

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5986095号
(P5986095)

(45) 発行日 平成28年9月6日(2016.9.6)

(24) 登録日 平成28年8月12日(2016.8.12)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 51/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/02 B

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 49/02 C

A 6 1 K 49/00 (2006.01)

A 6 1 K 43/00

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/48

C O 7 D 213/69 (2006.01)

A 6 1 K 49/00 A

請求項の数 17 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-538264 (P2013-538264)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月11日(2011.11.11)
 (65) 公表番号 特表2014-501714 (P2014-501714A)
 (43) 公表日 平成26年1月23日(2014.1.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/001599
 (87) 国際公開番号 W02012/063028
 (87) 国際公開日 平成24年5月18日(2012.5.18)
 審査請求日 平成26年11月6日(2014.11.6)
 (31) 優先権主張番号 1019118.7
 (32) 優先日 平成22年11月11日(2010.11.11)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 513200313
 キングス・カレッジ・ロンドン
 イギリス国ロンドン ダブリューシー2ア
 ール・2エルエス、ザ・ストランド
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コンジュゲートおよび分子イメージングにおけるそれらの用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物であつて、ここで、前記組成物が、

(i) 以下の式：

【化 1】



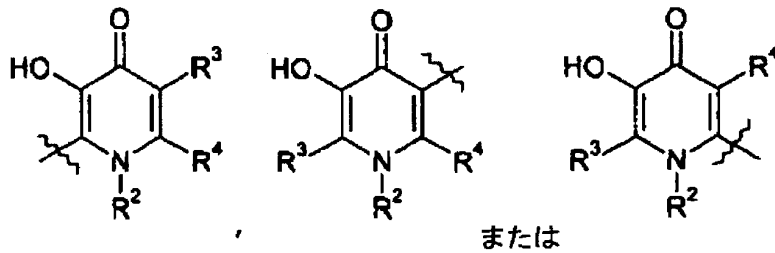
{ 式中、

XおよびYのうちの1つはC=Oであり、かつ、他方はNRであり、

各mおよびpは、独立して、0～6から選ばれ、

R¹は、放射性核種をキレートすることのできるキレーティング基であり、以下の：

【化 2】



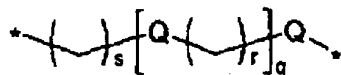
10

から選ばれ；

R、R²、R³およびR⁴は、独立して、水素または場合により置換されたC₁₋₇アルキル基であり；

Bは、前記キレーティング基を反応性基に連結するためのリンカー基であり、以下の式：

【化 3】



20

(式中、

各Qは、独立して、-NR⁵-、-C(O)NR⁵-、-C(O)O-、-NR⁵C(O)NR⁵-、-NR⁵C(S)NR⁵- および -O- からなる群から選ばれ、

各R⁵は、独立して、水素または場合により置換されたC₁₋₇アルキル基であり、

各qおよびsは、独立して、0～6から選ばれ、そして、

各rは、独立して、1～6から選ばれる。)

により表され；

A^{*}は、Tに連結された反応した反応性基であり、

Tは、対象中の着目の標的に結合可能なターゲティング基である。}

30

により表される二官能性化合物またはその塩；あるいは

(ii) 前記二官能性化合物および前記二官能性化合物のキレーティング基を介して結合される放射性核種を含む二官能性分子、
を含み、

ここで、前記方法が、以下のステップ：

(a) 前記二官能性化合物または二官能性分子が前記着目の標的に結合するように、前記二官能性化合物または二官能性分子を含む組成物を前記対象に投与するステップ；と

(b) 二官能性化合物を含む組成物が投与されている場合、前記二官能性化合物の前記キレーティング基R¹が前記着目の標的において放射性核種をキレートするように、放射性核種を含むイメージングプローブ組成物を前記対象にさらに投与するステップ；と

40

(c) 前記放射性核種を検出して、生物系における前記着目の標的を画像化するステップ；と

を含む、前記二官能性組成物。

【請求項 2】

前記生体内における分子イメージング方法が、PETまたはSPECTである、生体内における分子イメージング方法における使用のための請求項1に記載の二官能性組成物。

【請求項 3】

放射性核種治療における使用のための二官能性組成物であって、ここで、前記組成物が、

(i) 以下の式：

50

【化 4】



{ 式中、

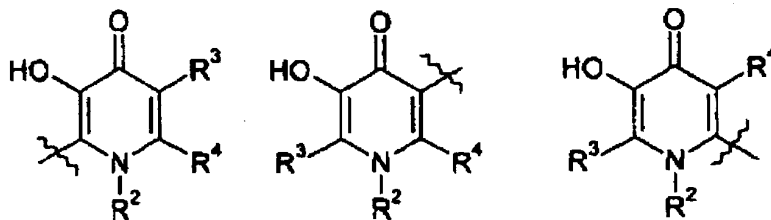
X および Y のうちの 1 つは C = O であり、かつ、他方は N R であり、

各 m および p は、独立して、0 ~ 6 から選ばれ、

R¹ は、放射性核種をキレートすることのできるキレーティング基であり、以下の：

10

【化 5】



または

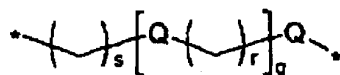
20

から選ばれ；

R、R²、R³ および R⁴ は、独立して、水素または場合により置換された C₁₋₇ アルキル基であり；

B は、前記キレーティング基を反応性基に連結するためのリンカー基であり、以下の式：

【化 6】



30

(式中、

各 Q は、独立して、- NR⁵ -、- C (O) NR⁵ -、- C (O) O -、- NR⁵ C (O) NR⁵ -、- NR⁵ C (S) NR⁵ - および - O - からなる群から選ばれ、各 R⁵ は、独立して、水素または場合により置換された C₁₋₇ アルキル基であり、

各 q および s は、独立して、0 ~ 6 から選ばれ、そして、

各 r は、独立して、1 ~ 6 から選ばれる。)

により表され；

A^{*} は、T に連結された反応した反応性基であり、

T は、対象中の着目の標的に結合可能なターゲティング基である。 }

40

により表される二官能性化合物またはその塩；あるいは

(i i) 前記二官能性化合物および前記二官能性化合物のキレーティング基を介して結合される放射性核種を含む二官能性分子、

を含み、

ここで、前記方法が、以下のステップ：

(a) 前記二官能性化合物または二官能性分子が前記着目の標的に結合するように、前記二官能性化合物または二官能性分子を含む組成物を前記対象に投与するステップ；と

(b) 二官能性化合物を含む組成物が投与されている場合、前記二官能性化合物の前記キレーティング基 R¹ が前記着目の標的において放射性核種をキレートするように、放射性核種を含むイメージングプローブ組成物を前記対象にさらに投与するステップ；と

50

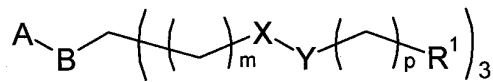
を含む、前記二官能性組成物。

【請求項 4】

二官能性化合物前駆体、二官能性化合物または二官能性分子であって、

(a) 前記二官能性化合物前駆体は、以下の式：

【化 7】



10

(式中、

(i) XはNRであり、YはC=Oであり、mは0～6から選ばれ、かつpは1～6から選ばれるか、あるいは

(ii) YはNRであり、XはC=Oであり、かつmおよびpは、独立に、0～6から選ばれ、

R¹およびBは請求項1に定義されるとおりであり、

Aは、対象中の着目の標的に結合可能なターゲティング基に連結するための反応性基である。)により表されるか、またはその塩であり；

(b) 前記二官能性化合物は、以下の式：

20

【化 8】



(式中、

(i) XおよびYのうちの1つはC=Oであり、かつ、他方はNRであり、mは0～6から選ばれ、かつpは1～6から選ばれるか、あるいは

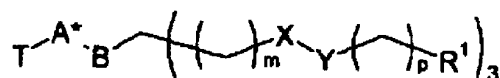
(ii) YはNRであり、XはC=Oであり、かつmおよびpは、独立に、0～6から選ばれ、

30

R¹、B、A*およびTは請求項1に定義されるとおりである。)により表されるか、またはその塩であり；そして

(c) 前記二官能性分子は、二官能性化合物および前記二官能性化合物のキレーティング基を介して結合される放射性核種を含み、前記二官能性分子の二官能性化合物は、以下の式：

【化 9】



40

(式中、

XおよびYのうちの1つはC=Oであり、かつ、他方はNRであり、

各mおよびpは、独立して、0～6から選ばれ、

R¹、B、A*およびTは請求項1に定義されるとおりである。)により表されるか、またはその塩である、

二官能性化合物前駆体、二官能性化合物または二官能性分子。

【請求項 5】

前記式中、sが、独立して0～6から選ばれ、各rが、独立して1～6から選ばれ、か

50

つ、q が、1～6 から選ばれる、請求項 1 又は 2 に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、請求項 3 に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項 4 に記載の官能性化合物前駆体、二官能性化合物または二官能性分子。

【請求項 6】

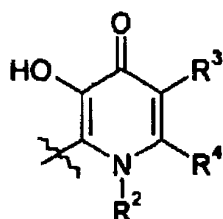
前記反応性基 A が、タンパク反応性の官能基であり、そして任意には、前記反応性基が、マレイミド、アルデヒド、エステル、ヒドラジン、ヒドラジン誘導体、アルコキシアミン、アルコキシアミン誘導体、アルキン、アルケンおよびアジド基から成る群から選択される、請求項 1、2 または 5 に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、請求項 3 または 5 に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項 4 または 5 に記載の官能性化合物前駆体、二官能性化合物または二官能性分子。

10

【請求項 7】

R¹ が、以下の：

【化 10】



20

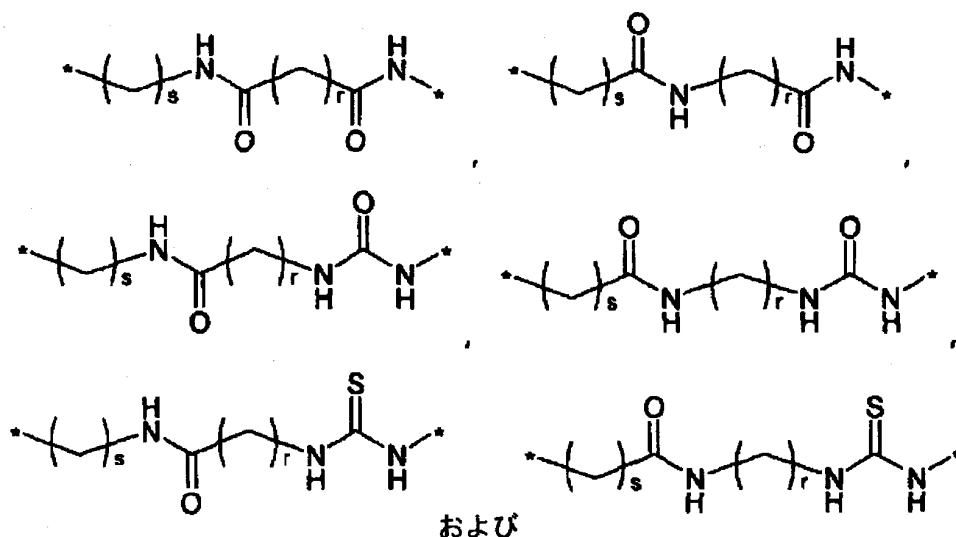
である、請求項 1、2、5 または 6 に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、請求項 3、5 または 6 に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の官能性化合物前駆体、二官能性化合物または二官能性分子。

【請求項 8】

B が、以下の式：

30

【化 11】



40

のいずれか 1 つにより表される、請求項 1、2、5～7 のいずれか 1 項に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、請求項 3、5～

50

7のいずれか1項に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項4～7のいずれか1項に記載の官能性化合物前駆体、二官能性化合物または二官能性分子。

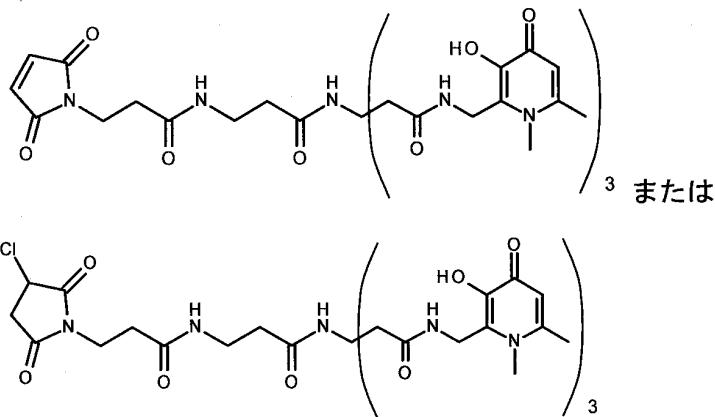
【請求項9】

前記式中、mが2であり、かつpが1である、請求項1、2、5～8のいずれか1項に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、請求項3、5～8のいずれか1項に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項4～8のいずれか1項に記載の官能性化合物前駆体、二官能性化合物または二官能性分子。

【請求項10】

以下の式：

【化12】



により表される二官能性化合物前駆体から得られる二官能性化合物または二官能性分子を含む、請求項1、2、5～9のいずれか1項に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、二官能性化合物または二官能性分子を含む、請求項3、5～9のいずれか1項に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項4～9のいずれか1項に記載の二官能性化合物または二官能性分子。

【請求項11】

前記ターゲティング基および着目の標的が、受容体とリガンド、または抗体と抗原、またはグルコーストランスポーターなどの代謝プローブ/グルコース、低酸素状態/低酸素応答性部位、または骨塩/ビスホスホネート、またはアビジン（もしくはストレプトアビジンもしくは関連タンパク質）/ビオチンもしくはビオチン様誘導体、またはRNA/アンチセンスRNAであり、前記ターゲティング基が、任意に、前記着目の標的における結合パートナーに結合することのできるペプチド、タンパク質、抗体、アプタマーまたは小分子リガンドであり、かつ、前記ターゲティング基が、さらに任意に、アネキシンVおよびシナプトタグミンのC2ドメイン、TIMP-2、CEA、RGDペプチド、ソマトスタチン受容体ターゲティングペプチド、ボンベシン、ガストリンまたはVCAMターゲティングペプチドを包含する、請求項1、2、5～10のいずれか1項に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、二官能性化合物または二官能性分子を含む、請求項3、5～10のいずれか1項に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項4～10のいずれか1項に記載の二官能性化合物または二官能性分子。

【請求項12】

前記着目の標的が、病気の細胞または組織上で発現されるリガンドまたは受容体、病気の状態に関連する細胞表面抗原、癌特異的マーカーまたは組織特異的マーカーなどの腫瘍

10

20

30

40

50

マーカーであるか、あるいは、前記着目の標的が、分子イメージングを受けている対象における位置、器官、組織タイプ、感染因子または生理学的性質である、請求項 1、2、5 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、二官能性化合物または二官能性分子を含む、請求項 3、5 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項 4 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の二官能性化合物または二官能性分子。

【請求項 13】

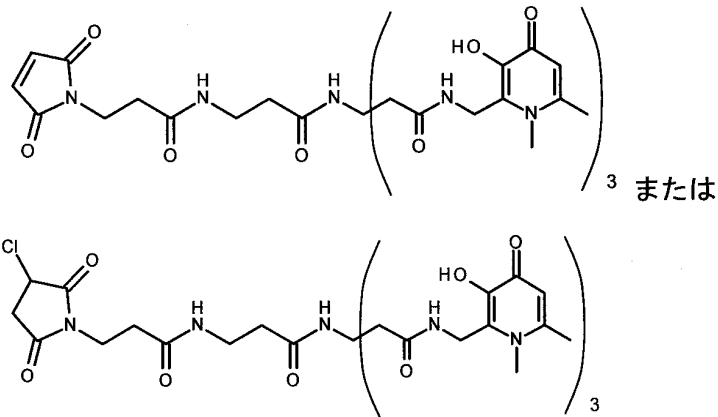
前記放射性核種が、スカンジウム、鉄、コバルト、銅、ガリウム、イットリウム、ジルコニウム、テクネチウム、インジウム、錫、レニウム、ガドリニウム、テルビウム、ホルミウムまたはルテチウムの同位体であり、前記放射性核種が、任意に、ガリウム、Ga - 68、Ga - 67、または Bi - 213 である、請求項 1、2、5 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の生体内における分子イメージング診断方法における使用のための二官能性組成物、二官能性化合物または二官能性分子を含む、請求項 3、5 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の放射性核種治療における使用のための二官能性組成物、あるいは請求項 4 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の二官能性分子。

10

【請求項 14】

前記二官能性化合物前駆体が、以下の式：

【化 13】



20

30

により表される、請求項 4 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の二官能性化合物前駆体。

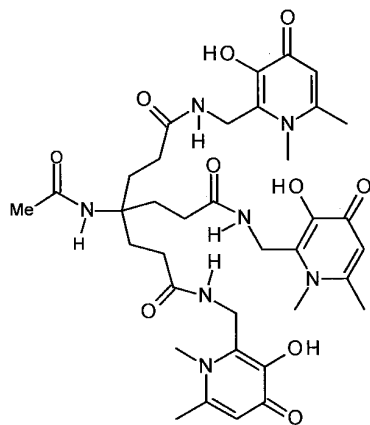
【請求項 15】

生体内における分子イメージング診断方法または放射性核種治療における使用のためのキットであって、前記キットが請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の二官能性化合物を含む二官能性組成物、及び放射性核種を含む組成物を含む、キット。

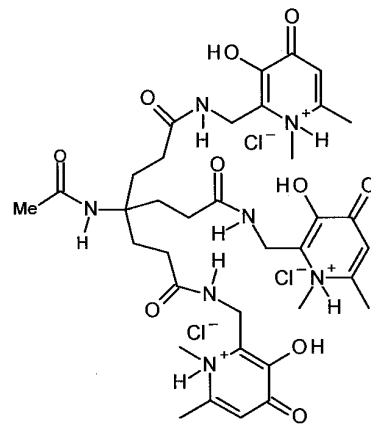
【請求項 16】

以下の式：

【化 1 4】



または



10

のいずれかにより表されるリガンド、及び前記リガンドと錯体を形成するガリウム同位体を含むガリウムリガンド錯体。

【請求項 1 7】

生体内における分子イメージング診断方法または放射性核種治療における使用のための請求項 1 6 に記載のガリウムリガンド錯体を含む組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、二官能性化合物、具体的には、分子イメージングおよび治療における使用のための化合物に関する。該化合物は、対象における特定の細胞または組織を該化合物が標的化するように、ターゲティング基 (targeting group) にコンジュゲーションされることができる。

【背景技術】

【0002】

分子イメージングは、インビボにおける遺伝子発現、血流、生理学的変化 (pH、 $[O_2]$ など)、免疫反応および細胞輸送などの分子過程の三次元マッピングとして定義されることができる。それは、病気を検出しおよび診断し、最適の治療を選択し、ならびに治療の効果をモニターして有効性の読出し情報を早期に得るために使用されることができる。原理上、ポジトロン放射断層撮影法 (PET)、単一光子放射断層撮影法 (SPET)、光画像法 (OI) および核磁気共鳴画像法 (MRI) を含む、多数の異なる技術が分子イメージングに使用されることができる。PET/CTおよびSPET/CTなどのこれらのモダリティの組み合わせ (「マルチ - モダルイメージング」) は、改善された臨床応用を提供するようになってきている。

30

【0003】

PETおよびSPETによる放射性核種イメージングは、極めて高い感度およびインビボの分子過程を混乱させない少量の投与造影剤 (例えば、インビボでピコモル) という利益を有する。さらに、放射性核種イメージングについてのターゲティング原理は、放射性核種治療の標的化デリバリーにも適用可能である。典型的に、分子イメージングにおける放射性核種として使用される同位体は、分子中に取り込まれて、対象にとって医薬として許容可能な放射性トレーサーを生成する。さまざまな特性を有する多くの放射性トレーサーが開発された。例えば、フルオロデオキシグルコース (^{18}F) は、PETによる分子イメージングにおいてしばしば使用される標識グルコース誘導体である。

40

【0004】

PCT国際特許出願公開第WO2009/021947号は、MRI造影剤としての使

50

用のための三脚型キレーターを記載する。親水性のR基を有するヒドロキシピリジノンキレーティング基が記載される。親水性基は、キレーターの可溶化を助けるために必要とされる。さらに、キレーターは、MRI造影剤の緩和能を増加させるために、デンドリマーなどの大分子に連結されることができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

感受性の官能部位を有する放射性トレーサーを調製することは難しいことがある。例えば、放射性トレーサーへの放射性同位体の組み込みは、タンパク構造を破壊しうる高温を伴いうる。感受性の官能部位を放射性トレーサー中に含ませることが望ましいことがあり、そのためには穏やかな条件を用いて調製しうる放射性トレーサーを提供する必要がある。その結果、改善された官能性と改善された分子イメージング特性を有するイメージングコンジュゲートが生成されうる。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

現在、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸(DOTA)は、分子イメージングおよび標的放射性核種治療において使用されるガリウム-68(およびGa-67、In-111、Cu-64、Lu-177、Y-90などの他の金属放射性同位体)のための一般的なキレーターである。しかしながら、(約68分の ^{68}Ga の半減期に対して)DOTAは約30分という長い放射性標識時間を有する。さらに、DOTA誘導体によるガリウムのキレーションは、しばしば約95の高い標識温度を必要とする。本発明者らは、生物学的環境中で解離に対する適度なまたはもっと言えば亢進された安定性を保持しつつ、室温で迅速に放射性核種をキレートすることのできる二官能性分子を発見した。該二官能性分子は、金属キレーティング部分に加えて、体内の細胞、組織または生体分子などを標的とすることのできるターゲティング基などの機能的部位に該二官能性分子を結合させるための反応性部分を有する。

20

【0007】

もっとも一般的に、本発明は、標的群またはデリバリービヒクルのインビボでの分布および/または最終位置がモニターされうるように、放射性核種またはイメージング標識に連結するための三脚型六配座トリス(ヒドロキシピリジノン)キレーティング部分と、対象中の特定の細胞もしくは組織を標的とするためのターゲティング基または薬剤、毒素もしくは他のそのような分子をデリバリーするためのデリバリービヒクルに連結するための反応性官能基を有する二官能性分子を提供する。

30

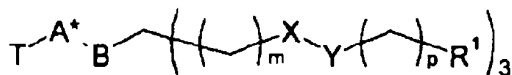
【0008】

したがって、第一の態様において、本発明は分子イメージング方法における使用のための二官能性化合物を提供し、ここで、該二官能性化合物は、以下の式：

【0009】

【化1】

40



【0010】

{式中、

XおよびYのうちの1つはC=Oであり、かつ、他方はNRであり、

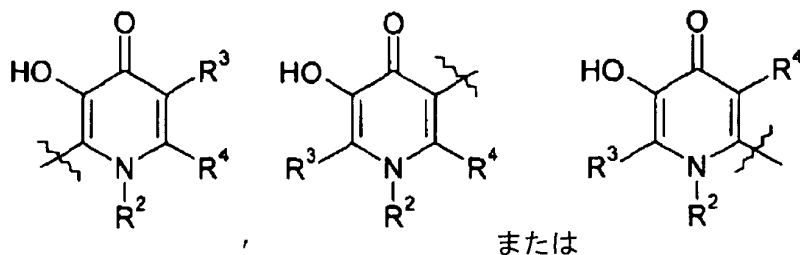
各mおよびpは、独立して、0~6から選ばれ、

R¹は、放射性核種をキレートすることのできるキレーティング基であり、以下の：

【0011】

50

【化 2】



10

【 0 0 1 2 】

から選ばれ；

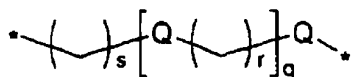
R 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、独立して、水素または場合により置換された C_{1-7} アルキル基であり；

B は、キレーティング基を反応性基に連結するためのリンカー基であり、以下の式：

【 0 0 1 3 】

【化 3】

20



【 0 0 1 4 】

(式中、

各 Q は、独立して、 $-NR^5-$ 、 $-C(O)NR^5-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-NR^5C(O)NR^5-$ 、 $-NR^5C(S)NR^5-$ および $-O-$ からなる群から選ばれ、

各 R^5 は、独立して、水素または場合により置換された C_{1-7} アルキル基であり、

各 q および s は、独立して、0～6から選ばれ、そして、

各 r は、独立して、1～6から選ばれる。)

30

により表され；

A^* は、 T に連結された反応した反応性基であり、

T は、対象中の着目の標的に結合可能なターゲティング基である。}

により表される化合物またはその塩である。

【 0 0 1 5 】

ここで、上記方法は、以下のステップ：

(a) 上記二官能性化合物が着目の標的に結合するように、該二官能性化合物を上記対象に投与するステップ；と

(b) 上記二官能性化合物のキレーティング基 R^1 が着目の標的において放射性核種をキレートするように、放射性核種を含むイメージングプローブ組成物を上記対象に投与するステップ；と

40

(c) 上記放射性核種を検出して、生物系における上記着目の標的を画像化するステップ；と
を含む。

【 0 0 1 6 】

第一の態様の二官能性化合物は、標的位置まで生物系を循環することができる。そして、上記放射性核種が対象中に導入されたとき、該放射性核種は迅速に上記系を通過し、二官能性化合物とキレート結合する。このようにして、放射性核種の有効性を最大化するように、放射性核種は生物系に導入されてから短時間で着目の位置に固定されることができ

50

る。

【 0 0 1 7 】

好ましくは、s は、独立して 0 ~ 6 から選ばれ、各 r は、独立して 1 ~ 6 から選ばれ、q は、1 ~ 6 から選ばれる。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、上記分子イメージングの方法は、P E T または S P E T である。

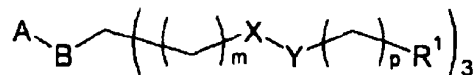
【 0 0 1 9 】

他の側面において、本発明は、分子イメージングにおける使用のための放射性核種をキレーティングするための二官能性化合物を提供し、ここで、該化合物は、以下の式：

【 0 0 2 0 】

10

【化 4】



【 0 0 2 1 】

{ 式中、

X および Y のうちの一方は C = O であり、他方は N R であり；

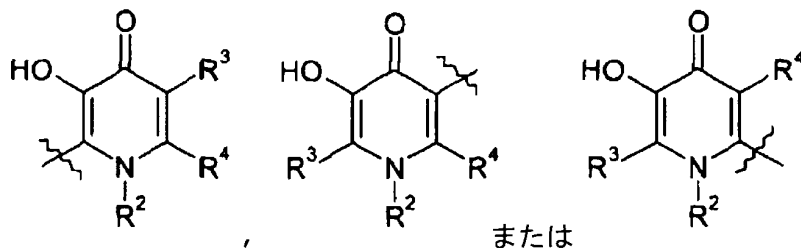
20

m および p はそれぞれ、独立して 0 ~ 6 から選ばれ；

R¹ は、キレーティング基であり、以下の：

【 0 0 2 2 】

【化 5】



30

【 0 0 2 3 】

から選ばれ；

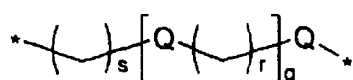
R、R²、R³ および R⁴ は、独立して、水素または場合により置換された C₁₋₇ アルキル基であり；

B は、キレーティング部分を反応性基に連結するためのリンカー基であり、以下の：

【 0 0 2 4 】

40

【化 6】



【 0 0 2 5 】

(式中、

各 Q は、独立して、- N R⁵ -、- C (O) N R⁵ -、- C (O) O -、- N R⁵ C (

50

O) NR^5 -、- $\text{NR}^5\text{C}(\text{S})\text{NR}^5$ - および - O - からなる群から選ばれ、
各 R^5 は、独立して、水素または場合により置換された C_{1-7} アルキル基であり、
各 q および s は、独立して、0 ~ 6 から選ばれ、そして、
各 r は、独立して、1 ~ 6 から選ばれる。)

により表され；

A は、生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルに連結するための反応性基である。}

により表される化合物またはその塩である。

【0026】

二官能性コンジュゲート化合物は、(5分以下のオーダーの)非常に短時間で金属放射性核種をキレートすることができ、かつ、それを室温においておよそ生理学的pHの水中で行うことができる三脚型六配座トリス(ヒドロキシピリジノン)キレーティング部分を提供する。反応性部分は、キレーティング部分に連結されて、二官能性分子がターゲティング基またはポリペプチドもしくは他の生物分子、薬剤もしくはナノ粒子などの他のビヒクルとコンジュゲーションされることを可能とする。キレーティング基の迅速かつ低温での標識化は、二官能性分子が、キレーティング部分を介して ^{68}Ga ($T_{1/2}=68$ 分)などの半減期の短い放射性核種に、および、体温を超える放射性標識温度において変性するポリペプチドなどの温度感受性ターゲティング基に、の両方に連結されることを可能とする。

【0027】

キレーティング反応の効率は、非常に低いデリバリービヒクル濃度における標識化も可能とする。こうして、かなりの割合のデリバリービヒクルが放射性核種で放射性標識され、その結果として、非常に高い比放射能をもたらす。こうして、二官能性分子は、放射性標識コンジュゲートのための優れた前駆体を提供する。

【0028】

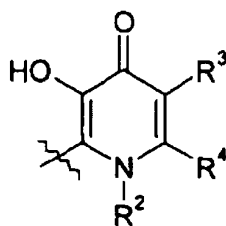
好ましくは、反応性基Aは、タンパク反応性の官能基である。タンパク反応性基は、タンパク質または修飾タンパク質またはペプチドまたは目的のために誘導体化された他のビヒクルと反応することができる。好ましくは、タンパク反応性基は、マレイミド基、アルデヒド、エステル、またはアルキン、アジド、アルケン、ヒドラジン、ヒドラジン誘導体、アルコキシアミン、アルコキシアミン誘導体、アミノキシもしくはチオール基などの「クリック」試薬である。マレイミド、アルデヒドおよびエステル基は、ペプチドチオール - またはアミン - 含有残基(システイン、リジン)と効率的に反応し、それでコンジュゲートが容易に形成する。他の生体直交型官能基は、それらをアルキン、アジド、アルケン、ヒドラジン、アミノキシまたはチオール基とコンジュゲーションさせるために、ペプチドおよびタンパク質中へ工学処理されることができる。

【0029】

好ましくは、 R^1 は、以下の式：

【0030】

【化7】



【0031】

により表される。

【 0 0 3 2 】

好ましくは、 R^2 、 R^3 および R^4 は、独立して、Hまたは CH_3 である。キレーティング基のキレーション部位を置換基が立体的に障害しないよう、かつ、キレーターが脂溶性となりすぎないように、比較的小さな置換基を複素環上に有することが好ましい。したがって、好ましい実施態様において、 R^2 、 R^3 および R^4 は、Hである。しかしながら、複素環基上の1つ以上のメチル置換基が、分子の溶解性および/または疎水性を調整するために使用されることができる。したがって、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの1つ以上が CH_3 であることができる。

【 0 0 3 3 】

好ましくは、mは、2または3である。好ましくは、pは、0または1である。より好ましくは、mが2であり、pが1であるか、または、mが3であり、pが0である。これはキレーティング基 R^1 に5原子の三脚のアーム長さを与える($m + p = 3 + X$ および Y)。三脚のアーム長さが5原子である場合、三脚型基は、ガリウムなどの放射性核種をキレーティングするのに適している。

10

【 0 0 3 4 】

リンカー基Bは、三脚型キレーティング部分と反応性官能基(およびコンジュゲーションされた場合のターゲティング基またはキャリアービヒクルなど)を接続する。リンキング基は、例えば、リンカーの長さを変えるために、基Q、q、rおよび/またはsを変えることによって調整されることができる。

【 0 0 3 5 】

Aまたは(キレーティング基を有する各アームに結合した)四級炭素のいずれかまたはその両方がQに結合されうるように、リンカー基はいずれの方向に配置されてもよい。好ましい実施態様において、Bは、二官能性化合物が以下の式：

20

【 0 0 3 6 】

【 化 8 】



30

【 0 0 3 7 】

により表されるように、配置される。

【 0 0 3 8 】

Qにより表される官能基中の原子の順番は制限されない。言い換えれば、Qがアミド基である場合、キレーティング部分から反応性官能基に向かう基の順番は、 $-NR^5-$ 、ついで $-C(O)-$ 、またはその逆であってよい。

【 0 0 3 9 】

好ましくは、少なくとも1つのQがアミド($-C(O)NR^5-$)である。好ましくは、qが1、rが2および/またはsが1である。より好ましくは、qが1、rが2、およびsが1である。好ましくは、 R^5 は水素である。

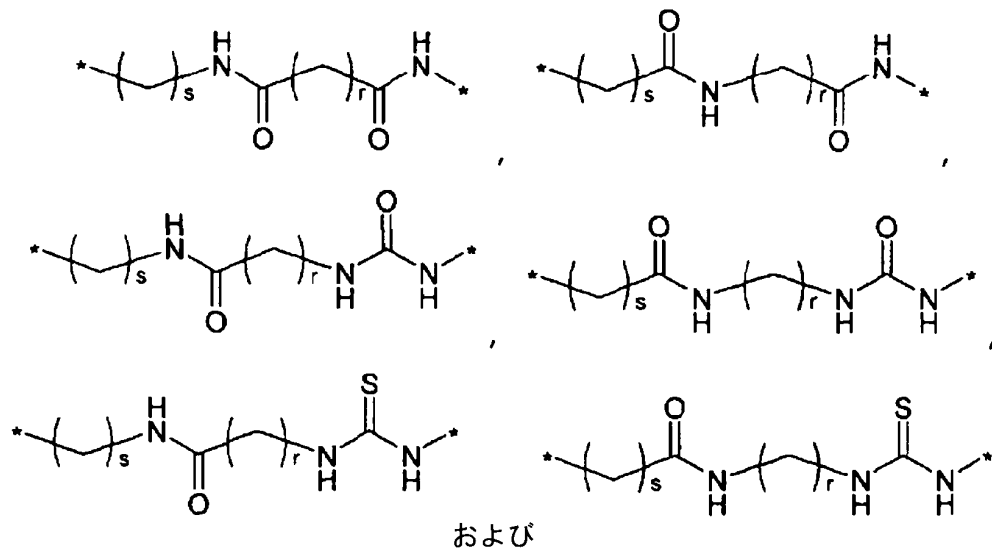
40

【 0 0 4 0 】

好ましくは、Bは、以下の式：

【 0 0 4 1 】

【化 9】



10

【 0 0 4 2 】

{ 式中、

r は、1 ~ 6 から選ばれ、かつ

s は、0 ~ 6 から選ばれる。}

のうちの 1 つにより表される。好ましくは、r が 2 であり、および / または s が 2 である。

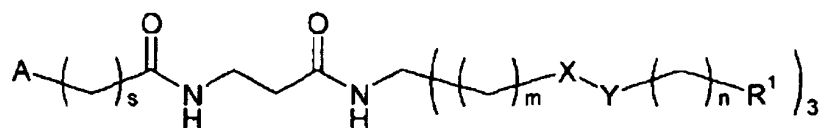
20

【 0 0 4 3 】

好ましい実施態様において、二官能性化合物は、以下の式：

【 0 0 4 4 】

【化 1 0】



30

【 0 0 4 5 】

{ 式中、

A、s、m、X、Y、n および R¹ は本明細書において定義されたとおりである。}

により表される。

【 0 0 4 6 】

好ましい実施態様において、放射性核種は、テクネチウム、レニウム、銅、コバルト、ガリウム、イットリウム、ルテチウムまたは他のランタニド、インジウム、ジルコニウム、スカンジウムの同位体である。より好ましくは、放射性核種は、Tc - 99m、Re - 186、Re - 188、Co - 57、In - 111、Cu - 60、Cu - 61、Cu - 62、Cu - 64、Cu - 67、Tc - 94m、Ga - 68、Ga - 67、Ga - 66、Y - 90、Y - 86、Sc - 44、Sc - 47、Fe - 52、Sn - 117m、Tb - 149、Gd - 153、Ho - 166、Lu - 177、Zr - 89、Bi - 213 または Co - 55 であり、より好ましくは、放射性核種は、ガリウムであり、最も好ましくは、Ga - 68 または Ga - 67 である。

40

【 0 0 4 7 】

50

好ましくは、ターゲティング基は、着目の標的における結合パートナーに結合することのできる特定の結合対のメンバーである。より好ましくは、ターゲティング基と着目の標的は、受容体とリガンド、または抗体と抗原、またはグルコーストランスポーター/グルコースなどの代謝プローブ (metabolic probe)、低酸素状態/低酸素応答性部位、または骨塩/ビスホスホネート、またはアビジン (もしくはストレプトアビジンもしくは関連タンパク質) とビオチン (もしくはビオチン様誘導体)、またはRNAとアンチセンスRNAである。

【0048】

好ましくは、ターゲティング基は、着目の標的における結合パートナーに結合することのできるペプチド、タンパク質、抗体、アプタマーまたは小分子リガンドである。より好ましくは、ターゲティング基は、二官能性コンジュゲート組成物がアポトーシスまたは細胞死のイメージング研究において使用可能であるように、ホスファチジルセリン (PS) に結合可能なポリペプチドである。より好ましくは、ターゲティング基は、アネキシンVおよびシナプトタグミンのC2ドメイン、TIMP-2、CEA、RGDペプチド、ソマトスタチン受容体ターゲティングペプチド、ボンベシン、ガストリンまたはVCAMターゲティングペプチドを包含する。

【0049】

好ましくは、着目の標的は、インビボの分子標的である。より好ましくは、着目の標的は、(その存在量またはリガンド占有率が決定される) 病気の細胞または組織上で発現されるリガンドまたは受容体、病気の状態に関連する細胞表面抗原、癌特異的マーカーまたは組織特異的マーカーまたは病気の状態において上方もしくは下方制御される正常過程のマーカーなどの腫瘍マーカーである。好ましくは、着目の標的は、分子イメージングを受けている対象における位置、器官、組織タイプまたは生理学的性質である。

【0050】

反応性基Aは、デリバリービヒクルに連結するためのものであることができる。本明細書に定義されたデリバリービヒクルは、小分子薬剤または毒素などの機能性分子を例えば生物系に送達する目的で該機能性分子を担持するための分子構造である。機能性分子は、デリバリービヒクル内に含まれるかまたはその表面に結合されることができる。機能性分子は、典型的に、機能性分子が生物系中の所与の位置で放出されうるように、デリバリービヒクルと可逆的に結合する。多くのかかるデリバリービヒクルが本分野で知られている。好ましくは、デリバリービヒクルは、ナノ粒子またはリポソームである。医薬品などの機能性分子は、ナノ粒子の表面に結合されるかまたはリポソーム内に含まれることができる。

【0051】

したがって、本発明の二官能性化合物がデリバリービヒクルに連結され、かつ放射性核種がキレート基 R^1 によりキレートされる場合、対象の中を通る(デリバリービヒクルにより運ばれる)薬剤の移動は、放射性核種のイメージングによりモニターされることができる。

【0052】

反応性基は、(生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルに加えて) 二次イメージング標識に連結されるためのものであることができる。好ましくは、二次イメージング標識は、光標識 (optical label)、SPIOなどの常磁性標識、または量子ドットである。より好ましくは、該イメージング標識は、常磁性プローブを有するMRI造影剤である常磁性標識である。或いは、該イメージング標識は、蛍光またはルミネッセント特性を有する有機分子または金属錯体である光標識である。該標識は、例えば、光標識または常磁性標識の場合、二官能性化合物がマルチモーダルイメージングにおいて使用されることを可能とする。

【0053】

反応性基Aは、さらなる生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルと連結することができる。例えば、二官能性化合物は、対象中の特

10

20

30

40

50

定の細胞を標的とするためのターゲティング基および医薬品を含むリポソームに放射性核種を連結することができる。こうして、標的薬物デリバリーが、生物系を通るその移動の間、モニターされることができる。

【0054】

分子イメージング方法は、放射性核種が生物系中に導入される前（すなわち、プレ-ターゲティング（pre-targeting））または放射性核種が二官能性化合物のキレート部分にキレートされた後（すなわち、プレ-アセンブル（pre-assembled））に、二官能性化合物（またはそのコンジュゲート）を生物系（例えば、対象）中に導入することを含んでよい。

【0055】

10

二官能性化合物（またはコンジュゲート）が、放射性核種より前に生物系中に導入された場合、二官能性化合物は、好ましいまたは標的の位置まで生物系内を循環することができる。そして、放射性核種が導入されたら、放射性核種は迅速に系の中を通過し、二官能性分子（またはコンジュゲート）とキレートする。こうして、放射性核種の有効性が最大化されるように、放射性核種は生物系への導入から短時間以内で着目の位置に固定されることができる。

【0056】

放射性核種が、生物系への導入前に二官能性化合物（またはコンジュゲート）にキレートされる場合、二官能性化合物は、該化合物に結合した生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチド、キャリアービヒクルまたは二次イメージング標識を有する二官能性化合物またはコンジュゲートの生物系内を通る移動をモニターするために使用されることができる。

20

【0057】

好ましくは、生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルが二官能性化合物に結合して、二官能性化合物組成物の生物系または対象への導入前に二官能性化合物コンジュゲートを形成する。

【0058】

好ましくは、生物系は、病気または状態の診断または治療を受けている対象である。治療は放射性核種治療であることができる。具体的には、治療は、例えばそれに結合したデリバリービヒクルを介して二官能性分子に結合した放射性核種または化学療法剤を用いる癌の治療であることができる。好ましくは、二官能性分子は、治療剤と会合している（associated with）かまたは結合（bound to）している。或いは、対象は、その中でターゲティング分子またはデリバリービヒクルの生体内分布が評価される対象であることができる。

30

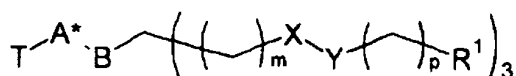
【0059】

第二の態様において、本発明は、分子イメージングにおける使用のための放射性核種をキレートするための二官能性化合物コンジュゲートを提供し、ここで、該コンジュゲートは、以下の式：

【0060】

【化11】

40



【0061】

{式中、

XおよびYのうちの1つはC=Oであり、かつ、他方はNRであり、

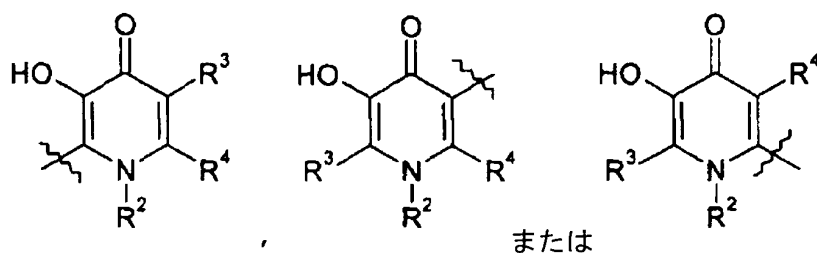
mおよびpは、独立して、0～6であり、

50

R^1 は、キレートリング基であり、以下の：

【0062】

【化12】



10

【0063】

から選ばれ；

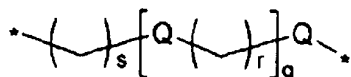
R 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、独立して、水素または場合により置換された C_{1-7} アルキル基であり；

B は、キレートリング部分を反応性基に連結するためのリンカー基であり、以下の式：

【0064】

【化13】

20



【0065】

(式中、

各 Q は、独立して、 $-NR^5-$ 、 $-C(O)NR^5-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-NR^5C(O)NR^5-$ 、 $-NR^5C(S)NR^5-$ 、 $-O-$ からなる群から選ばれ、

30

各 R^5 は、独立して、水素または場合により置換された C_{1-7} アルキル基であり、

各 q および s は、独立して、0～6から選ばれ、そして、

各 r は、独立して、1～6から選ばれる。)

により表され；

A^* は、 T への連結のための反応した反応性基であり、

T は、生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルである。}

により表される化合物またはその塩である。

【0066】

さらなる態様において、本発明は、以下の：本明細書に記載の二官能性化合物を有する二官能性分子組成物であって、ここで、該化合物が反応性基 A を介して生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルに連結されている、上記二官能性分子組成物；および本明細書に記載の放射性核種を含むイメージング組成物を含む、分子イメージングまたは治療の方法における使用のためのキットを提供する。

40

【0067】

他の態様において、本発明は、以下の：本明細書に記載の二官能性化合物を有する二官能性分子組成物；および該二官能性分子に連結するための生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルを含む、分子イメージングまたは治療の方法における使用のためのキットを提供する。該キットは、本明細書に記載の放射性核種を含むイメージング組成物も含んでよい。

50

【0068】

他の態様において、本発明は、生物系における着目の標的の分子イメージングの方法を提供し、該方法は以下の：

(a) 本明細書に記載の二官能性化合物を含む組成物を対象に投与するステップ、ここで、該化合物は、反応性基 A を介して生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルに連結され；と

(b) 放射性核種を含むイメージング組成物を上記対象に投与するステップ、ここで、上記二官能性化合物のキレート基 R¹ は、上記放射性核種をキレートすることができ；と

(c) 上記放射性核種を検出して、上記生物系における着目の標的を画像化するステップ；と
を含む。 10

【0069】

他の態様において、本発明は、生物系における着目の標的または着目の移動の分子イメージングの方法を提供し、該方法は以下の：

(a) 本明細書に記載のキレート基を介して、二官能性分子に放射性核種をキレートするステップ、ここで、該化合物は、反応性基 A を介して生体部位、ターゲティング基、タンパク質、ポリペプチドまたはデリバリービヒクルに連結されて、放射性標識二官能性分子化合物を形成し；と、

(b) 上記放射性標識二官能性化合物を含む組成物を対象に投与するステップ；と 20

(c) 上記生物系における着目の標的または移動を画像化するステップ；と
を含む。

【0070】

好ましくは、放射性核種は、着目の標的に放射線治療を送達することのできる放射性核種である。好ましくは、該放射性核種は、Cu - 67、Re - 186、Re - 188、Y - 90、Lu - 177、Sc - 47 または Bi - 213 である。

【0071】

任意の態様の好ましいおよび随意的な特徴は、任意の他の態様に適用されてよい。具体的には、二官能性化合物の好ましい特徴が分子イメージングの方法に適用でき、その逆も同様である。 30

【0072】

ここに、本発明の実様態様が、付随する図面を参照して、例として非制限的に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】図1は、80 において30分後の、⁶⁷Ga によるDOTAの放射性標識収率 (radio labelling yield) に比較した、室温において5分後の⁶⁷Ga によるキレート部分CP256の放射性標識収率を示す。

【図2】図2は、⁶⁷Ga - クエン酸塩 (C) に比較した、アポトランスフェリンとのインキュベーション後の2.27 μM (A) および0.227 μM (B) のCP256の放射性標識溶液についての、PD10カラムからの⁶⁷Ga - CP256の溶出プロフィールを示す。 40

【図3】図3は、アポトランスフェリンとのインキュベーション後の、⁶⁷Ga - クエン酸塩、⁶⁷Ga - CP256、⁶⁷Ga - DOTA および⁶⁷Ga - DTPA の、30 kDa MWCO フィルターへの保持を示す。

【図4】図4は、酢酸塩バッファー中でのガリウム - 68 との15分間のインキュベーション後の、C2Ac およびC2Ac - (7) の、PD10 サイズ排除カートリッジを用いた放射能溶出プロフィールを示す。

【図5】⁶⁸Ga - 標識コンジュゲートは、赤血球結合アッセイにおいて、ホスファチジルセリン (PS) に対する特異的なカルシウム依存性の結合を示した。 50

【図6】図6は、(a) C2Ac - (7) - ^{68}Ga および (b) キレートされていない「遊離の」 ^{68}Ga の投与の90分後のマウスのPETスキャンを示す。

【図7】血清中でのCP256による ^{68}Ga のキレーションを示すサイズ排除放射クロマトグラフィー(PD10カラム): a) 対照、血清中でインキュベートされた ^{68}Ga 塩化物; b) 対照、血清とともにインキュベートされた、あらかじめ形成された ^{68}Ga -CP256複合体; c) 対照、バッファー中でインキュベートされた ^{68}Ga ; および d) 実験的サンプル、CP256(23 μM 以上)がすでに添加されている血清に添加された ^{68}Ga 塩化物。

【図8】バッファー中での ^{111}In -CP256に比較した、血清中での ^{111}In -酢酸塩および ^{111}In -CP256のインキュベーション後の ^{111}In のPD10サイズ排除クロマトグラフィープロフィール。

10

【図9】野生型マウス(上)またはシアロアドヘシンノックアウトマウス(下)における、 ^{67}Ga -CP256-SER4(グループ1)、SER4の注射5分後の ^{67}Ga -クエン酸塩(グループ2)、およびCP256-SER4の注射5分後の ^{67}Ga -クエン酸塩(グループ3)の生体内分布。

【図10】野生型マウスにおける、 ^{68}Ga -CP256-SER4(グループ1)、SER4の注射1時間後に注射された ^{68}Ga -酢酸塩(グループ2)、およびCP256-SER4の注射1時間後に注射された ^{68}Ga -酢酸塩の生体内分布。

【図11】図11A(左): CP256-SER4を用いるプレ-ターゲティングを示す、グループ3からのマウスのPET/CTスキャン(最大値投影法): CP256-SER4、続いてGa-68酢酸塩を注射された8週齢のC57B1/6は、肝臓/脾臓取り込みを示す。注射の1.5時間後に画像を撮影した。図11B(右): 比較用の、Ga-68酢酸塩のみを注射されたマウスは、血液プール中の保持および関節における蓄積を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0074】

詳細な説明

A: 着目の部位のターゲティング

二官能性化合物がターゲティング分子への連結のためのものである場合、さまざまな一次ターゲティング基が二官能性化合物に連結されて、キレート基を有する該二官能性化合物を問題の生物系における着目の異なるターゲットに導くことができる。

30

【0075】

一態様において、着目の標的は、それらがお互いに特別な特異性を有し、正常条件下で他の分子に優先してお互いに結合する分子対のメンバーとなるように、上記系において一次ターゲティング基に特異的に結合可能な特異的結合対のメンバーを含むだろう。特異的結合対の例は、本分野で周知であり、例えば、受容体とリガンド、酵素と基質、抗体と抗原が挙げられる。したがって、一次ターゲティング基は、特異的なインビボの分子ターゲットに結合するペプチド、タンパク質またはアプタマーなどの他の生体分子または小分子リガンドであることができる。着目の標的のクラスとして、病気の細胞または組織上に発現されるリガンドまたは受容体またはトランスポーター、病気の状態に関連した細胞表面抗原、或いは、腫瘍マーカー、例えば癌特異的マーカーまたは組織特異的マーカー、が挙げられる。

40

【0076】

一次ターゲティング基の一群は、本発明の二官能性分子コンジュゲートがアポトーシスまたは細胞死のイメージング研究に使用可能であるように、ホスファチジルセリン(PS)に結合可能なポリペプチドである。かかるポリペプチドの例として、アネキシンVおよびシナプトタグミンのC2ドメインが挙げられる。1つ以上のC2ドメインを含むポリペプチドは本分野で周知である。いくつかのポリペプチドがC2ドメインを1つしか有さない一方、他は2つ以上のC2ドメインを有し、該ドメインは一般に、名前の最後に(アルファベット順に)文字を付することによって記述される(例えば、C2A、C2Bなど)

50

。C2ドメインを1つしか含まないタンパク質については、該ドメインは単純にC2ドメインと呼ばれる。以下の例はラットシナプトタグミンIのC2Aドメインを使用するが、他の種のシナプトタグミンのC2Aドメインなどの、PSに結合可能な他のC2ドメインが代わりに使用可能であった。C2ドメインを含むタンパク質のさらなる例として、シナプトタグミン1-13、セリン/スレオニンキナーゼ、ホスホリパーゼA2、ホスホリパーゼ1、第V因子および第VII因子を含む凝固カスケードにおけるコファクターならびにコピンファミリーのメンバーが挙げられるが、これらには限定されない。ヒトシナプトタグミンとして、シナプトタグミン1-7、12および13が挙げられる。

【0077】

本発明において使用されることのできる他のタンパク質として、癌細胞によって発現されるマーカーに特異的に結合可能であり、それによってバイオコンジュゲートを用いて癌細胞が画像化されることを可能とするポリペプチドが挙げられる。例として、本発明は、骨髄単球細胞系統の細胞および白血病細胞などのCD33を発現する癌細胞のイメージングのために、抗-CD33抗体またはその断片を使用することができる。Emberson et al., J. Immunol. Methods, 305(2):135-51, 2005を参照されたい。さらなる例は、メタロプロテイナーゼの発現が転移過程に関与するとされたため、マトリックスメタロプロテイナーゼ発現の画像化のためのTIMP-2などのメタロプロテイナーゼの組織インヒビター(TIMPs)の使用である。Giersing et al., Bioconjug Chem, 12(6):964-71, 2001を参照されたい。本発明によるコンジュゲートの作製に使用可能なポリペプチドのさらなる例は、補体受容体2(CR2)である。糖タンパク質である癌胎児性抗原(CEA)に結合することのできる抗体も、糖タンパク質のこのファミリーのメンバーが結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、すい臓癌細胞、肺癌細胞、甲状腺髄様癌細胞および乳癌細胞において発現されるため、一次ターゲティング基として使用されることができる。

【0078】

さらなる例は、好適な反応性基Aを用いてRGDペプチド誘導体を二官能性化合物に連結することによって、腫瘍、動脈硬化性プラークおよび梗塞を起こした心筋層などの修復中の病気の組織において一般的にみられるような、血管新生中の組織の内皮において高度に発現される $\alpha_v\beta_3$ インテグリンへの、ペプチド配列アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)の親和性を利用することができる。

【0079】

さらなる例は、好適な反応性基Aを用いてソマトスタチン類似体ペプチドを二官能性化合物に連結することによって、癌腫、甲状腺髄様癌種および他の神経内分泌腫瘍などの癌細胞の表面において高度に発現されるソマトスタチン受容体に結合しうるペプチド、オクトレオチド、またはソマトスタチンの他の関連類似体の親和性を利用することができる。

【0080】

他の例は、抗体の細胞接着分子への親和性を利用することができる。一例は、モノクローナル抗体、SER4のマクロファージ接着分子、シアロアドヘシンへの親和性である。シアロアドヘシンは、マクロファージ表面、そして、脾臓、肝臓、リンパ節、骨髄、結腸および肺のマクロファージ上などで多量に見出される。

【0081】

当業者は、ボンベシン、ガストリンまたはVCAMターゲティングペプチドなどの他のターゲティング基を使用することができるであろう。

【0082】

好ましくは、一次ターゲティング基は、二官能性化合物に結合するための官能基および一次ターゲティング基に連結するための反応性基を有するコンジュゲートとして、二官能性化合物に連結されることができる。これを達成するためのさまざまな可能性が当業者には明らかとなるであろう。例として、一実施態様において、一次ターゲティング基への部位特異的連結のための反応性基、例えば、ペプチド、ポリペプチドまたは抗体などの生体

分子中のチオール基への部位特異的連結のためのマレイミド基、が使用されてよい。その後、マレイミド基は、部位特異的にチオール基、例えば、目的のためにペプチドまたはタンパク質中に部位特異的に取り込まれたシステイン残基のチオール基、に連結されることができる。他の例において、二官能性キレーター中の反応性基は、ヒドラジンまたは類似の反応性の基が部位特異的に取り込まれて（例えば、ヒドラジノニコチン酸誘導体）、ヒドラゾンまたは類似の連結を形成しているタンパク質またはペプチドと部位特異的に反応することができるアルデヒドまたはケトン基であろう。

【0083】

いくつかの場合に、一次ターゲティング基は、好適なポリペプチドまたはタンパク質、或いはその断片またはドメインを含むことができる。したがって、都合上、本明細書中の方法が一般に「ポリペプチド」を基準に記載されるが、これは、時には本分野ではペプチドと呼ばれる、アミノ酸のより短い配列も含むと理解されるべきである（例えば、3から10アミノ酸までの長さから30、40または50アミノ酸までの長さ）。この用語は、一般にタンパク質ならびにマルチドメインタンパク質と呼ばれる、二次、三次または四次構造を有するポリペプチドも含むと理解されるべきである。いくつかの実施態様および以下に示す例において、一次ターゲティング基として使用されるポリペプチドは、タンパク質ドメインである。「タンパク質ドメイン」は、完全長タンパク質から独立して、構造を保持する能力を有する完全長タンパク質の断片であって、典型的に安定で折りたたまれた三次元構造を形成する。多くのタンパク質は、数個の構造上のタンパク質ドメインからなり、特別なドメインがさまざまな関連タンパク質で見出されるのは一般的である。タンパク質ドメインは、約25アミノ酸から500アミノ酸までの間の長さ、または50アミノ酸から250アミノ酸まで、または75アミノ酸から150アミノ酸まで、その長さが変化する。

【0084】

本発明において、ポリペプチドが抗体である場合、この用語は、天然または部分的もしくは全体として合成により作り出されたかにかかわらず、イムノグロブリンを表す。この用語は、抗体の抗原結合ドメイン；F a b、s c F v、F v、d A b、F dなどの抗原結合ドメインを含む抗体断片；および二重特異性抗体を含む、任意のポリペプチドまたはタンパク質にも及ぶ。他の抗体または元の抗体の特異性を保持するキメラ分子を作り出すために、モノクローナル抗体および他の抗体を利用し、組換えDNAテクノロジーの技術を用いることは可能である。かかる技術は、抗体のイムノグロブリン可変領域または相補性決定領域（CDRs）をコードするDNAを、異なるイムノグロブリンの定常領域または定常領域＋フレームワーク領域に導入することを含むことができる。たとえば、欧州特許出願公開第E P 0 1 8 4 1 8 7 A号明細書、英国特許出願公開第G B 2, 1 8 8, 6 3 8 A号明細書または欧州特許出願公開第E P 0 2 3 9 4 0 0 A号明細書を参照されたい。

【0085】

抗体は、多数の方法により修飾可能であり、用語「抗体分子」は、必要とされる特異性を有する抗体の抗原結合ドメインを有する、任意の特異的な結合メンバーまたは物質に及ぶと理解されるべきである。したがって、この用語は、天然または完全もしくは部分的に合成である、イムノグロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む、抗体断片および誘導体に及ぶ。したがって、他のポリペプチドに融合されたイムノグロブリン結合ドメインまたは等価物を含むキメラ分子が含まれる。キメラ抗体のクローニングおよび発現は、欧州特許出願公開第E P 0 1 2 0 6 9 4 A号明細書および欧州特許出願公開第E P 0 1 2 5 0 2 3 A号明細書に記載される。全抗体の断片が、抗原を結合する機能を発揮することが示された。結合断片の例は、(i) V L、V H、C LおよびC H 1ドメインから成るF a b断片；(ii) V HおよびC H 1ドメインから成るF d断片；(iii) 単一の抗体のV LおよびV Hドメインから成るF v断片、(iv) V Hドメインから成るd A b断片（Ward, E. S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)）；(v) 単離されたCDR領域；(vi) 連結された2つのF a b断片を含む二価断片である、F (a b')₂断片；(vii) 一本鎖F v分子（s c F v）、

ここで、VHドメインとVLドメインが、2つのドメインが（抗原結合部位を形成することを可能とするペプチドリンカーによって連結されている（Bird et al, Science, 242: 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85: 5879-5883, 1988）;（viii）二重特異性単鎖Fvダイマー（国際特許出願第PCT/US92/09965号）;および（ix）「二重特異性抗体」、遺伝子融合により構築された多価または多重特異性断片（PCT国際特許出願公開第WO94/13804号パンフレット; Hlliger et al, P.N.A.S. USA, 90: 6444-6448, 1993）である。Fv、scFvまたは二重特異性抗体分子は、VHおよびVLドメインを連結するジスルフィド架橋の取り込みによって安定化されうる（Reiter et al, Nature Biotech, 14: 1239-1245, 1996）。CH3ドメインとつながったscFvを含むミニボディも、作製されることができる（Hu et al, Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996）。

【0086】

アフィボディ（affibodies）も一次ターゲティング基として使用されることができる。アフィボディは、多数の標的タンパク質またはペプチドに特異的に結合することのできる小さな高親和性タンパク質である。アフィボディは、多くの点でモノクローナル抗体を模倣し、抗体模倣剤（antibody mimetics）に分類される。アフィボディの選定は限定的であってはならず、コンジュゲーションされていない抗TNF- α アフィボディなどの多くのアフィボディが本分野で知られている。抗TNF- α アフィボディは、E. コリ中で産生され、ヒトサイトカイン腫瘍壊死因子、TNF- α を標的とする。TNF- α は、多面発現性炎症性サイトカインである。サイトカインは、数種の細胞によって産生されるが、特にマクロファージによって産生される。それは、局所的な炎症性免疫反応における主要な介在物として作用し、さらなる免疫調節機能を有する。TNF- α は、サイトカインのカスケードを開始し、血管透過性を増加させ、それによってマクロファージと好中球を感染部位に動員する、急性期タンパク質である。したがって、TNF- α は、アテローム性動脈硬化症病変における炎症および炎症に関する重要な標的である。

【0087】

二官能性化合物はそれぞれ、複数の一次ターゲティング基に連結されることができ、それによって、（a）着目の標的に対する各ターゲティング基の親和性の産物として全体的な親和性が増加するときの、上記標的に対する一次ターゲティング基の親和性、および/または（b）標的に対する結合比率、すなわち、標的と一次ターゲティング基のインビボでの各遭遇の結果としての結合の可能性、を増加させる。

【0088】

B：イメージングプローブ

二官能性化合物に結合することのできるイメージングプローブは、（キレーティング基を介して結合される）放射性核種を含む。

【0089】

本発明によって使用されるイメージングプローブ（金属性放射性同位体）は、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、プレ-ターゲティングまたはプレ-アセンブルアプローチのいずれかで二官能性化合物のキレーティング部分に結合する性質を有する。これを達成するための1つの可能性は、二官能性化合物のキレーティング部分に対する固有の結合親和性を有する放射性核種を使用することである。例として、 $^{68}\text{Ga}^{3+}$ は、キレーティング部分のヒドロキシピリジノン基に結合することができ、PETイメージング技術において使用可能である。

【0090】

本発明によって使用される放射性核種プローブは、プローブが目的とする用途に応じてさまざまな異なる放射性核種を使用することができる。本発明のプローブの一部をなす放射性核種の例としては、テクネチウム、レニウム、銅、コバルト、ガリウム、イット

10

20

30

40

50

リウム、ルテチウム、インジウム、ジルコニウム、スカンジウム、すなわち、 $Tc-99m$ 、 $Ga-67$ 、 $In-111$ (SPECT)、 $Cu-64$ 、 $Cu-60$ 、 $Cu-61$ 、 $Cu-62$ 、 $Tc-94m$ 、 $Ga-68$ 、 $Co-55$ 、 $Zr-89$ 、 $Sc-44$ (PET)、 $Cu-67$ 、 $Re-186$ 、 $Re-188$ 、 $Y-90$ 、 $Lu-177$ 、 $Sc-47$ または $Bi-213$ (放射性核種治療) が挙げられる。本発明は、放射性核種を単独で、または組み合わせて使用することができる。

【0091】

放射性核種は、溶媒和物、水和物、塩または弱いキレートなどの任意の形態であってよい。放射性核種の溶媒和物、水和物および弱いキレートは、本分野で知られている。放射性核種が放射性核種組成物中で対象に投与される場合 (例えば、二官能性化合物が対象中の放射性核種を投与後にキレートする場合)、放射性核種は、医薬として許容可能な形態になければならない。例えば、放射性核種は金属イオンのクエン酸塩または酢酸塩であってよい。

10

【0092】

本発明は、例えば、マルチモーダルイメージングの実施を可能にするための、(反応性基 A を介して) 二官能性化合物に連結されるかまたは会合することのできる光学標識または常磁性標識などの二次イメージング標識の使用も含みうる。光学プローブの例として、フルオレセインなどのフルオロフォアおよびルミネッセント分子およびランタニド錯体などの錯体およびトリカルボニルレニウム - キノリネートコンジュゲートが挙げられる。光学プローブ並びに放射性核種および MR 造影剤を組み込む可能性は、モダリティーを組み合わせて診断および検出を促進する機会を提供し、例えば、PET または SPECT による全身のスキニングによって全身レベルで病気の位置が同定できる一方、同じトレーサーが手術中に可視的に検出されて、病気の組織の同定を支援しうる。同様に、PET および MR イメージングの組み合わせは、高い感度 (PET、SPECT)、シグナルの定量 (PET) および解剖学的解像度 (MR) および微小環境の測定 (MR コントラスト増強法) という利益を提供することができる。

20

【0093】

C : コンジュゲーション化学

本発明の二官能性化合物は、生体部位、ターゲティング基、標識、タンパク質またはポリペプチドを二官能性化合物に連結するため、および / または、さらなる基および特性を本発明の二官能性化合物に導入するために、さまざまな化学および技術を使用しうる。

30

【0094】

したがって、本発明においては、例えば、(タンパク質 / ペプチド配列中のシステインのチオール側鎖に結合するための) 反応性基がマレイミド基である場合、反応性基は二官能性化合物にターゲティング基を連結する手段を提供する。

【0095】

本発明の用途

本発明の二官能性化合物は、癌、循環器疾患、免疫疾患などの病気、ならびに、移植、炎症、白血球トラッキング、幹細胞トラッキング、アレルギーおよび感染などの関連する状態の分子イメージングのために使用されることができる。二官能性化合物は、癌および関節炎を治療するための放射性核種治療のためにも使用されることができる。

40

【0096】

本発明の二官能性化合物および放射性核種の適用として、放射性核種および / またはさらなる標識を使用することのできる、マルチモーダルイメージング研究などの広い範囲のイメージングおよび分光学的適用が挙げられる。本明細書に記載のとおり、二官能性化合物は、例えば、アポトーシスの検出のために二官能性化合物を使用する細胞死イメージングなどのインビボのイメージング適用のために特に有用である。これは、例えば (化学療法への反応をモニターすることなどの) 腫瘍学、(心筋梗塞後の損傷された心筋のイメージングなどの) 循環器の医薬品または (心臓同種移植片の拒絶のイメージングなどの) 移植片拒絶の分野での多くの異なる医学的または研究的適用において有用でありうる。

50

【 0 0 9 7 】

本発明は特に、放射性核種から放射されたガンマ線を検出して、サンプルまたは対象中の放射性核種の分布の三次元画像を提供するイメージング技術である、単一光子放射断層撮影法 (S P E T)、および、サンプルまたは対象中に導入されたポジトロン放射性核種によって間接的に放射されたガンマ線対を検出することによって三次元画像を提供する、ポジトロン放射断層撮影法 (P E T) などの核医学イメージング技術に関する。例として、S P E T 研究は I n - 1 1 1 を用いて、P E T 研究は G a - 6 8 を用いて実施されることができる。しかしながら、当業者は、本発明において使用可能な他の好適な S P E T および P E T 放射性核種を知っているであろう。一般に、本発明は、適切なイメージングプローブの選択により、ポジトロン放射断層撮影法 (P E T)、単一光子放射断層撮影法 (S P E T)、光画像法 (O I) および核磁気共鳴画像法 (M R I) のために、または適切な放射性核種の選択により (例えば、Y - 9 0、L u - 1 7 7)、放射性核種治療のために使用されることができる。

10

【 0 0 9 8 】

本発明の二官能性化合物は、2つの異なる技術を用いて検出可能なイメージングプローブの検出によるか、または二官能性化合物が限局されるようになる生物系中の部位において第二の標識を提供することによるか、最も好都合には、第二の標識を上記で詳細に説明した二官能性化合物と連結するかまたは会合させることによって、2つの異なる技術から情報またはイメージが引き出されるマルチモーダルイメージングの方法において使用されることができる。マルチモーダル研究は、共記録され、2つのモダリティーによる同時イメージングを必要とするか、または2つのステップにおいて行われるかも知れないが、一般的に、2つの技術を用いて得られた空間情報が比較可能であるように、同じサンプルを使用する。マルチモーダルイメージングの例としては、P E T / C T、S P E T / C T、P E T / M R および S P E T / M R が挙げられる。

20

【 実施例 】

【 0 0 9 9 】

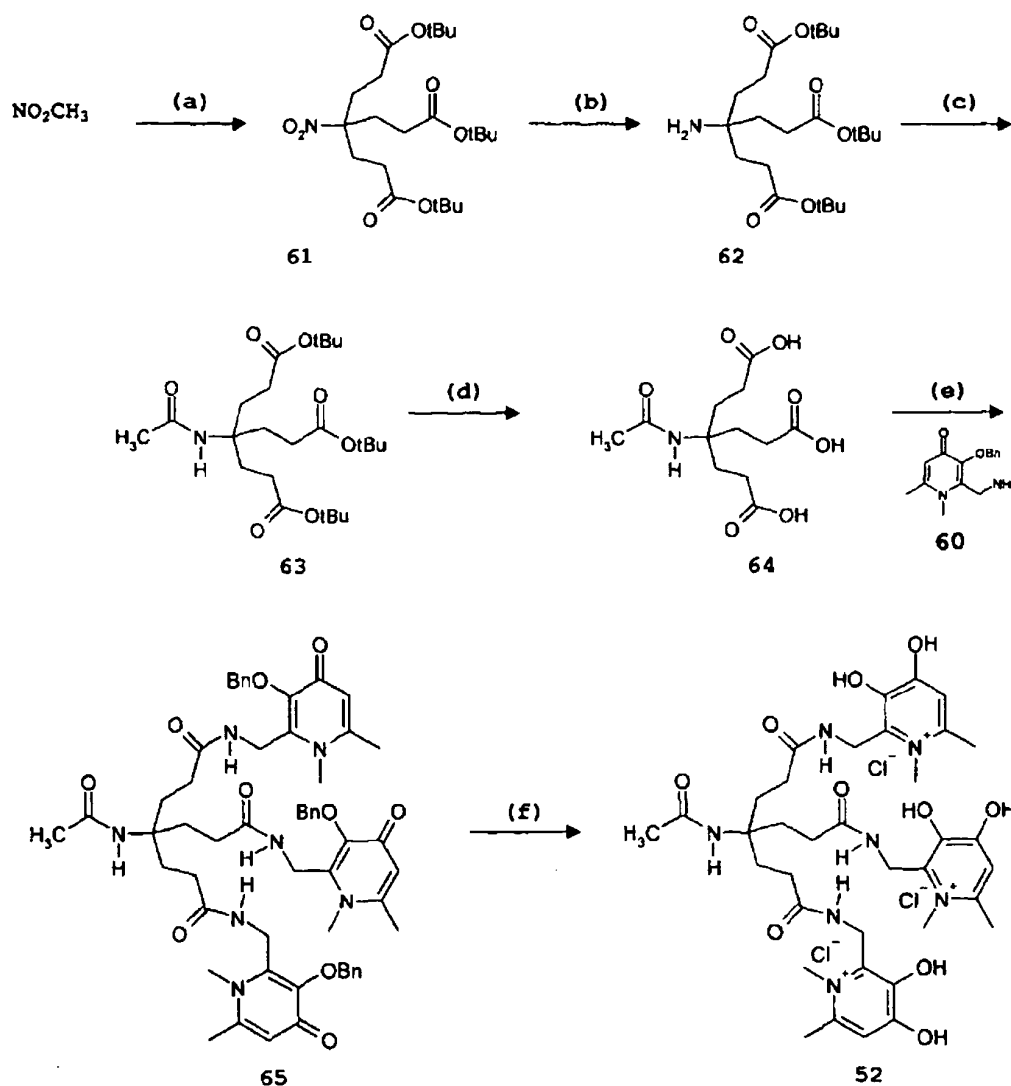
実施例 1 - キレーター C P 2 5 6 (化合物 5 2) の合成

トリステート - ブチルエステル 6 1 および 6 2 を、以下の確立された文献の方法によって合成した (G . R . Newkome , R . K . Behera , C . N . Moorefield and G . R . Baker , J Org Chem , 1991 , 56 , 7162 - 7167) 。

30

【 0 1 0 0 】

【化 1 4】



52の合成。材料および方法：(a) Triton B, アクリル酸 tert-ブチル, DME, 70°C; (b) T-1 Raney Ni, H_2 , 25°C, EtOH; (c) CH_3COCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , 0-25°C, (d) HCOOH ; (e) **60**, DCCI, HOBt , DMF 25°C; (f) Pd/C , H_2 , HCl , CH_3OH , 25°C.

【0101】

ベンジルトリメチルアンモニウムハイドロオキシドの存在下でのニトロメタンとアクリル酸 tert-ブチルの反応により、ニトロトライポッド (nitro tripod) **61** を生成し、57%の収率でエタノールから再結晶化した。次いで、**61** のニトロ基をアミンに還元して、ニッケル/アルミニウム合金から特別に調製した T-1 ラネーニッケル触媒による水素化によって **62** を形成した。塩化アセチルによる **62** のアセチル化およびカラムクロマトグラフィーによる精製により、72%の収率で **63** が得られた。次いで、tert-ブチル基をギ酸により除去して、生成物である化合物 **64** を、エタノール/石油精から93%の収率で再結晶化した。

【0102】

52 を生成するための、三脚型骨格への二配座部分 (bidentate moieties) のコンジュゲーションおよびその後の脱保護を、上に模式的に示す。DMF 中の DCCI および HOBt によるカップリング反応において、1当量の三酸 **64** を 3.6 当

10

20

30

40

50

量の二配座化合物 (b i d e n t a t e c o m p o u n d) 60 と反応させた。溶媒の除去後、保護された六配座リガンド65をカラムクロマトグラフィーによって50%の収率で精製した。メタノールの酸性溶液 (H C l) 中での接触水素化 (P d / C) によってベンジル保護基を除去した。触媒の除去後、52のトリスHCl塩をメタノール/ジエチルエーテルから沈殿させ、真空下で乾燥すると、白色固体として、0.4g (74%) の52が得られた。

【0103】

実験の詳細

すべての化学物質を、Sigma AldrichおよびAcros Organicsから購入し、それらは試薬グレード以上だった。溶媒は、Fisher Scientific、Sigma AldrichおよびVWRから購入した。NMR溶媒はGOS Scientificから購入し、NMR管はWilmaadが製造した。TLCプレート (アルミニウムで裏打ちしたシリカゲル60 U V ₂₅₄) およびカラムクロマトグラフィーのためのシリカゲルは、Merckから購入した。

【0104】

真空ポンプ (BOC - Edwards) につないだ真空オープン (Gallenkamp、250 以下とみなされる) 中でサンプルを乾燥させた。40psiで自動攪拌しながらParr水素化装置 (室温) においてサンプルを水素化した。KBrディスクを用いてPerkin Elmer Spectrum one FTIRにおいて赤外スペクトルを取得した。使用したソフトウェアは、「Spectrum」と呼ばれた。

【0105】

400MHzのUltra-shield magnet (Bruker) において、XWin - NMRソフトウェアを用いて¹H - NMRスペクトルを取得した。MestReNovaソフトウェアバージョン5.3 (Mestrelab Research) によりスペクトルを分析した。質量分析サンプルをEPSRC Mass Spectrometry Centre, Swanseaまたはthe Mass Spectrometry facility, King's College, Londonに提出した。EPSRCにおけるサンプルは、Waters ZQ4000四極子質量分析計 (ESI)、Finnigan MAT 95 XP高分解能ダブルフォーカシング質量分析計 (EI、CI) またはMicromass Quattro II四極子質量分析計 (EI) で処理した。King's Collegeにおけるサンプルは、ThermoFisher LCQ DECA XPイオントラップ質量分析計で処理した。

【0106】

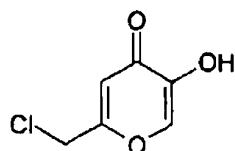
Molecular Weight Calculatorバージョン6.46を用いて同位体分布を計算した。得られたグラフデータを抽出し、Microsoft Excel 2003で処理した。

【0107】

2 - クロロメチル - 5 - ヒドロキシピラン - 4 (1 H) - オン (クロロコウジ酸) (54)

【0108】

【化15】



【0109】

50gのコウジ酸 (350ミリモル、1当量) を220mlの塩化チオニルに攪拌しな

10

20

30

40

50

から添加した。反応容器を氷で冷却し、明るい黄色の懸濁液が形成されるまで、混合物を 1 時間撹拌した。混合物を真空濾過して、石油精で洗浄後、粗製の白色固体が得られた。この固体を温水から再結晶化すると、40 g のオフホワイト結晶が 71 % の収率で得られた。

【0110】

【数1】

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) σ 9.2 (s, 1H 3-OH) 8.1 (s, 1H 2-H) 6.5 (s, 1H 5-H) 4.6 (s, 2H 6-CH₂-Cl)

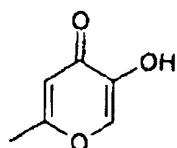
10

【0111】

2-メチル-5-ヒドロキシピラン-4(1H)-オン(アロマルトール(Alloimaltol))

【0112】

【化16】



20

【0113】

20 g のクロロコウジ酸(54)(125 ミリモル、1 当量)を、100 ml の蒸留水に添加し、50 で撹拌した。亜鉛末(17 g)をゆっくりと溶液に加え、温度を 70 に上昇させた。混合物を撹拌しながら、40 ml の濃 HCl をゆっくりと 90 分間にわたって滴下して加えた。この時間の間にクロロコウジ酸が溶解した。70 ~ 80 でさらに 3 時間撹拌後、濃い茶色となった溶液を保温濾過して任意の固体を除去した。冷却後、1 回あたり 70 ml の CH₂Cl₂ で生成物を 5 回抽出した。溶液を脱水し(Na₂SO₄)、溶媒を真空中で除去した。粗製固体を温イソプロパノールから再結晶化すると、8.63 g のベージュ色の結晶が 55 % の収率で得られた。

30

【0114】

【数2】

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) σ 9.0 (s, 1H 2-H) 8.0 (s, 1H 3-OH) 6.2 (s, 1H 5-H) 2.2 (s, 3H 6-CH₃)

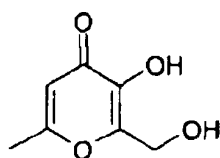
40

【0115】

2-ヒドロキシメチル-3-ヒドロキシ-6-メチル-ピラン-4(1H)-オン(56)

【0116】

【化 17】



【0117】

10

3 gのアロマルトール(55)(23.8ミリモル、1当量)を、25 mlの蒸留水中1.05 gのNaOHの攪拌した溶液に添加した。2.2 mlの37%ホルムアルデヒド溶液を10分間にわたって、滴下して加えた。溶液を、室温でさらに18時間攪拌した。濃HClでpHを1に調整し、ここで白色沈殿が形成した。沈殿を完了させるために、溶液を4で24時間冷却した。固体を濾過し、冷ジエチルエーテルで洗浄し、真空中で乾燥させると、2.92 gの白色固体が78%の収率で得られた。

【0118】

【数3】

20

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) σ 8.8 (s, 1H 3-OH) 6.2 (s, 1H 5-H) 4.3 (s, 2H 2-CH₂-OH) 2.2 (s, 3H 6-CH₃)

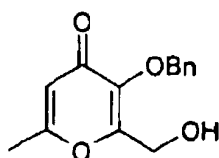
【0119】

2-ヒドロキシメチル-3-ベンジルオキシ-6-メチル-ピラン-4(1H)-オン(57)

【0120】

【化18】

30



【0121】

60 mlのCH₃OHに10 gの56(64ミリモル、1当量)を添加し、溶液を還流温度まで加熱した。6 mlのH₂O中、2.82 gのNaOH(70ミリモル、1.1当量)をゆっくりと還流中の溶液に添加した。12.05 gの臭化ベンジル(70ミリモル、1.1当量)を還流中の溶液に対してゆっくりと30分間にわたって滴下して加えた。溶液をさらに16時間還流した。真空中で溶媒を除去し、残渣を180 mlのCH₂Cl₂に溶解した。不溶性のNaBrを濾過して除去した。1回あたり100 mlの5% NaOH水溶液で有機層を2回洗浄し、その後、1回あたり100 mlの水で2回洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、そして蒸発させると、透明な黄色の油が残った。該油をCH₂Cl₂および石油精から再結晶化させると、9.8 gの白色固体が62%の収率で得られた。

40

【0122】

【数4】

 m/z 247 (M+H)⁺ [ES⁺]

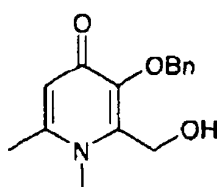
¹H NMR (CDCl₃) σ 7.25 (m, 5H 3-O-CH₂-Bnz) 6.1 (s, 1H 5-H) 5.1 (s, 2H 3-O-CH₂-Bnz) 4.2 (m, 2H 2-CH₂-OH) 2.15 (s, 3H 6-CH₃)

【0123】

1, 6 - ジメチル - 2 - ヒドロキシメチル - 3 - ベンジルオキシピリジン - 4 (1H) - オン (58) 10

【0124】

【化19】



20

【0125】

4.92 g の 57 (20 ミリモル、1 当量) を、60 ml の CH₂Cl₂ に攪拌しながら添加した。3.4 g の 3, 4 - ジヒドロ - 2 - H - ピラン (42.5 ミリモル、2.2 当量) を添加し、続いて、触媒として 60 mg の p - トルエンスルホン酸を添加した。3 時間攪拌後、混合物を分液漏斗に加え、40 ml の Na₂CO₃ (5%) で 2 回、続いて、40 ml の蒸留水で 2 回洗浄した。有機層を脱水し (Na₂SO₄)、蒸発させると、黄色の油が得られ、これを 20 ml の EtOH に再溶解した。200 ml の NH₂CH₃ (40%、水溶液) を添加し、混合物を 70 °C で 18 時間攪拌した。真空中で溶媒を除去し、得られた油を 40 ml の EtOH に再溶解した。2 ml の濃 HCl (37%) を添加し、溶液を 4 時間還流した。真空中で溶媒を除去し、100 ml の蒸留水を残渣に添加した。50 ml のジエチルエーテルで 2 回溶液を洗浄した。次いで、10 N の NaOH 水溶液で水性相の pH を 9 に調整した。溶液を分液漏斗に加え、100 ml の CH₂Cl₂ で 4 回抽出した。有機層を無水 Na₂SO₄ で脱水し、溶媒を除去すると粗製の茶色固体が得られ、これを、CH₃OH およびジエチルエーテルから再結晶化すると、2.8 g の白色結晶が 54% の収率で得られた。

30

【0126】

【数5】

 m/z 260 (M+H)⁺ [ES⁺]

¹H NMR (DMSO) σ 7.3-7.5 (m, 5H 3-O-CH₂-Bnz) 6.15 (s, 1H 5-H) 5.4 (m, 1H 2-CH₂-OH) 5.0 (s, 2H 3-O-CH₂-Bnz) 4.5 (m, 2H 2-CH₂-OH) 3.58 (s, 3H 6-CH₃) 2.28 (s, 3H 1-N-CH₃)

40

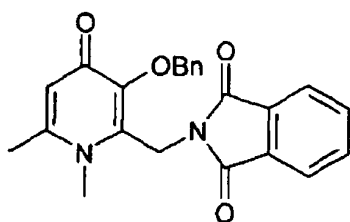
【0127】

1, 6 - ジメチル - 2 - フタルイミドメチル - 3 - ベンジルオキシピリジン - 4 (1H) - オン (59)

【0128】

50

【化 20】



10

【0129】

8.6 g のトリフェニルホスフィン (32 ミリモル、1.2 当量) および 4.8 g のフタルイミド (32 ミリモル、1.2 当量) を、0 の 150 ml の THF 中、58 (7 g、27 ミリモル、1 当量) の撹拌した懸濁液に添加した。6.47 g のジイソプロピルアゾカルボキシレート [DIAD] (32 ミリモル、1.2 当量) を、30 分間にわたって滴下して加えた。溶液を放置して室温まで温め、さらに 17 時間撹拌し、その後、該溶液を濾過した。固体を冷 THF で洗浄すると、9.92 g の白色無定形固体が 95 % の収率で得られた。

【0130】

【数 6】

20

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) σ 7.65 (m, 4H 2- CH_2 -フタルイミド) 7.15 (m, 5H 3-O- CH_2 -Bnz) 6.25 (s, 1H 5-H) 5.35 (s, 2H 3-O- CH_2 -Bnz) 4.75 (s, 2H 2- CH_2 -フタルイミド) 3.5 (s, 3H 1-N- CH_3) 2.1 (s, 3H 6- CH_3)

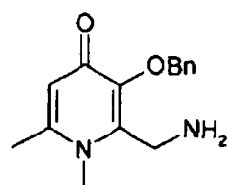
【0131】

1,6-ジメチル-2-アミノメチル-3-ベンジルオキシピリジン-4(1H)-オン (60)

30

【0132】

【化 21】



40

【0133】

10 g の 59 (26 ミリモル、1 当量) を 100 ml の EtOH に溶解した。17 ml の N_2H_4 (5.5 % 水溶液) を添加し、溶液を 3 時間還流した。59 は、還流が始まるまで完全には溶解しなかった。溶液を放置して冷却すると、その時点で凝固した。水を添加し、濃 HCl で pH を 1 に調整した。4 で一夜冷却後、溶液を濾過した。10 N の NaOH で濾液の pH を 14 に調整し、100 ml の CH_2Cl_2 で 5 回抽出した。抽出液を併合し、 Na_2SO_4 で脱水した。真空中で溶媒を除去すると、6.2 g の白色固体が 92 % の収率で得られた。

【0134】

【数 7】

 m/z 259 (M+H)⁺ [ES⁺]

¹H NMR (CDCl₃) σ 7.25 (m, 5H 3-O-CH₂-Bnz) 6.35 (s, 1H 5-H) 5.25 (s, 2H 3-O-CH₂-Bnz) 3.7 (s, 2H 2-CH₂-NH₂) 3.6 (s, 3H 1-N-CH₃) 2.3 (s, 3H 6-CH₃)

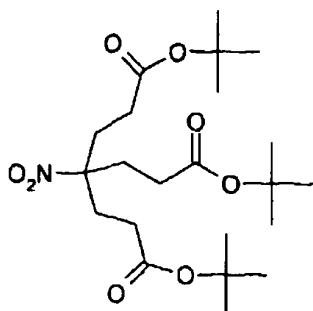
【0135】

10

ジ - tert - ブチル 4 - ニトロ - 4 - [2 - (tert - ブトキシカルボニル) エチル] - ヘプタンジオエート (61)

【0136】

【化 22】



20

【0137】

1.53 g のニトロメタン (25 ミリモル、1 当量) を、10 ml の 1, 2 - ジメトキシエタン (DME) に添加した。0.25 ml のベンジルトリメチルアンモニウムハイドロオキサイド (Triton B) を添加し、溶液を 70 に加熱した。9.93 g のアクリル酸 tert - ブチル (77.5 ミリモル、3.1 当量) を 1 回あたり 1 ml ずつ、別に 1 回あたり 0.25 ml で 2 回の Triton B とともに添加して、温度を 70 ~ 80 に維持した。試薬の添加を完了後、溶液を 70 でさらに 1 時間加熱した。真空中で溶媒を除去し、残渣を 60 ml の CHCl₃ に再溶解し、分液漏斗に入れた。20 ml の HCl (10 % 水溶液)、続いて 20 ml の濃 NaCl 溶液で 3 回、有機層を洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で脱水し、濾過し、真空中で溶媒を除去した。粗生成物を温 EtOH から再結晶化し、濾過し、氷冷の EtOH で洗浄すると、6.4 g の白色結晶が 57 % の収率で得られた。

30

【0138】

【数 8】

40

 m/z 463 (M+NH₄)⁺ [CI]

¹H NMR (CDCl₃) σ 2.2 (s, 12H [CH₂-CH₂-COO-tbu]₃) 1.45 (s, 27H [CH₂-CH₂-COO-tbu]₃)

IR (KBr) 2975s (CH₂), 1723s (C=O), 1536s (NO₂) cm⁻¹

【0139】

T - 1 ラネーニッケル触媒

50

1 L の 3 つ首丸底フラスコに、600 ml の 10% NaOH 溶液、続いて、40 g のニッケル - アルミニウム合金を加えた。溶液を磁性スターラーで攪拌し、90 ~ 95 の温度で加熱した。40 分間の加熱後、ニッケルが磁性スターラーに付着し始め、攪拌プロセスを妨げた。ここで攪拌をガラス棒により手で継続した。1 時間後、加熱を中止し、放置してニッケルを沈殿させた。ニッケル触媒が沈殿し、溶液が冷却したら、上清をデカントして廃棄した。200 ml の蒸留水で 3 回、50 ml のエタノールで 5 回、触媒を洗浄した。洗浄ステップの間、確実に触媒が液体で覆われて空気に露出しないように注意した。その後、4 の冷蔵庫中、50 ml のエタノールのもとで触媒を貯蔵した。

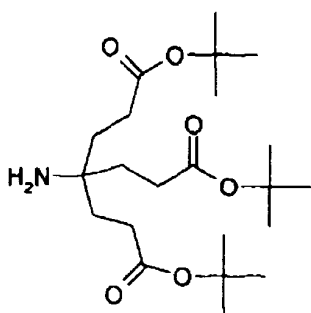
【0140】

ジ - tert - ブチル 4 - アミノ - 4 - [2 - (tert - ブトキシカルボニル) エチル] - ヘプタンジオエート (62)

10

【0141】

【化23】



20

【0142】

100 ml の EtOH に 5 g の 61 (11.24 ミリモル、1 当量) を溶解した。4 g の T - 1 ラネーニッケル触媒を添加した。40 psi (室温) で 7 日間、溶液を水素化した。この期間中、H₂ 圧を 40 psi に維持し、圧力がさらに減少しなくなったら反応を停止した。最初、61 は完全には溶解しなかったが、水素化の間に完全に溶解した。セライトを通して溶液を濾過し、真空中で溶媒を除去すると、定量的収率で 4.5 g の油が得られ、これは数日そのまま置くと凝固した。

30

【0143】

【数9】

m/z 416 (M+H)⁺ [ES⁺]

¹H NMR (CDCl₃) σ 2.2 (m, 6H [CH₂-CH₂-COO-*t*bu]₃) 1.6 (m, 6H [CH₂-CH₂-COO-*t*bu]₃) 1.45 (s, 27H [CH₂-CH₂-COO-*t*bu]₃)

IR (KBr) 3376s (NH₂) 2978s (CH₂), 1730s (C=O) cm⁻¹

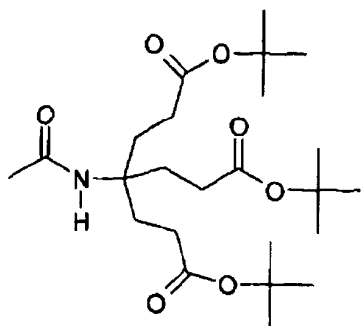
40

【0144】

4 - アセチルアミノ - 4 - (2 - tert - ブトキシカルボニル - エチル) - ヘプタンジオイックアシッド ジ - tert - ブチルエステル (63)

【0145】

【化 2 4】



10

【 0 1 4 6】

5 ml の CH_2Cl_2 に、1 g のトリエステル 6 2 (2.4 ミリモル、1 当量) および 0.3 g のトリエチルアミン (2.9 ミリモル、1.2 当量) を添加した。氷浴で溶液を 0℃ まで冷却し、0.23 g の塩化アセチル (2.9 ミリモル、1.2 当量) を滴下して加えた。溶液をさらに 4 時間攪拌し、放置して室温までゆっくりと温めた。溶液を分液漏斗に注ぎ、15 ml の HCl (5% 水溶液) で 2 回、15 ml の濃 NaCl で 1 回、洗浄した。 Na_2SO_4 で溶液を脱水し、真空中で溶媒を除去した。最小量の EtOAc に残渣を溶解し、シリカカラムに負荷し、ここで、 EtOAc およびヘキサン (1:1) によるカラムクロマトグラフィーで精製して、0.79 g の白色固体が 72% の収率で得られた。

20

【 0 1 4 7】

【数 1 0】

m/z 458 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 475 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺ [ES^+]

¹H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) σ 7.2 (s, 1H [CONH]) 2.0 (m, 6H [$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-tbu}$]) 1.8 (s, 3H [$\text{CH}_3\text{-CO}$]) 1.7 (m, 6H [$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-tbu}$]) 1.35 (s, 27H [$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-tbu}$])

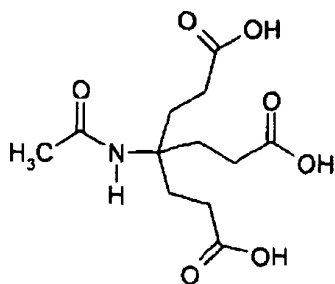
30

【 0 1 4 8】

4 - アセチルアミノ - 4 - (2 - カルボキシ - エチル) - ヘプタンジオイックアシッド (64)

【 0 1 4 9】

【化 2 5】



40

【 0 1 5 0】

50

1.5 g のトリエステル 63 (3.28 ミリモル) を 20 ml のギ酸 (96%) に添加し、4 時間撹拌した。この後、1 回あたり 20 ml のトルエンによる 5 回の共沸蒸留によってギ酸を除去した。EtOH および石油精から粗残渣を再結晶化すると、0.9 g のオフホワイトの結晶が 93% の収率で得られた。

【0151】

【数11】

m/z 290 (M+H)⁺ [ES⁺]

¹H NMR (DMSO-d₆) σ 12 (s, 3H [CH₂-COOH]) 7.2 (s, 1H [N-H]) 2.1 (m, 6H [CH₂-CH₂-COOH]₃) 1.8 (m, 6H [CH₂-CH₂-COO-tbu]₃) 1.7 (s, 3H [CH₃-CO])

10

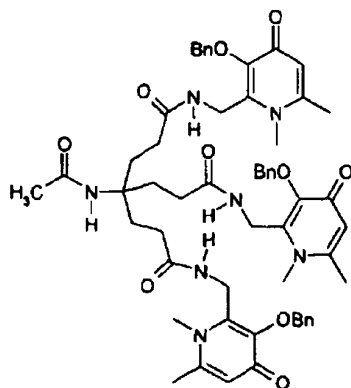
【0152】

4 - アセチルアミノ - 4 - { 2 - [(3 - ベンジルオキシ - 1 , 6 - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロ - ピリジン - 2 - イルメチル) - カルバモイル] - エチル } - ヘプタンジオイックアシッドビス - [(3 - ベンジルオキシ - 1 , 6 - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロ - ピリジン - 2 - イルメチル) - アミド] (65)

【0153】

【化26】

20



30

【0154】

100 ml の丸底フラスコ中の 10 ml の無水 DMF に、0.4 g の 64 (1.38 ミリモル、1 当量)、1.29 g の 60 (4.98 ミリモル、3.6 当量)、0.67 g の HOBt (4.98 ミリモル、3.6 当量) および 1.03 g の DCC (4.98 ミリモル、3.6 当量) を添加した。N₂ 雰囲気下、室温で 48 時間、混合物を撹拌した。溶液を濾過して、沈殿した DCU を除去した。真空中で DMF を除去した。残渣をメタノールに溶解し、4 : 1 の CHCl₃ / CH₃OH の移動相を用いるカラムクロマトグラフィー (シリカゲル) によって精製した。分画を併合し、脱水し (Na₂SO₄)、真空中で溶媒を除去すると、0.7 g の白色固体が 50% の収率で得られた。

40

【0155】

【数 1 2】

m/z 1010 (M+H)⁺ 1032 (M+Na)⁺ [ES⁺]

¹H NMR (DMSO-d₆) σ 8 (t, 3H [CONH]) 7.3 (m, 15H [CH₂-Bnz]) 7.15

(s, 1H [CONH]) 6.2 (s, 3H [5-H ピリジノン]) 5.05 (s, 6H [CH₂-Bnz])

4.3 (d, 6H [CONH-CH₂-ピリジノン]) 3.35 (s, 9H [6-CH₃ ピリジノン])

2.2 (s, 9H [N-CH₃ ピリジノン]) 2.0 (m, 6H [CH₂-CH₂-CONH-

ピリジノン]) 1.75 (m, 6H [CH₂-CH₂-CONH-ピリジノン]) 1.7 (s, 3H

[CH₃-CONH-トリポッド])

10

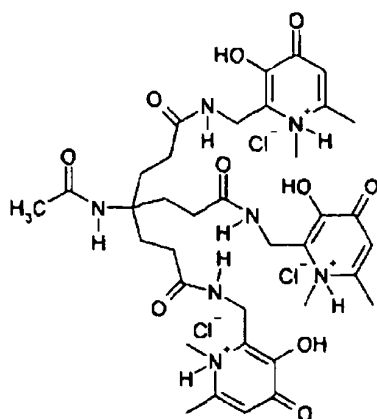
【0 1 5 6】

4 - アセチルアミノ - 4 - { 2 - [(3 - ヒドロキシ - 1 , 6 - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロ - ピリジン - 2 - イルメチル) - カルバモイル] - エチル } - ヘプタンジオイックアシッドビス - [(3 - ヒドロキシ - 1 , 6 - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロ - ピリジン - 2 - イルメチル) - アミド] トリス塩酸塩 (5 2) (C P 2 5 6)

【0 1 5 7】

【化 2 7】

20



30

【0 1 5 8】

0.64 g の 65 (0.63 ミリモル、1 当量) を、肉厚の水素化用フラスコ中の 40 ml の CH₃OH に溶解した。2.3 ml の HCl (CH₃OH 中、1.25 M) を溶液に添加した。0.2 g の Pd/C 触媒を添加し、溶液を 18 時間水素化した (室温、40 psi)。注意してフラスコを取り除き、溶液を濾過して Pd/C を除去した。真空中で溶媒を除去した。残渣を最小量のメタノールに再溶解した。生成物 (52) をジエチルエーテルで沈殿させた。沈殿が沈んだら、上清を取り除き、冷ジエチルエーテルで沈殿を洗浄した。このプロセスを 3 回繰り返し、真空中で溶媒を除去すると、52 のトリス塩酸塩が 0.4 g、白色固体として 74 % の収率で得られた。

40

【0 1 5 9】

【数 1 3】

 m/z 740.4 (M+H)⁺ 370.7 (M+2H)²⁺

¹H NMR (DMSO-d₆) σ 8.8 (t, 3H [CONH]) 7.25 (s, 1H [CONH]) 7.1 (s, 3H [5-H ピリジノン]) 4.5 (d, 6H [CONH-CH₂-ピリジノン]) 3.8 (s, 9H [6-CH₃ ピリジノン]) 2.55 (s, 9H [N-CH₃ ピリジノン]) 2.1 (m, 6H [CH₂-CH₂-CONH-ピリジノン]) 1.8 (m, 6H [CH₂-CH₂-CONH-ピリジノン]) 1.7 (s, 3H [CH₃-CONH- トライポッド])

10

【0 1 6 0】

実施例 2 - C P 2 5 6 のガリウムおよび鉄錯体の特徴づけならびに G a - 6 7 標識手順

G a - C P 2 5 6 および F e - C P 2 5 6 錯体の形成は、表 1 および表 2 に示す質量分析データから明らかである。各錯体のプロトン化形態を検出し、マスマスペクトルからの同位体分布は表 1 に記録した計算値に一致する。G a - C P 2 5 6 錯体は、ガリウムが原子量 69 および 71 の安定な同位体を有するため、(M + H)⁺に関して、 m/z 806 および m/z 808 において 2 つの分子種を有する。1 : 1 以外の G a : リガンド比を有する G a - C P 2 5 6 の証拠はなかった。

【0 1 6 1】

20

F e - C P 2 5 6 錯体についての質量分析データは、予測した同位体分布に一致した。

【0 1 6 2】

【表 1】

分子式およびモノアイソトピック質量

CP256:	C ₃₆ H ₄₉ N ₇ O ₁₀	(M = 739.3541)
Ga-CP256:	C ₃₆ H ₄₆ N ₇ O ₁₀ Ga	(M = 805.2562)
Fe-CP256:	C ₃₆ H ₄₆ N ₇ O ₁₀ [⁵⁶ Fe]	(M = 792.2656)

30

【0 1 6 3】

【表 2】

サンプル	LC 保持時間(分)	種	m/z (計算値)	m/z (実測値)
CP256	5.1	$(M + H)^+$	740.3614	740.3631
		$(M + 2H)^{2+}$	370.6843	370.6865
Ga-CP256	5.3	$(M + H)^+$	806.2635	806.2636
		$(M + Na)^+$	828.2454	828.2448
		$(M + 2H)^{2+}$	403.6354	403.6367
		$(M + H + Na)^{2+}$	414.6263	414.6266
		$(M + 2Na)^{2+}$	425.6173	425.6180
Fe-CP256	5.4	$(M + H)^+$	793.2728	793.2733
		$(M + Na)^+$	815.2548	815.2545
		$(M + 2H)^{2+}$	397.1401	397.1401
		$(M + H + Na)^{2+}$	408.1310	408.1316
		$(M + 2Na)^{2+}$	419.1220	419.1230

表 1. LC-MS の結果の概要

【 0 1 6 4 】

Ga - 67 による CP 2 5 6 の放射性標識により、その H P L C が「非放射性」Ga - CP 2 5 6 錯体のものと同一の溶出時間を有する単一の放射能ピークを示す生成物が得られた。

【 0 1 6 5 】

【表 3】

(C ₃₆ H ₄₆ N ₇ O ₁₀ Ga+H) ⁺ に関する同位体分布	
m/z : 計算値 / (実測値)	%相対存在度 : 計算値 / (実測値)
806.2635 / (806.2635)	100.00 / (100.00)
807.2635 / (807.2655)	42.59 / (41.73)
808.2635 / (808.2634)	77.28 / (76.99)
809.2635 / (809.2653)	30.34 / (29.20)
810.2635 / (810.2670)	7.56 / (7.36)
(C ₃₆ H ₄₆ N ₇ O ₁₀ Fe+H) ⁺ に関する同位体分布	
m/z : 計算値 / (実測値)	%相対存在度 : 計算値 / (実測値)
791.2775 / (791.2779)	6.33 / (5.47)
792.2775 / (792.2768)	2.69 / (2.92)
793.2775 / (793.2741)	100.00 / (100.00)
794.2775 / (794.2765)	44.72 / (42.20)
795.2775 / (795.2782)	12.14 / (10.88)
(C ₃₆ H ₄₆ N ₇ O ₁₀ +2H) ²⁺ に関する同位体分布	
m/z : 計算値 / (実測値)	%相対存在度 : 計算値 / (実測値)
370.6843 / (370.6858)	100.00 / (100.00)
371.1843 / (371.1869)	42.64 / (51.38)
371.6843 / (371.6887)	10.93 / (14.26)

10

20

表 2. Ga-CP256およびFe-CP256およびCP256リガンドの計算および実験により得られた同位体分布

【0166】

実験の詳細

30

錯体の調製

Ga-CP-256

1 mgのCP256を1 mlのメタノールに溶解して、(RMMが848のCP256のトリスHCl付加物に基づき) 1.18 mMのリガンド濃度とした。この溶液を0.3 mgの無水Ga(NO₃)₃ (RMM 255) に添加して、1.18 mMの濃度における1:1の金属対リガンドの化学量論比が得られた。

【0167】

Fe-CP256

Fe(NO₃)₃・9H₂O (RMM = 386) を金属源とするが、Ga³⁺錯体と類似する手順でFe³⁺錯体を作製した。

40

【0168】

サンプルの分析

サンプルをLC-MSにより分析した。HPLCシステムは、脱ガス装置、クオアターナリー・ポンプ(ternary pump)、紫外・可視光可変波長検出器およびオートサンプラーを備えた、Agilent 1200システムであった。質量分析計は、Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MSであった。Agilent Masshunterワークステーション収集ソフトウェアを用いてサンプルを取得し、Agilent Masshunter Qualitative分析ソフトウェアを用いてデータを分析した。使用したHPLCカラムは、Agilent Zorbax SB C18カートリッジカラム(2.1 mm×30 mm、3.

50

5 μm)であった。溶出液の流速は、0.5 ml / 分であり、移動相は、質量分析グレードの試薬を用いるグラジエント：A = H_2O + 0.1 %ギ酸 (Fluka、34673) および B = メタノール + 0.1 %ギ酸 (Fluka、34671) であった。グラジエントを表3に示す。スペクトルは、ヘキサキス(1H, 1H, 3H-テトラフルオロプロポキシ)ホスファジン ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}_3\text{F}_{24}$ 、 $m/z = 922.0098 (M+H)^+$) によるリファレンスマス補正 (reference mass correction) を用いるポジティブモードのエレクトロスプレーイオン化を用いて取得した。

【0169】

【表4】

10

時間 (分)	A (%)	B (%)
0	95	5
1	95	5
10	5	95
20	5	95
23	95	5
30	95	5

表3. CP256ならびに Fe^{3+} および Ga^{3+} 錯体のLC-MS分析のためのグラジエント

20

【0170】

放射性標識サンプルのHPLC

HPLC分析

直列につながれたFC3600検出器と 検出器プローブによりHPLC分析を実施した。HPLCシステムは、四重ポンプ (quadruple pump)、脱ガス装置、UV検出器および手動のシリンジインジェクターを備えたAgilent 1200シリーズであった。すべての分析に使用したHPLCカラムは、ガードカラムを備えたAgilent Eclipse XDB-C18 (5 μm 、4.6 mm \times 150 mm) であつた。ラジオTLCおよびラジオHPLCに使用した分析ソフトウェアは、Laura (Lablogic) であつた。すべての一般的試薬および消耗品は、Sigma-AldrichまたはFisher Scientificから購入した。注入のための ^{67}Ga -クエン酸塩溶液は、Mallinkrodt Medicalから入手し、74 MBq / ml (参照日において；6.5 mMのクエン酸ナトリウム、135 mMのNaCl、0.9 %のベンジルアルコールを含む) であつた。

30

【0171】

HPLC分析のための放射性標識手順

CP256の1 mg / ml原液を、1 mlのプラスチック製の微量遠心管中のPBSバッファー中で調製した。放射性標識化溶液は、10 μl のアリコートの原液をプラスチック製の微量遠心管中の90 μl の標識化バッファーに添加して、100 μl 中、0.1 mg / ml総リガンド濃度とした。10 μl の ^{67}Ga -クエン酸塩を添加することによって、この溶液を放射性標識した。放射性標識条件を表4に示す。

40

【0172】

【表 5】

リガンド	標識化バッファー	標識温度	標識時間	リガンド濃度 (M)	pH測定値
CP256	PBS	25℃	1分	1.18×10^{-4}	6.6

表 4. ^{67}Ga によるCP256の放射性標識条件

【0173】

HPLC 移動相

0分における10% Bから15分における90% Bまでの直線勾配 (A = H_2O 中、0.1% TFA、B = メタノール中、0.1% TFA)。流速は、1 ml / 分であった。

【0174】

HPLC サンプルの注入

20 μl のサンプルを、25 μl のHPLC シリンジを用いて手動でHPLC に注入した。

【0175】

実施例 3 - Ga - 67 データによる CP 256 標識効率

薄層クロマトグラフィー (TLC) により測定した、表 5 中の放射性標識結果は、CP 256 は、DOTA がより高温で標識されたよりも低濃度の ^{67}Ga で、室温で放射性標識し、100% の放射性標識化は10 μM という低濃度においてであるが、DOTA についての放射性標識収率は10 μM でわずか35%であった。これらの結果を、図 1 にグラフで示す。

【0176】

【表 6】

リガンド濃度	放射性トレーサー標識収率	
	CP256	DOTA
1mM	100	100
100 μM	100	100
10 μM	100	35
1 μM	84	0
100nM	0	0
10nM	0	0

表 5. ^{67}Ga —CP256および ^{67}Ga —DOTAの放射性標識収率。
TLC分析から計算した。

【0177】

実験の詳細

すべての一般的な試薬および消耗品は、Sigma - AldrichまたはFisher Scientificから購入した。専門的な化学物質および消耗品は、以下のとりに購入した：pH 4.6 の酢酸塩バッファー溶液 (Sigma Aldrich 31048-1L)；注入用の ^{67}Ga - クエン酸塩溶液 (Mallinkrodt Medical) 74 MBq / ml (参照日において；6.5 mMのクエン酸ナトリウム、135 mMのNaCl、0.9%のベンジルアルコールを含む)；ガラスTLCプレート (シリカゲル 60、F₂₅₄、250 mm x 750 mm) (Merck)；ITLC - SGストリップ (Pall Sciences)。

【 0 1 7 8 】

T L C プレートのスポッティングと実施手順

シリカ T L C プレートおよび I T L C - S G ストリップに、 $1\mu\text{l}$ の放射性標識錯体を、 5mm のところに鉛筆でマークした起点にスポットした。シリカゲル T L C プレート上ではスポットを乾燥させたが、I T L C - S G ストリップでは乾燥させなかった。深さ 3mm の移動相を満たした展開槽 (100ml の広口サンプル瓶) 中にプレートを置いた。固定相および移動相を表 8 に列挙する。溶媒の先端が 65mm の距離に到達するまで、T L C プレートを展開した。プレートを、展開槽から取り外し、 80°C に設定したオーブン中で乾燥させた。放射性化学物質の収率を、Laura ソフトウェアまたはインスタントイメージャーソフトウェアのいずれかを用いて決定した。

10

【 0 1 7 9 】

T L C および I T L C 分析を、F C 3 6 0 0 検出器および 検出器プローブを備えた M i n i - s c a n T L C スキャナーにおいて実施した。使用した分析用ソフトウェアは、Laura (L a b l o g i c) であった。U l t r o t e r m ソフトウェアを使用して、1 2 8 2 C o m p u g a m m a G a m m a C o u n t e r (L K B W a l l a c) において、放射性サンプルを 10 秒間 (ウインドウ 1 0 1 - 1 1 0) カウントした。サンプル中の放射能の測定のために使用したキュリーメータは、C R C - 2 5 R (C a p i n t e c) であった。I m a g e r バージョン 2 . 0 5 ソフトウェアを備えた P a c k a r d I n s t a n t I m a g e r においてエレクトロニック・オートラジオグラフィを実施した。ガス混合物は、1 % イソブタン、2 . 5 % 二酸化炭素および 9 6 . 5 %

20

【 0 1 8 0 】

T L C 分析による放射性化学物質収率の決定のための放射性標識手順

各リガンドの 1.25mM 原液を、表 6 に列挙した適切な標識化バッファー中で調製した。放射性標識化バッファーの連続添加によって原液を 10 倍に希釈して、 $125\mu\text{M}$ 、 $12.5\mu\text{M}$ 、 $1.25\mu\text{M}$ 、 125nM および 12.5nM のリガンド濃度を有する追加の溶液を作製した。 $80\mu\text{l}$ の各溶液をプラスチック製の微量遠心管に添加し、 $20\mu\text{l}$ の ^{67}Ga - クエン酸塩 (1.5MBq) で放射性標識して、最終リガンド濃度が、 1mM 、 $100\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、および 100nM の放射性標識溶液を作製した。 ^{67}Ga - D O T A 溶液を加熱するために、(ウエル中に油を入れた) メタルヒーターブロックを使用した。放射性標識条件を表 6 に示す。

30

【 0 1 8 1 】

【表 7】

リガンド	標識化バッファー	標識温度	標識時間	pH測定値
DOTA	酢酸塩	80°C	45分	4.6
CP256	PBS	25°C	1分	6.6

表 6. 各リガンドのための放射性標識条件。標識混合物中の各リガンドの最終濃度は、 1mM 、 $100\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 100nM および 10nM であった。

40

【 0 1 8 2 】

実施例 4 - G a - 6 7 で標識した C P 2 5 6 - 動力学的安定性

P D 1 0 サイズ排除によるアポ - トランスフェリン中の ^{67}Ga - C P 2 5 6 の安定性

図 2 は、 $100\mu\text{M}$ (A) および $10\mu\text{M}$ (B) の C P 2 5 6 の放射性標識溶液についての、P D 1 0 カラムからの ^{67}Ga - C P 2 5 6 の溶出プロファイルを示す。アポ - トランスフェリン中での希釈およびインキュベーション後、これらの溶液中の C P 2 5 6 濃度は、それぞれ、 $227\mu\text{M}$ および 2.27nM であった。アポ - トランスフェリン中での 4 時間のインキュベーション後、該プロファイルは、参照バッファー中でのインキュベ

50

ションのそれとは変わらず、 $2.27 \mu\text{M}$ または 227nM 溶液のいずれについても、 ^{67}Ga がトランスフェリンに結合していないことまたはリガンドから ^{67}Ga が失われたことを示唆している。

【0183】

30 kDaのMWCOフィルターを用いる放射性医薬品の安定性

表7および図3に示す通り、すべての放射性標識トレーサーのフィルター膜への残留結合は低度であった(5%以下)。アポ-トランスフェリン中での ^{67}Ga -クエン酸塩のインキュベーション由来の放射能の73%が、4時間後にMWCOフィルターに結合していた。MWCO法は、4時間のインキュベーション時間にわたる、 ^{67}Ga -CP256および ^{67}Ga -DOTA溶液中での ^{67}Ga からアポ-トランスフェリンへの無視できるトランスキレーション(1%以下)も示す。 $100 \mu\text{M}$ のCP256溶液(アポ-トランスフェリン中、 2.27M)の場合、参照バッファー中でのインキュベーション由来のバックグラウンド結合は、1%高かった。 ^{67}Ga -DTPAは、4時間のインキュベーション時間経過後、参照バッファー中の溶液と比べて、いくらかの解離とこの溶液中の放射能のさらなる10%のフィルターへ結合を示した。

【0184】

【表8】

トレーサー	MWCOフィルターに結合した放射能の%	
	参照バッファー中	アポトランスフェリン インキュベーション、4時間後
^{67}Ga -クエン酸塩	1.7 ± 0.5	73.0 ± 4.1
^{67}Ga -CP256 ($10 \mu\text{M}$)	3.5 ± 1.3	3.9 ± 0.8
^{67}Ga -CP256 ($100 \mu\text{M}$)	4.9 ± 0.5	3.8 ± 0.5
^{67}Ga -DOTA	1.5 ± 1.7	2.6 ± 0.8
^{67}Ga -DTPA	1.5 ± 0.6	11.4 ± 1.4

表7. ^{67}Ga -クエン酸塩、 ^{67}Ga -CP256、 ^{67}Ga -DOTAおよび ^{67}Ga -DTPAの30kDa MWCOフィルターへの結合

【0185】

実験の詳細

専門的な化学物質および消耗品は、以下のように購入した：ヒトアポトランスフェリン(Sigma Aldrich T5391-10MG)；Sartorius Vivaspin 500 30 kDa MWCOフィルター(Fisher Scientific FDP-875-025B)；PD10 カラム(GE Healthcare 17-0851-01)；アポ-トランスフェリンのUV分光光度分析は、Cary WinUVソフトウェアを備えたCary UV分光光度計において実施した。波長を280nmに設定した。

【0186】

【表 9】

放射性トレーサー	移動相	固定相
^{67}Ga -CP256	メタノール／クエン酸 (0.5 M) ／ ギ酸アンモニウム (10% w, v) [40/20/40]	シリカゲル
^{67}Ga -DOTA	クエン酸ナトリウム (aq) [0.3 M]	シリカゲル
^{67}Ga -DTPA	メタノール／クエン酸 (0.5 M) ギ酸アンモニウム (10% w, v) [40/20/40]	シリカゲル
	メタノール／酢酸 (0.5 M) ギ酸アンモニウム (10% w, v) [40/20/40]	シリカゲル
	酢酸 [0.5 M]	シリカゲル
	9/1/0.1メタノール／氷酢酸／ クエン酸ナトリウム [0.3 M]	ITLC-SG
	クエン酸ナトリウム [0.1 M]	ITLC-SG

表 8. ^{67}Ga -CP256、 ^{67}Ga -DOTAおよび ^{67}Ga -DTPAのTLCおよびITLC品質管理のために使用する移動相および固定相の詳細

【 0 1 8 7 】

 ^{67}Ga - クエン酸塩参照溶液の調製

200 μl の P B S 中、20 μl の ^{67}Ga - クエン酸塩をインキュベートすることによって、 ^{67}Ga - クエン酸塩の参照溶液を作製した。メタルヒーティングブロック中、37 でこの溶液をインキュベートし、血清インキュベーションについてと同じやり方の分析のためにサンプルを取り出した。

【 0 1 8 8 】

アポ - トランスフェリン溶液の調製

1 M 原液の希釈によって、50 mM の T R I S - H C l バッファー (pH 7.5) を調製した。重炭酸ナトリウムを 25 mM の濃度まで添加した。アポ - トランスフェリンの 2.5 mg / ml (32 μM) 溶液をこのバッファー中で調製した。

【 0 1 8 9 】

 ^{67}Ga - トレーサーの調製

すべてのトレーサーの溶液を、100 μM の濃度で放射性標識した。10 μM の C P 256 溶液も調製した。放射性標識条件については、表 9 を参照されたい。

【 0 1 9 0 】

各放射性標識トレーサーの 10 μl アリコートに 30 μl の適切なバッファーに添加して、pH を 7 から 7.5 の間に中和した。酢酸塩バッファー中で標識したトレーサーの場合には、このバッファーは、2 M の T R I S - H C l (pH 7.5) であった。 ^{67}Ga - C P 256 および ^{67}Ga - クエン酸塩の調製のためには、バッファーは P B S であった。詳細を表 9 に示す。

【 0 1 9 1 】

【表 10】

リガンド	放射性標識後の リガンド濃度	放射性標識化 バッファー	希釈バッファー	最終リガンド濃度
DOTA	100 μ M	酢酸	TRIS	25 μ M
DTPA	100 μ M	酢酸	TRIS	25 μ M
CP256	100 μ M	PBS	PBS	25 μ M
	10 μ M	PBS	PBS	2.5 μ M

表 9. トレーサーの放射性標識条件

10

【0192】

アポ - トランスフェリン中でのトレーサーのインキュベーション

プラスチック製の微量遠心管中のアポ - トランスフェリン溶液 (200 μ l) を、メタルヒーティングブロック中、37 でインキュベートした。これに、20 μ l の pH - 中和した各トレーサーを添加した。25 mM 重炭酸ナトリウムを含む 50 mM TRIS - HCl の (アポ - トランスフェリンを含まない) 参照バッファー中でも、20 μ l の各トレーサーをインキュベートした。

【0193】

参照バッファー中でのトレーサーのインキュベーション

50 mM TRIS - HCl (200 μ l、アポ - トランスフェリンを含まない) を、ヒーティングブロック中、37 でインキュベートした。pH 調整した適切なトレーサー (20 μ l) をインキュベーションに加えた。分析のために、適切な間隔でアリコートを採取した。

20

【0194】

PD10 カラムを用いるゲル濾過アポ - トランスフェリンのインキュベーション

PBS 溶出バッファーに添加した 25 mM の重炭酸ナトリウムにより、PD10 カラムの平衡化と溶出を行った。参照バッファー (25 mM の重炭酸ナトリウムを含む 50 mM の TRIS - HCl) 中でインキュベートした 20 μ l の各トレーサーを加え、上記のカラムを溶出することにより、 ^{67}Ga - クエン酸塩、 ^{67}Ga - CP256、 ^{67}Ga - DOTA および ^{67}Ga - DTPA の標準的な溶出プロフィールを決定した。

30

【0195】

0.5 ml の各分画についての総溶出放射能のパーセンテージを計算する

各カラムについての総溶出放射能を、30 個の分画それぞれについてのカウントを加算することによって計算した。そして、各分画についての溶出放射能を以下の式によって計算した。

【0196】

【数 14】

40

$$\frac{\text{分画あたりのカウント}}{(30\text{の分画すべてについての)総カウント}} \times 100$$

【0197】

PD10 ゲル濾過カラムからのアポ - トランスフェリンの UV 溶出プロフィール

PD10 カラムからのトランスフェリンの溶出プロフィールを、UV 分光光度法によって決定した。アポ - トランスフェリン (非放射性、500 μ l の 2.5 mg/ml 溶液) を PD10 カラムに入れ、PBS バッファーで溶出して、0.5 ml の分画を集めた。サ

50

ンプルを1mlの水晶キュベットに負荷し、追加の0.4mlのPBSで0.9mlまで希釈した。参照基準としてPBSを用い、280nmにおける吸収を測定した。

【0198】

30kDaのMWCO微量遠心分離フィルターを用いる、トレーサーの安定性の決定
管の上部（フィルター部分）に（100μl、25mMの重炭酸塩を含む）PBSを加えた。各トレーサーについての（4時間後の）インキュベーション溶液（5μl）を添加し、微量遠心機中で、管を10,000gで8分間回転させた。さらなる100μlのPBSを洗浄のために添加し、再度、管を10,000gでさらに8分間回転させた。管のフィルター部分を取り出し、管とは別にガンマカウンター中でカウントした。放射能のMWCOフィルターへの結合のパーセンテージを、以下の式を用いて計算した。

10

【0199】

【数15】

$$\frac{\text{フィルター部分由来のカウント}}{\text{フィルター部分由来のカウント} + \text{管部分由来のカウント}} \times 100$$

【0200】

アポ-トランスフェリンのインキュベーションに関して、4時間後に三連で分析を行った。50mMのTRIS-HCl参照バッファー中でのインキュベーションに関しては、6回（6つの管）行った。上記のように平均値をとった。

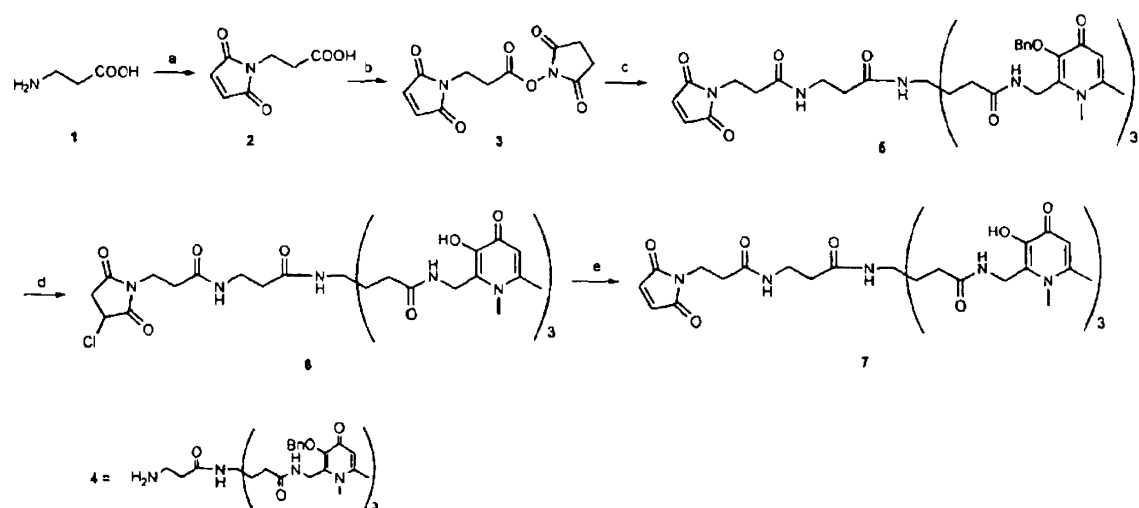
20

【0201】

実施例5 - CP256 - マレイミドコンジュゲートの合成

【0202】

【化28】



30

40

マレイミドに連結した六配座キレーター7の合成。a) 無水マレイン酸/DMF; b) DCC/NHS/DMF; c) 4/DMF; d) BCl₃/DCM; e) Et₃N/DCM.

【0203】

実験の詳細

化合物4の合成は、先に報告されている (Zhou T. et al., J Med Chem. 2006, 49, 4171-4182)。

【0204】

サクシニミド 3 - マレイミドプロパノエート3の合成

50

DMF (30 mL) 中、 α -アラニン (1.8 g、20 ミリモル) および無水マレイン酸 (2 g、20 ミリモル) の溶液を室温で 3 時間撹拌した。固体を完全に溶解した後、N-ヒドロキシサクシニミド (NHS; 2.3 g、20 ミリモル) およびジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC; 4.6 g、24 ミリモル) を溶液中に添加し、そして、混合物を室温で一晩撹拌した。溶液を濾過し、水 (100 mL) およびジクロロメタン (100 mL) で沈殿を洗浄した。濾液を集め、50 mL の 5% NaHCO_3 で 3 回、塩水で 1 回、有機層を洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で脱水し、減圧下でジクロロメタンを除去すると、白色固体 (55%) が得られた。この固体は、さらなる精製を必要とせず、次のカップリングステップのために直接使用可能である。

【0205】

10

【数16】

 ^1H

NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 2.82 (s, 4H, two サクシニミド- CH_2),
3.02 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, COCH_2), 3.94 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, NCH_2),
6.74 (s, 2H, 2つの CH).

【0206】

20

化合物 5 の合成

無水 DMF (50 mL) 中、活性化した酸 3 (6 ミリモル) およびアミン 4 (5 ミリモル) を、室温で一日、撹拌した。減圧下で溶媒を除去し、クロロホルム: メタノール (8:2) を溶出液として用いるシリカゲルカラムにおいて残渣を精製し、溶出液として白色の泡を得た (81%)。

【0207】

【数17】

 ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz):

30

δ 2.05 (brs, 6H, CH_2), 2.15 (s, 9H, CH_3), 2.23 (brs, 2H, CH_2),
2.29 (brs, 6H, CH_2), 2.41 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2), 3.32 (brs, 2H,
 CH_2), 3.36 (s, 9H, CH_3), 3.73 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2), 4.35 (s, 6H,
 CH_2), 4.87 (s, 6H, CH_2), 6.10 (s, 3H, CH), 6.65 (s, 2H, CH), 6.76
(brs, 1H, NH), 7.23-7.30 (m, 15H, ArH), 7.72 (brs, 3H, NH). ^{13}C
NMR (CDCl_3 , 100MHz): 20.81 (CH_3), 30.70 (CH_2), 31.71 (CH_2), 34.43
(CH_2), 34.62 (CH_2), 34.82 (CH_2), 36.31 (CH_3), 36.68 (CH_2), 57.99,
73.42 (CH_2), 118.25 (CH), 128.30 (CH), 128.52 (CH), 128.58 (CH),
134.23 (CH), 136.97, 141.05, 146.35, 148.04, 170.43, 170.66,
171.70, 173.10, 173.23. ESI-MS: 1190.40 ($\text{M}+1$)⁺

40

【0208】

化合物 6 の合成

無水 DCM 中のベンジル保護化合物 5 に、 N_2 下で三塩化ホウ素 (1.2 当量) を氷浴中で添加し、混合物を室温で 2 日間撹拌した。過剰の BCl_3 を、 MeOH 、続いて 1 mL の濃塩酸を添加することによってクエンチングした。混合物を蒸発させて茶色固体を得て、これをメタノールに溶解し、アセトンを加えて沈殿させた。この手順を 3 回繰り返して、白色固体を得た (72%)。

50

【 0 2 0 9 】

【 数 1 8 】

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 1.75-1.84 (m, 6H, CH₂), 2.08-2.13 (m, 6H, CH₂), 2.21 (t, J=7.1 Hz, 2H, CH₂), 2.32 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.57 (s, 9H, CH₃), 2.85 (dd, J=4.1, 8.3 Hz, 1H, マレイン酸のCH₂のうちの1つのH), 3.16 (q, J=6.5 Hz, 2H, CH₂), 3.34 (dd, J=8.5, 18.3Hz, 1H, マレイン酸のCH₂のうちの1つのH), 3.58 (t, J=7.5Hz, 2H, CH₂), 3.89 (s, 9H, CH₃), 4.57 (d, J=5.0 Hz, 6H, CH₂), 4.99 (dd, J=4.1, 8.5 Hz, マレイン酸のCHのH), 7.28 (s, 3H, CH), 7.30 (brs, 1H, NH), 8.09 (t, J=5.6 Hz, 1H, NH), 8.92 (t, J=5.1 Hz, 3H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100MHz): δ 20.56 (CH₃), 29.26, (CH₂), 29.98 (CH₂), 32.67 (CH₂), 34.71 (CH₂), 35.27 (CH₂), 35.58 (CH₂), 35.83 (CH₂), 39.00 (CH₂), 39.05 (CH₃), 49.82 (CH), 56.79, 112.73 (CH), 139.90, 142.69, 148.55, 159.59, 169.12, 170.08, 173.18, 173.36, 173.44. ESI-MS: 956.27 (M+1)⁺. HRMS: C₄₄H₅₉ClN₉O₁₃ (M+1)⁺についての計算値, 956.3921; 実測値, 956.3953.

10

20

【 0 2 1 0 】

化合物 7 の合成

DCM (20 mL) 中の化合物 6 (20 mg) に過剰の Et₃N を添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。蒸発させて溶媒を除去した後、残渣を 1 mL の 0.1 % ギ酸溶液に溶解することによって固相抽出カラムに負荷した。カラムを最初に 0.1 % ギ酸 (10 mL) で洗浄してトリエチルアミン塩酸塩を除去し、続いて、メタノール (10 mL) で溶出した。メタノール溶液の分画を濃縮し、真空オーブンで乾燥させると、白色粉末が得られた (80 %)。

【 0 2 1 1 】

【 数 1 9 】

30

^1H NMR (CD₃OD, 400MHz): δ 1.94-2.03 (m, 6H, CH₂), 2.20-2.29 (m, 6H, CH₂), 2.32 (t, J=6.3 Hz, 2H, CH₂), 2.38 (s, 9H, CH₃), 2.42 (t, J=7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.31 (q, J=6.7 Hz, 2H, CH₂), 3.66 (s, 9H, CH₃), 3.69 (t, J=7.1Hz, 2H, CH₂), 4.58 (s, 6H, CH₂), 5.25 (s, 3H, NH), 6.29 (s, 3H, CH), 6.81 (s, 2H, CH). ^{13}C NMR (CD₃OD, 100MHz): δ 21.03 (CH₃), 30.11, (CH₂), 31.48 (CH₂), 35.43 (CH₂), 35.69 (CH₂), 36.02 (CH₂), 37.21 (CH₃), 37.49 (CH₂), 59.17, 63.70 (CH₂), 114.58 (CH), 129.59, 132.25, 135.57 (CH), 147.38, 148.87, 171.12, 172.26, 172.98, 173.33, 175.89. ESI-MS: 920.33 (M+1)⁺. HRMS: C₄₄H₅₈N₉O₁₃ (M+1)⁺についての計算値, 920.4154; 実測値, 920.4146.

40

【 0 2 1 2 】

実施例 6 - C P 2 5 6 - クロロサクシニミド (6) または C P 2 5 6 - マレイミド (7) と C 2 A c タンパク質のコンジュゲーション

50

C2Aは、アポトーシスを被っている細胞上に提示されるホスファチジルセリンを認識する。それは、チオール反応性作用物質による部位特異的標識を促進するために、システイン残基が遺伝子操作されている(Tavare R, Torres Martin de Rosales R, Blower PJ, Mullen GED. Efficient site-specific radiolabeling of a modified C2A domain of synaptotagmin I with [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)$] $^+$: a new radiopharmaceutical for imaging cell death. Bioconjugate Chem 2009; 20: 2071-2081を参照されたい)。6または7のいずれかを用いて、得られた遺伝子操作されたタンパク質(C2Ac)をCP256とコンジュゲーションした。同じ生成物を両コンジュゲーション反応から得た。

10

【0213】

C2Acの平均分子量は14997であり、したがって、C2Ac-(7)コンジュゲートは、15918.44の平均分子量を有すると考えられる。実測の平均分子量は、15970.85であり、これは、追加の鉄原子を有し、3つの水素原子を含まないC2Ac-(7)コンジュゲートに相当する。

【0214】

実験の詳細

C2Ac(2mg/mLの溶液中、2mg)を、3:1のモル過剰のクロロサクシニミド-六配座キレーター(6)またはマレイミド-六配座キレーター(7)で、4時間、室温で処理した。PBSであらかじめ平衡化させ、Chelex上で貯蔵しておいたPD-10カラムを用いて、混合物を精製し、LC-MSにより分析した。

20

【0215】

実施例7 - ^{68}Ga によるC2Acタンパク質コンジュゲートの標識化および標識タンパク質に関する機能性データ

本明細書に記載の方法にしたがって、C2Ac-(7)コンジュゲートを ^{68}Ga で放射性標識した。図4は、酢酸塩バッファー中で ^{68}Ga とわずか15分間インキュベーションした後の、高度なキレーションを示す。 ^{68}Ga -標識コンジュゲートは、赤血球結合アッセイにおいてホスファチジルセリン(PS)への特異的なカルシウム依存性の結合を示した(図5を参照されたい)。

30

【0216】

実験の詳細

バッファー中のキレートされていない ^{68}Ga を以下のように調製した。ジェネレーターを2mLの0.1M HClで溶出して25MBqの ^{68}Ga 溶出液を得た。1.5mLの濃HCl(36%)を溶出液に加えて、HClの最終濃度4Mとして、ガリウム四塩化物アニオンを形成し、該溶液はすべての放射能をトラップしながら陰イオン交換カラム(SAX SPEC, Chromafix 30-PS-HCO₃, 45mg, Macherey-Nagel, Germany)を通過した。次いで、カラムを250μLの5M NaClで洗浄し、放射能は300μLの蒸留水により溶出し、溶出液(pH1未満、約70MBq)を5μLの1M NaOHおよび30μLの酢酸アンモニウムバッファー、pH6を加え、pHを7に上昇させることによって緩衝化した。100μLのPBS、pH6をその後添加した。

40

【0217】

200μLの予備濃縮し、緩衝化した ^{68}Ga 溶液を(100μL中)100μgのC2Ac-(7)キレーターコンジュゲートに添加した。5分の間隔で、2μLの混合物をITLC-SGにスポットし、0.1Mクエン酸バッファーを移動相として使用してクロマトグラムを展開した。

【0218】

放射性標識C2Ac-(7)の赤血球(RBC)上のPSへの結合を、文献記載の方法にしたがって実施した(Tait, J.F., Gibson, D.F., and

50

Smith, C. (2004) Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. Anal. Biochem. 329, 112-119を参照されたい)。保存ヒトRBCの市販の調製物をBeckman-Coulter (High Wycombe, UK) から得た。RBCのカルシウム滴定を、キャリアタンパク質として1mg/mLのBSAを含む50mM HEPES-ナトリウム、pH7.4、100mM NaCl、3mM NaN₃中で実施した。1nMの⁶⁸Ga標識C2AcHおよびカルシウムにより反応を準備し；RBCを添加し、そして、反応(1ml)を室温で8分間インキュベートした。

10

【0219】

次いで、細胞を遠心分離し(7500RCFで3分間)、上清を除去し、インキュベーションステップの間に使用したのと同じ濃度のカルシウムを含むアッセイバッファー1mlに細胞を再懸濁した。細胞を再び遠心分離して上清を除去し、ペレットを0.7mlのアッセイバッファー+10mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)に再懸濁して、カルシウム依存性に結合した⁶⁸Ga標識C2Ac-(7)を放出させた。RBCを除去するための遠心分離後、上清中の放出された標識C2Ac-(7)をガンマカウンターを用いて測定した。式 $Y = (Ca)^N / ([Ca]^N + EC50^N)$ を用いて文献記載のとおりEC50を計算し、ここで、 $Y = B / B_{max}$ であり、Bは、所与のカルシウム濃度において結合した放射性標識タンパク質の実際の量であり、B_{max}は、飽和カルシウム濃度において結合した放射性標識タンパク質の濃度である。

20

【0220】

Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, US) を用いるLevenberg-Marquardtアルゴリズムに基づく日常の非線形曲線適合を用いて曲線のあてはめを実施した。

【0221】

実施例8 - ⁶⁸Ga - C2AcコンジュゲートによるPETスキャンおよびマウスにおける生体内分布

マウスへの⁶⁸Ga - C2Ac-(7)コンジュゲートおよびキレートされていない(「遊離の」)⁶⁸Gaの注入の1.5時間後に撮影したPET画像を図6aおよび6bにそれぞれ示す。⁶⁸Gaの存在を画像中の明るい白色の領域により示す。⁶⁸Ga - C2Ac-(7)コンジュゲートの注入は、膀胱へ排出された少量の放射能を、ほとんど独占的な腎臓での取り込みによる放射能の血液および組織からの急速なクリアランスを示した(図6a)。これは、その放射能がゆっくりと血液プールから主にリモデリング中の骨へと消失することが見られた「遊離の」⁶⁸Gaの注入により得られた画像(図6b)とは対照的である。

30

【0222】

【表 1 1】

	平均 (n = 4)	標準偏差
脾臓	0.46	0.11
胃	0.77	0.31
小腸	0.42	0.06
盲腸	0.34	0.05
肝臓	0.94	0.15
血液	0.33	0.18
腎臓	155.29	27.21
胸腺	0.27	0.09
心臓	0.47	0.15
肺	0.63	0.15
筋肉	0.39	0.23
大腿骨 (L)	0.40	0.10
尾	0.85	0.29

10

表10. $^{68}\text{Ga}-\text{C2Ac}-(7)$ コンジュゲートの注入90分後のマウス組織中のグラムあたりの注入放射能の%

20

【0 2 2 3】

実験の詳細

^{68}Ga 標識 $\text{C2Ac}-(7)$ コンジュゲートを上記の通りに合成した。バッファー中のキレートされていない ^{68}Ga を、実施例 7 に記載の予備濃縮（および pH 7 への緩衝化）法を用いて調製した。TLC 分析を実施した。注入時までは、水酸化ガリウムの沈殿は検出されなかった。注入のための溶液を、 $0.22\ \mu\text{m}$ フィルターを通して濾過して、雌性 C57B/6 マウス ($n = 4$ 、各動物に対して $100\ \mu\text{l}$ 中 $10\ \text{MBq}$) の尾静脈に注入した。NanoPET/CT スキャナー (Bioscan, Paris, France) を用い、PET 収集時間 1800 秒、同時計数関係 (coincidence relation) : 1 ~ 3 で、PET/CT スキャンを取得した。画像再構築 : SSRB 2D LOR による OSEM、エネルギーウィンドウ : $400 \sim 600\ \text{keV}$ 、フィルター : Ramlak カットオフ 1、相互作用 / サブセットの数 : 8 / 6。動物を 90 分で殺し、外植された器官は、生体内分布を決定するためにガンマカウンターでカウントした。

30

【0 2 2 4】

実施例 9 - 血清中での ^{68}Ga による CP256 の標識

図 7 は、血清中での CP256 による ^{68}Ga のキレーションならびに血清中でインキュベートした ^{68}Ga - 塩化物、血清とともにインキュベートした、あらかじめ形成された ^{68}Ga - CP256 - (7) 錯体およびバッファー中でインキュベートした ^{68}Ga を示すための対照実験のサイズ排除ラジオクロマトグラフィー (PD10 カラム) を示す。

【0 2 2 5】

CP256 による ^{68}Ga のキレーションの効率の尺度として、そして以下に記載のプレターゲットングアプローチの実行可能性を実証するために、標識化は血清中で行われ、したがって、血清トランスフェリンからの攻撃を伴うキレーションプロセスを表す。CP256 と血清の混合物への ^{68}Ga 塩化物の添加は、CP256 サンプル濃度が $23\ \mu\text{M}$ 以上である場合に ^{68}Ga - CP256 のそれに類似するサイズ排除クロマトグラムを生じるが、血清のみへの ^{68}Ga の添加は、 ^{68}Ga - トランスフェリン錯体と「遊離の」ガリウムの混合物と一致するクロマトグラムを生じる。これは、CP256 が血清トランスフェリンと効果的に競合することを示す。さらに、 ^{68}Ga を最初に血清で平衡化し、次いで CP256 を添加した場合、ここでも、クロマトグラムは ^{68}Ga - CP256 での観察と類似し、CP256 が ^{68}Ga - トランスフェリン錯体から ^{68}Ga を抽出できることを示している

40

50

。エタノール沈殿およびITLC実験は、CP256を含む血清中では、測定可能なタンパク質結合も検出可能な遊離の ^{68}Ga もなかったことを確認した。すべての ^{68}Ga は、上清のITLCの起点に留まった。これらの観察結果は、 ^{68}Ga とCP256のコンジュゲートが、インビボでの新規「プレターゲティング」モードに使用可能であり、それによって、標的とされるCP256コンジュゲートが投与され、そして標的に結合可能となり、続いて、プレターゲティングされたCP256を位置決めするために ^{68}Ga が注入されることを示唆する。

【0226】

実験の詳細

2つの異なる放射性標識技術を使用した。方法1においては、100 μl のキレーター (CP-256、PBS/重炭酸塩バッファー中2.35 mM、1.17 mM、589 μM 、117 μM 、34 μM および11.7 μM ; pH 7~7.5)を300 μl のヒト血清と混合する。10~15分後、20 μl の ^{68}Ga 溶出液を添加し、該溶液をプラスチック管中で38℃でインキュベートした。第2の方法においては、20 μl の ^{68}Ga 溶液を300 μl のヒト血清に添加した。15~20分後、100 μl のキレーター (CP-256)を添加した。各時点で50 μl のインキュベーション溶液をPD-10カラムの上部に適用し、PBSでカラムを溶出して0.5 ml分画を集めた。ガンマカウンター (Perkin Elmer wizard 31480自動ガンマカウンター、サンプルあたり10秒)で分画をカウントした。インキュベートした溶液を、エタノール沈殿によっても分析し、ペレットおよび遠心分離後の上清をカウントして、タンパク質に結合した ^{68}Ga を決定し、そして、遠心分離された上清を、0.1 Mクエン酸ナトリウムを移動相とするITLC-SGにより分析した。これらの条件において、「遊離の」 ^{68}Ga は溶媒先端とともに移動し(Rf = 1)、 ^{68}Ga -CP256は起点に留まった(Rf = 0)。

【0227】

実施例10 - ^{111}In によるCP256の標識

^{111}In -塩化物は、ITLC-SG (HSA)により決定して、5分後に約90%の収率でCP256 (589 μM)と錯体を形成する。該錯体は、ヒト血清中で2時間インキュベートした場合、PD10サイズ排除クロマトグラフィーにより決定して、In-111の放出または血清タンパク質への結合が2%未満であることを示した(図8)。

【0228】

実験の詳細

酢酸塩バッファー (pH = 6)の50 μl アリコート、HCl中の $^{111}\text{InCl}_3$ (7 MBq, Mallinckrodt Medical)を入れたバイアルに添加した。CP256の589 μM 溶液を、0.5 mgのCP256を1 mlのPBSに溶解することによって調製した。このCP256溶液の100 μl アリコートを上記 ^{111}In 溶液の50 μl アリコートと混合した。5分間のインキュベーション後、 ^{111}In のスペシエーションを、先にヒト血清アルブミン (HSA)で飽和させて乾燥したITLC-SGストリップを用いて分析した。5:2:1の比の水、エタノールおよびアンモニアでクロマトグラムを展開した。これらの条件下、 ^{111}In は起点に留まるが、 ^{111}In -CP256は溶媒先端まで移動する。

【0229】

実施例11 - ^{67}Ga によるプレターゲティングモードを介する、抗体-CP256コンジュゲートのインビボでのイメージング

前炎症性マクロファージにより発現されたシアロアドヘシン抗原に対するモノクローナル抗体、SER4を、最初に抗体ジスルフィド結合を2-メルカプトエタノールで還元し、次いで、そうして形成したチオール基をCP256-マレイミド(7)で処理することにより、CP256-マレイミド(7)とコンジュゲーションして、CP256-SER4を得た。

【0230】

以前に観察した(非公開データ) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で標識したSER4のマウス中での典型的な

生体内分布は、主に脾臓、そしてある程度の肝臓での取り込みによる、循環からの急速なクリアランスを反映している。

【0231】

^{67}Ga でCP256-SER4を標識することにより、 ^{67}Ga -CP256-SER4が得られた。野生型マウスの群に、直接的に標識 ^{67}Ga -CP256-SER4（グループ1）、または（コンジュゲーションしていない）SER4、続いて5分後に ^{67}Ga クエン酸塩（グループ2）またはCP256-SER4、続いて ^{67}Ga クエン酸塩のいずれかを注入した。

【0232】

同じ実験を、シアロアドヘシンノックアウトマウスを用いても実施した。すべての動物を3時間後に殺し、放射能の生体内分布を決定した。

10

【0233】

結果を図9に示す。各器官について、グループ1についての生体内分布データを左側のカラムに示し、グループ2についての生体内分布データを中央のカラムに示し、そして、グループ3についての生体内分布データを右側のカラムに示した。

【0234】

グループ1は、 ^{67}Ga -CP256-SER4の脾臓への強力なターゲティング（36% ID/g）を示したが、グループ2は、 ^{67}Ga クエン酸塩の非常に低い脾臓による取り込みを示した（4% ID/g）。一方、グループ3は、CP256-SER4の先行注入が ^{67}Ga クエン酸塩の脾臓による取り込みを4% ID/gから10% ID/gまで増加させることができたことを示し、 ^{67}Ga がかなりの程度まで抗体コンジュゲートの位置を追跡することを示唆している。

20

【0235】

グループ1はまた、循環血中の ^{67}Ga -CP256-SER4の高い放射能（31% ID/g）を示すが、 ^{67}Ga クエン酸塩（グループ2）はそうでなく（7% ID/g）；CP256-SER4の先行投与（グループ3）が、血液プール中の保持を7%から16% ID/gまで増加させたことも示している。ノックアウトマウスは、脾臓ターゲティング挙動を示さず、このパターンがシアロアドヘシン発現に関連していることと一致する。これらの実験は、 ^{67}Ga クエン酸塩の後からの注入による、CP256のプレターゲティングされた非標識バイオコンジュゲートのイメージングの実行可能性を実証する。

30

【0236】

実験の詳細

SER4へのCP256のコンジュゲーションのために：リン酸塩緩衝食塩水中の2mg（5mg/mL）のSER4抗体に、25μLの50mMのEDTAを添加した。得られた溶液中に存在する金属イオンをキレートするために、溶液を室温で1時間放置した。

【0237】

そして、50,000mwcoのVivaspin2超遠心管中で、3000rpm、3×15分の遠心分離によって抗体を洗浄した。遠心分離ステップの合間に抗体を再懸濁し、0.1Mの金属を含まないリン酸塩バッファー、pH7の添加により2mLの体積に調整した。濃縮し、洗浄した抗体を約300μLの0.1Mリン酸塩バッファー中に集めた。

40

【0238】

抗体の還元のために、0.1Mリン酸塩バッファー、pH7で、2-メルカプトエタノール（5μL）を20μLに希釈した。3.8μL（1000倍過剰）の希釈した2-メルカプトエタノールを抗体に添加し、室温で30分間、還元を進行させた。

【0239】

0.1Mリン酸塩バッファーの添加により体積を1mLに調整し、還元した抗体をディスプレイザブルのサイズ排除カラム（PD10）に適用した。還元した抗体を含む分画を併合し、すぐに（0.77mgを8μLのDMSOに溶解した、40倍過剰の）CP256-マレイミドを加えた。コンジュゲーション反応を37℃で30分間加熱した。その後、

50

50,000 mwc の V i v a s p i n 2 超遠心管を先のように使用するが、0.1 M 酢酸アンモニウムバッファー、pH 6 を過剰のリガンドを除去するために使用して、コンジュゲーションされた抗体を洗浄した。濃縮した C P 2 5 6 - 抗体を、0.1 M 酢酸アンモニウムバッファー、pH 6 中に集めた。

【0240】

45 μ L の ^{67}Ga クエン酸塩 (0.6 ~ 0.75 MBq) を 90 μ L (90 μ g) の C P 2 5 6 - S E R 4 に添加することによって、 ^{67}Ga ガリウム放射性標識を実施した。リン酸塩緩衝食塩水で 350 μ L に希釈する前に、放射性標識を 10 分間進行させた。25 μ g の標識抗体を含む注射液を調製した。標識抗体の分析を、2 mM E D T A を含む 0.1 M リン酸塩バッファーを移動相として用いるサイズ排除 H P L C によって実施して、動物への注入の前に、良好な放射性標識が達成されたことを確認した。

10

【0241】

野生型マウスの群 (C 5 7 B 1 / 6、雄性 8 ~ 10 週、一群あたり $n = 2 \sim 3$) に、直接的に標識 ^{67}Ga - C P 2 5 6 - S E R 4 (グループ 1)、または (コンジュゲーションしていない) S E R 4、続いて 5 分後に ^{67}Ga クエン酸塩 (グループ 2)、または C P 2 5 6 - S E R 4、続いて ^{67}Ga クエン酸塩のいずれかを注入した。各ケースにおいて使用した ^{67}Ga の放射能および抗体の量は同じであった。同じ実験を、ノックアウトマウス (シアロアドヘシンノックアウト、C 5 7 B 1 / 6、雄性 8 ~ 10 週、一群あたり $n = 2 \sim 3$) を用いても実施した。すべての動物を 3 時間後に殺し、組織の外植および体重測定およびカウントにより、放射能の生体内分布を決定した。

20

【0242】

実施例 1 2 - ^{68}Ga によるプレターゲティングモードを介する、抗体 - C 2 5 6 コンジュゲートのインビボでのイメージング

実施例 1 1 に記載の C P 2 5 6 - マレイミドとコンジュゲーションした S E R 4 (7) を、実施例 7 に上記した通りに ^{68}Ga で標識することにより、 ^{68}Ga - C P 2 5 6 - S E R 4 が得られた。3 回の別個の時に、野生型マウスの群 (C 5 7 B 1 / 6、雄性 8 ~ 10 週、一群あたり $n = 2 \sim 3$) に ^{68}Ga - C P 2 5 6 - S E R 4 (グループ 1)、または (コンジュゲーションしていない) S E R 4、続いて 1 時間後に ^{68}Ga 酢酸塩 (グループ 2)、または C P 2 5 6 - S E R 4、続いて 1 時間後に ^{68}Ga 酢酸塩 (グループ 3) のいずれかを注入した。

30

【0243】

すべての動物を ^{68}Ga 注入の 1.5 時間後に殺し、放射能の生体内分布を決定した。結果を図 10 に示す。各器官について、グループ 2 についての生体内分布データを左側のコラムに示し、グループ 3 についての生体内分布データを中央のコラムに示し、そして、グループ 1 についての生体内分布データを右側のコラムに示した。

【0244】

グループ 1 は、 ^{68}Ga - C P 2 5 6 - S E R 4 の脾臓への強力なターゲティング (3 つの実験にわたり、20 ~ 50 % I D / g) を示したが、グループ 2 は、 ^{68}Ga 酢酸塩の非常に低い脾臓による取り込みを示した (2 ~ 5 % I D / g)。一方、グループ 3 は、C P 2 5 6 - S E R 4 の先行注入が ^{68}Ga 酢酸塩の脾臓による取り込みを 2 ~ 5 % I D / g から 17 ~ 40 % I D / g まで増加させることができたことを示し、 ^{68}Ga がかなりの程度まで抗体コンジュゲートの位置を追跡することを示唆している。これらの実験は、 ^{68}Ga 酢酸塩の後からの注入による、C P 2 5 6 のプレターゲティングされた非標識バイオコンジュゲートのイメージングの実行可能性を実証する。

40

【0245】

グループ 3 からのマウスの N a n o P E T / C T 画像を図 11 A に示す。該マウスは、C P 2 5 6 - S E R 4 を用いる本発明のプレターゲティング方法を用いて撮像され：C P 2 5 6 - S E R 4 に続いて ^{68}Ga 酢酸塩を注入した 8 週齢の C 5 7 B 1 / 6 であった。該図は、標的化された肝臓 / 脾臓による取り込みを示す。比較のために、 ^{68}Ga 酢酸塩のみを注射したマウスを図 11 B に示し、血液プール中の保持および関節への蓄積を

50

示す。

【 0 2 4 6 】

実験の詳細

実施例 11 の記載のとおりに、抗体を C P 2 5 6 にコンジュゲーションさせた。放射性標識のために、 ^{68}Ga を ^{68}Ga ジェネレーターから溶出して実施例 7 に記載のように濃縮して、 ^{68}Ga 酢酸塩を得た。150 μL (105 μg) の C P 2 5 6 - S E R 4 に150 μL の ^{68}Ga 酢酸塩 (16 MBq) を添加した。放射性標識反応を室温で5分間進行させた。35 μg の放射性標識抗体を含む注射液を調製した。放射性標識抗体の分析を実施例 11 に記載の通りに実施した。

【 0 2 4 7 】

野生型マウス (C 5 7 B 1 / 6、雄性 8 ~ 10 週、一群あたり $n = 2 \sim 3$) に、直接的に標識 ^{68}Ga - C P 2 5 6 - S E R 4 (グループ 1)、または (コンジュゲーションしていない) S E R 4、続いて1時間後に ^{68}Ga 酢酸塩 (グループ 2)、または C P 2 5 6 - S E R 4、続いて1時間後に ^{68}Ga 酢酸塩のいずれかを注入した。各ケースにおいて使用した ^{68}Ga の放射能および抗体の量は同じであった。すべての動物を2 ~ 3 時間後に殺し、組織の外植および体重測定およびカウントにより、放射能の生体内分布を決定した。各グループからの1匹の動物を、NanoPET/CT スキャナー (Bioscan) を用いてスキャンした。 ^{68}Ga 酢酸塩または ^{68}Ga - C P 2 5 6 - S E R 4 の注入直後にスキャンを開始し、1.5 時間継続した。

【 0 2 4 8 】

参考文献

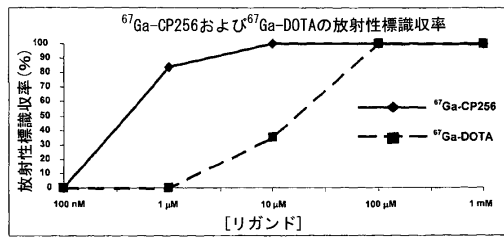
以下の参考文献は、すべての目的のために、その全体が参照することにより明示的に組み込まれる。

【 0 2 4 9 】

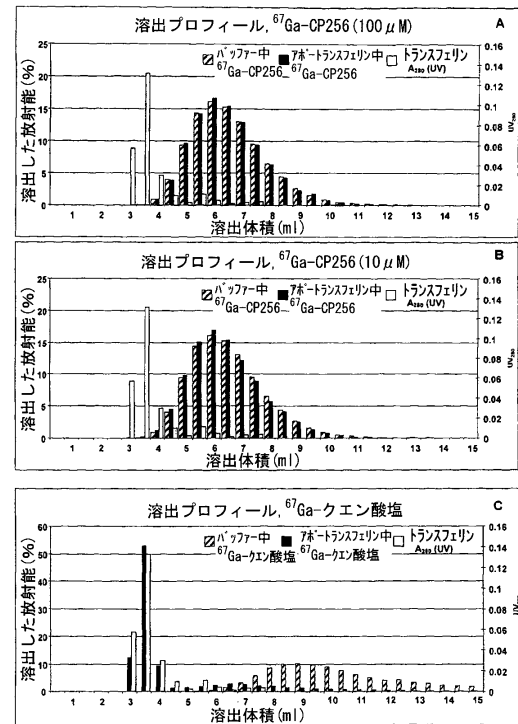
【表 1 2】

1. Emberson et al., J. Immunol. Methods. 305(2):135-51, 2005
2. Giersing et al., Bioconjug Chem. 12(6): 964-71, 2001
3. Bird et al, Science, 242; 423-426, 1988
4. Huston et al, PNAS USA, 85: 5879-5883, 1988
5. Holliger et al, P.N.A.S. USA, 90: 6444-6448, 1993
6. Reiter et al, Nature Biotech, 14: 1239-1245, 1996
7. Hu et al, Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996
8. Newkome et al., J Org Chem, 1991, 56, 7162-7167
9. Zhou T. et al., J Med Chem. 2006, 49, 4171-4182
10. Tavare et al., Bioconjugate Chem 2009; 20:2071-2081
11. Tait et al., Anal. Biochem. 329, 112-119

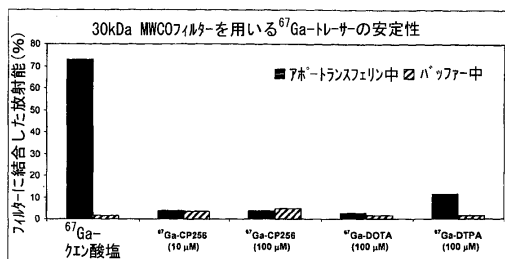
【図 1】



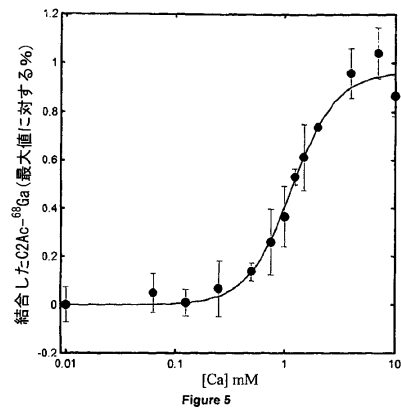
【図 2】



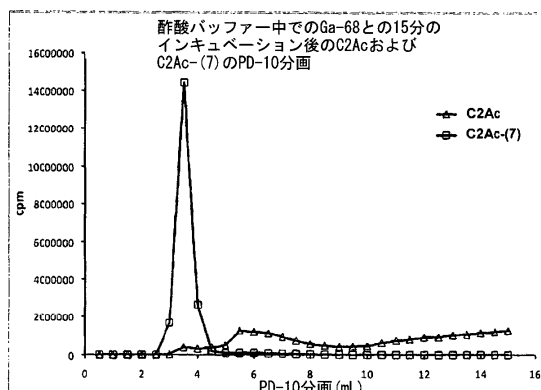
【図 3】



【図 5】



【図 4】



【図 6 a)】



【図 6 b)】



【図 7】

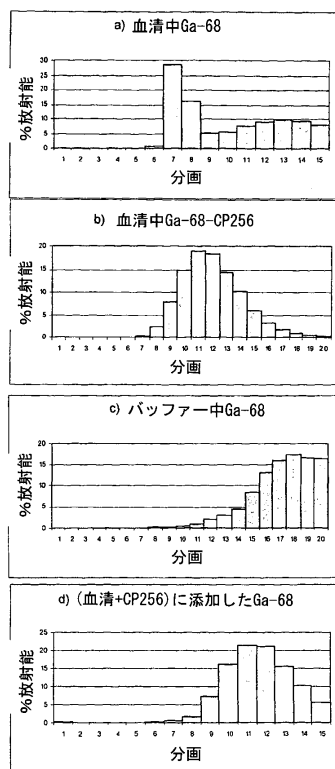


Figure 7

【図 8】

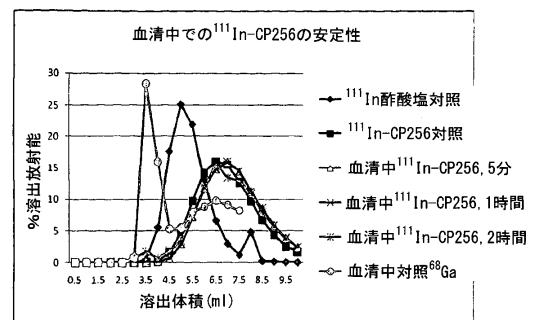


Figure 8

【図 9】

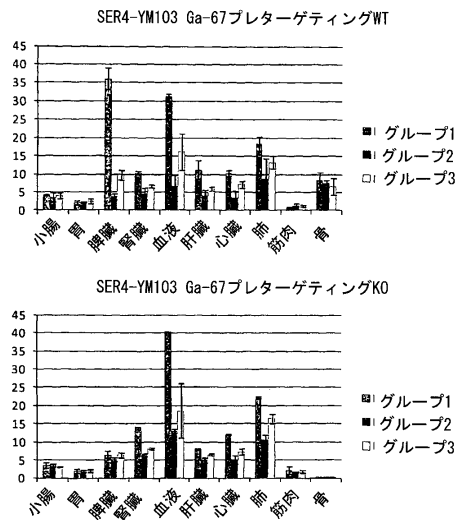


Figure 9

【図 10】

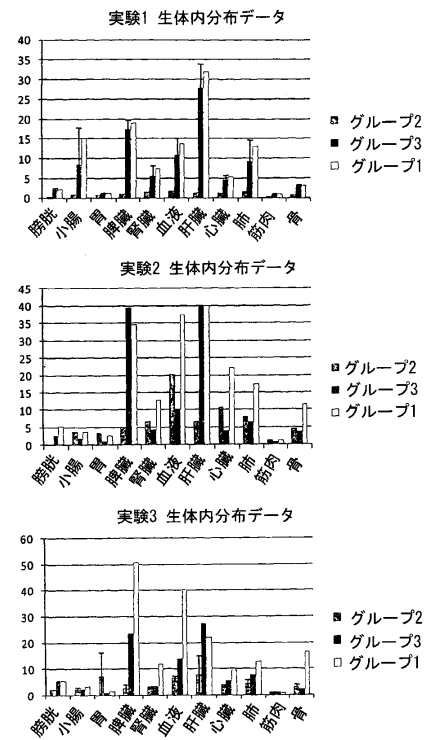


Figure 10

【図 11 A】



【図 11 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 7 F 5/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
 C 0 7 F 15/02 (2006.01) C 0 7 D 213/69 C S P
 C 0 7 F 5/00 H
 C 0 7 F 5/00 J
 C 0 7 F 15/02

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ジェイムズ ラッセル バリンガー

イギリス国, ロンドン, エスイー 1 7イーエイチ, セント トーマス ホスピタル, ランベス
 ウィング, フォース フロア, ザ レイン インスティテュート, ディビジョン オブ イメージ
 ング サイエンス

(72)発明者 デイビッド ベリー

イギリス国, ロンドン, エスイー 1 7イーエイチ, セント トーマス ホスピタル, ランベス
 ウィング, フォース フロア, ザ レイン インスティテュート, ディビジョン オブ イメージ
 ング サイエンス

(72)発明者 フィリップ ジョン プロワー

イギリス国, ロンドン, エスイー 1 7イーエイチ, セント トーマス ホスピタル, ランベス
 ウィング, フォース フロア, ザ レイン インスティテュート, ディビジョン オブ イメージ
 ング サイエンス

(72)発明者 マ ヨンミン

イギリス国, ロンドン, エスイー 1 9エヌエイチ, スタンフォード ストリート 150, フラ
 ンクリン - ウィルキンス ビルディング, インスティテュート オブ ファーマシューティカル
 サイエンス

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 国際公開第2009/021947(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 D
 C 0 7 F
 A 6 1 K
 A 6 1 P
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)