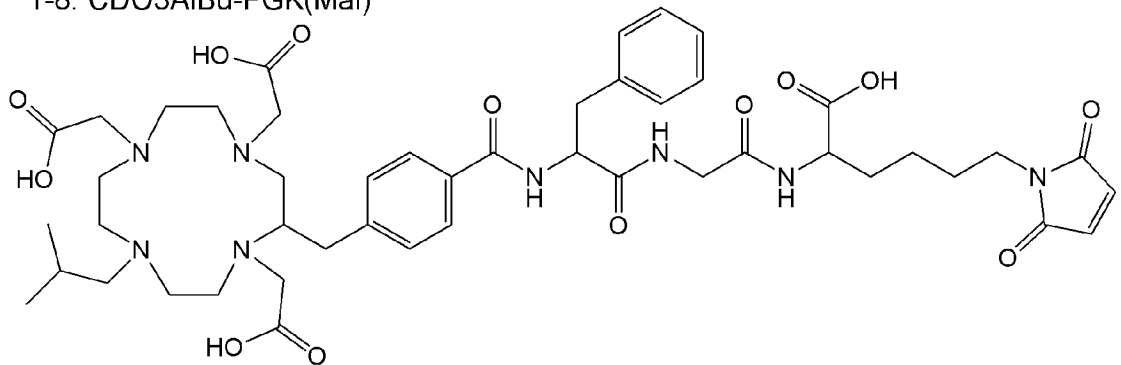


[0022] [化23]

1-7: CDO3AiBu-FGK



1-8: CDO3AiBu-FGK(Mal)



[0023] 本発明の化合物（１）等は、上記化合物の薬理的に許容可能な塩であってもよい。

薬理的に許容可能な塩としては、例えば、酸付加塩、塩基付加塩が挙げられる。

酸付加塩としては、無機酸塩、有機酸塩のいずれであってもよい。

無機酸塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩が挙げられる。

有機酸塩としては、例えば、クエン酸塩、シュウ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩が挙げられる。

塩基付加塩としては、無機塩基塩、有機塩基塩のいずれであってもよい。

無機塩基塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩が挙げられる。

有機塩基塩としては、例えば、トリエチルアンモニウム塩、トリエタノールアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩が挙げられる。

[0024] <化合物（２）等>

本発明の化合物（２）等は、化合物（１）、又はその薬理的に許容可能な塩に、標的分子認識素子を結合させてなる化合物、又はその薬理的に許容可能な塩である。標的分子認識素子は、化合物（１）、又はその薬理的に許容可能な塩に、連結基を介して結合していてもよいし、直接結合していてもよい。連結基としては、2-イミノチオランから誘導されるイミノチオールが挙げられる。

[0025] [標的分子認識素子]

「標的分子認識素子」とは、生体内において、標的分子に結合する等の標的分子を認識可能な分子、置換基、官能基又は原子団である。

標的分子認識素子としては、例えば、ポリペプチド、その他、標的分子に

結合するリガンドが挙げられる。

ポリペプチドは、通常、標的分子に結合するポリペプチドであり、好ましくは標的分子に特異的に結合するポリペプチドである。特異的に結合するとは、標的分子に結合するが、標的分子以外の分子には結合しないか、弱い結合であることをいう。

標的分子とは、放射性薬剤による診断の対象となる標的部位、例えば、組織や細胞に存在する分子、好ましくは特異的に発現する分子をいう。「特異的に発現する」とは、標的部位に発現するが、標的部位以外の部位には発現しないか、低い発現であることをいう。

[0026] 標的分子認識素子としては、例えば、炎症や腫瘍細胞浸潤等に伴う組織構築において高い発現が認められるタンパク質や腫瘍細胞に特異的に発現するタンパク質に結合するリガンド、並びに、抗体及び抗体の抗原結合領域断片が挙げられる。

[0027] 抗体としては、例えば、抗CD25抗体、抗CD20抗体等のモノクローナル抗体が挙げられる。

抗体の抗原結合領域断片としては、例えば、Fab断片（以下単に「Fab」ともいう）、 $F(ab')_2$ 断片、 $F(ab)_2$ 断片、可変領域断片（以下、「Fv断片」ともいう）が挙げられる。

Fab断片とは、抗体のパパイン分解により生ずるN末端側の産物及びこれと同様のドメイン構造を有する断片を意味する。

$F(ab')_2$ 断片とは、抗体の $F(ab')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を還元することにより得られる断片及びこれと同様のドメイン構造を有する断片を意味する。

$F(ab)_2$ 断片とは、2分子のFab断片が互いにジスルフィド結合で結合した二量体を意味する。

Fv断片とは、抗体の断片であって抗原との結合活性を有する最小の断片を意味する。

抗体の抗原結合領域断片としては、より具体的には、特定のがん細胞に特

異的に発現するタンパク質に対する抗体、及び、そのFab断片若しくはFv断片が挙げられる。

[0028] その他の標的分子認識素子としては、がんの新生血管に高発現が認められるインテグリンに親和性を有する環状ペプチド、例えばシクロ-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys（以下、「c(RGDfK)」ともいう）が挙げられる。その他、造骨性のがん（骨転移）に多く存在するヒドロキシアパタイトへの親和性を有するビスフォスホン酸やオリゴアスパラギン酸、オリゴグルタミン酸、マクロファージの表面に存在する走査因子の受容体と親和性があるペプチドであるfMet-Leu-Phe（fMLP）、がん細胞に発現が認められる葉酸受容体と結合する葉酸とその誘導体等が挙げられる。

なお、標的分子認識素子は、これら例示されたポリペプチドに限定されず、標的分子に結合するポリペプチドであればいずれを使用することもできる。

[0029] 標的分子認識素子は、例えば、2-イミノチオラン等のチオール化試薬を用いて、化合物の官能基と反応する連結基を導入して結合させてもよい。Fab断片への当該連結基の導入は、上記チオール化試薬をpH7-9の条件で反応させることによって、Fab断面のアミノ基に対してするスルフヒドリル基を付加させることができる。

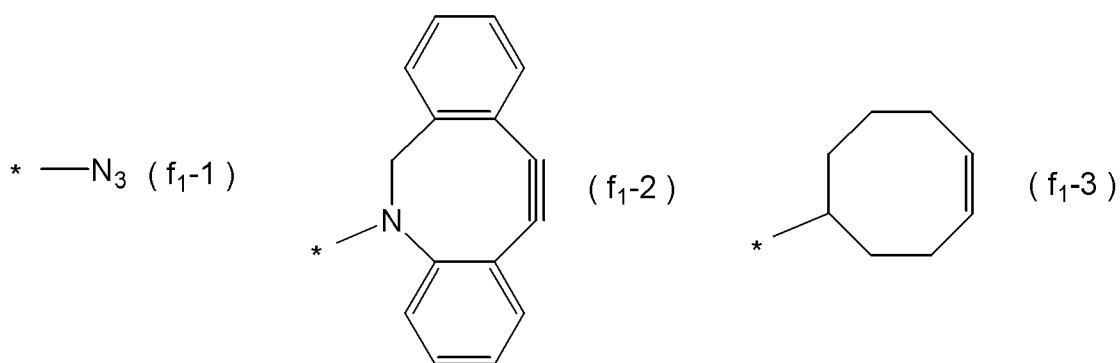
[0030] 標的分子認識素子としては、例えば、Asn-urea-Lys 部位又はGlu-urea-Lys 部位を有するリガンドを用いてもよい。当該リガンドによれば、前立腺がんにおいて発現が著しく上昇する前立腺特異的膜抗原（prostate specific membrane antigen）のレセプターに選択的に結合する。

Asn-urea-Lys 部位とは、式：

において高い発現が認められるタンパク質や腫瘍細胞に特異的に発現するタンパク質等の標的分子に結合させ、標的分子認識素子として、官能基 f_1 と反応し結合を形成する官能基 f_2 を有する化合物 (2) 等を投与し、標的分子を認識する方法が挙げられる [Chemical Society Reviews 45: 6409-6658, 2016, Chemical Society Reviews 42: 5131-5142, 2013]。

[0032] 官能基 f_1 としては、例えば、下記の式 (f_1-1)、式 (f_1-2)、又は式 (f_1-3) で表される基が挙げられる。

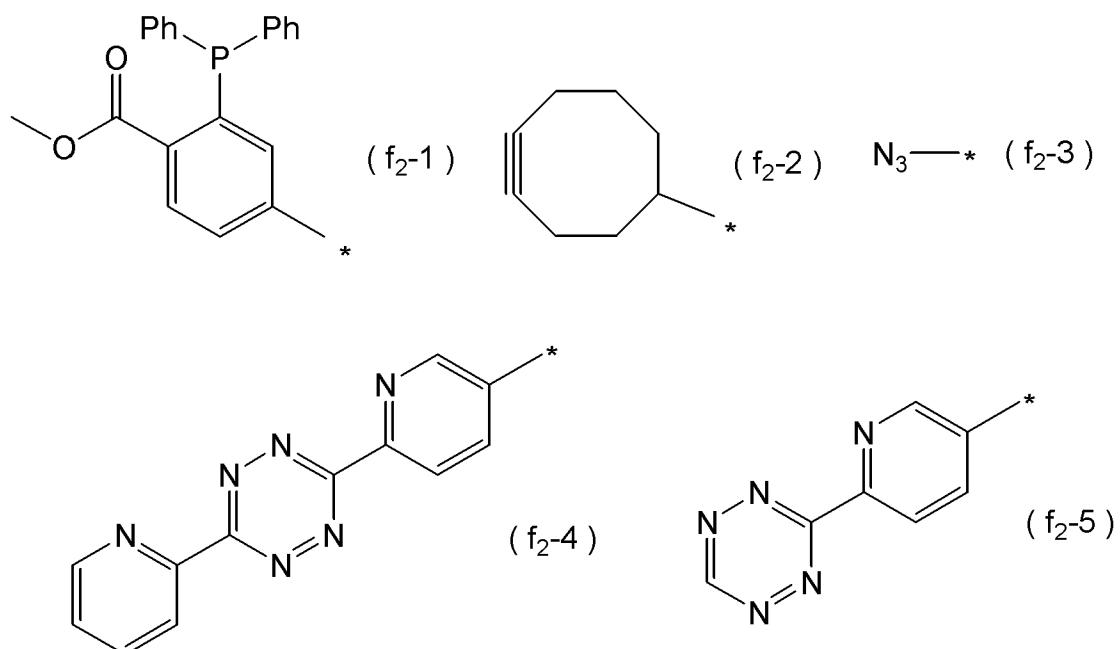
[化26]



[式中、*は結合部位である。]

[0033] 官能基 f_2 としては、例えば、下記の式 (f_2-1)、式 (f_2-2)、式 (f_2-3)、式 (f_2-4)、又は式 (f_2-5) で表される基が挙げられる。

[化27]



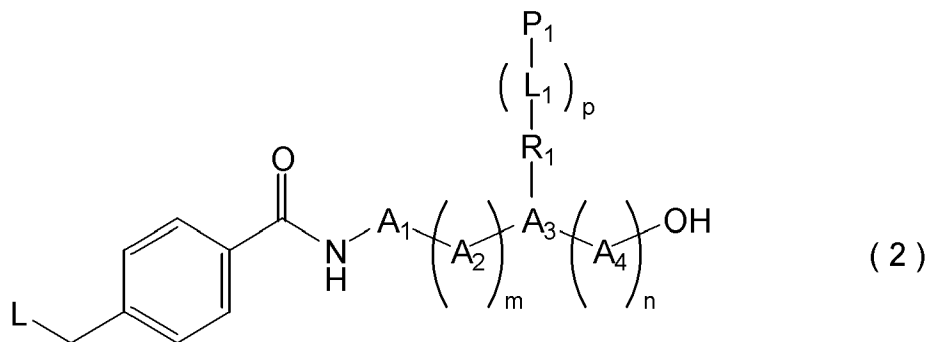
[式中、*は結合部位である。]

[0034] 本発明の化合物(2)等を使用して、当該化合物を含む放射性薬剤の調製用薬剤を提供できる。

放射性薬剤の調製用薬剤は、当該化合物の他に、水性緩衝液などのpH調節剤、アスコルビン酸、p-アミノ安息香酸等の安定化剤等を含んでいてもよい。

[0035] 本発明の化合物(2)等としては、例えば、以下の式(2)で表される化合物、又はその薬理的に許容可能な塩が挙げられる。

[0036] [化28]



[式中、 A_1 、 A_2 、 m 、 A_3 、 A_4 、 n 、 R_1 、 L は式(1)と同様であり、

L_1 は、 R_1 と P_1 を連結する連結基であり、

p は0又は1であり、

P_1 は、標的分子認識素子である。]

L_1 は、 R_1 の連結基と連結可能な官能基により結合を形成し、標的分子認識素子とも結合を形成する。 L_1 は、好ましくは、2-イミノチオランから誘導されるイミノチオール等である。

p は、好ましくは1である。

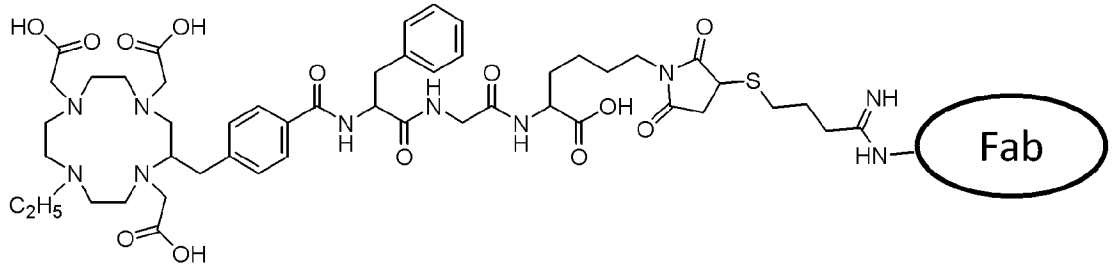
P_1 は、例えば、上述の標的分子認識素子であり、好ましくはポリペプチド、その他標的分子に結合するリガンド、又は、式(f_2-1)、式(f_2-2)、式(f_2-3)、式(f_2-4)、又は式(f_2-5)で表される官能基 f_2 である。

[0037] 上記本発明の化合物(2)の好ましい具体例として、下記の化合物2-1

～化合物 2-4 が挙げられる。ただし、下記の式中 F a b は、F a b 断片部位を意味する。

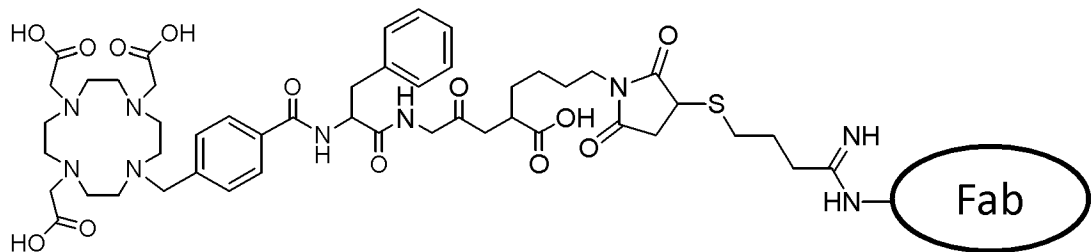
[0038] [化29]

2-1: CDO3AEt-FGK-Fab



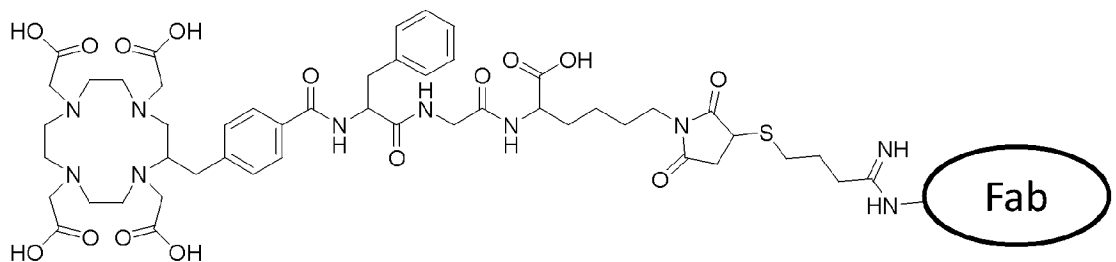
[0039] [化30]

2-2: DO3A-Bn-CO-FGK-Fab



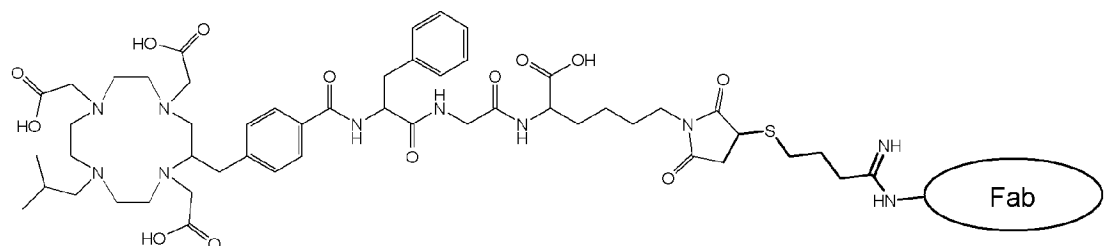
[0040] [化31]

2-3: CDO3A-Bn-CO-FGK-Fab



[0041] [化32]

2-4: CDO3AiBu-FGK-Fab



[0042] <金属錯体化合物（3）等>

本発明の金属錯体化合物、又はその薬理的に許容可能な塩（以下「金属錯体化合物（3）等」ともいう）は、放射性金属及び放射性原子標識金属からなる群から選ばれる1種の金属と、前記金属に配位した本発明の化合物又はその薬理的に許容可能な塩と、を有する。

[0043] 本発明の金属錯体化合物（3）等を含む、放射性薬剤は、金属錯体化合物（3）等の他に未反応物や不純物を含んでいてもよいし、製造後に高速液体クロマトグラフィ（HPLC）法等により精製された金属錯体化合物（3）等を含むものであってもよい。

[0044] 用語「錯体」とは、金属及び金属類似元素の原子又はイオンを中心にして、配位子が配位した物質を意味し、配位化合物ともいう。配位とは、配位子が中心の金属と配位結合を形成して中心金属の周囲に配列することをいう。錯体は、配位子と金属との配位結合により形成される。配位子と金属による錯体の形成を、錯形成と称することがある。配位結合とは、1本の結合にあずかる2個の原子価電子が、一方の原子のみから提供されている結合をいう。

[0045] [金属]

金属としては、例えば、 ^{111}In 、 ^{223}Ra 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{44}Sc 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{225}Ac 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{227}Th 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu が挙げられる。

金属は、好ましくは ^{111}In 、 ^{223}Ra 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{225}Ac 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、及び ^{227}Th からなる群から選ばれる少なくとも1種であり、より好ましくは ^{111}In 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{225}Ac 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 及び ^{212}Pb からなる群から選ばれる少なくとも1種であり、更に好ましくは ^{111}In 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 及び ^{225}Ac である。

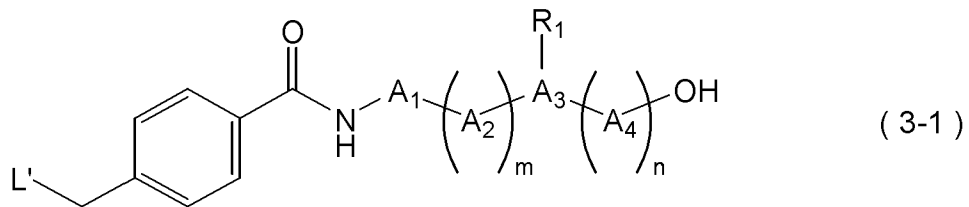
[0046] 金属は、これら具体例に限定されず、放射性薬剤を用いた診断等の目的に適切な放射線、放射線量、半減期を有する限りにおいていずれも使用することができる。放射線画像診断において正常な組織や細胞への影響を少なくするという観点から、短半減期金属放射性同位体が好ましく使用される。

[0047] 金属錯体化合物（3）等の製造は、標的分子認識素子と結合させた上記化合物を配位子として用い、金属放射性同位体とインビトロで錯形成させるこ

とにより実施できる。錯形成は、従来知られている錯形成反応を利用する簡便な操作で実施できる。

[0048] 本発明の金属錯体化合物（3）としては、例えば、化合物（1）のLが、式（L 1-4）、式（L 1-5）、式（L 1-9）又は式（L 2）で表される基である場合を例にとれば、以下の式（3-1）で表される金属錯体化合物が挙げられる。

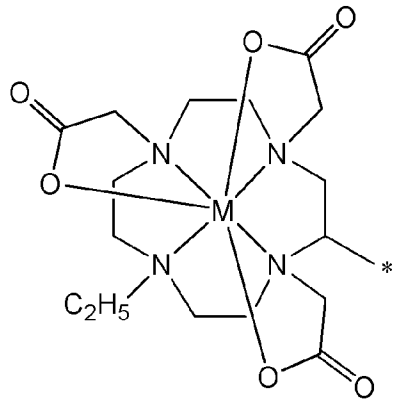
[0049] [化33]



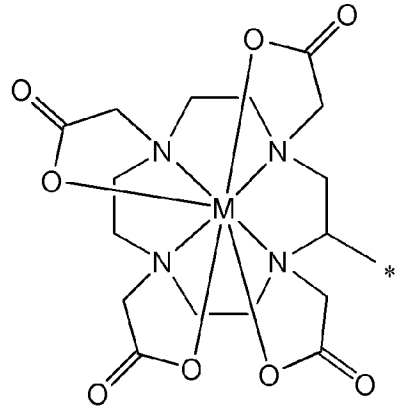
〔式中、 A_1 、 A_2 、 m 、 A_3 、 A_4 、 n 、 R_1 は、式（1）と同様であり、

L' は、式（L 1'-4）、式（L 1'-5）、式（L 1'-9）、又は式（L 2'）：

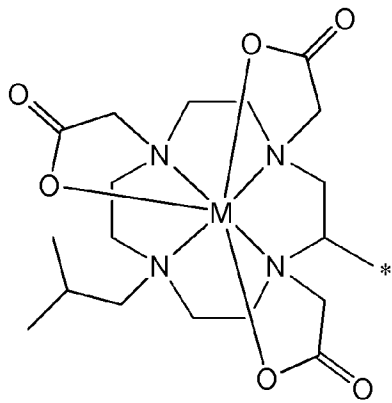
[化34]



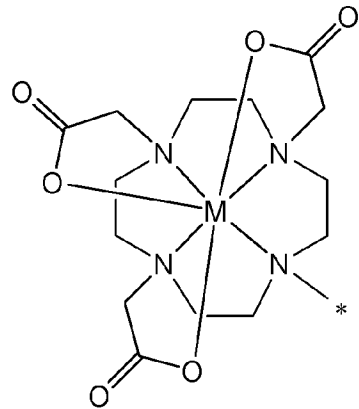
(L1'-4)



(L1'-5)



(L1'-9)

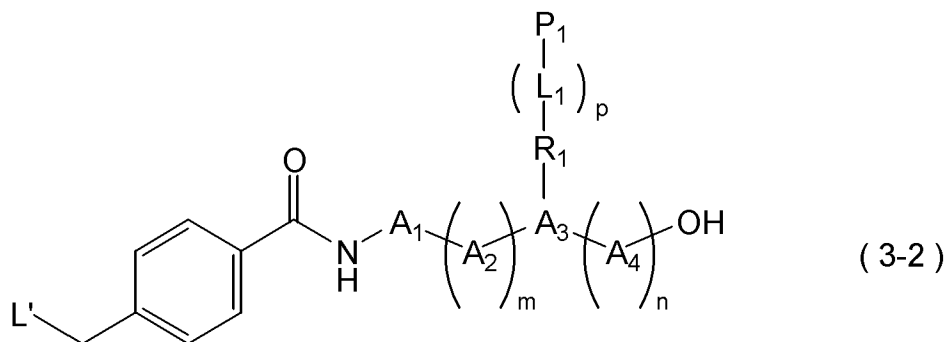


(L2')

(式中、Mは、¹¹¹In、²²³Ra、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁴⁴Sc、⁹⁰Y、¹⁷⁷Lu、²²⁵Ac、²¹²Bi、²¹³Bi、²¹²Pb、²²⁷Th、⁶⁴Cu、又は⁶⁷Cuである。)で表される基である。]

[0050] 本発明の金属錯体化合物(3)としては、例えば、化合物(2)のLが、式(L1-4)、式(L1-5)、式(L1-9)、又は式(L2)で表される基である場合を例にとれば、以下の式(3-2)で表される金属錯体化合物が挙げられる。

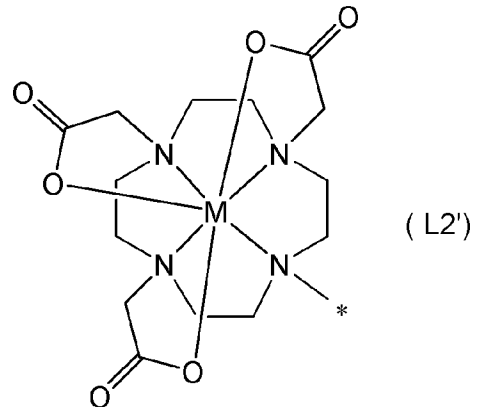
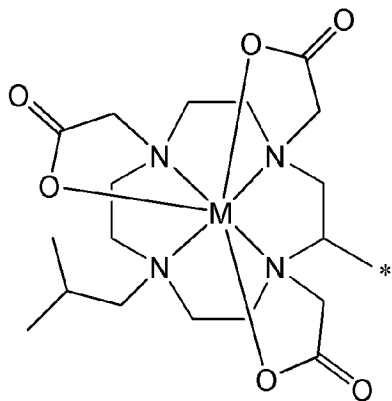
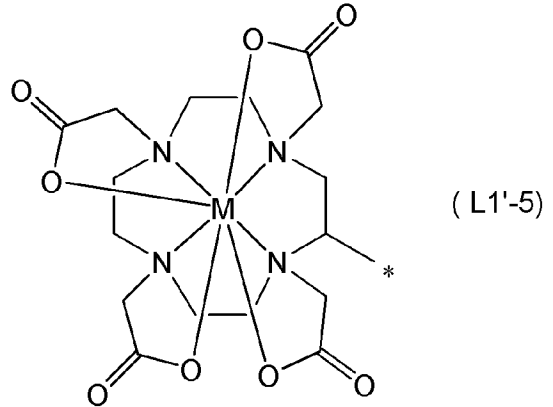
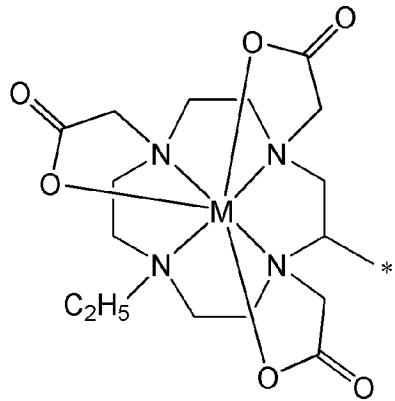
[0051] [化35]



(3-2)

[式中、 A_1 , A_2 , m , A_3 , A_4 , n , R_1 は、式(1)と同様であり、
 L_1 , p , P_1 は、式(2)と同様であり、
 L' は、式(L1'-4)、式(L1'-5)、式(L1'-9)又は式(L2'):]

[化36]



(式中、 M は、 ^{111}In 、 ^{223}Ra 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{44}Sc 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{225}Ac 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{227}Th 、 ^{64}Cu 、又は ^{67}Cu である。)で表される基である。]

[0052] 本発明の放射性薬剤は、上記放射性標識ポリペプチドを有効成分として含む他、必要に応じて、1種類又は2種類以上の医薬的に許容される担体(医薬用担体)を含む医薬組成物として調製できる。医薬用担体として、水性緩衝液、酸、及び塩基などのpH調節剤、アスコルビン酸やp-アミノ安息香酸などの安定化剤、D-マンニトールなどの賦形剤、等張化剤、並びに保存剤などを例示できる。また、放射化学的純度を改良するのに役立つクエン酸、酒石

酸、マロン酸、グルコン酸ナトリウム、グルコヘプトン酸ナトリウムなどの化合物を添加してもよい。本発明の放射性薬剤は、水溶液の形態、凍結溶液の形態、及び凍結乾燥品のいずれでも提供が可能である。

[0053] 本発明のキットは、上記化合物と、上記金属を含む薬剤とを、別々の包装単位として含む。

本発明のキットは、例えば、化合物（１）等と、標的分子認識素子を含む薬剤と、放射性金属及び放射性原子標識金属からなる群から選ばれる１種の金属を含む薬剤とを、別々の包装単位として含むキット；化合物（１）等に標的分子認識素子を結合させてなる化合物（２）等と、放射性金属及び放射性原子標識金属からなる群から選ばれる１種の金属を含む薬剤とを、別々の包装単位として含むキットが挙げられる。

キットに含まれる化合物及び薬剤はいずれも、必要に応じて、上記のような１種類又は２種類以上の医薬的に許容される担体（医薬用担体）を含むことができる。

[0054] [製造方法]

本発明の化合物（１）等、及び、当該化合物（１）等に標的分子認識素子を結合させてなる化合物（２）等は、公知の方法を用いて合成することができ、例えば、本明細書の実施例に記載された方法により製造することができる。

本発明の金属錯体化合物（３）等は、化合物（２）等を配位子として用い、金属放射性金属又は放射性原子標識金属とインビトロで錯形成させることにより、製造することができる。錯形成は、公知の方法を用いて行うことができる。

[0055] [用法容量]

本発明の金属錯体化合物等は、例えば、放射線治療又は放射線画像診断に用いられる放射性薬剤として使用される。

[0056] 本発明の金属錯体化合物等は、その有効量をヒトを含む哺乳動物に投与することによって癌を抑制する放射線治療に使用することができる。抗癌剤と

して使用する場合、例えば、癌の発生、又は転移・着床、再発を防止するという予防的作用、並びに癌細胞の増殖を抑制したり、癌を縮小することによって癌の進行を阻止したり、症状を改善させるという治療的作用の両方を含む最も広い意味を有し、いかなる場合においても限定的に解釈されるものではない。

放射線治療薬として用いられる、放射性金属及び放射性原子標識金属からなる群から選ばれる1種の金属は、例えば、アルファ線放出核種、ベータ線放出核種、ガンマ線放出核種、ポジトロン放出核種が挙げられる。これらの中でも、放射線治療の用途では、ベータ線放出核種（即ち、 β 線を放出する核種）が好ましい。

[0057] 放射線画像診断としては、例えば、単一光子放射断層撮影（Single Photon Emission Computed Tomography, 以下単に「SPECT」ともいう）、陽電子放射断層撮影（Positron Emission Tomography, 以下単に「PET」ともいう）等が挙げられる。

診断としては、特に限定されず、腫瘍、炎症、感染症、心循環器疾患、脳・中枢系疾患等の各種疾患及び臓器・組織の放射線画像診断等に用いられ、好ましくは、がんの放射線画像診断に使用される。

診断の対象となる標的の特性にしたがって、標的分子認識素子を選択することにより、多種類多様な標的の診断や治療が可能であり、本発明の放射性薬剤は診断の分野で放射性画像診断薬として広く使用できる。

[0058] 本発明の放射性薬剤の投与経路としては、例えば、静脈内投与若しくは動脈内投与などの非経口投与、経口投与が挙げられ、静脈内投与が好ましい。

投与経路はこれら経路に限定されず、放射性薬剤の投与後に、その作用が有効に発現し得る経路であればいずれも利用できる。

[0059] 本発明の放射性薬剤の放射活性強度は、本薬剤を投与することにより目的を達成し得る強度であり、且つ、被験者の放射線被曝が可能な限り低い臨床投与量である限りにおいて任意である。

放射活性強度は、放射性薬剤を使用する一般的な診断方法や治療方法で使用

されている放射活性強度を参考にして決定できる。その投与量は患者の年齢、体重、適当な放射線イメージング装置、及び対象疾患の状態等の諸条件を考慮し、イメージングが可能と考えられる放射能及び投与量が決定される。

[0060] ヒトを対象とする場合、放射性薬剤における放射エネルギーは、以下のとおりである。

通常、放射線治療に使用されることが想定され、その診断薬剤の投与量は、特に限定されないが、例えば、放射性金属（例えば¹¹¹In）の放射エネルギーとして1.0MBq/kg～3.0MBq/kgである。

[0061] 以上、本発明によれば、腎臓への集積を投与早期から低減できる放射性薬剤が得られる化合物が提供できる。

実施例

[0062] 以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。なお、以下の実験は、千葉大学の動物倫理委員会によって承認された後に実施された。

[0063] 下記実施例及び比較例で、置換基、化合物、及び有機溶媒について、下記の略号を使用した。

Fmoc : フルオレニルメトキシカルボニル基

Boc : tert-ブトキシカルボニル基

THF : テトラヒドロフラン

NMM : N-メチルモルフォリン

DMF : ジメチルホルムアミド

Tfa : トリフルオロアセテイト基

DCC : N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

Trt(2-Cl) : 2-クロロトリチル基

Cl-Trt(2-Cl)Resin : 2-クロロトリチルクロライドレジン (2-Chlorotriethyl chloride resin)

Fmoc-Lys(Dde)-OH : N- α -(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-N- ϵ -[1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチル]-L-リシン

TFA : トリフルオロ酢酸

MeCN : アセトニトリル

DIPEA : N,N-ジイソプロピルエチルアミン

DIC : N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド

HOBt : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

NMCM : N-メトキシカルボニルマレイミド

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

DPS : 2,2'-ジピリジルジスルフィド

EtOH : エタノール

FBS : ウシ胎児血清

D-PBS : ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液

EGTA : グリコールエーテルジアミン四酢酸

[0064] [測定方法、実験動物]

下記実施例及び比較例において、各種物性等の測定方法は下記の方法で行った。

[0065] [NMR (核磁気共鳴)]

¹H-NMRによる分析はJEOL ECS - 400 spectrometer (日本電子株式会社)を使用した。

[ESI-MS (エレクトロスプレーイオン化質量分析)]

ESI-MSによる分析はHPLC1200 series-6130 quadrupole LC/MS mass spectrometer (アジレント・テクノロジー株式会社)を使用した。

[0066] [薄層クロマトグラフィ(TLC)]

薄層クロマトグラフィ(TLC)による分析にはシリカプレート (TLC aluminium sheets Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S, メルク株式会社)を使用し、0.1 M 酢酸アンモニウム水溶液:メタノール= 1 : 1の展開溶媒で10 cm展開したものを5 mmずつ切断し、オートウェルガンマシステム(WIZARD3, パーキンエルマー社)によりそれぞれの画分の放射活性を測定した。

[0067] [セルロースアセテート膜電気泳動(CAE)]

セルロースアセテート膜電気泳動(以下「CAE」ともいう)では泳動膜に11 cm x 1 cmの大きさに切ったセルロースアセテート膜(ADVANTEC SELECA-V, 東洋濾紙株式会社), 緩衝液に(veronal buffer, pH 8.6, I=0.06)又はsolvent 2 (20 mM P.B. (pH 6.0))を用いて、一定電流(1 mA/cm)にて泳動した。泳動後のセルロースアセテート膜を5 mmずつ切断し、オートウェルガンマシステムによりそれぞれの画分の放射活性を測定した。

[0068] [逆相高速液体クロマトグラフィ(RP-HPLC)及び分子ふるい高速液体クロマトグラフィ(SE-HPLC)]

(分析)

逆相高速液体クロマトグラフィ(以下「RP-HPLC」ともいう)による分析はUV検出器としてL-7405(株式会社日立製作所)、送液ポンプとしてL-7100(株式会社日立製作所)、分析用カラムとしてCosmosil 5C₁₈-AR-300 column (4.6 x 150 mm, ナカライテスク株式会社)を使用した。

移動相には0.1% (v/v) TFA/H₂O (A相)と0.1% (v/v) TFA/MeCN (B相)を用い、0-20 minまでA相95% (v/v)、B相5%(v/v)からA相70%(v/v)、B相30%(v/v)まで変化させ、20-40 minでA相70%(v/v)、B相30%(v/v)からA相0%(v/v)、B相100%(v/v)まで変化させる直線グラジエント法により流速1.0 mL/minで溶出した。

[0069] (分取)

RP-HPLCによる分取にはガードカラムCadenza 5CD-C18 guard column (10 x 8 mm, インタクト株式会社)を連結したCadenza 5CD-C18 column (20 x 150 mm, インタクト株式会社)を使用した。

移動相には0.1%(v/v) TFA/H₂O (A相)と0.1%(v/v) TFA/MeCN (B相)を用い、0-30 minまでA相90%(v/v)、B相10%(v/v)からA相20%(v/v)、B相80%(v/v)まで変化させ、30-40 minでA相20%(v/v)、B相80%(v/v)からA相0%(v/v)、B相100%(v/v)まで変化させる直線グラジエント法により流速5.0 mL/minで溶出した。

[0070] 分子ふるいHPLC (以下「SE-HPLC」ともいう)による分析はCosmosil 5 Diol-300II (7.5×600 mm, ナカライテスク株式会社)にCosmosil 5 Diol-300II

ガードカラム (7.5×50mm, ナカライテスク株式会社) を接続し、移動相に0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を使用して流速1.0 mL/minで溶出した。

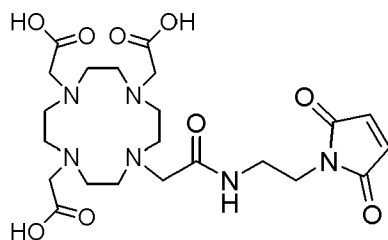
[0071] 溶出液はRP-HPLCでは254 nm、SE-HPLCでは280 nmの吸光度を計測し、⁶⁷Ga標識化合物の分析にはγ線検出器 Gabi star (Raytest社) をオンラインで接続、若しくは溶出液をフラクションコレクター (Frac-920, GEヘルスケア・ジャパン株式会社) により0.5分間隔で分取後、オートウェルガンマシステムにより放射活性を測定することで分析した。

[0072] [試薬]

下記合成例における、「D03A-EDA (Mal)」は、下記の式で表される化合物であり、Macrocyclics社製の商品名「B-272」を使用した。

[化37]

D03A-EDA(Mal)



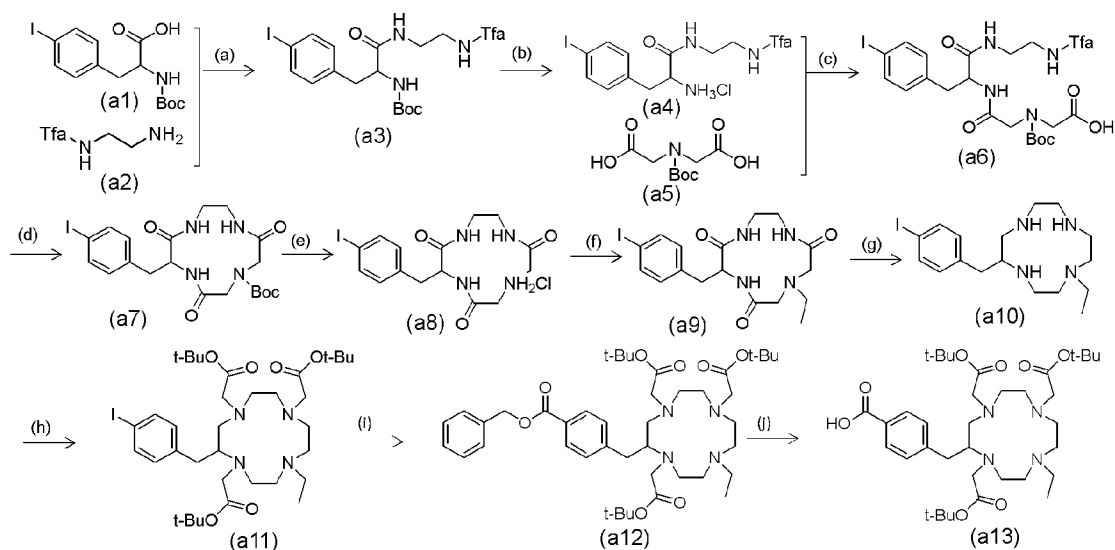
[0073] [実験動物]

動物実験は、雄性のddY系SPFマウス6週齢 及び雄性のBALB/c-nu/nuマウス(日本エスエルシー株式会社)を使用した。

[0074] [CD03AEt-FGK, CD03AEt-FGK(Mal), CD03AEt-FGK(Boc)の合成]

合成例L1：化合物(a13)の合成

[化38]



(a) Isobutylchloroformate, *N*-methylmorpholine. THF, DMF; 98% (b) 4N HCl/AcOEt; 99.8% (c) DCC, Et₃N, THF, AcOEt; 91.2% (d) i. 25% NH₃ aq, ii. HATU, HOAt, DIEA 54.2% ; (e) 4N HCl/AcOEt 98.4% ; (f) Iodoethane, K₂CO₃, MeCN; (g) i. 0.95M BH₃/THF, ii. conc. HCl ; (h) tert-butyl bromoacetate, K₂CO₃, MeCN, DMF ; (i) Pd(OAc)₂, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, Et₃N, CO, BnOH, DMF ; (j) 10% Pd/C, MeOH

[0075] 合成例L1(a): 化合物(a3)の合成

化合物(a1) (7.97 g、20.4 mmol) をTHF 40 mLに溶解し-15° Cに冷却後、アルゴン雰囲気下、*N*-メチルモルフォリン (NMM, 3.36 mL、30.5 mmol) 及びクロロギ酸イソブチル (4.01 mL、30.5 mmol) を順に加えた。5分間攪拌した後、化合物(a2) (5.87 g、30.5 mmol) とNMM (3.36 mL、30.5 mmol) のDMF溶液24 mLを滴下し、冷却下で30分、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル100 mL及び5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液100 mLにて溶解し、5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL × 3)、5質量%クエン酸水溶液 (50 mL × 3) で洗浄した。有機層に無水硫酸マグネシウムを加えて乾燥した後、溶媒を除去して得られた結晶を減圧乾燥することで化合物(a3) (10.6 g、20.0 mmol、収率98.0%) を淡黄色結晶として得た。

¹H NMR (CDCl₃) : δ 1.42 [9H, s, Boc], 2.96–3.03 [2H, m, CHCH₂], 3.39–3.51 [4H, CH₂CH₂], 4.22–4.24 [1H, dd, NHCH], 4.85, 6.42, 7.74 [3H, t, NH], 6.93–6.95 [2H, d, CCH], 7.62–7.66 [2H, d, ICCH].

ESI-MS (M+Na)⁺: m/z 552.07. found 552.09.

[0076] 合成例L1(b): 化合物(a4)

化合物(a3) (10.6 g、20.0 mmol) を4 N塩酸/酢酸エチル50 mLに溶解し、室温で3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、減圧乾燥することで化合物(a4) (8.08 g、20.0 mmol、収率99.8%) を淡黄色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : δ 3.42–3.55 [6H, overlapped, CH_2], 3.86–3.88 [1H, dd, CH_2CH], 7.04–7.06 [2H, d, CCH], 7.62–7.64 [2H, d, ICCH].

ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: m/z 452.02. found 452.03.

[0077] 合成例L1(c): 化合物(a6)

化合物(a5) (4.45 g、19.1 mmol) をTHF 70 mLに溶解し、溶液を氷冷した後、アルゴン雰囲気下でDCC (4.30 g、20.8 mmol) のTHF 溶液20 mLを滴下した。滴下完了後、室温で1時間攪拌し、反応液をろ過することでジシクロヘキシル尿素(以下、「DC-urea」ともいう)を除去し、ろ液を化合物(a5)の無水物溶液として次の反応に用いた。化合物(a4) (8.08 g、17.4 mmol) を酢酸エチル80 mLに懸濁し、 Et_3N (3.63 mL、26.0 mmol) を加えて冷却、10分間攪拌した後、アルゴン雰囲気下、先に調製した化合物(a5)の無水物溶液を滴下した。滴下完了後、室温にて1 時間攪拌し、反応液を5質量%クエン酸水溶液 (50 mL \times 3) で洗浄した。有機層に無水硫酸マグネシウムを加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣を、酢酸エチルを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行うことで化合物(a6) (10.2 g、15.8 mmol、収率91.2%) を淡黄色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : δ 1.37 [9H, s, BOC], 3.00–3.19 [2H, m, CHCH_2], 3.42–3.52 [5H, overlapped, NCH_2 , NHCH_2], 3.77–4.03 [2H, m, COCH_2], 4.11–4.16 [1H, dd, NCH_2], 4.60–4.62 [1H, t, CH_2CH], 6.96–7.01 [2H, d, CCH], 7.58–7.60 [2H, d, ICCH].

ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: m/z 667.09. found 667.02.

[0078] 合成例L1(d): 化合物(a7)

化合物(a6) (3.52 g、5.46 mmol) を25質量%アンモニア水50 mLに溶解し、室温で3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、減圧乾燥して得られた油状物をDMF 90 mLに溶解したものをA液とした。0-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-

イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HATU, 3.12 g、8.21 mmol) をDMF 90 mLに溶解したものをB液とした。DMF 1600 mLにDIEA (3.81 mL、21.9 mmol)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (1.12 g、8.22 mmol) を溶解し、A液及びB液を、シリンジポンプを用いて1.2 mL/hにて低速同時滴下し、滴下終了後24 時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を酢酸エチル及びヘキサンで洗浄することで化合物(a7) (1.57 g、2.96 mmol、収率54.2%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) : δ 1.46 [9H, s, Boc], 2.82-2.89 [1H, m, CH_2], 2.91-2.96 [2H, m, CH_2], 3.03-3.14 [1H, m, CH_2], 3.56-3.64 [2H, m, CH_2], 3.82-4.02 [3H, m, CH_2], 4.10-4.18 [1H, m, CH_2], 4.46-4.50 [1H, dd, CH], 7.02-7.04 [2H, d, CH], 7.60-7.62 [2H, d, CH].

ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$)⁺: m/z 553.09. found 553.10.

[0079] 合成例L1(e): 化合物(a8)

化合物(a7) (1.57 g、2.96 mmol)を4 N塩酸/酢酸エチル40 mLに懸濁し、室温にて4 時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた結晶をヘキサンで洗浄し、減圧乾燥することで化合物(a8) (1.36 g、2.92 mmol、収率98.4%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : δ 2.83-2.89 [1H, m, CH_2], 2.96 [1H, s, CH_2], 3.12-3.19 [1H, m, CH_2], 3.40-3.52 [2H, m, CH_2], 3.62-3.59 [2H, m, CH_2], 4.07-4.13 [1H, m, CH_2], 4.19-4.42 [1H, m, CH_2], 4.60-4.62 [1H, dd, CH], 6.11 [1H, s, NH], 6.54 [1H, s, NH], 6.96-7.01 [2H, d, CH], 7.58-7.60 [2H, d, CH].

ESI-MS ($\text{M}+\text{H}$)⁺: m/z 431.06. found 431.03.

[0080] 合成例L1(f): 化合物(a9)

化合物(a8) (880 mg、2.04 mmol) をDMF13.5mLに懸濁し、さらに炭酸カリウム (424 mg、3.06 mmol) を加えて懸濁させた。溶液を氷冷し、アルゴン雰囲気下ヨードエタン (327 μL 、4.08 mmol) を滴下した。滴下完了後、80 °Cで四日間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を酢酸エチルに懸濁

しろ過を行った。ろ液を5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をクロロホルムとメタノールを用いたフラッシュクロマトシステムにより生成を行うことで化合物(a9) (340 mg、0.742 mmol、収率36.3%)を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : δ 1.10 [3H, t, CH_3], 2.76-2.84 [2H, q, CH_2], 2.85-2.89 [1H, m, CH_2], 3.08-3.25 [6H, m, CH_2], 3.37-3.43 [1H, m, CH_2], 3.53-3.57 [1H, m, CH_2], 3.69-3.75 [1H, m, CH_2], 4.61-4.66 [1H, dd, CH], 6.59 [1H, s, NH], 6.84 [1H, s, NH], 6.97-6.99 [2H, d, CH], 7.16 [1H, s, NH], 7.58-7.60 [2H, d, CH].

ESI-MS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: m/z 459.09. found 459.17.

[0081] 合成例L1(g): 化合物(a10)

化合物(a9) (340 mg、0.742 mmol) をTHF 1.4 mLに懸濁し、溶液を氷冷した後、アルゴン雰囲気下、0.95 Mのボラン-THF錯体/THF溶液13.5 mLを緩徐に加え、1時間攪拌した後、24時間還流した。溶液を氷冷し、メタノール13.5 mLを加えた後、1時間攪拌し、溶媒を減圧留去した。その後、残渣に再度メタノール13.5 mLを加え、溶媒を減圧留去した。残渣に濃塩酸13.5 mLを加え、24時間室温で攪拌した後、1時間還流した。溶液を氷冷し、12.5 N水酸化ナトリウム水溶液を加えて塩基性とした後、クロロホルムで抽出した。有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をクロロホルム：メタノール：25質量%アンモニア水 (10 : 1 : 0.1) を溶出溶媒とするフラッシュクロマトシステムにより精製を行うことで化合物(a10) (163 mg、0.391 mmol、収率52.7%)を黄色油状物として得た。

[0082] 合成例L1(h): 化合物(a11)

化合物(a10) (197 mg、0.401 mmol) をアセトニトリル2.75 mLとDMF 0.55 mLの混液に溶解し、さらに炭酸カリウム (229 mg、1.65 mmol) を加えて懸濁させた。溶液を氷冷し、アルゴン雰囲気下、ブromo酢酸tert-ブチル (229 μ L、1.40 mmol) を滴下した。滴下完了後、室温で48時間攪拌し、懸濁液をろ

過した後、ろ液から溶媒を減圧留去した。残渣を少量のクロロホルムに溶解し、厚さ1 mmの分取用TLCにアプライし、クロロホルム：メタノール=8：1を展開溶媒とすることで精製し、化合物(a11) (306 mg、0.403 mmol、100%)を赤褐色油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : δ 0.98–1.03 [3H, t, CH_3], 1.41–1.48 [27H, m, tBu], 1.90–4.90 [27H, m, CH_2 , DOTA], 6.89–7.07 [2H, m, CH], 7.50–7.61 [2H, m, CH].

ESI-MS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: m/z 759.36. found 759.24.

[0083] 合成例L1(i): 化合物(a12)

化合物(a11) (306 mg、0.403 mmol) をDMF 2.8 mLに懸濁し、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (9.1 mg、0.0403 mmol)、1,2-ビス(ジフェニルホスフィノ)エタン (24.12 mg、0.0604 mmol)、 Et_3N (168 μL 、1.21 mmol)、ベンジルアルコール (840 μL 、8.06 mmol) を加え、一酸化炭素雰囲気下、24時間還流した。反応後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチルに溶解後、ろ過を行い、ろ液を5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層に硫酸ナトリウムを加え乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をクロロホルムとメタノールを用いたフラッシュクロマトシステムにより精製することで化合物(a12) (113 mg、0.166 mmol、収率41.4%) を黄色油状物として得た。

ESI-MS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: m/z 767.50. found 767.60.

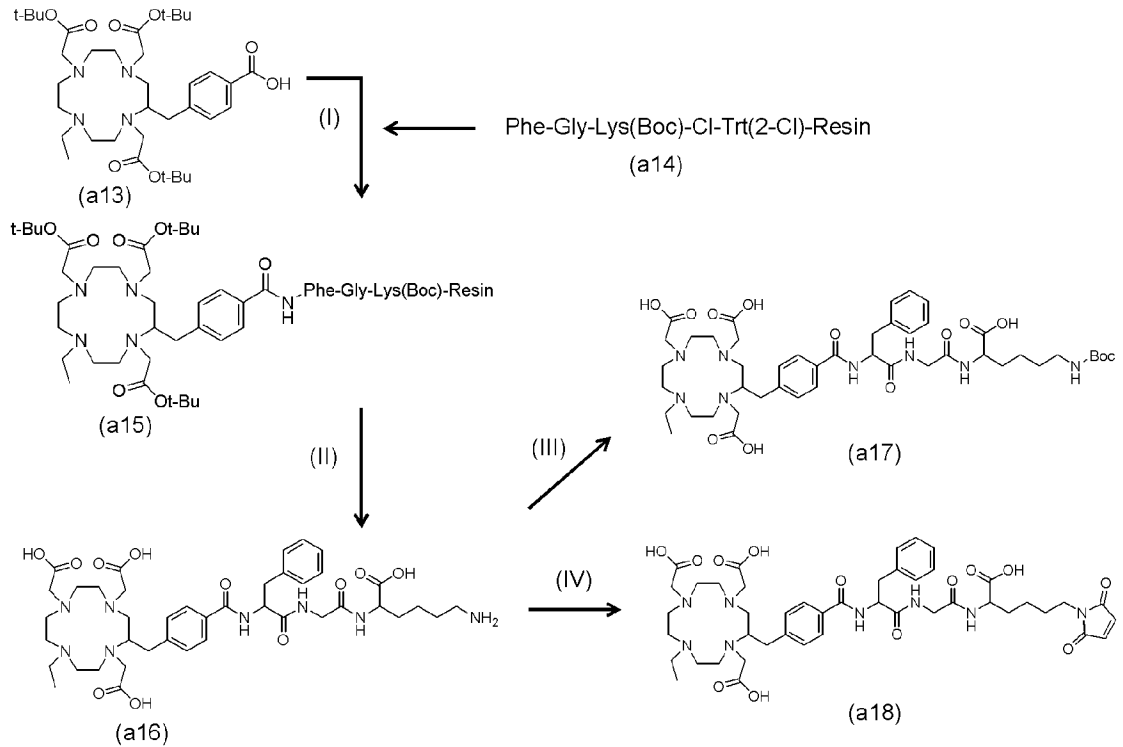
[0084] 合成例L1(j): 化合物(a13)

化合物(a12) (46 mg、0.0600 mmol) をメタノール1 mLに溶解した後、10質量% Pd/C を100mg加えて水素雰囲気下、室温で2時間攪拌した。反応溶液をろ過後、溶媒を減圧留去することで化合物(a13) (25.5mg、0.0377 mmol、収率62.8%) を黄色油状物として得た。

ESI-MS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: m/z 677.45. found 677.62.

[0085] 合成例L2 : CD03AEt-FGK(化合物(a16)(上述の化合物1-1と同じ)), CD03AEt-FGK-Boc(化合物(a17)), CD03AEt-FGK(Mal)(化合物(a18)(上述の化合物1-2と同じ))の合成

[化39]



(I) DIC, HOAt, DMF; TFA: TIS: MQ = 95: 2.5: 2.5, 2hr, (II) (Boc)₂O dioxane, satNaHCO₃; (III) satNaHCO₃aq, (Boc)₂O, dioxane, 2hr (IV) N-methoxycarbonylmaleimide, sat NaHCO₃aq

[0086] 合成例L2(I)及び(II): 化合物(a16)

Fmoc固相合成法を用いてペプチドを伸長した樹脂(a14) (22 μ mol)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(15.1 mg、110 μ mol)、化合物(a13) (15 mg、22 μ mol)をDMF溶解し、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(17.2 μ L、110 μ mol)を加えて室温で16時間緩やかに攪拌した。反応終了後DMF及びC H₂Cl₂を用いて樹脂を洗浄した。

得られた樹脂(a15)をトリフルオロ酢酸: トリイソプロピルシラン: 水= 95: 2.5: 2.5を組成とする溶液に懸濁し2時間緩やかに攪拌した。反応終了後、ろ過にて樹脂を除去し、ろ液を減圧留去することで白色結晶を得た。さらにHPLCにてImtakt Cadenza 5CD-C18 150×20 mmを用い移動相にはA相に0.1% TFA/MilliQ、B相に0.1% TFA/MeCNを使用し、0-35分でA相95%、B相5%からA相70%、B相30%まで変化させ、35-40分でA相70%、B相30%からA相0%、B相100%まで変化させる直線gradient法により流速5 mL/minで精製することで目的とする

化合物(a16)(以下、「CD03AEt-FGK」ともいう)(5.7 mg、6.78 μmol 、収率30.8%)を得た。

ESI-MS (M-H)⁻: m/z 839.4, found: 839.3

[0087] 合成例L2(III): 化合物(a17)

化合物(a16)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液100 μL に溶解し、1.5当量の(Boc)₂Oを溶解したジオキサン100 μL を加え、室温で二時間激しく攪拌した。減圧留去によりジオキサンを除去後、水層をクロロホルムにより洗浄を行った。さらに水層をHPLCにてImtakt Cadenza 5CD-C18 150×20 mmを用い移動相にはA相に0.1%TFA/MilliQ、B相に0.1% TFA/MeCNを使用し、2分までA相 100%に保った後に、2-5分でA相 100%、B相 0%からA相 95%、B相 5%まで変化させ、5-40分でA相 95%、B相 5%からA相 70%、B相 30%まで変化させ、40-45分でA相 70%、B相 30%からA相 0%、B相 100%まで変化させる直線gradient法により流速5 mL/minで精製することで目的とする化合物(a17)(以下、「CD03AEt-FGK-Boc」ともいう)を得た。

ESI-MS (M-H)⁻: m/z 939.5, found: 940.49

[0088] 合成例L2(IV): 化合物(a18) CD03AEt-FGK(Mal)

化合物(a16) (2.2 mg、2.6 μmol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液200 μL に溶解し、氷冷下N-メトキシカルボニルマレイミド (0.8 mg、5.2 μmol) を加え、氷冷下で二時間攪拌した。反応終了後、10質量%クエン酸水溶液で酸性に調整した。さらにHPLCにてImtakt Cadenza 5CD-C18 150×20 mmを用い移動相にはA相に0.1%TFA/MilliQ、B相に0.1% TFA/MeCNを使用し、5分までA相 100%に保った後に、5-35分でA相 100%、B相 0%からA相 55%、B相 45%まで変化させ、35-50分でA相 55%、B相 45%からA相 0%、B相 100%まで変化させる直線gradient法により流速5 mL/minで精製することで目的とする化合物(a18) (以下、「CD03AEt-FGK(Mal)」ともいう) (0.8 mg、0.870 μmol 、収率33.4%) を得た。

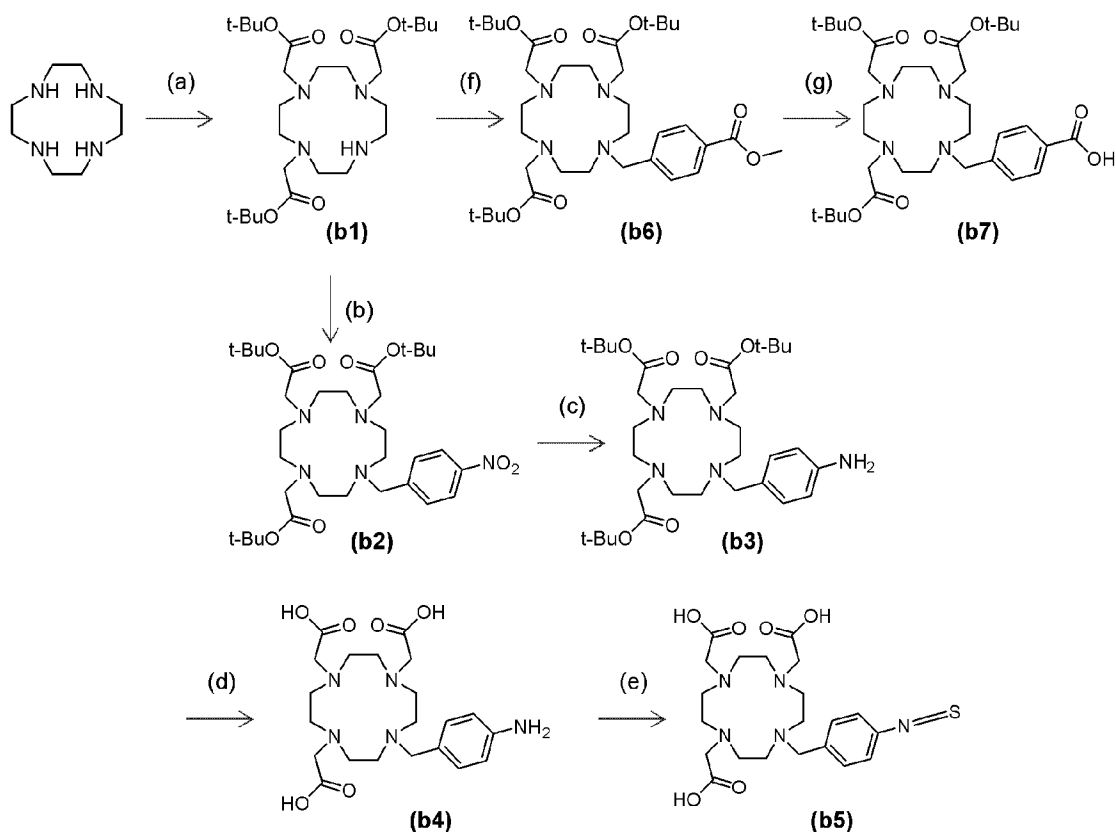
ESI-MS (M-H)⁻: m/z 919.42, found: 919.45.

[0089] [D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)及びD03A-Bn-SCN-Met-OH, D03A-Bn-SCN-MVK(Mal)の

合成]

合成例L3：化合物(b5)及び化合物 (b7) の合成

[化40]



(a) tert-butyl bromoacetate, NaHCO₃, acetonitrile, 43.1%; (b) 4-nitrobenzyl bromide, Na₂CO₃, acetonitrile, 98.0%; (c) 10% Pd/C, methanol, 1 N NaOH, 87.2%; (d) 10% anisole/TFA, 64.9%; (e) 1 M thiophosgene/chloroform, 74.9%

[0090] 合成例L3(a)：化合物(b1)の合成

サイクレン(523.6 mg, 3.04 mmol)をアセトニトリル(25 mL)に溶解し、NaHCO₃ (893.6 mg, 10.6 mmol)を加え、Ar雰囲気下、氷冷した後、ブromo酢酸tert-ブチル(1.39 mL, 3.34 mmol)を滴下した。室温で48時間攪拌した後、反応液をろ過し、ろ液を減圧留去した。残渣をトルエンを用いた再結晶により精製することで化合物(b1) (672.4 mg, 収率43.1%)を白色結晶として得た。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.44 (27H, s, tBu), 2.86–3.35 (22H, overlapped, CH₂)

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 515.3, found: 515.3.

[0091] 合成例L3(b)：化合物(b2)の合成

化合物(b1) (212.9 mg, 413.6 μmol)をアセトニトリル(4.0 mL)に溶解し

、Na₂CO₃ (87.7 mg, 827.4 μmol)を加え、Ar雰囲気下、氷冷した後、アセトニトリル(1.0 mL)に溶解した4-ニトロベンジルブロミド(134.1 mg, 620.7 μmol)を滴下した。60 °Cで18時間攪拌した後、反応液をろ過し、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム:メタノール=10:1を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することで化合物(b2) (263.4 mg, 収率98.0%)を黄色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.36 (27H, s, Bu), 2.06–3.58 (24H, overlapped, CH₂), 7.61–7.63 (2H, d, aromatic), 8.07–8.09 (2H, d, aromatic).

ESI-MS (M+Na)⁺: m/z 672.4, found: 672.3.

[0092] 合成例L3(c): 化合物(b3)の合成

化合物(b2) (150 mg, 231 μmol)をメタノール(3.5 mL)に溶解した後、1 N NaOH (0.5 mL)、10%Pd/C (15.4 mg)を加えた。水素雰囲気下、室温で1.5時間攪拌した。溶液をろ過した後、ろ液からメタノールを減圧留去し、クロロホルム(5 mL×3)により抽出した。有機層にNa₂SO₄を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(b3) (124.6 mg, 収率87.2%)を黄色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.43 (27H, s, Bu), 2.85–3.35 (24H, overlapped, CH₂), 6.59–6.61 (2H, d, aromatic), 6.93–6.95 (2H, d, aromatic).

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 620.4, found: 620.5.

[0093] 合成例L3(d): 化合物(b4)の合成

化合物(b3) (124.6 mg, 201 μmol)を10% アニソール/トリフルオロ酢酸(TFA) (2 mL)に溶解し、室温で4時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、ジエチルエーテル(5 mL)を加えることで結晶化させた。結晶をろ取し、ジエチルエーテルで洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(b4)のTFA塩(118.4 mg, 収率64.9%)を赤褐色結晶として得た。

¹H NMR (D₂O): δ 2.50–3.50 (24H, overlapped, CH₂), 6.78–6.81 (2H, d, aromatic), 7.36–7.38 (2H, d, aromatic).

[0094] 合成例L3(e): 化合物(b5)の合成

化合物(b4) (82.5 mg, 80.8 μmol)をmilliQ水(1 mL)に溶解し、1 M チオホスゲン/クロロホルム (1 mL)を加えた。室温で2時間攪拌した後、クロロホルム(5 mL \times 4)で洗浄した。水層を凍結乾燥することで化合物(b5) (57.4 mg, 収率74.9%)を淡黄色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (D_2O): δ 2.50–3.65 (24H, overlapped, CH_2), 7.18–7.22 (2H, d, aromatic), 7.38–7.41 (2H, d, aromatic).

[0095] 合成例L3(f): 化合物(b6)の合成

化合物(b1) (100.0 mg, 194.4 μmol)をアセトニトリル(2.0 mL)に溶解し、 Na_2CO_3 (26.5 mg, 252.9 μmol)を加え、Ar雰囲気下、氷冷した後、アセトニトリル(0.5 mL)に溶解したメチル-4-(ブロモメチル)ベンゾエート(58.0 mg, 253.0 μmol)を滴下した。60 $^\circ\text{C}$ で18時間攪拌した後、ろ過し、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム:メタノール=10:1を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することで化合物(b6) (106.1 mg, 収率82.6%)を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1.46 (27H, s, Bu), 2.01–3.58 (24H, overlapped, CH_2), 3.88 (3H, s, OCH_3), 7.53–7.55 (2H, d, aromatic), 7.95–7.97 (2H, d, aromatic).

ESI-MS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: m/z 663.4, found: 663.4

[0096] 合成例L3(g): 化合物(b7)の合成

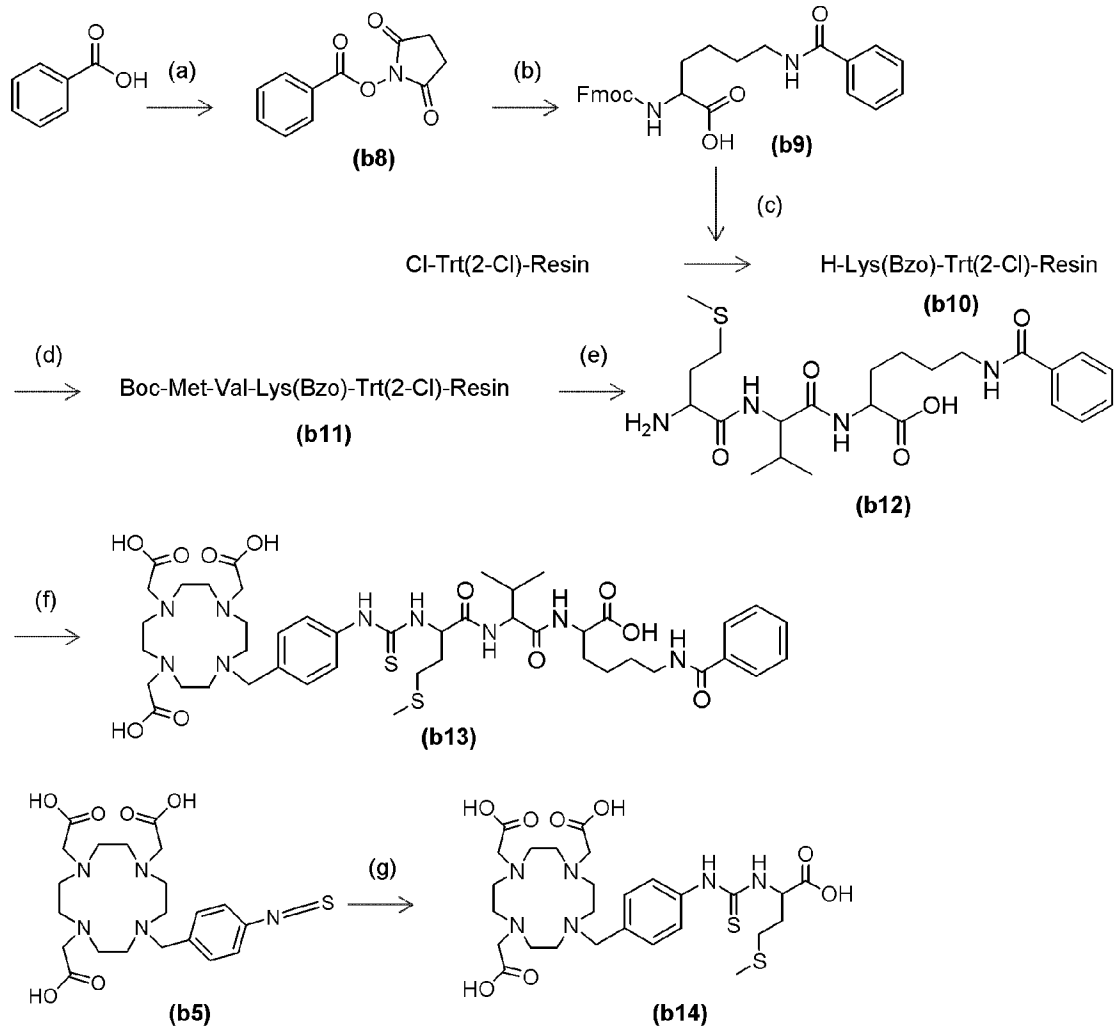
化合物(b6) (106.1 mg, 160.0 μmol)をメタノール(1 mL)に溶解した後、1 N NaOH (1 mL)を加えて室温で2時間攪拌した。溶液からメタノールを減圧留去した後、クロロホルム(5 mL \times 3)により抽出した。有機層に Na_2SO_4 を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(b7) (50.5 mg, 収率48.6%)を黄色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1.44 (27H, s, Bu), 2.13–3.58 (24H, overlapped, CH_2), 7.31–7.33 (2H, d, aromatic), 8.09–8.11 (2H, d, aromatic). ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: m/z 671.4, found: 671.5

[0097] 合成例L4 : D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo) (化合物(b13)) 及びD03A-Bn-SCN-Met-OH (

化合物(b14)の合成

[化41]



(a) N-hydroxysuccinimide, DCC, dichloromethane, 74.7%; (b) Fmoc-Lys-OH, DIPEA, DMF, 82.0%; (c) i. DIPEA, dichloromethane; ii. methanol, DIPEA; iii. 20% piperidine/DMF; (d) Fmoc solid-phase elongation; (e) TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5, 69.0%; (f) p-SCN-Bn-DO3A, 0.16 M borate buffer pH 11.0, 1 N NaOH, 53.3%; (g) methionine, 0.16 M borate buffer pH 11.0, 1 N NaOH, 36.2%

[0098] 合成例L4(a): 化合物(b8)の合成

安息香酸 (560 mg, 4.59 mmol)とN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS, 581 mg, 5.05 mmol)をCH₂Cl₂ (15 mL)に溶解し、氷冷した後、CH₂Cl₂ (8 mL)に溶解したN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC, 1.05 g, 5.05 mmol)を滴下した。室温で3時間攪拌した後、ろ過し、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(10 mL)に溶解し、sat. NaHCO₃ (10 mL×3)で洗浄した。有機層にMgSO₄を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(b8) (749.7 mg, 収率74.7%)を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 2.89 (4H, s, succinimide), 7.47–7.51 (2H, m, aromatic), 7.64–7.68 (1H, m, aromatic), 8.11–8.13 (2H, m, aromatic)

[0099] 合成例L4(b): 化合物(b9)の合成

Fmoc-Lys-OH (86.7 mg, 100 μmol)をDMF (1.5 mL)に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA, 40 μL , 246 μmol)を加え、Ar雰囲気下、氷冷したのち、DMF (0.5 mL)に溶解した化合物(b8)を滴下した。室温で3時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル(5 mL)に溶解し、10質量%クエン酸(5 mL \times 3)で洗浄した。有機層に Na_2SO_4 を加え乾燥した後、溶媒を減圧留去し、クロロホルム:メタノール=5:1を展開溶媒とするTLC分取により精製することで、化合物(b9) (82.0 mg, 収率82.0%)を白色結晶として得た。

ESI-MS ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: m/z 473.2, found: 473.2

[0100] 合成例L4(c): 化合物(b10)の合成

Cl-Trt(2-Cl)Resin (62.5 mg, 100 μmol 、渡辺化学工業株式会社)を出発物質として、Fmoc-Lys(Bzo)-OH (47.2 mg, 100 μmol)及びDIPEA (65 μL , 400 μmol)をジクロロメタン(1.5 mL)中1.5時間反応させた。メタノール(1.5 mL)及びDIPEA (65 μL)を加えて反応を停止させた。樹脂をDMF次いでジクロロメタンで洗浄した。樹脂を乾燥させた後、ピペリジン処理の際に生成するN-(9-フルオレニルメチル)ピペリジンのA301における吸光度を測定することによりFmoc-Lys(Bzo)-OHの樹脂への導入量を定量(0.96 mmol/g)した。20% ピペリジン/DMF (mL)を加え、室温で20分間攪拌することで、化合物(b10)を作製した。樹脂の一部を採取してkaiser testを行い、 $\text{N}\alpha$ -Fmoc基の脱保護を確認した。

[0101] 合成例L4(d): 化合物(b11)の合成

化合物(b10) (22.9 mg, 22.0 μmol)を出発物質として、Fmoc固相合成法により2.5等量のFmoc-Met-OH (55.0 μmol)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC, 8.5 μL , 55.0 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物(HOBt, 8.43 mg, 55.0 μmol)をDMF中、室温で2時間攪拌した。樹脂の一部を採取してKaiser testを行うことで、縮合反応の終了を確認した後、20% ピ

ペリジン/DMF (2 mL)を加え、20分間室温で攪拌した。樹脂の一部を採取して Kaiser testを行いN α -Fmoc基の脱保護を確認した。さらに、保護アミノ酸Boc-Met-OHを用いて同様の操作を行うことで、化合物(b11)を作製した。

[0102] 合成例L4(e): 化合物(b12)の合成

化合物(b11)をTFA:トリイソプロピルシラン(TIS):H₂O=95:2.5:2.5 (1 mL)の混液中室温で2時間攪拌した。樹脂をろ去した後、ろ液を減圧留去して得られた残渣にジエチルエーテルを加えることで結晶化させた。結晶をろ取し、ジエチルエーテルで洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(b12)のTFA塩(9.7 mg, 収率69.0%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 481.2, found: 481.2.

[0103] 合成例L4(f): 化合物(b13)の合成

化合物(b5) (1.0 mg, 1.05 μ mol)と化合物(b12) (1.58 μ mol)を0.16 M ホウ酸緩衝液 pH 11.0 (100 μ L)に溶解した後、1 N NaOHでpH 9.0に調整した。室温で2時間攪拌した後、分取用RP-HPLCにより精製し、化合物(b13) (以下、「D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)」ともいう)のTFA塩(0.8 mg, 収率53.3%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 974.4, found: 974.4.

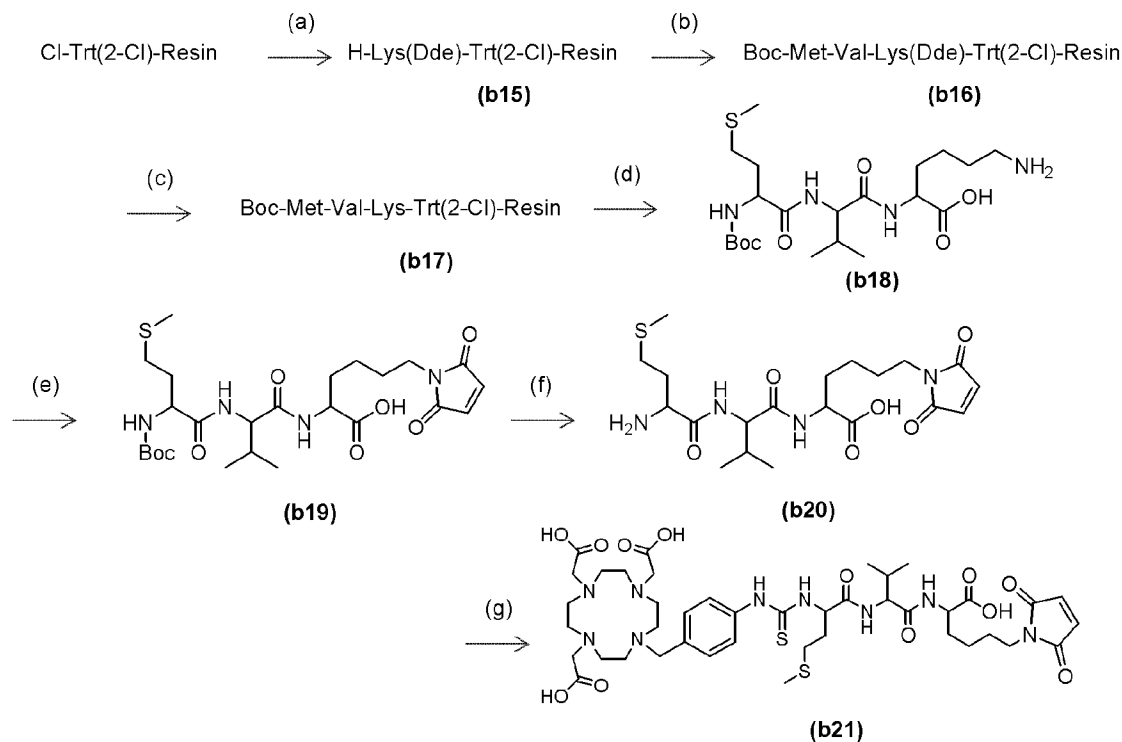
[0104] 合成例L4(g): 化合物(b14)の合成

化合物(b5) (5.5 mg, 5.78 μ mol)とメチオニン(1.29 mg, 8.67 μ mol)を出発物質として、合成例L4(f)と同様の操作を行うことで、化合物(b14) (以下、「D03A-Bn-SCN-Met-OH」ともいう)のTFA塩(2.3 mg, 収率36.2%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 643.2, found: .643.2

[0105] 合成例L5 : D03A-Bn-SCN-MVK(Mal) (化合物(b21)) の合成

[化42]



(a) i. Fmoc-Lys(Dde)-OH, DIPEA, dichloromethane; ii. methanol, DIPEA; iii. 20% piperidine/DMF; (b) Fmoc solid-phase elongation; (c) 2% hydrazine/DMF; (d) acetic acid:TFE:CH₂Cl₂=3:1:6, 93.9%; (e) NMCM, sat. NaHCO₃, 94.1%; (f) 4 M HCl/AcOEt, 92.4%; (g) p-SCN-Bn-DO3A, TEA, DMF, 33.2%

[0106] 合成例L5(a): 化合物(b15)の合成

Cl-Trt(2-Cl)Resin (104.4 mg, 114.8 μmol、渡辺化学工業株式会社)を出発物質として、Fmoc-Lys(Dde)-OH (61.2 mg, 114.8 μmol)及びDIPEA (81 μL, 459.2 μmol)をジクロロメタン(2 mL)中1.5時間反応させた。メタノール及びDIPEAを加えて反応を停止させた。樹脂をDMF次いでジクロロメタンで洗浄した。合成例L4(c)と同様の方法でFmoc-Lys(Bzo)-OHの樹脂への導入量を定量(0.769 mmol/g)した。20% ピペリジン/DMF (2 mL)を加え、室温で20分間攪拌することで、化合物(b15)を作製した。樹脂の一部を採取してkaiser testを行い、Nα-Fmoc基の脱保護を確認した。

[0107] 合成例L5(b): 化合物(b16)の合成

化合物(b15) (153.4 mg, 114.8 μmol)を出発物質として、保護アミノ酸を順次Fmoc-Val-OH、Boc-Met-OHと変えて、合成例L4(d)と同様の操作を行うことで、化合物(b16)を得た。

[0108] 合成例L5(c): 化合物(b17)の合成

化合物(b16) (117.9 μmol)を2% ヒドラジン/DMF (2 mL)中室温で1時間攪拌した後、樹脂の一部を採取しKaiser testを行い、反応の終了を確認した。樹脂をDMF次いでジクロロメタンで洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(b17)を得た。

[0109] 合成例L5(d): 化合物(b18)の合成

化合物(b17)を酢酸:2,2,2-トリフルオロエタノール(TFE):ジクロロメタン=3:1:6 (2 mL)の混液中室温で2時間攪拌した。樹脂をろ去した後、ろ液を減圧留去して得られた残渣にジエチルエーテルを加えることで結晶化させた。結晶をろ取り、ジエチルエーテルで洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(b18)の酢酸塩(51.4 mg, 収率93.9%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 477.2, found: 477.2.

[0110] 合成例L5(e): 化合物(b19)の合成

化合物(b18) (6.60 mg, 13.9 μmol)を氷冷化でsat. NaHCO₃ (100 μL)に溶解し、N-メトキシカルボニルマレイミド(NMCM, 3.22 mg, 20.8 μmol)を加えた。氷冷下2時間攪拌した後、5質量% クエン酸を加え中和し、クロロホルム(5 mL×3)により抽出した。Na₂SO₄を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで、化合物(b19) (7.26 mg, 収率94.1%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 557.2, found: 557.2.

[0111] 合成例L5(f): 化合物(b20)の合成

化合物(b19) (7.26 mg, 13.1 μmol)を4 M HCl/酢酸エチル(1 mL)に溶解し、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、ヘキサンで共沸することにより、化合物(b20)の塩酸塩(5.92 mg, 収率92.4%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 457.2, found: 457.2.

[0112] 合成例L5(g): 化合物(b21)の合成

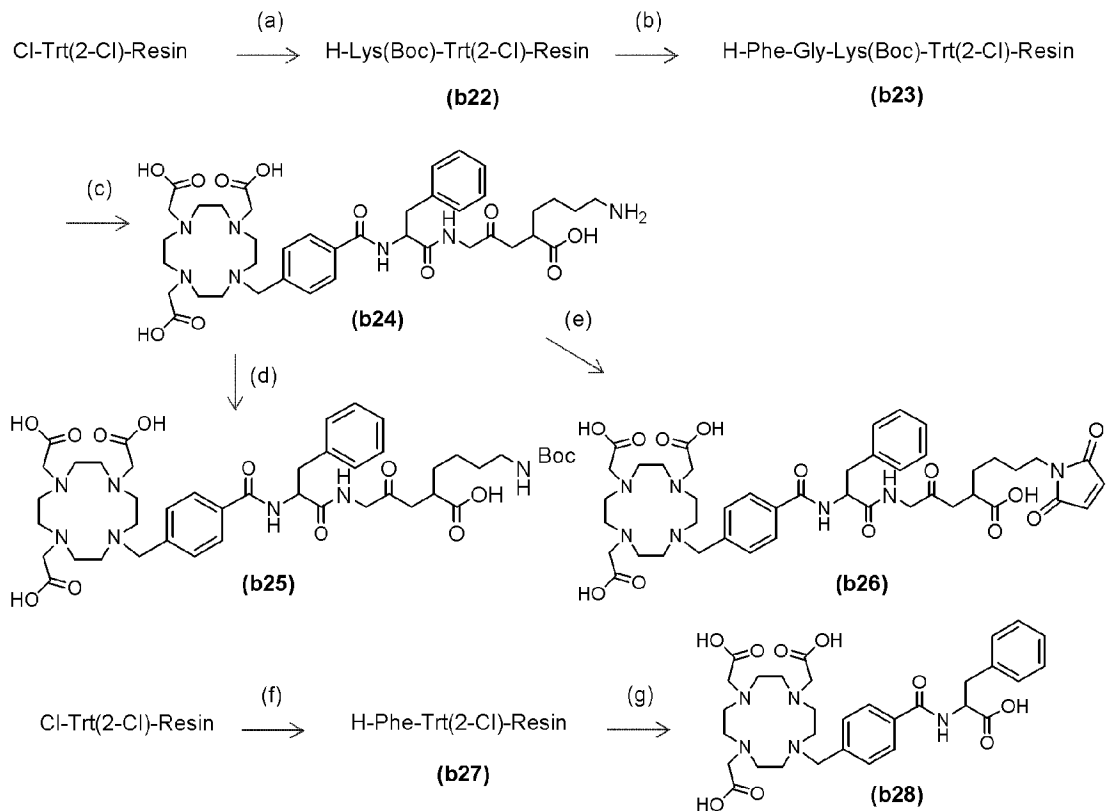
化合物(b20)の塩酸塩(3.38 mg, 4.74 μmol)をDMF(100 μL)に溶解し、トリエチルアミン (TEA, 6 μL , 43.3 μmol)を加えた。化合物(b5) (3.0 mg, 3.16 μmol)を加え、室温で2時間攪拌した後、H₂Oで10倍に希釈し、分取用RP-HPLCにより精製することで化合物(b21)(以下「D03A-Bn-SCN-MVK(Mal)」とも

いう)のTFA塩(1.5 mg, 収率33.2%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 972.5, found: 972.5.

[0113] [D03A-Bn-C0-FGK、D03A-Bn-C0-FGK(Boc)、D03A-Bn-C0-FGK(Mal)、D03A-Bn-C0-Phe-OHの合成]

合成例L6 : D03A-Bn-C0-FGK (化合物(b24) (上述の化合物 1 - 3 と同じ))、D03A-Bn-C0-FGK(Boc) (化合物(b25))、D03A-Bn-C0-FGK(Mal) (化合物(b26)) (上述の化合物 1 - 4 と同じ))、D03A-Bn-C0-Phe-OH (化合物(b28)) の合成 [化43]



(a) i. Fmoc-Lys(Boc)-OH, DIPEA, dichloromethane; ii. methanol, DIPEA; iii. 20% piperidine/DMF; (b) Fmoc solid-phase elongation; (c) i. p-COOH-Bn-DO3A, DIC, HOAt, DMF; ii. TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5, 53.7%; (d) (Boc)₂O, sat.NaHCO₃, 26.9%; (e) NMCM, sat.NaHCO₃, 44.4%; (f) i. Fmoc-Phe-OH, DIPEA, dichloromethane; ii. methanol, DIPEA; iii. 20% piperidine/DMF; (g) i. p-COOH-Bn-DO3A, DIC, HOAt, DMF; ii. TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5, 59.1%

[0114] 合成例L6(a): 化合物(b22)の合成

Cl-Trt(2-Cl)Resin (22.1 mg, 24.3 μmol、渡辺化学工業株式会社)を出発物質として、Fmoc-Lys(Boc)-OH (17.1 mg, 36.5 μmol)及びDIPEA (16.5 μL, 97.2 μmol)をジクロロメタン (1 mL)中1.5時間反応させた。メタノール及びDIPEAを加えて反応を停止させた。樹脂をDMF次いでジクロロメタンで洗浄

した。合成例L4(c)と同様の方法でFmoc-Lys(Boc)-OHの樹脂への導入量を定量(0.884 mmol/g)した。20% ピペリジン/DMF (2 mL)を加え、室温で20分間攪拌することで、化合物(b22)を作製した。樹脂の一部を採取してkaiser testを行い、N α -Fmoc基の脱保護を確認した。

[0115] 合成例L6(b): 化合物(b23)の合成

化合物(b22) (12.1 μ mol)を出発物質として、保護アミノ酸を順次Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Phe-OHと変えて、合成例L4(d)と同様の操作を行うことで、化合物(b23)を得た。

[0116] 合成例L6(c): 化合物(b24)の合成

化合物(b23) (12.1 μ mol)に対して、化合物(b7) (15.7 mg, 24.2 μ mol)、DIC (3.7 μ L, 24.2 μ mol)、HOAt (3.29 mg, 24.2 μ mol)をDMF中、室温で一晩攪拌した。樹脂の一部を採取しKaiser testを行うことで、縮合反応の終了を確認した後、TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5 (1 mL)の混液中室温で2時間攪拌した。樹脂をろ去した後、ろ液を減圧留去してえられた残渣にジエチルエーテルを加えることで結晶化した。結晶をろ取し、ジエチルエーテルで洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(b24) (以下、「D03A-Bn-CO-FGK」ともいう)のTFA塩(9.0 mg, 収率53.7%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 813.4, found: 813.4.

[0117] 合成例L6(d): 化合物(b25)の合成

化合物(b24) (2.17 μ mol)をsat. NaHCO₃ (100 μ L)に溶解した後、ジオキサソ(100 μ L)に溶解した(Boc)₂O (7.1 mg, 3.26 μ mol)を加え室温で2時間激しく攪拌した。ジオキサソを減圧留去した後、クロロホルム(3 mL \times 3)で洗浄した。水層を分取用RP-HPLCにより精製することで化合物(b25) (以下、「D03A-Bn-CO-FGK(Boc)」ともいう)のTFA塩(0.8 mg, 収率26.9%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 913.5, found: 913.5.

[0118] 合成例L6(e): 化合物(b26)の合成

化合物(b24) (2.17 μ mol)をsat. NaHCO₃ (100 μ L)に溶解した後、氷冷しNM

CM (0.5 mg, 3.26 μmol)を加えた。氷冷下2時間攪拌した後、分取用RP-HPLCにより精製することで化合物(b26) (以下、「D03A-Bn-CO-FGK(mal)」ともいう)のTFA塩(1.3 mg, 収率44.4%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 893.4, found: 893.4.

[0119] 合成例L6(f): 化合物(b27)の合成

Cl-Trt(2-Cl)Resin (5 mg, 5.50 μmol 、渡辺化学工業株式会社)を出発物質として、Fmoc-Phe-OH (6.01 μmol)及びDIPEA (3.73 μL , 21.9 μmol)をジクロロメタン (0.5 mL)中1.5時間反応させた。メタノール及びDIPEAを加えて反応を停止させた。樹脂をDMF次いでジクロロメタンで洗浄した。合成例L4(c)と同様の方法でFmoc-A.A.-OHの樹脂への導入量を定量した(0.917 mmol/g)。20% ピペリジン/DMF (2 mL)を加え、室温で20分間攪拌することで、化合物(b27)を作製した。樹脂の一部を採取してkaiser testを行い、N α -Fmoc基の脱保護を確認した。

[0120] 合成例L6(g): 化合物(b28)の合成

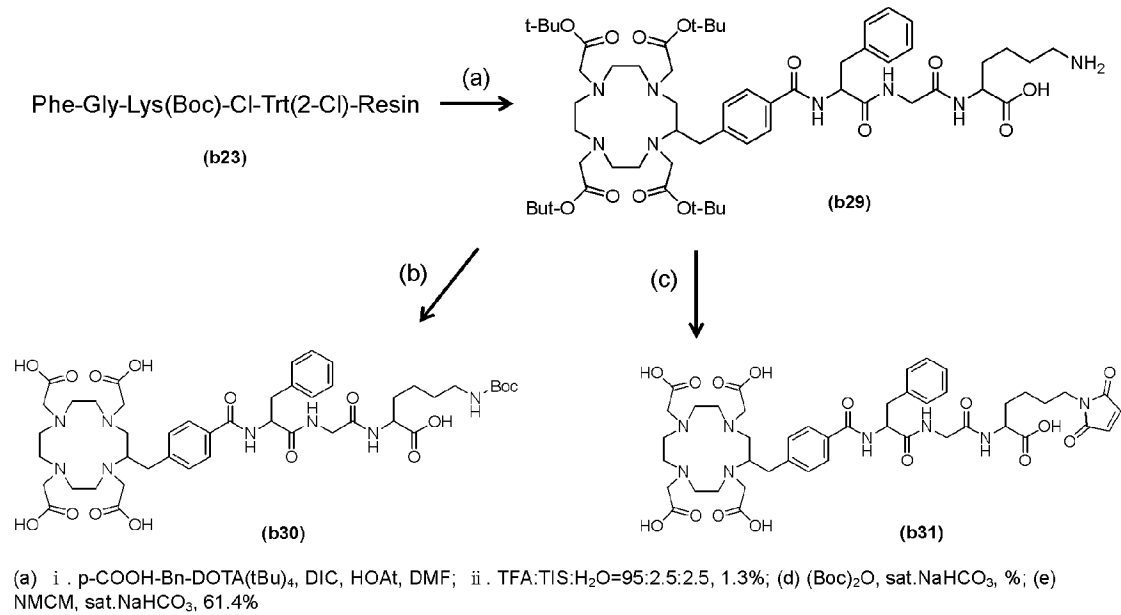
化合物(b27) (5.5 μmol)を出発物質として、合成例L6(c)と同様の操作をすることで化合物(b28) (以下、「D03A-Bn-CO-Phe-OH」ともいう)のTFA塩(4.5 mg, 収率59.1%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 628.3, found: 628.3.

[0121] [CDOTA-Bn-CO-FGK、CDOTA-Bn-CO-FGK(Boc)、CDOTA-Bn-CO-FGK(Mal)の合成]

合成例L7: CDOTA-Bn-CO-FGK (化合物(b29))、CDOTA-Bn-CO-FGK(Boc) (化合物(b30))、CDOTA-Bn-CO-FGK(Mal) (化合物(b31))の合成

[化44]



[0122] 合成例L7(a): 化合物(b29)の合成

p-COOH-Bn-DOTA(tBu)₄ (52.4 μmol) を出発物質として、合成例L6(c)と同様の操作をすることで化合物(b29) (以下、「CDOTA-Bn-CO-FGK」ともいう) のTFA塩(2.4 mg, 収率1.3%)を白色結晶として得た。

ESI-MS ([M+K]⁻-H)⁻: m/z 907.36, found: 907.31.

[0123] 合成例L7(b): 化合物(b30)の合成

化合物(b29) (5.75 μmol) を出発物質として、合成例L6(d)と同様の操作をすることで化合物(b30) (以下、「CDOTA-Bn-CO-FGK(Boc)」ともいう) のTFA塩(0.4 mg, 収率71.8%)を白色結晶として得た。

ESI-MS ([M+K]⁻-H)⁻: m/z 1007.41, found: 1007.31.

[0124] 合成例L7(c): 化合物(b31)の合成

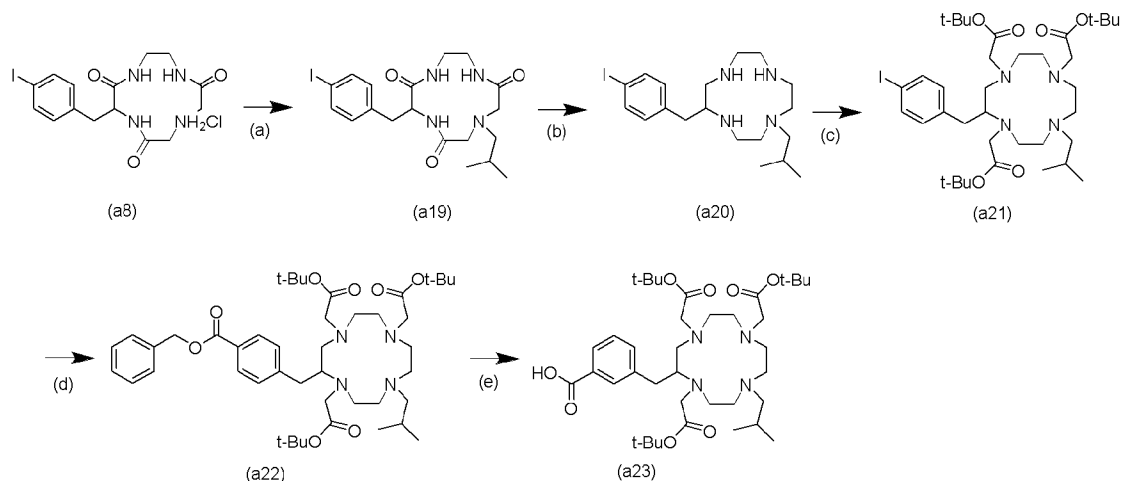
化合物(b29) (0.694 μmol) を出発物質として、合成例L6(e)と同様の操作をすることで化合物(b31) (以下、「CDOTA-Bn-CO-FGK(mal)」ともいう) のTFA塩(0.6 mg, 収率61.4%)を白色結晶として得た。

ESI-MS (M-H)⁻: m/z 949.39, found: 949.43.

[0125] [CD03AiBu-FGK(Boc), CD03AiBu-FGK(mal), CD03AiBu-Pheの合成]

合成例L8: 化合物(a23)の合成

[化45]



(a) isobutylaldehyde, sodium triacetoxyborohidride, THF, 42.4%; (b) 1M BH₃-THF, THF, 74.7%; (c) *tert*-butyl bromoacetate, Na₂CO₃, acetonitrile, 58.8%; (d) Pd(OAc)₂, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, Et₃N, CO, BnOH, DMF, 25.5% ; (j) 10% Pd/C, MeOH, 48.8%.

[0126] 合成例L8(a):化合物(a19)の合成

化合物(a8) (913 mg、1.96 mmol)をTHF (20 mL)に溶解し、isobutylaldehyde (357 μ L、3.91 mmol)、sodium triacetoxyborohidride (498 mg、2.35 mmol)を加え、Ar雰囲気下、室温で一晩拌した。Isobutylaldehyde (179 μ L、1.96 mmol)、sodium triacetoxyborohidride (249 mg、1.18 mmol)を加えた後、さらに室温で2時間攪拌した。反応液を氷冷し、水を加えた後、THFを減圧留去して得られた水溶液からクロロホルムで三回抽出した。有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をクロロホルムとメタノールを用いたフラッシュクロマトシステムにより生成を行うことで化合物(a19) (403 mg、829 μ mol、42.4%)を白色結晶として得た。

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.92–0.95 (6H, m, CH₃), 1.68–1.71 (1H, m, CH), 2.40–2.44 (2H, m, CH₂), 2.82–3.30 (8H, overlapped, CH₂), 3.61–3.74 (2H, m, CH₂), 4.58–4.62 (1H, m, CH), 6.48 (1H, s, NH), 6.66 (1H, s, NH), 6.96–6.98 (2H, d, CH₂), 7.56–7.58 (2H, d, CH₂), 8.00 (1H, s, NH). ESI-MS (M +H)⁺: m/z 487.12, found: 487.18.

[0127] 合成例L8(b):化合物(a20)の合成

化合物(a19) (403 mg、829 μmol)をTHF 2 mLに懸濁し、溶液を氷冷した後、アルゴン雰囲気下、0.95 Mのボラン-THF錯体/THF溶液13 mLを緩徐に加え、1時間攪拌した後、22時間還流した。溶液を氷冷し、メタノール13 mLを加えた後、1時間攪拌し、溶媒を減圧留去した。その後、残渣に再度メタノール13 mLを加え、溶媒を減圧留去した。残渣に濃塩酸13 mLを加え、24 時間室温で攪拌した後、1 時間還流した。溶液を氷冷し、12.5 N水酸化ナトリウム水溶液を加えて塩基性とした後、クロロホルムで抽出した。有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をクロロホルム：メタノール：25質量%アンモニア水 (10：1：0.1) を溶出溶媒とするフラッシュクロマトシステムにより精製を行うことで化合物(a20) (275 mg、619 μmol 、収率74.7%) を黄色油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 0.89–0.92 (6H, m, CH_3), 1.80–1.84 (1H, m, CH), 2.06–2.89 (19H, overlapped, CH , CH_2), 6.92–6.94 (2H, d, CH_2), 7.58–7.60 (2H, d, CH_2).

[0128] 合成例L8(c):化合物(a21)の合成

化合物(a20) (275 mg、619 μmol)をアセトニトリル 2 mLに懸濁し、炭酸ナトリウム(428 mg、3.10 mmol)を加えた。溶液を氷冷し、アルゴン雰囲気下、ブromo酢酸tert-ブチル (272 μL 、1.86 mmol) を滴下した。滴下完了後、室温で24時間攪拌し、懸濁液をろ過した後、ろ液から溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルムとメタノールを用いたフラッシュクロマトシステムにより生成を行うことで化合物(a21) (286 mg、364 μmol 、58.8%)を黄色油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 0.86–0.89 (6H, m, CH_3), 1.41–1.50 (27H, m, tBu), 1.86–3.90 (26H, overlapped, CH , CH_2), 6.99–7.01 (2H, d, CH_2), 7.59–7.61 (2H, d, CH_2). ESI-MS ($\text{M}+\text{H}$)⁺: m/z 787.39, found: 787.45.

[0129] 合成例L8(d):化合物(a22)の合成

化合物(a21) (286 mg、364 μmol)をDMF 3.0 mLに懸濁し、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (16.3 mg、0.0728 mmol)、1,2-ビス(ジフェニルホスフィノ)エタン (58.0 mg、0.1

46 mmol)、Et₃N (156 μL、1.12 mmol)、ベンジルアルコール (753 μL、7.28 mmol) を加え、一酸化炭素雰囲気下、一晩還流した。反応後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をクロロホルムとメタノールを用いたフラッシュクロマトシステムにより精製することで化合物(a22) (73.8 mg、92.8 μmol、収率25.5%) を黄色油状物として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 795.53, found: 795.40.

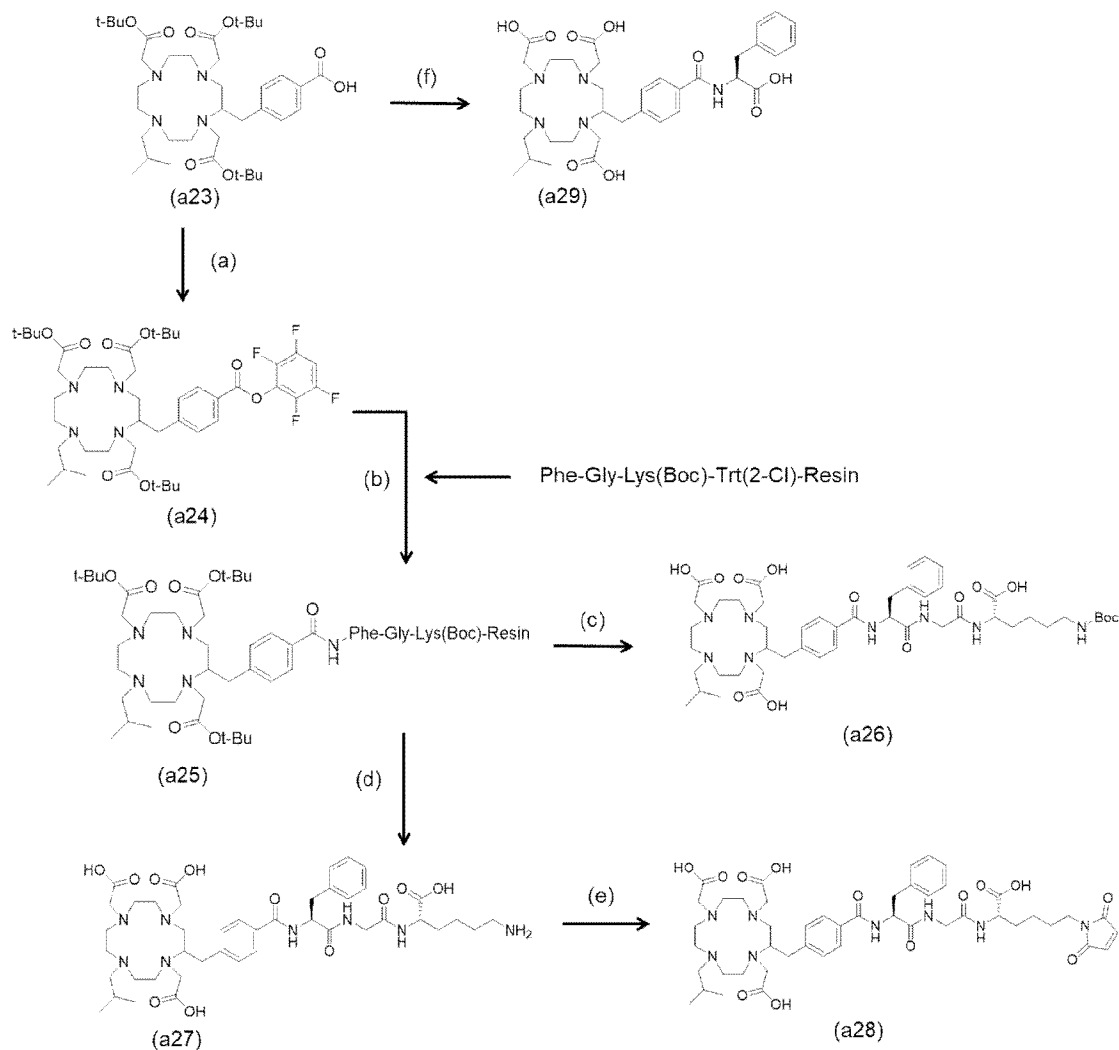
[0130] 合成例L8(e):化合物(a23)の合成

化合物(a22) (73.8 mg、92.8 μmol) をメタノール1.5 mLに溶解した後、10質量% Pd/Cを150 mg加えて水素雰囲気下、室温で5時間攪拌した。反応溶液をろ過後、溶媒を減圧留去することで化合物(a23) (31.9 mg、45.3 μmol、収率48.8%) を白色結晶として得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 705.48, found: 705.40.

[0131] 合成例L9:化合物(a28)の合成

[化46]



(a) 2,3,5,6-tetrafluorophenol, EDC, Et₃N, DMF, 68.9%; (b) Phe-Gly-Lys(Boc)-Trt(2-Cl)-Resin, DIEA, DMF; (c) AcOH : 2,2,2-trifluoroethanol : CH₂Cl₂ = 3 : 1 : 6, 2.1%; (d) TFA: TIS : water = 95 : 2.5 : 2.5, 6.4%; (e) N-methoxycarbonylmalesimide, sat. NaHCO₃, 45.5%; (f) i) H-Phe-OtBu HCl, COMU, DIEA, DMF, ii) 10% anisole/TFA, 2.3%.

[0132] 合成例L9(a):化合物(a24)の合成

化合物(a23) (23.7 mg、33.6 μmol) をDMF 0.9 mLに溶解した後、2,3,5,6-テトラフルオロフェノール (8.4 mg、50.6 μmol)、トリエチルアミン (9.3 μL、66.9 μmol)を加えた。溶液を氷冷し、EDC (9.6 mg、50.6 μmol)を加えた後、室温に戻し、4時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を酢酸エチルに溶解し、飽和塩化アンモニウム水溶液で三回洗浄した。有機層に硫酸

ナトリウムを加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(a24) (18.3 mg、23.2 μmol 、収率68.9%) を黄色油状物として得た。

[0133] 合成例L9(b)及び(c): 化合物 (a26)の合成

Fmoc固相合成法を用いてペプチドを伸長した樹脂(64.0 mg、57.6 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(23.6 μL 、135 μmol)、化合物(a24) (18.3 mg、23.2 μmol)をDMFに溶解し、室温で16時間緩やかに攪拌した。反応終了後DMF及び CH_2Cl_2 を用いて樹脂を洗浄した。

得られた樹脂(a25)を酢酸: 2,2,2-トリフルオロエタノール: ジクロロメタン= 3 :1 : 6を組成とする溶液に懸濁し2時間緩やかに攪拌した。反応終了後、ろ過にて樹脂を除去し、ろ液を減圧留去し、さらにトルエンで三回共沸した。残渣をHPLCにてImtakt Cadenza 5CD-C18 150 \times 20 mmを用い移動相にはA相に0.1%TFA/MilliQ、B相に0.1% TFA/MeCNを使用し、0-35分でA相95%、B相5%からA相50%、B相50%まで変化させ、35-45分でA相50%、B相50%からA相0%、B相100%まで変化させる直線gradient法により流速5 mL/minで精製 (保持時間 34.7分) することで目的とする化合物(a26) (以下、「CD03AiBu-FGK(Boc)」ともいう) (1.0 mg、0.70 μmol 、収率2.1%)を得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 969.53, found: 969.51.

[0134] 合成例L9(d): 化合物(a27)の合成

Fmoc固相合成法を用いてペプチドを伸長した樹脂(48.3 mg、43.4 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(17.8 μL 、102 μmol)、化合物(a24) (18.3 mg、17.5 μmol)を用いて作製した上記と同様の方法で作製した樹脂(a25)をトリフルオロ酢酸: トリイソプロピルシラン: 水= 95 : 2.5 : 2.5を組成とする溶液に懸濁し2時間緩やかに攪拌した。反応終了後、ろ過にて樹脂を除去し、ろ液を減圧留去し、さらにトルエンで三回共沸した。残渣を水に溶解し、ジエチルエーテルで三回洗浄して得られた水溶液を凍結乾燥させて得られた白色結晶をHPLCにてImtakt Cadenza 5CD-C18 150 \times 20 mmを用い移動相にはA相に0.1%TFA/MilliQ、B相に0.1% TFA/MeCNを使用し、0-35分でA相95%、B相5%からA相50%、B相50%まで変化させ、35-45分でA相50%、B相50%からA相0%

、B相100%まで変化させる直線gradient法により流速5 mL/minで精製（保持時間 24.8分）することで目的とする化合物(a27)（以下、「CD03AiBu-FGK」ともいう）(1.8 mg、1.25 μ mol、収率6.4%)を得た。ESI-MS (M+H)⁺: m/z 869.48, found: 869.38.

[0135] 合成例L9(e): 化合物(a28)の合成例

化合物 (a27) (1.8 mg、2.6 μ mol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液150 μ Lに溶解し、氷冷下N-メトキシカルボニルマレイミド (1.0 mg、6.5 μ mol) を加え、氷冷下で二時間攪拌した。反応終了後、5質量%クエン酸水溶液で酸性に調整した。さらにHPLCにてImtakt Cadenza 5CD-C18 150 \times 20 mmを用い移動相にはA相に0.1%TFA/MilliQ、B相に0.1% TFA/MeCNを使用し、5分までA相100%に保った後に、5-35分でA相100%、B相0%からA相40%、B相60%まで変化させ、35-50分でA相40%、B相60%からA相0%、B相100%まで変化させる直線gradient法により流速5 mL/minで精製（保持時間 30.7分）することで目的とする化合物(a28)（以下、「CD03AiBu-FGK(Mal)」ともいう）(0.8 mg、0.57 μ mol、収率45.5%)を得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 949.47, found: 949.36.

[0136] 合成例L9(f): 化合物(a29)の合成

化合物 (a23) (2.7 mg、3.83 μ mol) をDMF (0.3 mL) に溶解し、H-Phe-Ot Bu \cdot HCl (1.5 mg、5.75 μ mol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (2.9 μ L、17.2 μ mol)、(1-シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチリデンアミノオキシ)ジメチルアミノ-モルホリノ-カルベニウムヘキサフルオロリン酸塩 (4.9 mg、11.5 μ mol) を添加し、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を酢酸エチルに再溶解し、5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液で三回、5質量%クエン酸水溶液で三回洗浄した。有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで得られた残渣に10質量%アニソール/TFA溶液 (2.0 mL) を加えて、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、トルエンで三回共沸した。残渣を水に溶解し、ジエチルエーテルで三回洗浄して得られた水溶液から溶媒を減圧留去して得られた白色結晶をHPLCにてImtakt Ca

denza 5CD-C18 150×20 mmを用い移動相にはA相に0.1%TFA/MilliQ、B相に0.1% TFA/MeCNを使用し、0-30分でA相100%、B相0%からA相40%、B相60%まで変化させ、30-35分でA相40%、B相60%からA相0%、B相100%まで変化させる直線gradient法により流速5 mL/minで精製（保持時間 25.2分）することで目的とする化合物(a29)(以下、「CD03AiBu-Phe」ともいう)(0.1 mg、8.8 μmol、収率2.3%)を得た。

ESI-MS (M+H)⁺: m/z 684.36ound: 684.27

[0137] [二官能性キレート試薬結合Fabの作製]

合成例F1: Fab(Rabbit serum IgG由来)及びIT-Fab(Rabbit serum IgG由来)の作製

(Fab(Rabbit serum IgG由来)の作製)

Rabbit serum IgG (9 mg)を10 mM Na₂EDTA及び20 mM cysteineを含む20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0) 1.5 mLに溶解し、immobilized papain 50% slurry (Thermo Scientific, Yokohama, Japan) 500 μLを加え、37 °Cで42時間インキュベートした。反応終了後、10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)を2 mL加え、0.45 μmのフィルターでろ過し、ろ液を回収した。ろ液を10 kDaの限外ろ過膜を用いて20 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に置換し、1 mLに濃縮した。その後、protein Aカラムを用いて精製を行い、Fabを得た。得られたFabは、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.8)を溶出溶媒とした流速1.0 mL/minで溶出するSE-HPLCにより生成を確認し、A280を測定することで濃度を算出した。

[0138] (IT-Fab(Rabbit serum IgG由来)の作製)

十分に脱気した2 mM EDTA含有0.16 Mホウ酸緩衝液(pH 8.0)を用いてFab溶液(100 μL, 5 mg/mL)を調製し、同じ緩衝液に溶解した2-イミノチオラン(2-IT) (5 μL, 2.88 mg/mL)を1 μLずつ攪拌しながら加え、37 °Cで静かに30分間攪拌した。反応後、十分に脱気した2 mM EDTA含有0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したSephadex G-50 Fineを用いるスピンカラム法[Analytical Biochemistry, 1984, 142, 68-78]により反応溶液中の過剰の2-ITを除去し、IT-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液を得た。Fab一分子あたりに導入されたチオ

ール基の数は2, 2'-ジピリジルジスルフィドを用いて測定した[Archives of Biochemistry and Biophysics, 1967, 119, 41-49]。

[0139] 合成例F2: Fab(抗c-kit IgG由来)及びIT-Fab(抗c-kit IgG由来)の作製

Rabbit serum IgG (9 mg)を、抗c-kit IgG (9 mg)とした以外は、合成例F1と同様の方法で、Fab(抗c-kit IgG由来)及びIT-Fab(抗c-kit IgG由来)を作製した。

[0140] [Fabが結合した配位子の作製]

合成例: CD03Aet-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、CD03Aet-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)、D03A-EDA-Fab(Rabbit serum IgG由来)、CD0TA-Bn-CO-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)、D03A-Bn-SCN-MVK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、D03A-Bn-CO-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、CD03AiBu-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)及びCD03AiBu-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)の作製

IT-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液(100 μ L)にH₂Oに溶解したCD03Aet-FGK(Mal) (5 μ L, チオール基に対して20等量)を1 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応した。次いで、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0)を用いてヨードアセトアミド溶液を調製し、これを残存チオール基に対して500等量加えた後、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応を行い、未反応のチオール基をアルキル化した。その後、0.25 M酢酸緩衝液(pH 5.5)で平衡化したSephadex G-50 Fineを用いるスピンカラム法で精製し、CD03Aet-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液を得た。Fab一分子あたりに導入されたCD03Aet-FGK(Mal)由来の単位数は、ヨードアセトアミドを加える前にDPSを用いて測定した[Archives of Biochemistry and Biophysics, 1967, 119, 41-49]チオール数を先に求めたチオール数を差し引くことにより求めた。

CD03Aet-FGK(Mal)を、D03A-EDA (Mal)、D03A-Bn-SCN-MVK(Mal)、D03A-Bn-CO-FGK(Mal)、及びCD03AiBu-FGK(Mal)にそれぞれ変更し、その他は上記と同様の方法で、D03A-EDA-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液、D03A-Bn-SCN-MVK-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液、D03A-Bn-CO-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液、及びCD03AiBu-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液を得た。

IT-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液を、IT-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液に変更し、その他は上記と同様の方法で、CD03AEt-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液を得た。

IT-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液を、IT-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液に変更し、CD03AEt-FGK(Mal)を、CD0TA-Bn-CO-FGK(Mal)に変更し、その他は上記と同様の方法で、CD0TA-Bn-CO-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液を得た。

IT-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液を、IT-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液に変更し、CD03AEt-FGK(Mal)を、CD03AiBu-FGK(Mal)に変更し、その他は上記と同様の方法で、CD03AiBu-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液を得た。

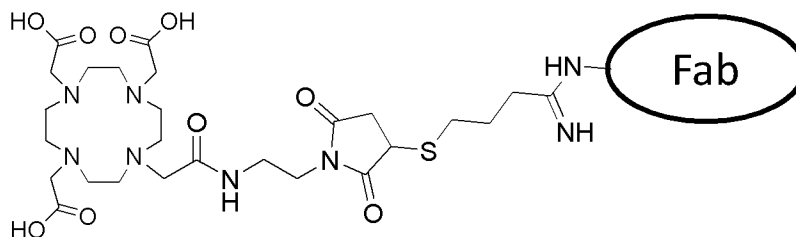
[0141] 合成例：DOTA-Bn-SCN-Fab(抗c-kit IgG由来)の作製

0.16 Mホウ酸緩衝液(pH 8.5)を用いてFab溶液(100 μ L, 5.0 mg/mL)を調整し、同じ緩衝液に溶解したDOTA-Bn-SCN (Macrocyclics, USA) (14 μ L, 10mg/mL)を加え、4°Cで一晩静置した。反応後、十分に脱気した0.25 M酢酸緩衝液(pH 5.5)で平衡化したSephadex G-50 Fineを用いるスピンカラム法により過剰のDOTA-Bn-SCNを除去し、DOTA-Bn-SCN-Fab(抗c-kit IgG由来)を得た。

なお、上述のCD03AEt-FGK-Fab、D03A-Bn-CO-FGK-Fab、CD0TA-Bn-CO-FGK-Fab、CD03AiBu-FGK-Fabの化学構造は上述のとおりである。また、D03A-EDA-Fab、D03A-Bn-SCN-MVK-Fab、及びDOTA-Bn-SCN-Fabの化学構造は以下のとおりである。

[0142] [化47]

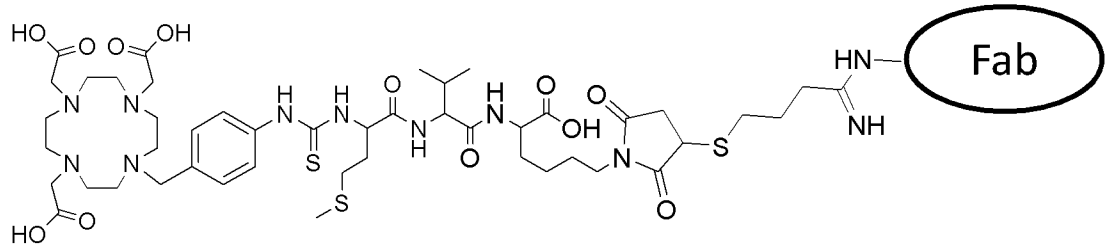
D03A-EDA-Fab



[0143]

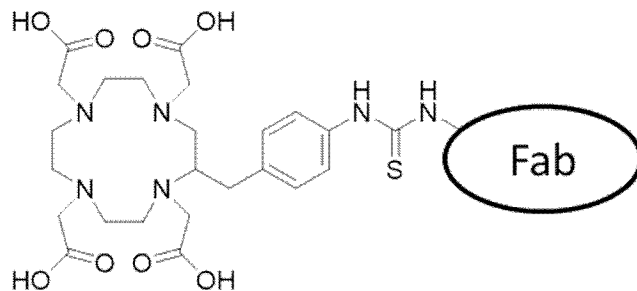
[化48]

DO3A-Bn-SCN-MVK-Fab



[0144] [化49]

DOTA-Bn-SCN-Fab



[0145] [金属錯体化合物の作製]

合成例： ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)、 ^{111}In -D03A-EDA-Fab(Rabbit serum IgG由来)、 ^{111}In -CDOTA-Bn-CO-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)、 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)、 ^{111}In -DOTA-Bn-SCN-Fab(抗c-kit IgG由来)、 ^{111}In -CD03AEt-FGK(Boc)、 ^{111}In -CDOTA-Bn-CO-FGK(Boc)、 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)、及び ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK(Boc)の作製

$^{111}\text{InCl}_3$ (45 μL)を1 M酢酸緩衝液(pH 5.5, 5 μL)に混和し、室温で5分間静置した。CD03AEt-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液(30 μL)を混合した後、40 $^\circ\text{C}$ で90分間インキュベートした。最終濃度が10 mMとなるようにDTPAを加えた後、室温で18時間静置した。0.1 M D-PBS (pH 7.4)で平衡化したSephadex G-50 Fineを用いるスピンカラム法で精製することで、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fabを作製した。CD03AEt-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液を、CD03AEt-FGK

-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液、D03A-EDA-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液、CDOTA-Bn-CO-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液、D03A-Bn-SCN-MVK-Fab溶液(Rabbit serum IgG由来)、D03A-Bn-CO-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液、CD03AiBu-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)溶液、DOTA-Bn-SCN-Fab(抗c-kit IgG由来)溶液、CD03AEt-FGK(Boc)溶液、CDOTA-Bn-CO-FGK(Boc)溶液、D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)溶液、及びD03A-Bn-CO-FGK(Boc)溶液にそれぞれ変更し、その他は上記と同様の方法で、¹¹¹In-CD03AEt-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)、¹¹¹In-D03A-EDA-Fab(Rabbit serum IgG由来)、¹¹¹In-CDOTA-Bn-CO-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)、¹¹¹In-D03A-Bn-SCN-MVK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、¹¹¹In-D03A-Bn-CO-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、¹¹¹In-CD03AiBu-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)、¹¹¹In-DOTA-Bn-SCN-Fab(抗c-kit IgG由来)、¹¹¹In-CD03AEt-FGK(Boc)、¹¹¹In-CDOTA-Bn-CO-FGK(Boc)、¹¹¹In-D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)、及び¹¹¹In-D03A-Bn-CO-FGK(Boc)、を作製した。

[0146] [特性の検討]

[BBMVsとのインキュベート試験]

(腎刷子縁膜小胞)

腎刷子縁膜小胞(BBMVs)はWistar系雄性ラット(200-250 g)の腎臓からHoriiらの方法に従って作製した[Biochemical Pharmacology 45: 1763-1768, 1993]。全ての操作は氷上で行った。皮質に重量で4-5倍の300 mM mannitol、及び5 mM EGTAを含む12 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.1)を加え、ポリトロンホモジナイザー(PT-3100 Kinematica GmgH Littau, Switzerland)で2分間ホモジナイズし、同じ緩衝液で希釈することで10%ホモジネートとした。次いで、蒸留水で2倍に希釈した後、最終濃度が10 mMとなるよう、1.0 Mに調整したMgCl₂水溶液を加え、15分間放置した。その後、ホモジネートを1,900 gで遠心し、上清をさらに30分間24,000 gで遠心した。沈殿を皮質重量の20倍に相当する150 mM mannitol、及び2.5 mM EGTAを含む6 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.1)に再懸濁し、テフロン(登録商標)ホモジナイザー(1,000 rpm, 10 strokes)によりホモジナイズした。次いで、最終濃度が10 mMとなるように

1.0 M $MgCl_2$ 水溶液を加え、懸濁液を15分間放置し、その後、ホモジネートを1,900 gで遠心し、上清をさらに30分間24,000 gで遠心した。得られた沈殿を皮質重量の10倍に相当する0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、再度テフロン (登録商標) ホモジナイザー (1,000 rpm, 10 strokes) によりホモジナイズした。次いで、ホモジネートを30分間24,000 gで遠心し、BBMVsを沈殿として得た。次いで、BBMVsの沈殿を0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁し、0.4 x 19 mmの針に10回通すことで小胞の大きさを一定にした。インキュベート実験にはタンパク質濃度が10 mg/mLとなるように希釈して用いた。調製したBBMVsについて、リソソームマーカー酵素である β -galactosidase活性をp-nitrophenyl- β -D-galacto- pyranosideを用いて測定することにより、リソソーム酵素の混入を評価した[Plant Physiology 55: 94-98, 1975]。また、 γ -glutamyl transferase、aminopeptidaseの活性を、Glossmannら[FEB S Letters 19: 340-344, 1972]、Kramersら[European Journal of Biochemistry 99: 345-351, 1979]の方法に従い、L- γ -glutamyl- p-nitroanilide、L-leucine-p-nitroanilideを用いて測定した。

[0147] (インキュベート試験)

BBMVsと ^{111}In 標識低分子モデル基質のインキュベート実験は以下の方法で行った。タンパク質濃度を10 mg/mLとなるように調製したBBMVs (10 μ L)を、37 $^{\circ}C$ で10分間プレインキュベートした。その後、逆相HPLCによって過剰の配位子を除去してPBSに溶解した ^{111}In -CD03AEt-FGK(Boc)溶液(10 μ L)を加え、37 $^{\circ}C$ で二時間インキュベートした。BBMVs溶液に対してエタノール濃度が60%となるようにエタノールを加え、5000rpmで10分間遠心した。上清を回収後、沈殿に60%エタノールを加え再度同様の方法で遠心した後に、上清を回収した。得られた上清を、HPLCにてImtakt Unison US-C18 150x4.6 mmを用い移動相にはA相に0.1%TFA/MilliQ、B相に0.1% TFA/MeCNを使用し、0-30分でA相 100%、B相 0%からA相 55%、B相 45%まで変化させる直線gradient法により流速1 mL/minで分析を行った。

図1は、 ^{111}In -CD03AEt-FGK(Boc)とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す

。

^{111}In -CD03AEt-FGK(Boc)溶液を、 ^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK(Boc)溶液、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK(Boc)溶液、 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)溶液、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK(Boc)溶液に代えて同様のインキュベート実験及びBBMVsを使用せずコントロール実験を行った。

図2は、 ^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK(Boc)溶液とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

図3は、 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

図4は、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK(Boc)とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

図5は、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK(Boc)とBBMVsのインキュベートの実験結果を示す。

上記の実験結果から、連結基として、本願発明の化合物と同様に、ベンジルアミド構造を有する、 ^{111}In -CD03AEt-FGK(Boc)、 ^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK(Boc)、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK(Boc)、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK(Boc)では、BBMVsのインキュベートにより、キレート配位子部位が遊離されることが理解できる。これに対して、連結基としてチオウレア構造を有する化合物 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK(Bzo)では、遊離物が観測されない。

[0148] [金属錯体化合物のマウス血漿中安定性の検討]

PBSに溶解した ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来) (10 μL)をマウス血漿(90 μL)に加え、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。1、3、6、24時間後に溶液の一部を採取しメタノール：10質量% 酢酸アンモニウム水溶液=3：2を展開溶媒とするRP-TLCにより分析することで、未変化体 (^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab) の放射活性の割合を算出し、表1に示した。

[0149]

[表1]

表1

	Percent of intact(%)
1h	95.5±0.31
3h	95.5±0.89
6h	95.6±0.63
24h	94.8±0.58

[0150] ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)を、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)に変更し、その他は上記と同様の方法で、マウス血漿中安定性試験を行った。インキュベート2時間後、未変化体 (^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab) の放射活性の割合は、 $95.2 \pm 0.3\%$ であった。

^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)を、 ^{111}In -CDOTA-Bn-CO-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)に変更し、その他は上記と同様の方法で、マウス血漿中安定性試験を行った。インキュベート2時間後、未変化体 (^{111}In -CDOTA-Bn-CO-FGK-Fab) の放射活性の割合は、 $95.2 \pm 0.3\%$ であった。

[0151] ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)を、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) に変更し、その他は上記と同様の方法で、マウス血漿中安定性試験を行った。表2に実験結果を示す。

[0152] [表2]

表2

	Percent of intact (%)
1 h	92.0±0.1 %
6 h	93.6±0.3 %
24 h	91.4±1.6 %

[0153] [金属錯体化合物のマウス体内動態の検討]

実施例及び比較例で作製した金属錯体化合物をD-PBS(-) (pH 7.4)を用いて希釈した。6週齢のddY系雄性マウス尾静注により、未修飾Fab濃度を $5 \mu\text{g}/10$

0 μ Lに調整した¹¹¹In-CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) 溶液(0.3 μ Ci/100 μ L/匹)を投与した。投与後10、30分、1、3、6、24時間後に各群3匹のマウスを屠殺し、関心臓器を採取、重量を測定後、オートウェルガンマシステムにより放射活性を測定した。また、6、24時間後までの糞尿をそれぞれ採取し、放射活性を測定した。同様の方法にて¹¹¹In-CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液を用いて、6週齢のddY系雄性マウス尾静注により、関心臓器、糞尿について、放射活性を測定した。対照化合物として同様の方法にて調製した¹¹¹In-D03A-EDA-Fab (Rabbit serum IgG由来) を用いた。

表3は、¹¹¹In-CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

表4は、¹¹¹In-CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

表5は、¹¹¹In-D03A-EDA-Fab (Rabbit serum IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

上記と同様の方法にて¹¹¹In-CD0TA-Bn-C0-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液、¹¹¹In-D03A-Bn-SCN-MVK-Fab (Rabbit serum IgG由来) 溶液、¹¹¹In-D03A-Bn-C0-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) 溶液、¹¹¹In-CD03AiBu-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) 溶液、¹¹¹In-CD03AiBu-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液、¹¹¹In-D0TA-Bn-SCN-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液を用いて、6週齢のddY系雄性マウス尾静注により、関心臓器、糞尿について、放射活性を測定した。

表6は、¹¹¹In-CD0TA-Bn-C0-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

表7は、¹¹¹In-D03A-Bn-SCN-MVK-Fab (Rabbit serum IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

表8は、¹¹¹In-D03A-Bn-C0-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

表9は、¹¹¹In-CD03AiBu-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

表10は、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

表11は、 ^{111}In -DOTA-Bn-SCN-Fab (抗c-kit IgG由来) によるマウス体内の放射活性の測定結果を示す。

図6A～Cに、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fabと ^{111}In -D03A-EDA-Fabとの結果の比較を示した。

これら本発明の化合物である ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fabと比較化合物である ^{111}In -D03A-EDA-Fabとの結果から、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fabは、 ^{111}In -D03A-EDA-Fabと同程度の血中濃度を示しながら、腎臓への蓄積が抑制され、低い腎臓-血液比が得られることがわかる。

上記の実験結果から、連結基として、ベンジルアミド構造を有する本願発明の化合物 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来)、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来)、 ^{111}In -DOTA-Bn-CO-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来)、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) では、腎臓での放射活性が顕著に抑えられているのに対して、連結基としてチオウレア構造を有する比較化合物 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK-Fab、及びエチレン構造を有する ^{111}In -D03A-EDA-Fab (Rabbit serum IgG由来) では、腎臓での放射活性が高い値を示す。上記結果及びBBMVsとのインキュベート試験の試験結果から、ベンジルアミド構造を有する本願発明の化合物では、酵素による代謝が行われ、腎臓に取り込まれる前に、放射性金属部位が遊離されたものと考えられ、一方で、チオウレア構造を有する比較化合物では、酵素認識されず、代謝物の遊離がなかったと考えられる。

図7A～Cに、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来)、 ^{111}In -DOTA-Bn-SCN-Fab (抗c-kit IgG由来)、及び ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) の結果の比較を示した。

これらの結果から、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fabは、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fabよりも、更に腎臓への蓄積が抑制され、より低い腎臓-血液比が得られることがわかる。

[0154] [表3]

表3 ^{111}In -CDO3AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG 由来)

	10min	30min	1h	3h	6h	24h
血液	20.97±2.89	15.27±0.22	8.21±2.67	4.84±0.39	2.67±0.46	0.47±0.08
肝臓	5.75±0.45	4.56±0.26	4.36±0.21	3.31±0.28	3.44±0.43	1.85±0.14
脾臓	3.90±0.62	3.12±0.09	2.64±0.59	1.30±0.73	1.63±0.19	0.76±0.16
腎臓	11.87±0.79	16.93±3.34	18.74±3.75	15.13±5.01	12.55±1.03	7.53±2.02
膵臓	1.26±0.15	1.37±0.10	1.82±0.67	1.38±0.02	1.23±0.22	0.49±0.06
心臓	4.76±0.76	4.68±0.14	3.75±0.16	1.72±0.21	1.22±0.22	0.49±0.08
肺	8.86±1.66	9.94±2.43	9.21±2.01	4.17±0.31	2.21±0.45	0.57±0.02
胃*	0.55±0.04	0.61±0.06	0.89±0.16	0.87±0.26	0.65±0.26	0.21±0.04
腸*	2.97±0.21	3.50±0.08	4.04±0.50	4.28±1.51	3.56±2.78	0.91±0.15
筋肉	0.79±0.23	0.92±0.20	0.99±0.40	0.83±0.16	0.53±0.15	0.19±0.05
骨	2.47±0.14	2.61±0.17	2.58±0.37	1.60±0.07	0.96±0.15	0.47±0.08
尿*					45.68±5.70	64.09±3.60
糞*					0.74±0.52	8.88±3.91

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0155] [表4]

表4 ^{111}In -CDO3AEt-FGK-Fab (抗 c-kit IgG 由来)

	10min	1h	3h	6h	24h
血液	26.96±1.22	12.96±1.36	4.66±0.34	2.15±0.29	0.14±0.02
肝臓	5.21±0.44	4.95±1.02	3.38±0.38	2.65±0.21	1.66±0.28
脾臓	4.48±0.75	4.42±0.90	3.62±1.54	1.53±0.21	0.70±0.08
腎臓	16.23±1.69	23.73±5.30	24.21±4.25	18.52±5.34	7.92±3.22
膵臓	1.01±0.02	1.50±0.28	1.35±0.35	1.72±0.19	0.88±0.07
心臓	5.27±0.20	4.71±0.55	2.87±0.18	2.39±0.15	1.17±0.17
肺	13.50±2.22	8.26±1.29	3.67±0.70	1.77±0.24	0.42±0.05
胃*	0.70±0.30	0.71±0.14	0.59±0.06	0.57±0.06	0.26±0.11
腸*	2.39±0.21	4.51±0.72	4.15±0.63	5.27±0.51	2.11±0.72
筋肉	0.70±0.15	1.01±0.19	0.95±0.19	0.83±0.21	0.46±0.11
骨	2.55±0.62	2.76±0.41	1.65±0.54	0.96±0.36	0.46±0.11

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0156] [表5]

表5 ^{111}In -DO3A-EDA-Fab (Rabbit serum IgG 由来)

	10min	30min	1h	3h	6h	24h
血液	25.50±0.79	15.88±0.15	10.93±0.74	5.30±0.81	2.83±0.19	0.47±0.03
肝臓	4.24±0.30	3.43±0.28	3.25±0.21	3.66±1.00	3.04±0.39	3.62±0.56
脾臓	3.06±0.11	2.26±0.07	1.96±0.15	1.73±0.32	1.85±0.21	1.98±0.25
腎臓	13.92±0.79	20.45±0.86	25.93±1.82	35.49±3.05	43.59±4.03	34.45±3.76
膵臓	1.03±0.21	1.08±0.21	1.05±0.07	1.06±0.20	1.05±0.05	0.62±0.02
心臓	4.65±0.20	3.83±0.15	3.18±0.40	1.94±0.28	1.50±0.07	0.87±0.15
肺	10.84±1.78	6.46±1.32	4.64±0.96	2.73±0.71	1.81±0.27	0.69±0.03
胃*	0.40±0.01	0.51±0.11	0.51±0.03	0.52±0.12	0.33±0.09	0.24±0.02
腸*	2.59±0.47	2.98±0.37	3.00±0.37	2.69±0.27	2.49±0.44	1.57±0.08
筋肉	1.04±0.20	1.32±0.10	1.35±0.20	1.05±0.16	0.92±0.01	0.56±0.18
骨	2.24±0.77	1.73±0.18	1.58±0.31	1.07±0.15	0.77±0.03	0.44±0.18
尿*					33.04±4.57	49.59±0.80
糞*					0.05±0.02	2.15±1.02

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0157] [表6]

表6 ^{111}In -CDOTA-Bn-CO-FGK-Fab (抗 c-kit IgG 由来)

	10min	1h	3h	6h	24h
血液	27.09±2.25	13.36±1.78	5.75±0.85	2.75±0.50	0.22±0.05
肝臓	6.22±0.23	6.09±0.90	7.06±1.43	6.44±1.23	5.04±1.01
脾臓	4.53±0.50	5.03±0.98	4.56±1.35	3.37±0.47	2.62±0.51
腎臓	13.09±1.89	20.69±2.86	23.19±2.08	25.41±2.83	13.31±3.73
膵臓	0.88±0.13	1.17±0.15	1.68±0.20	1.58±0.19	1.23±0.20
心臓	4.32±0.50	4.17±0.90	3.25±0.59	2.46±0.16	1.69±0.25
肺	8.96±1.34	4.87±0.83	3.16±0.42	1.85±0.16	0.75±0.06
胃*	0.35±0.04	0.54±0.08	0.65±0.08	0.55±0.07	0.72±0.18
腸*	2.16±0.34	3.18±0.69	7.75±1.09	9.26±0.77	5.98±4.94
筋肉	0.82±0.29	1.11±0.17	0.99±0.17	0.72±0.12	0.47±0.06
骨	2.97±0.74	2.62±0.64	3.21±0.72	2.49±1.13	2.43±1.15

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0158] [表7]

表7 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK-Fab (Rabbit serum IgG 由来)

	10min	30min	1h	3h	6h
血液	23.99±0.87	15.39±0.87	9.43±0.42	3.94±0.28	1.93±0.23
肝臓	4.03±0.09	3.02±0.29	2.64±0.10	2.13±0.03	1.79±0.15
脾臓	2.88±0.15	2.05±0.05	1.48±0.12	0.95±0.06	0.68±0.03
腎臓	20.68±3.07	30.16±1.77	33.71±2.35	37.78±5.90	23.32±4.55
膵臓	1.04±0.22	1.13±0.01	1.11±0.17	0.96±0.09	0.79±0.12
心臓	4.42±0.32	3.98±0.15	2.89±0.26	1.45±0.14	1.07±0.12
肺	8.60±0.44	6.62±1.41	5.47±2.14	2.23±0.30	1.34±0.20
胃*	0.38±0.06	0.53±0.06	0.43±0.05	0.43±0.06	0.27±0.07
腸*	2.33±0.31	3.51±0.09	3.20±0.07	3.40±0.54	2.73±0.17
筋肉	0.84±0.06	1.22±0.12	1.13±0.02	0.86±0.09	0.54±0.06
骨	2.25±0.14	2.24±0.23	1.64±0.21	0.77±0.05	0.53±0.11
尿*					46.02±2.04
糞*					0.13±0.13

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0159]

[表8]

表8 ^{111}In -DO3A-Bn-CO-FGK-Fab (Rabbit serum IgG 由来)

	10min	30min	1h	3h	6h
血液	25.57±2.36	15.35±1.62	9.69±0.87	4.23±0.29	2.31±0.07
肝臓	4.08±0.31	2.87±0.20	2.41±0.27	1.63±0.11	1.45±0.14
脾臓	2.76±0.32	1.80±0.32	1.25±0.086	0.82±0.06	0.57±0.04
腎臓	14.59±2.27	21.65±2.41	26.99±3.09	22.77±2.74	15.64±6.81
膵臓	0.88±0.05	0.99±0.08	1.15±0.12	0.93±0.05	0.95±0.08
心臓	4.98±0.96	4.53±0.76	3.50±0.33	1.73±0.06	1.23±0.18
肺	9.05±1.74	6.07±1.03	4.46±1.00	2.18±0.38	1.51±0.07
胃*	0.40±0.03	0.51±0.10	0.52±0.05	0.43±0.73	0.30±0.04
腸*	2.28±0.18	3.25±0.18	3.58±0.14	3.72±0.42	3.88±0.73
筋肉	0.88±0.10	1.17±0.19	1.34±0.08	0.88±0.04	0.71±0.12
骨	2.68±0.47	1.78±0.24	1.48±0.20	0.87±0.06	0.71±0.08
尿*					45.98±6.55
糞*					0.01±0.02

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0160]

[表9]

表9 ^{111}In -CDO3AiBu-FGK-Fab (Rabbit serum IgG 由来)

	10min	1h	3h	6h	24 h
血液	22.97±1.16	11.27±0.73	5.41±0.36	2.80±0.11	0.31±0.03
肝臓	4.58±0.28	2.74±0.21	2.32±0.33	1.70±0.28	0.71±0.10
脾臓	3.08±0.23	1.98±0.23	1.17±0.09	0.60±0.36	0.26±0.04
腎臓	15.18±1.49	12.74±1.49	8.94±2.01	8.76±2.00	1.61±0.48
膵臓	1.01±0.26	1.09±0.26	1.26±0.09	1.03±0.08	0.35±0.14
心臓	3.97±0.29	3.44±0.29	1.64±0.05	1.17±0.06	0.24±0.04
肺	7.44±0.19	4.66±0.19	2.69±0.24	1.82±0.18	0.33±0.10
胃*	0.37±0.07	0.59±0.07	0.57±0.09	0.44±0.17	0.43±0.33
腸*	2.49±0.34	5.48±0.34	7.13±0.15	6.96±2.87	3.40±1.65
筋肉	0.60±0.11	0.98±0.11	0.78±0.16	0.46±0.08	0.09±0.05
骨	2.60±0.24	1.42±0.24	0.87±0.24	0.59±0.12	0.11±0.13
尿*				55.55±3.54	71.38±6.89
糞*				0.90±0.71	8.52±3.53

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0161]

[表10]

表10 ^{111}In -CDO3AiBu-FGK-Fab(抗 c-kit IgG 由来)

	10min	1h	3h	6h	24 h
血液	25.29±1.56	11.11±1.29	4.55±0.21	2.23±0.36	0.13±0.04
肝臓	4.72±0.40	3.30±0.35	2.24±0.12	1.87±0.36	0.61±0.06
脾臓	3.79±0.42	2.47±0.12	1.41±0.18	0.89±0.17	0.25±0.08
腎臓	18.34±1.70	16.70±3.59	12.55±2.15	10.21±2.60	2.30±0.57
膵臓	1.05±0.11	1.17±0.12	1.40±0.10	1.42±0.18	0.44±0.14
心臓	4.83±0.32	3.65±0.43	2.16±0.23	1.26±0.12	0.27±0.05
肺	9.07±2.88	5.08±0.99	2.56±0.17	1.57±0.27	0.23±0.08
胃*	0.38±0.03	0.57±0.12	0.60±0.14	0.45±0.10	0.34±0.22
腸*	2.33±0.20	4.30±0.17	7.05±0.66	12.75±3.07	2.16±0.56
筋肉	0.76±0.13	1.08±0.16	0.78±0.20	0.44±0.07	0.10±0.03
骨	2.46±0.81	2.08±1.32	0.90±0.13	0.72±0.14	0.24±0.05
尿*				45.52±5.64	69.43±2.50
糞*				0.31±0.21	14.34±1.25

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0162]

[表11]

表11 ^{111}In -DOTA-Bn-SCN-Fab(抗 c-kit IgG 由来)

	10min	1h	3h	6h	24 h
血液	25.65±0.95	12.45±0.99	4.14±0.44	1.88±0.20	0.26±0.05
肝臓	4.20±0.35	3.80±0.47	3.32±0.59	3.45±0.33	3.35±0.77
脾臓	4.16±0.57	3.72±0.52	3.95±0.75	3.43±0.53	3.05±0.89
腎臓	18.93±1.77	42.23±5.69	53.17±6.89	51.88±4.68	29.08±3.45
膵臓	0.79±0.10	1.11±0.12	1.62±0.13	1.90±0.19	1.43±0.51
心臓	5.34±0.71	4.81±0.66	3.29±0.09	2.91±0.33	2.56±0.70
肺	9.43±2.58	5.79±0.71	3.04±0.38	1.95±0.19	0.97±0.16
胃*	0.38±0.03	0.63±0.07	0.60±0.04	0.59±0.07	0.64±0.19
腸*	2.43±0.56	4.75±0.49	4.32±0.23	4.50±0.58	6.43±5.02
筋肉	0.72±0.06	1.15±0.09	1.15±0.15	1.00±0.17	0.57±0.16
骨	2.79±0.63	1.91±0.30	1.79±0.30	1.69±0.16	1.19±0.63
尿*				16.36±1.96	38.27±6.80
糞*				0.05±0.06	1.76±0.43

単位は「%ID/g」、但し*は、「%ID」

[0163] [尿中放射活性の分析]

^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) をD-PBS (-)で希釈した。マウス尾静脈より、Fab濃度を5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ に調整した ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) 溶液(4 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}/匹$)を投与し、24時間後までに集積した尿を0.45 μm のフィルターで濾過した後、SE-HPLCにて化学形を分析した。また、回収した尿に2倍量のEtOHを加えることでタンパクを沈殿させ、15,000 gで5分間遠心した後に上清を回収した。上清を回収した後に66% EtOH溶液100 μL を用いてペレットを洗浄し、再度遠心して上清を回収する作業を2回行い、放射活性の上清への回収率を算出した。その後、EtOH濃度が15%以下になるよう上清をD-PBS (-)で希釈し、RP-HPLCによる分析を行った。

図8は、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) をマウスに投与後24時間までに排泄された尿中放射活性の化学形の分析結果を示す。以上、尿

中の放射活性の分析により図8Aに示すSE-HPLCによる分析で、大部分の放射活性が低分子画分で排泄され、図8Bに示すRP-HPLCの結果から、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fabでは、低分子画分における主たる放射活性 ^{111}In -CD03AEt-Phe(^{111}In -CD03AEt-FGK-Fabがフェニルアラニン-グリシン間で切断された化合物)であることがわかる。

^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) を、 ^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) に変更し、投与後6時間後までに排泄された尿を集積し分析した以外は、上記と同様の方法で、尿中放射活性の分析を行った。

図9は、 ^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK-Fab(抗c-kit IgG由来)をマウスに投与後6時間までに排泄された尿中放射活性の化学形の分析結果を示す。RP-HPLCの結果から、 ^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK-Fabでは、低分子画分における主たる放射活性 ^{111}In -CD0TA-Phe (^{111}In -CD0TA-Bn-CO-FGK-Fabがフェニルアラニン-グリシン間で切断された化合物)であることがわかる。

^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) を、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)に変更した以外は、上記と同様の方法で、尿中放射活性の分析を行った。

図10は、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)をマウスに投与後24時間までに排泄された尿中放射活性の化学形の分析結果を示す。RP-HPLCの結果から、 ^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK-Fabでは、低分子画分における主たる放射活性 ^{111}In -D03A-Phe (^{111}In -D03A-Bn-CO-FGK-Fabがフェニルアラニン-グリシン間で切断された化合物)であることがわかる。

^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) を、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)に変更した以外は、上記と同様の方法で、尿中放射活性の分析を行った。

図11は、 ^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab(Rabbit serum IgG由来)をマウスに投与後24時間までに排泄された尿中放射活性の化学形の分析結果を示す。以上、尿中の放射活性の分析により図11Aに示すSE-HPLCによる分析で、大部分の放射活性が低分子画分として排泄され、図11Bに示すRP-HPLCの結果から、¹

^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fab (Rabbit serum IgG由来) では、低分子画分における主たる放射活性が ^{111}In -CD03AiBu-Phe (^{111}In -CD03AiBu-FGK-Fabがフェニルアラニン-グリシン間で切断された化合物)であることがわかる。

[0164] [SPECT/CT撮像]

上述の方法により調製した ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) をD-PBS (-)で希釈した。上記SY皮下腫瘍モデルマウスの尾静脈より、Fab濃度を25 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ に調整した ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab溶液(45 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ /匹)を投与した。各群2匹のマウスをSPECT/CT装置 (SPECT4CT, Trifoil Imaging, CA) を用いて、開口径1 mm、5穴ピンホールコリメータを360度収集、16プロジェクション、14分/プロジェクションの条件にて、投与後2.5時間から撮像した。

^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液(45 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ /匹)を ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液(14 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ /匹)に変更した以外は、同様にして、SY皮下腫瘍モデルマウスの尾静脈より投与して、投与後2.5時間から撮像した。

図12は、 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液を、又は ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fab (抗c-kit IgG由来) 溶液をSY皮下腫瘍モデルマウスに投与後2.5時間のSPECT/CT画像である。

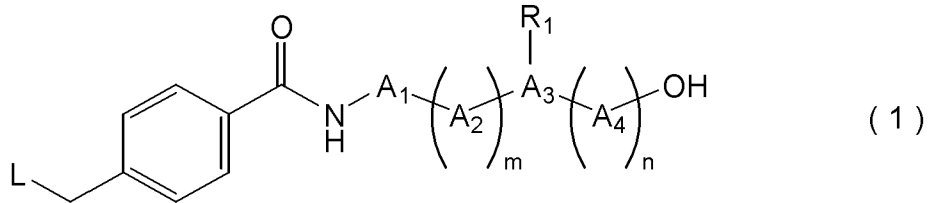
投与2.5時間後において、 ^{111}In -CD03AEt-FGK-Fabは腎臓への集積が低く、腫瘍を明瞭に画像化した。一方で、 ^{111}In -D03A-Bn-SCN-MVK-Fabでは、腫瘍を画像化した。腎臓にも高い放射活性が観察された。

以上、放射性標識薬剤は、腎臓への集積が低く、放射線画像診断の感度、精度を向上させることができる。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（1）で表される化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

[化1]



[式中、

A_1 、 A_2 は、それぞれ独立にアミノ酸残基であり、

m は、0～3の整数であり、

A_3 は、側鎖にアミノ基又はカルボキシ基を有するアミノ酸残基であり、

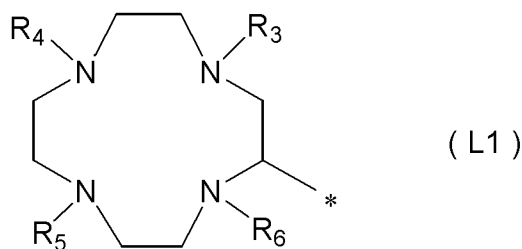
A_4 は、アミノ酸残基であり、

n は、0～3の整数であり、

R_1 は、 A_3 の側鎖のアミノ基又はカルボキシ基と結合し、標的分子認識素子又はその連結基と結合可能な官能基を有する基、又は、 A_3 の側鎖のアミノ基若しくはカルボキシ基の水素原子であり、ただし、 R_1 は、環構成原子の一つとして A_3 の側鎖のアミノ基の窒素原子を含む炭素数3～10の複素環基を形成していてもよく、

L は、式（L1）：

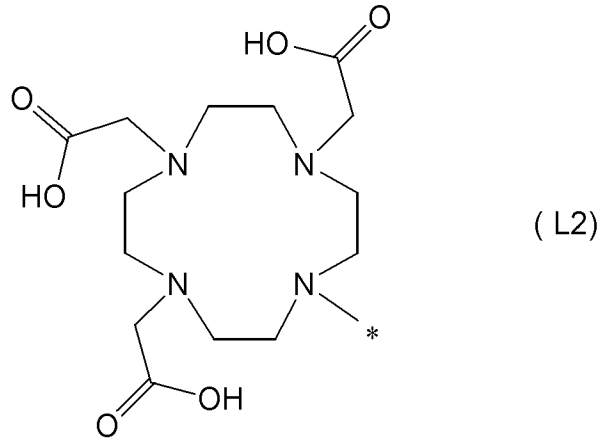
[化2]



(式中、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 は、それぞれ独立に、水素原子、 $-CH_2COOR_{10}$ 基、又は炭素数1～8の炭化水素基であり、 R_{10} は、水素

原子又は炭素数 1～8 の炭化水素基であり、* は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、少なくとも 3 個以上は $-CH_2COOH$ 基である。) で表される基、又は、式 (L2) :

[化3]



(式中、* は結合部位である。) で表される基である。]

[請求項2]

A_1 から A_4 のアミノ酸配列 (ただし、 $n=0$ の場合、 A_1 から A_3 のアミノ酸配列) が、腎刷子縁膜酵素の基質配列の一部と同一の配列である、請求項 1 に記載の化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

[請求項3]

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、3 個が $-CH_2COOH$ 基である、請求項 1 又は 2 に記載の化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

[請求項4]

A_3 が、リシン、オルニチン又はアルギニンの残基である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

[請求項5]

m が、1 である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

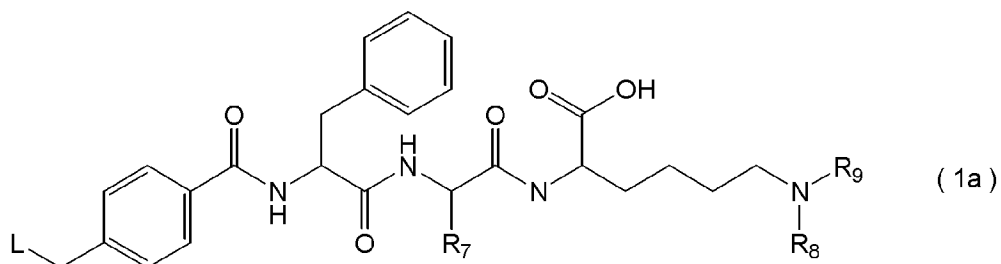
[請求項6]

n が、0 である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

[請求項7]

前記化合物が、下記式 (1a) で表される、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の化合物、又はその薬理的に許容可能な塩。

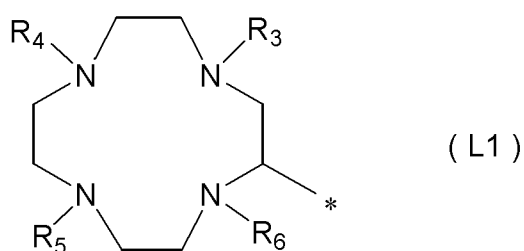
[化4]



〔式中、

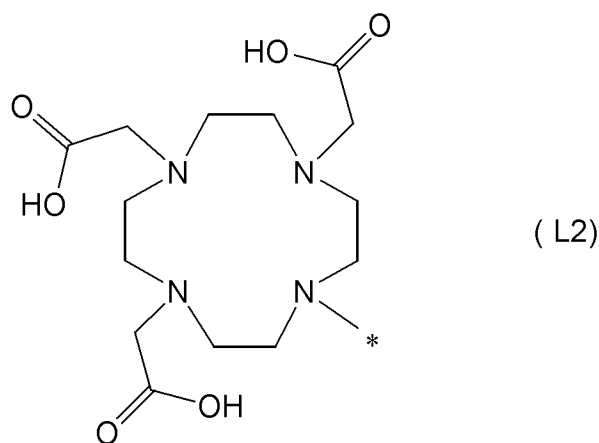
Lは、式(L1)：

[化5]



(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、それぞれ独立に、水素原子、 $-CH_2COOR_{10}$ 基、又は炭素数1～8の炭化水素基であり、 R_{10} は、水素原子又は炭素数1～8の炭化水素基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、少なくとも3以上は $-CH_2COOH$ 基である。)で表される基、又は、式(L2)：

[化6]

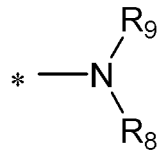


(式中、*は結合部位である。)で表される基であり、

 R_7 は、水素原子又はメチル基であり、

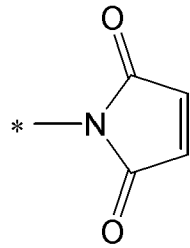
R_8 , R_9 は、それぞれ独立に、水素原子、又は、官能基を有する総炭素数2～20のアシル基、官能基を有する総炭素数2～20のアルキル基、官能基を有する総炭素数2～20のアルキルカルバモイル基、若しくは官能基を有する総炭素数2～20のアルキルチオカルバモイル基である。ただし、 R_8 及び R_9 は、隣接する窒素原子を含む複素環を形成していてもよく、その場合、式：

[化7]



で表される基は、式：

[化8]

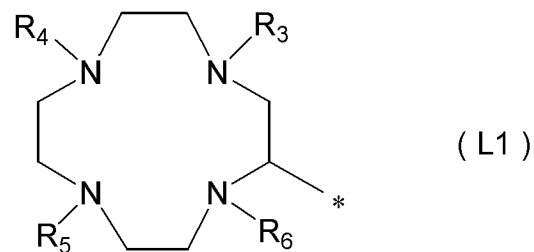


で表される基である。]

[請求項8]

Lが、式(L1)：

[化9]



(式中、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 は、それぞれ独立に、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 基、イソブチル基であり、*は結合部位である。ただし、 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 のうち、3個が $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 基であり、1個がイソブチル基である。) で表される基である、請求項1～7のいずれか1項に記載

の化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項9] 請求項1～8のいずれか1項に記載の化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩に、標的分子認識素子を結合させてなる化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項10] 放射性金属及び放射性原子標識金属からなる群から選ばれる1種の金属と、前記金属に配位した請求項1～9のいずれか1項に記載の化合物又はその薬理的に許容可能な塩と、を有する金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項11] 前記金属が、 ^{111}In 、 ^{223}Ra 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{44}Sc 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{225}Ac 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{227}Th 、 ^{64}Cu 、又は ^{67}Cu である、請求項10に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項12] 請求項1～11のいずれか1項に記載の化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩を含む、放射性薬剤の調製用薬剤。

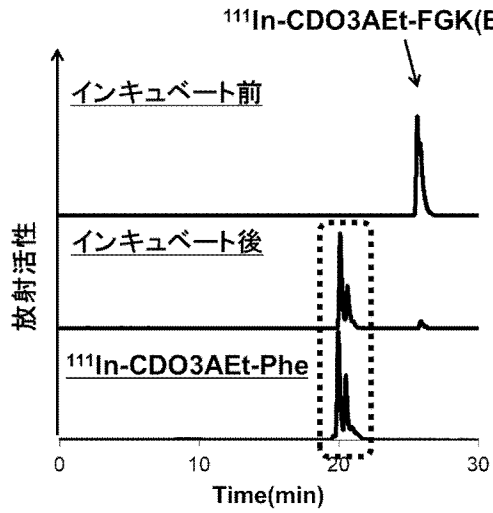
[請求項13] 請求項1～11のいずれか1項に記載の化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩の放射性薬剤の製造のための使用。

[請求項14] 請求項10又は11に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩を含む、放射性薬剤。

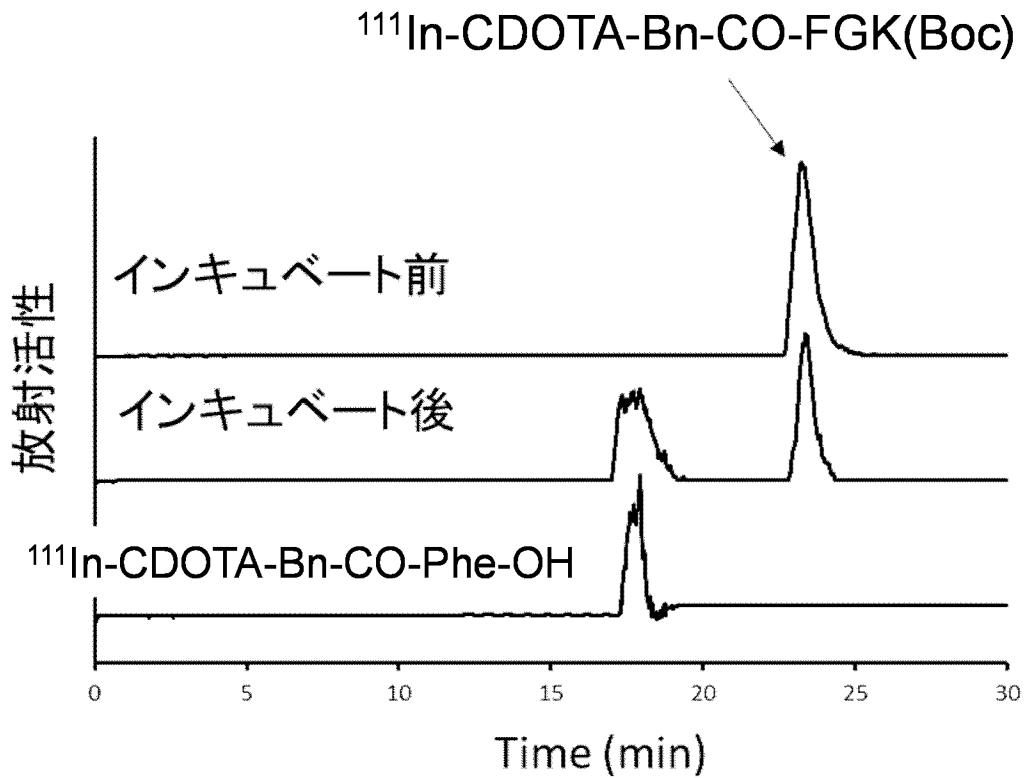
[請求項15] 請求項10又は11に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩を含む、放射線治療薬。

[請求項16] 請求項10又は11に記載の金属錯体化合物、又はその薬理学的に許容可能な塩を含む、放射性画像診断薬。

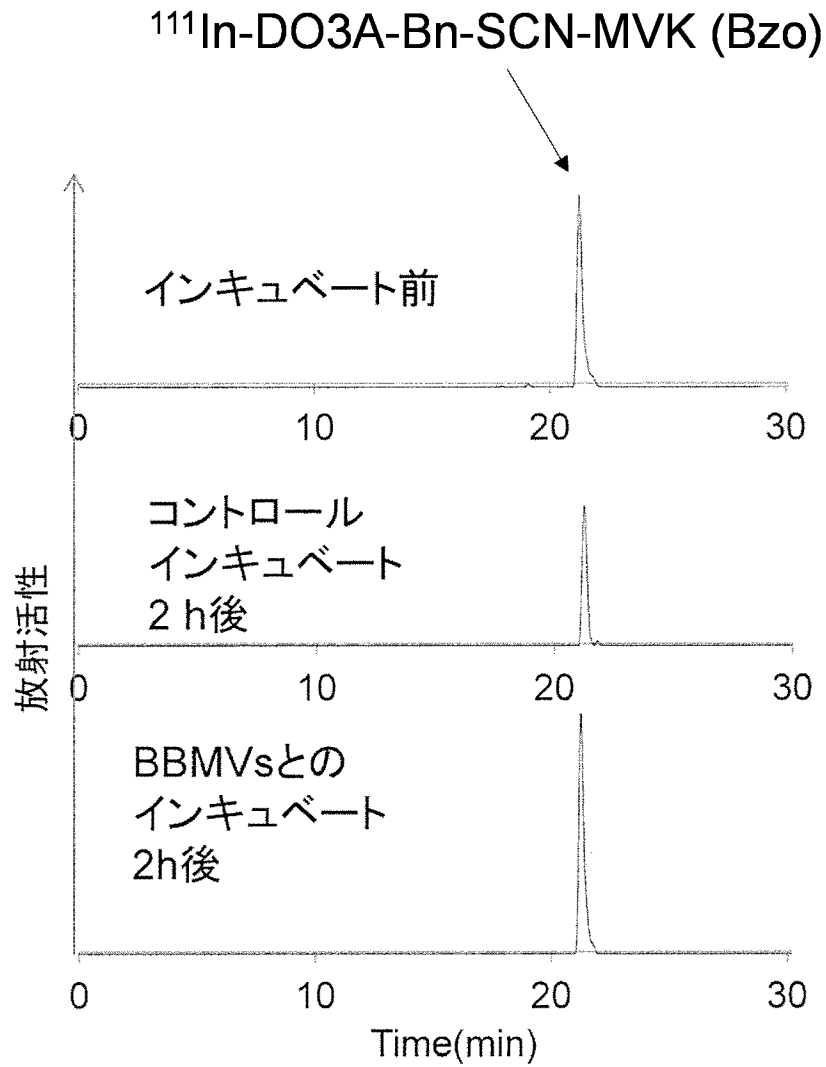
[図1]



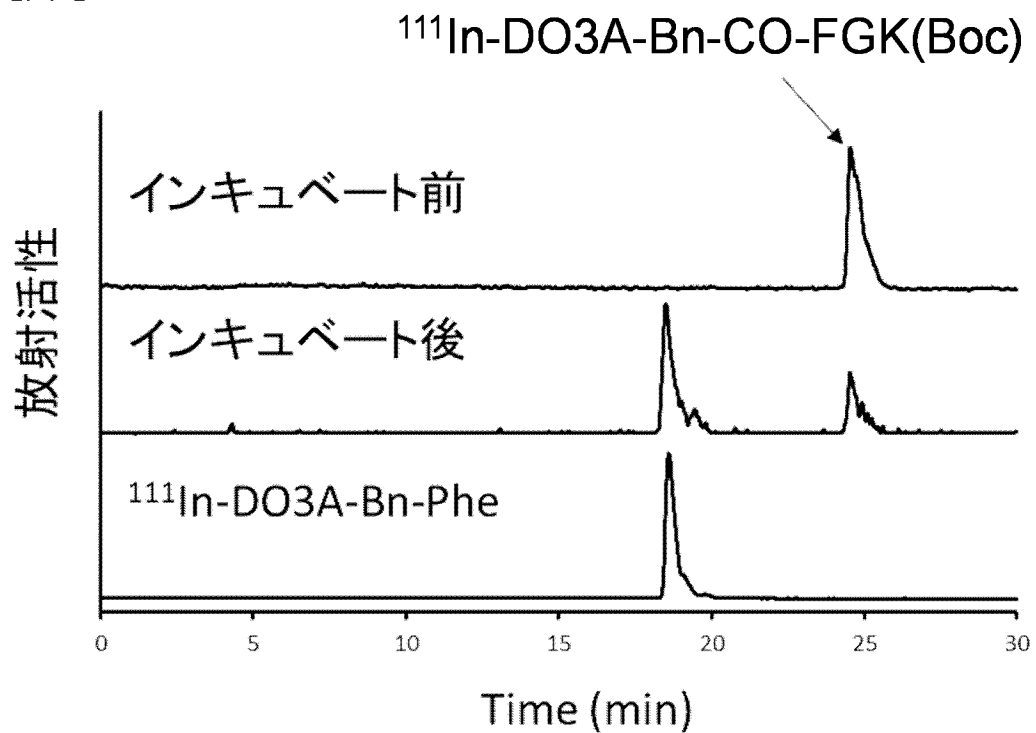
[図2]



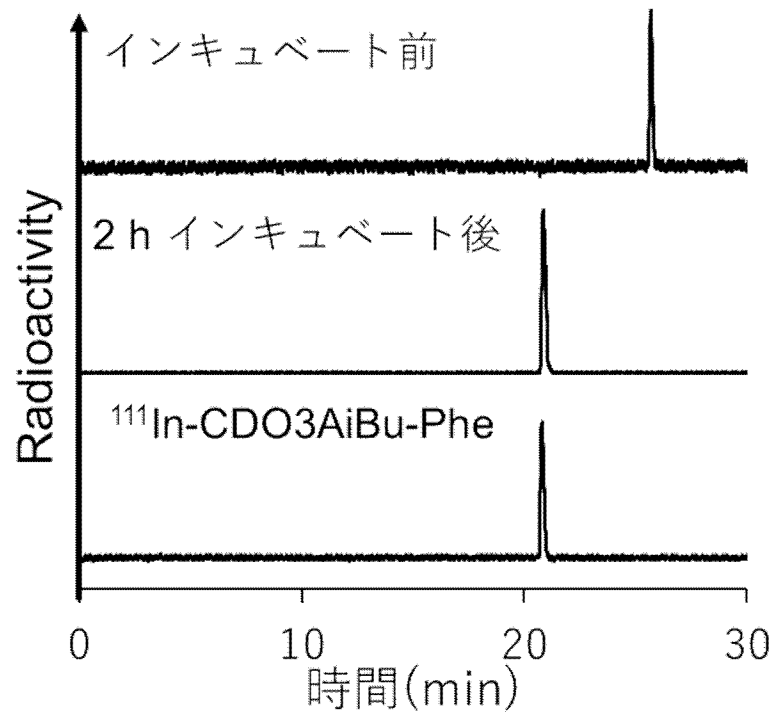
[図3]



[図4]



[図5]



[図6]

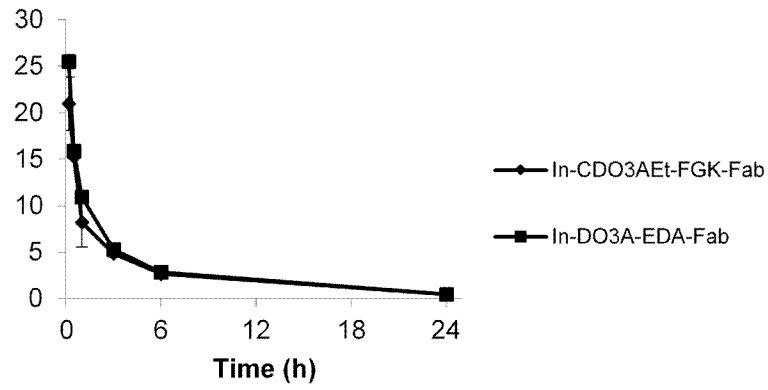


図6 A 血液(%ID/g)

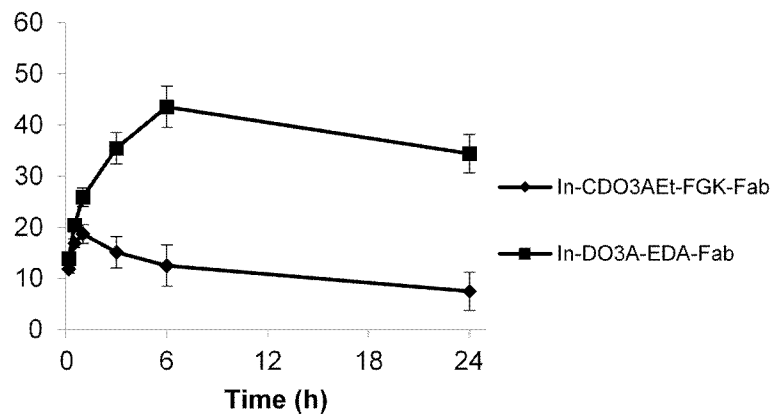


図6 B 腎臓(%ID/g)

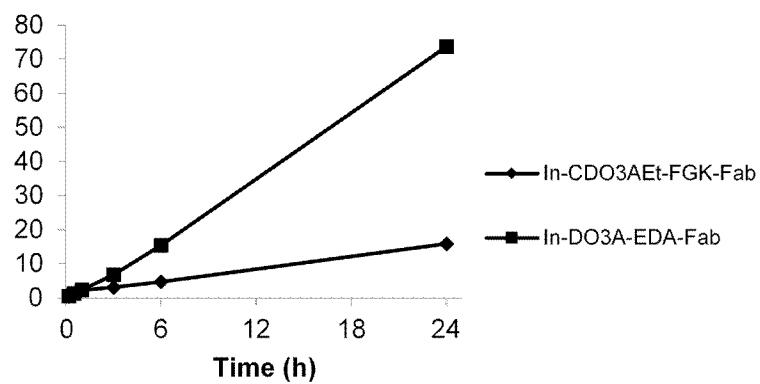


図6 C 腎臓-血液比

[图7]

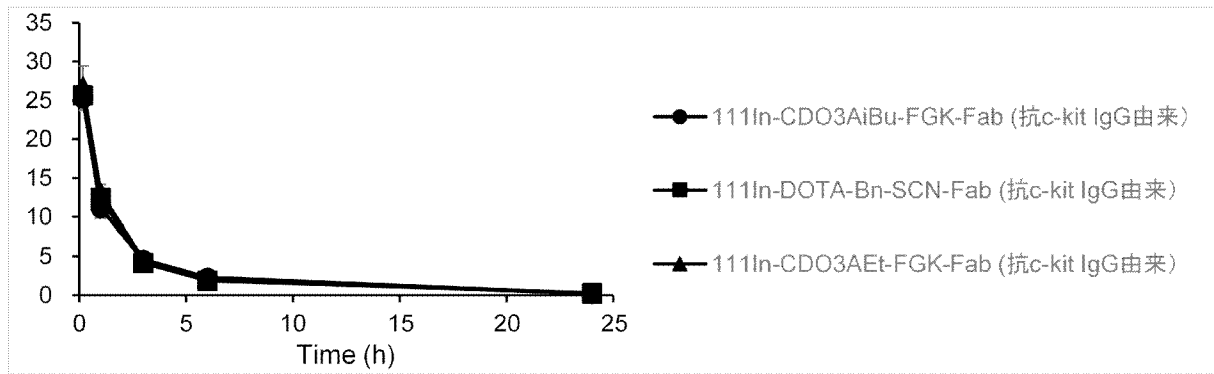


图 7 A 血液 (%ID/g)

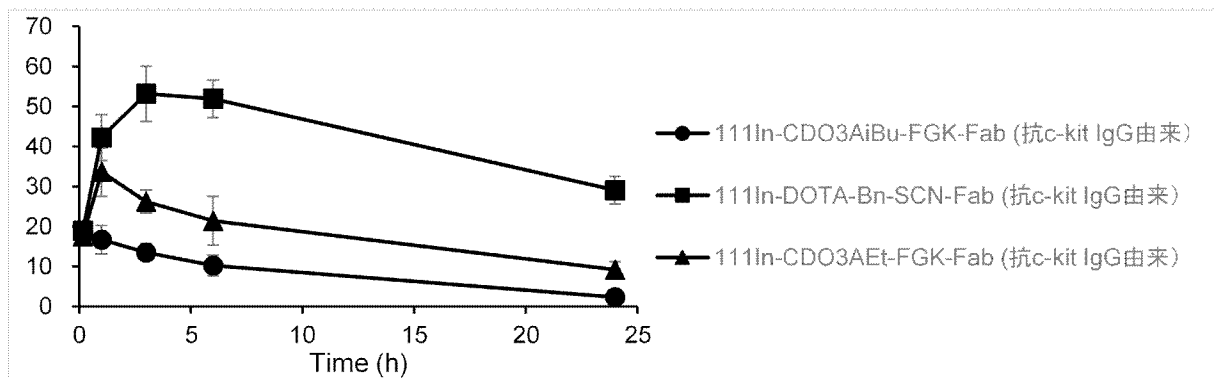


图 7 B 腎臟 (%ID/g)

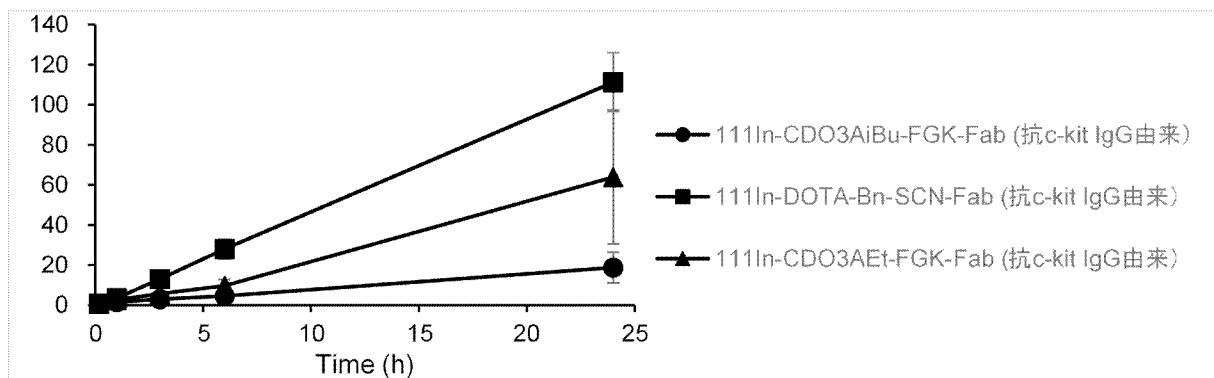


图 7 C 腎臟-血液比

[図8]

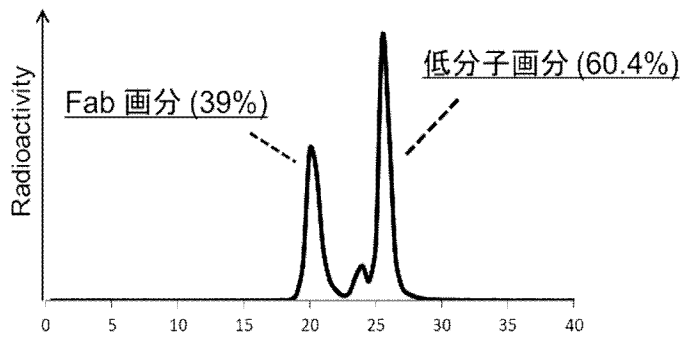


図 8 A SE-HPLC の結果

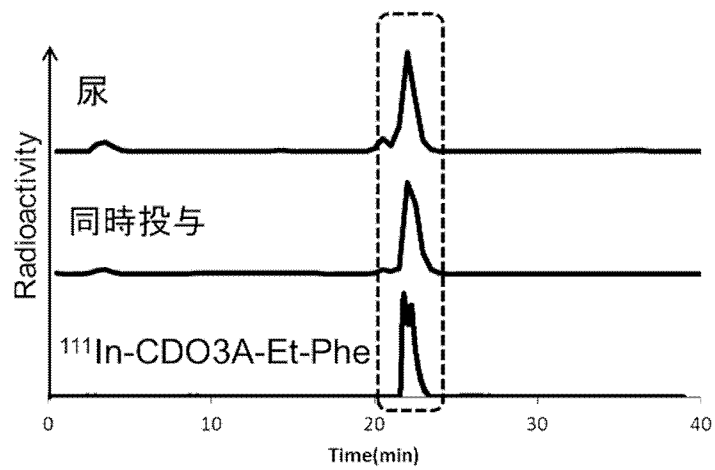
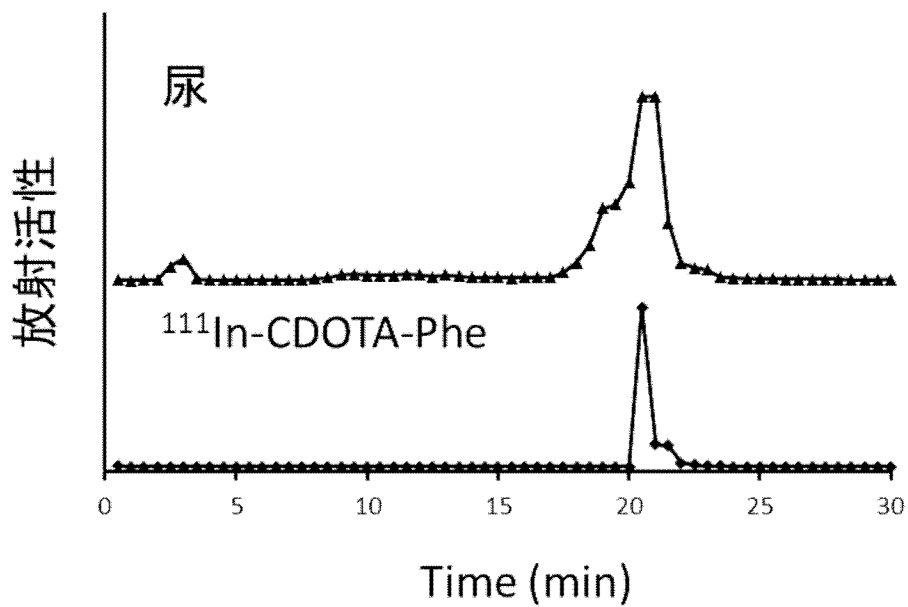
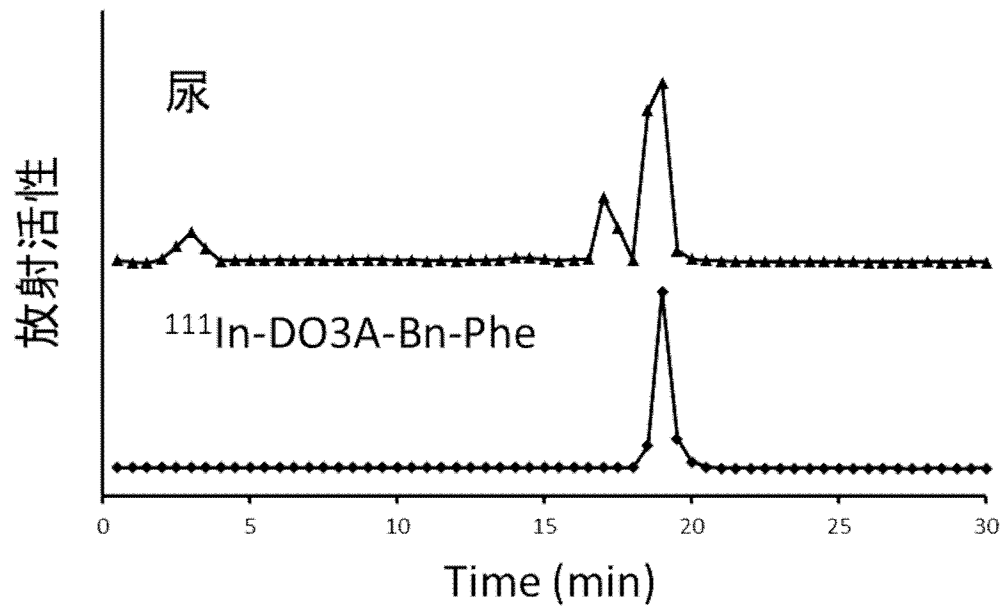


図 8 B RP-HPLC (回収率 62%)

[図9]



[図10]



[図11]

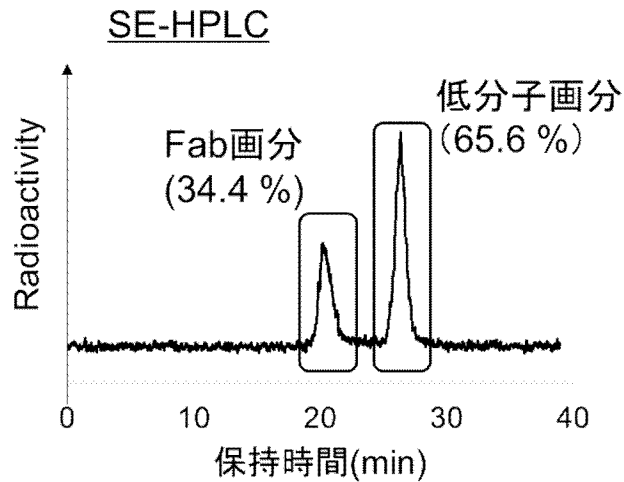


図 1 1 A SE-HPLC の結果

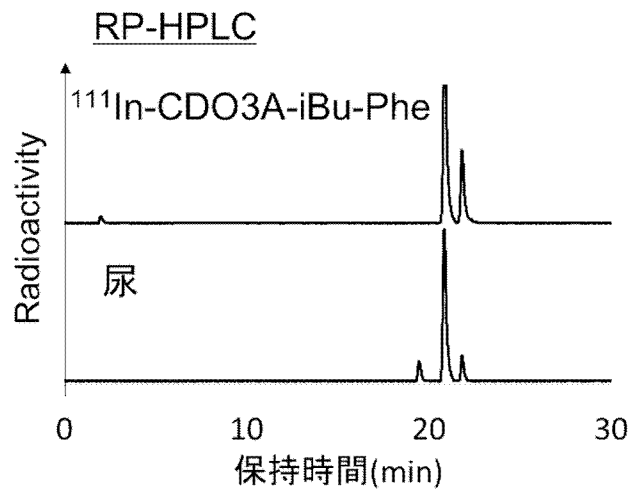


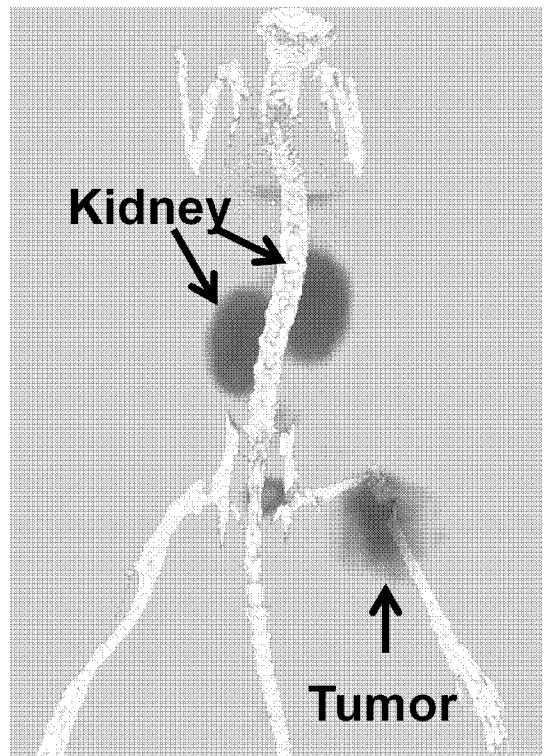
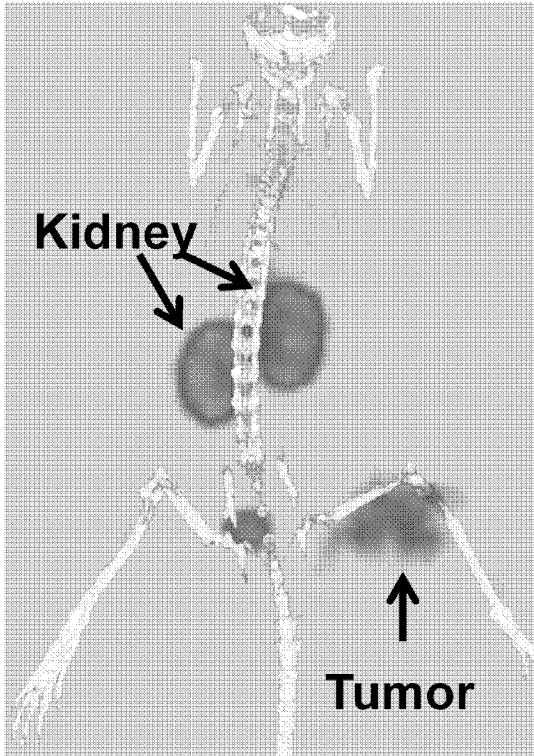
図 1 1 B RP-HPLC の結果

[12]

high

^{111}In -DO3A-Bn-SCN-MVK-Fab

^{111}In -CDO3AEt-FGK-Fab



low

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/035786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K5/00 (2006.01)i, A61K51/08 (2006.01)i, A61P35/00 (2006.01)i,
C07K7/00 (2006.01)i, G01T1/161 (2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C07K5/00, A61K51/08, A61P35/00, C07K7/00, G01T1/161

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-86213 A (CHIBA UNIVERSITY) 07 May 2015 entire text (Family: none)	1-16
A	ZIMMERMANN, Kurt et al., "A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake and Biodistributions of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma MAb chCE7 F (ab') ₂ Fragments", Nuclear Medicine & Biology, 1999 vol. 26, pp. 943-950, ISSN 0969-8051	1-16
A	WO 2017/150549 A1 (CHIBA UNIVERSITY) 08 September 2017 entire text (Family: none)	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 November 2018 (09.11.2018)

Date of mailing of the international search report
27 November 2018 (27.11.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K5/00(2006.01)i, A61K51/08(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/00(2006.01)i, G01T1/161(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K5/00, A61K51/08, A61P35/00, C07K7/00, G01T1/161

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2015-86213 A (国立大学法人 千葉大学) 2015.05.07 文献全体 (ファミリーなし)	1-16
A	ZIMMERMANN, Kurt et al., A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake and Biodistributions of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma MAb chCE7 F(ab') ₂ Fragments, Nuclear Medicine & Biology, 1999 Vol. 26, pp.943-950, ISSN 0969-8051	1-16

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.11.2018

国際調査報告の発送日

27.11.2018

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

星 功介

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2017/150549 A1 (国立大学法人 千葉大学) 2017.09.08 文献全体 (ファミリーなし)	1-16