

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6764460号
(P6764460)

(45) 発行日 令和2年9月30日(2020.9.30)

(24) 登録日 令和2年9月15日(2020.9.15)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 5/093 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)C07K 5/093
A61K 51/08 200

請求項の数 6 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2018-226733 (P2018-226733)
 (22) 出願日 平成30年12月3日 (2018.12.3)
 (65) 公開番号 特開2019-196348 (P2019-196348A)
 (43) 公開日 令和1年11月14日 (2019.11.14)
 審査請求日 平成30年12月3日 (2018.12.3)
 (31) 優先権主張番号 107115646
 (32) 優先日 平成30年5月9日 (2018.5.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 台湾(TW)

(73) 特許権者 599171866
 行政院原子能委員會核能研究所
 台灣32546桃園市龍潭區佳安里文化路
 1000號
 1000 Wenhua Rd. Jiaan
 n Village, Longtan D
 istrict, Taoyuan City 32546, Taiwan
 (74) 代理人 100169904
 弁理士 村井 康司
 (74) 代理人 100159916
 弁理士 石川 貴之
 (72) 発明者 林武智
 台灣桃園市龍潭區佳安里文化路1000號

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヘキサ乳糖NOTA誘導体、ヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法及びヘキサ乳糖陽電子肝受容体造影剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法 (hexamer lactose positron liver receptor contrast agent Ga-68 radiolabeled method) であって、

トリエチルアミン (triethylamine) / デミチルホルムアミド (dimethyl formamide) に溶解しているヘキサ乳糖 (HexaLac) であるAHA-Asp[DCM-Lys(ah-Lac)₃]₂と、p-NCS-benzyl-NODA GA (p-thiocyanate-benzyl-triazanonane diacetic acid-glutamic acid) とを反応させて、HexaLac-NCS-benzyl-NODA GAを得るステップと、

Ga-68と、酢酸ナトリウムを含むHexaLac-NCS-benzyl-NODA GAとを、凍結乾燥アンプル (freeze drying ampoule) に添加して室温で反応させるステップと、

を含む、

ヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法。

【請求項2】

前記室温での反応は、15分間行われることを特徴とする、

請求項1に記載のヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法。

【請求項3】

前記室温での反応は、pH4.8 ± 0.2の条件で行われることを特徴とする、

請求項1に記載のヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法。

【請求項4】

完成した標識物は、Ga-68がキレートされるHexaLac-NCS-benzyl-NODA GAであることを

特徴とする、

請求項1に記載のヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法。

【請求項5】

標識物のHexaLac-NCS-benzyl-NODA GAは、6個の配位結合によってGa-68がキレートされる特徴とする、

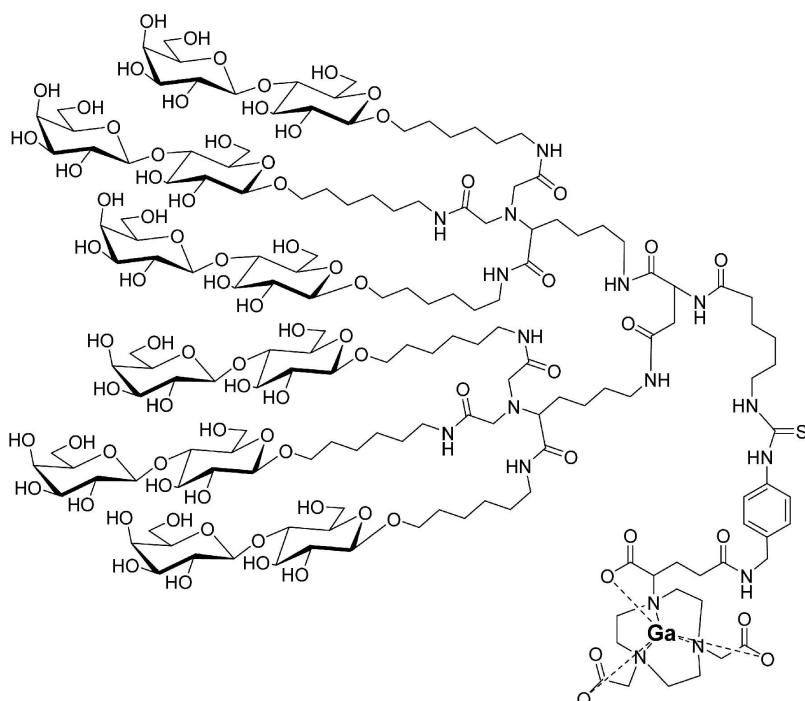
請求項1に記載のヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法。

【請求項6】

前記ヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤は、下記の化学式で示される構造を有することを特徴とする、

【化1】

10



20

30

請求項1に記載のヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、造影剤の分野に関し、更に詳しくは、ポリラクトース (Polylactose) 分子イメージング陽電子造影剤に適用される準備方法及びその造影剤に関する。

【背景技術】

【0002】

全世界の1/10の人口が慢性肝炎を患っており、これは肝硬変による肝臓がんの危険性が高いグループである。過度に生長した肝細胞の腫瘍、度重なる外科手術、または肝臓の急性発熱により残肝容量が少なくなると、個体によっては肝機能の低下により死亡することもある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

一般的には、医師は従来のコンピュータ断層撮影に基づき、経験に照らし合わせて判断を下す。7割の肝臓を切除しても個体は生存可能であるが、但し、びまん性肝臓がんや肝硬

40

50

変の個体は単純に肝臓の体積によって生存している肝細胞がどれだけ残されているのかを判断するのは難しく、肝臓の保存を正確に評価する方法を確立する必要があった。手術前に必要な残肝容量を評価するのみならず、肝臓がんの切除手術及び肝臓移植後に必要な残肝容量の定期的評価を行い、肝臓の回復及び維持状況を確実に把握する必要がある。臨床における交換する肝臓の残肝容量の閾値の評価方法は確立されていない。このため、残肝容量を精確に測定する検査技術を開発し、臨床における残肝容量の閾値を決定することは非常に重要なマイルストーンとなる。

【 0 0 0 4 】

1968年にAswellとMorellの両教授は、正常な肝細胞の表面には「アシアロ糖タンパク質レセプター (asialoglycoprotein receptor)」と呼ばれる非常に特殊な受容体が存在することを発見した。アシアロ糖タンパク質レセプターは末端に乳糖またはガラクトース基を有するグリコペプチドと強力に結合される。上述の特性を利用して多くの人がアシアロ糖タンパク質レセプター造影標識を開発し、残肝容量の評価を行っている。10

【 0 0 0 5 】

また、1991年にHa-Kawa教授はTc-99mジエチレントリアミンペニタ酢酸-ガラクトサミン-アルブミン (Diethylenetriamine pentaacetic acid-galactosamine-albumin) を提出し、且つTc-99mジエチレントリアミンペニタ酢酸 - ガラクトサミン - アルブミンを臨床で応用している（日本ではNihon Medi-Physicsが製造を担っている）。造影結果は正常な人と慢性肝硬変の個体とでは、肝臓のTc-99m ディエチレントリアミンペニタ酢酸-ガラクトサミン - アルブミンの吸収に関して有意な統計的差異が生じる (Ha-Kawa SK, Tanaka Y. A quantitative model of technetium-99m-DTPA-galactosyl-HSA for the assessment of hepatic blood flow and hepatic binding receptor. J Nucl Med 1991;32 (12) :2233-40.)。20

【 0 0 0 6 】

なお、2010年に楊教授はTc-99m生物体分布データを発表し、結果はバックグラウンド干渉の吸収が30%にも達することを示した (Yang W, Mou T, Zhang X, Wang X. Synthesis and biological evaluation of (99m)Tc-DMP-NGA as a novel hepatic asialoglycoprotein receptor imaging agent. Appl Radiat Isot 2010;68 (1) :105-9.)。Tc-99mの供給源は欠乏しているため、Ga-68 DTPA-GSAを開発する者も現れ、特にGa-68溶液の規格は既にヨーロッパでの臨床審査を通過しており、欧州薬局方に加えられている。陽電子設備も増え続け、Ga-68造影標識も追隨して開発されることになる。30

【 0 0 0 7 】

さらに、2013年にHaubner教授等はGa-68 DTPA-GSA及びTc-99m DTPA-GSAの両者の肝標的特性を比較し、動的時間及び吸収される放射能の関係曲線または肝臓での吸収について検討を重ねた。両者の生物的特性は十分酷似しており、血清中における標識物の安定性のみが一致していない。詳しくは、Tc-99m DTPA-GSAは4時間後も安定しているが、Ga-68-DTPA GSAは安定しておらず、安定性は30分間も続かない。GSA以外にも、Tc-99m及びGa-68乳糖アルブミン造影剤を発展させているグループがある。乳糖はガラクトース(galactose)及びブドウ糖で構成され、その末端のガラクトース構造もアシアロ糖タンパク質レセプターと強力に結合するが、但し、乳糖はガラクトースよりもずっと安価であり、コスト節約に効果がある。40

【 0 0 0 8 】

2015年、Choi等の学者は2-(p-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (SCN-Bn-NOTA) からGa-68-SCN-Bn-NOTA-乳糖アルブミン (Lactose albumin) (Ga-68-NOTA-LSA) を発展させて実験を行っている。Choi氏の研究結果に基づくと、pH4.8-6の標識条件において、Ga-68-NOTA-LSAは10分以内に95%を超える標識生成率 (productivity) を達成させた。37の血清中では十分安定しており、その安定時間は少なくとも4時間に達した (Choi J, Jeong JM, Yoo BC, Hong MK, Kim YJ, Lee Y S, et al. Ga-68-labeled neolactosylated human serum albumin (LSA) for PET imaging of hepatic asialoglycoprotein receptor. Nucl Med Biol 2015;42 (1) :53-8.)。50

ここから分かるように、単一光子造影標識から陽電子造影標識に変換されると、キレート剤（Chelating agent）の選択が標識全体の安定性にとって最も重要な鍵となる。Choi氏等の学者による生物体分布研究によると、Ga-68-NOTA-LSAはGSAに対して過度にバックグラウンド干渉しないが、但し、Ga-68-NOTA-LSAはプロテインが主体であり、製薬法規の出願上は生物製剤に属し、小分子ペプチド類に対して製薬のハードルを超えるための検査コストが非常に高かった。この点にペプチド型造影標識に変える優位性と商機がある。

【0009】

2011年に李教授はポリラクトペプチド（Polylactopeptide）を新規のアシアロ糖タンパク質造影標識として提出した（Lee RT, Wang MH, Lin WJ, Lee YC. New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes. Bioorg Med Chem 2011;19(8):2494-500.）。2015年に核エネルギー研究所がインジウム-111（Indium-111）ポリ乳糖ペプチド及びその特性の研究開発を完成させ、一連の急性肝炎、肝臓がん、肝臓切除動物モデルにおいてペプチド型インジウム-111ポリ乳糖をアシアロ糖タンパク質レセプター造影とする場合、背景値が低いという特性を確実に有することを証明し、且つ肝臓がん及び急性肝炎等の肝臓病のマウスと正常なマウスとの差異を有効的に区別することに成功した。また、造影数値及び残肝容量は線形相関を呈する。核エネルギー研究所は更に、マウスの個体の残肝容量が25%以下である場合の個体が肝機能低下により死亡する閾値を初めて提出した。

【0010】

ペプチド型インジウム-111（Peptide Indium-111）ポリ乳糖造影剤は臨床前試験において優れた特異度及び精度を誇る方法であることを証明したが、但し、インジウム-111はサイクロトロンにより生成される核種（nuclide）であるため、使用場所が厳しく制限され、普及が難しかった。

【0011】

そこで、本発明者は上記の欠点が改善可能と考え、鋭意検討を重ねた結果、合理的設計で上記の課題を効果的に改善する本発明の提案に到った。

【0012】

かかる従来の実情に鑑みて、本発明は、ヘキサ乳糖NOTA誘導体、ヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法及びヘキサ乳糖陽電子肝受容体造影剤を提供することを目的とする。すなわち、従来のインジウム-111が普及せず、使用制限があるという問題を解決させる。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記課題を解決するために、本発明のある態様のヘキサ乳糖NOTA誘導体は、p-NCS-benzyl-NODA GAのキレート剤がトリエチルアミンアルカリ性溶剤によりヘキサ乳糖と結合され、六鎖乳糖及びNOTAの結合物が得られ、キレートされたGa-68が陽電子肝受容体造影剤として適合する。

【0014】

本発明のある態様において、ヘキサ乳糖はAHA-Asp[DCM-Lys(ah-Lac)3]2である。

【0015】

本発明のある態様において、NOTA誘導体係はp-チオシアネート-トルエン-トリアザノナン二酢酸-グルタミン酸（p-thiocyanate-toluene-triazanonane diacetic acid-glutamic acid）である。

【0016】

本発明の別の態様は、ヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法は、三価Ga-68、酢酸ナトリウム、及び六鎖乳糖-NOTA結合物を含む凍結乾燥アンプルを室温で反応させる。

【0017】

本発明のある態様において、室温反応の反応時間は15分間である。

【0018】

10

20

30

40

50

本発明のある態様において、室温反応はpH 4.8 ± 0.2 の条件で完成される。

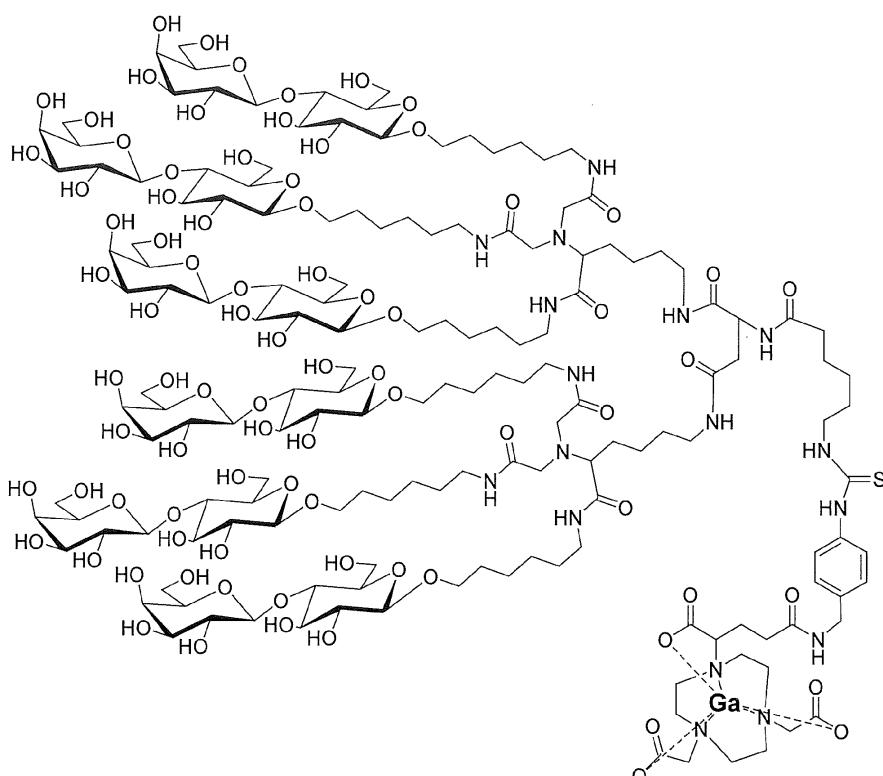
【0019】

本発明のある態様において、標識物（label product）のヘキサ乳糖-チオシアネート-トルエン-トリアザノナン二酢酸-グルタミン酸（HexaLac-thiocyanate-toluene-triazanone diacetic acid-glutamic acid）は6個の配位結合及びGa-68のキレートである。

【0020】

本発明のさらなる他の態様は、ヘキサ乳糖陽電子肝受容体造影剤である。下記化学式Iのとおりである。

【化1】



10

20

30

【0021】

本発明のある態様において、標識物は上述の放射能標識法により準備されて形成される。

【発明の効果】

【0022】

本発明のヘキサ乳糖NOTA誘導体、ヘキサ乳糖陽電子肝臓受容体造影剤のGa-68放射能標識法及びヘキサ乳糖陽電子肝受容体造影剤によると、造影には1.5mLの生理食塩水が添加されて均等に混合されるのみでサンプリングを実行可能であり、いかなる純化工程も必要なく、且つ比放射能は 3.7×10^{15} Bq/molに達する。本発明の標識の効果は安定しており、獲得される標識物の標識生成率は95%以上に達し、且つ安定性が高く、4時間後も90%の放射化学的純度を達成させる。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】トリフルオロ酢酸塩で保護されたヘキサ乳糖構造である。

【図2】HexaLac及びdiBoc-NOTAを示す結合方法である。

【図3】HexaLac diBoc-NOTAでBoc保護基を除去する方法である。

【図4】HexaLac及びNHS-NOTAを示す結合方法である。

【図5】Ga-68及びHexaLac-NCS-Bn-NODA-GAを示す配位結合である

【図6】HexaLac及びp-NCS-Bn-NODAGAを示す結合方法である。

【図7A】Ga-68-HexaLac-NCS-Bn-NODA-GAの放射化学的純度分析マップである。

50

【図7B】free Ga-68の放射化学的純度分析マップである。

【図8】Ga-68-Hexalac-NCS-Bn-NODA-GAの造影図である。

【図9】Hexalac-NCS-Bn-NODA-GAのGa-68標識収率再現性分析である。

【図10】Hexalac-NCS-Bn-NODA-GAのGa-68標識の経時安定性である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明における好適な実施の形態について、添付図面を参照して説明する。尚、以下に説明する実施の形態は、特許請求の範囲に記載された本発明の内容を限定するものではない。また、以下に説明される構成の全てが、本発明の必須要件であるとは限らない。

【0025】

本実施形態では、Ga-68核種が選択され、使用されるGa-68は発生器により製造される。これに比べると、Ga-68発生器があれば容易に獲得可能なGa-68により標識を行うことで、使用上の利便性が大幅に高まる。また、Ga-68は陽電子核種に属し、取得される陽電子画像は単一光子造影画像よりも明晰であり、且つ半減期は68分間しかなく、標的として造影診断に用いるのに極めて適合している。本発明の実施形態において、ヘキサ乳糖が適合するキレート剤に接続されて放射性同位元素Ga-68の標識を行い、ガリウム-68陽電子肝受容体造影剤として開発された。

【0026】

金属キレート剤の選択において、DTPA及び1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid(DOTA)は金属のキレートによく用いられるキレート剤である。然しながら、Ga-68は小さく、1,4,7-triazanonane triacetic acid(NOTA)の環状キレート剤はGa-68の大きさの金属をより緊密に掴む。よって、以下ではNOTA系統のキレート剤が選択されてヘキサ乳糖との結合反応を生じさせ、diBocNOTA(di-tert-butyl oxycarbonyl protecting NOTA)、NHS-NOTA(N-hydroxysuccinimidetriazanonane)及びp-NCS-Bn-NODA-GA(2,2'-(7-(1-carboxy-4-(4-isothiocyanatobenzyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acidを含み、この中から最適化されたキレート剤が選択される。

【0027】

本発明の特徴及び実施に関し、最も好ましい実施形態について詳細に説明する。

【実施例1】

【0028】

ヘキサ乳糖の準備

トリフルオロアセテートにより保護される白色固体ヘキサ乳糖の構造を図1に示し、その化合物の分析データは次のとおりである。C140H247F3N12O76; TLC RP-18(MeOH/1%TFA=5:5) R_f=0.26; ¹H NMR(300 MHz, D₂O) δ 4.46(t, J=6.0 Hz), 4.30(d, J=7.8 Hz), 4.29(d, J=7.8 Hz), 3.83-3.06(m), 2.53(dd, J=14.7, 6.0 Hz), 2.41(dd, J=14.7, 8.4 Hz), 2.12(t, J=6.9 Hz), 1.46-1.19(m); ¹³C NMR(75 MHz, D₂O) δ 176.50, 174.32, 173.28, 172.25, 171.35, 103.08, 102.22, 78.53, 75.50, 74.90, 74.61, 72.99, 72.66, 71.09, 70.66, 68.69, 66.43, 61.17, 60.26, 56.03, 51.07, 39.72, 39.33, 39.19, 35.46, 28.87, 28.49, 27.65, 26.05, 25.54, 24.92, 23.23; ESI-HRMS: calcd for 1124.5350, found: m/z 1124.5314 [M+3 H]⁺。

【0029】

保護工程は次のとおりである。化合物(626mg, 0.186mmol)がトリエチルアミン/エタノール/水に溶かされ(体積比=1:1:8、12mL)、室温で一晩攪拌される(約15時間)。反応が完成した後に減圧濃縮されて乾燥される。次いで、メタノールが添加され(約20mL)、且つ超音波で振動(5分間)された後に白色固体が分離されると共に遠心管内に吸入され、3000 rpm(回転/毎分)で2分間遠心分離される。上層のメタノール上澄み液がピペットにより抽出され、下層の固体が高真空システムにより乾燥され、保護のためのヘキサ乳糖化合物(Hexalac, 503mg)が獲得され、生成率は83%に上る。獲得された化合物分析データは次の通りである。C138H248N12O75; TLC RP-18(MeOH/1%TFA=5:

10

20

30

40

50

5) $R_f = 0.68$; ESI-MS: calcd for 1092.53, found: m/z 1092.97 [M+3H]+3。ヘキサ乳糖はAHA-Asp[DCM-Lys (ah-Lac) 3]2であり、即ちaminohexnoyl-aspartic acid[dicarboxy methyl-L-Lys (aminohexyl-lactose) 3]2であり、略称はHexaLacである。

【実施例 2】

【0030】

diBoc-NOTAによりヘキサ乳糖 (HexaLac) が結合される

HexaLac及びdiBoc-NOTAの結合合成経路を図2に示す。二口フラスコが窒素に通され、HexaLac-NH₂ (1当量, 10 mg, 0.003 mmol) 、HBTU (N,N,N',N'-Tetramethyl-0-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, 2.0当量, 2 mg, 0.006 mmol) 、diBoc-NOTA (di-tert-butyloxycarbonyl protecting NOTA, 2当量, 2.5 mg, 0.006 mmol) 、ジメチルホルムアミド (DMF, 0.2mL) がサンプルフラスコに添加される。続いて、DIEA (diethylamine, 4.0当量, 1 μL, 0.012 mmol) が反応フラスコ内に添加され、1時間攪拌される。反応の終結後に酢酸エチル (ethylacetate, EA) が添加されて生成物が分離される。続いて、遠心分離が行われて上澄み液が除去される。その後、EAが再度添加されて洗浄、遠心分離、上澄み液の除去の上述の工程が3回重複して実行される。最後に、自動的に高速に中圧液体クロマトグラフィー (MPLC) が準備されて純化が行われ、使用されるカラムはRP-18カラム (MeOH/H₂O = 40%/60% e MeOH/H₂O = 100%/0%) である。獲得される生成物はHexaLac-diBocNOTA計10mgであり、生成率は89%である。

【0031】

次は、Boc保護基が除去される。HexaLac-diBocNOTAによるBoc保護基の除去方法の経路は図3に示す。まず、HexaLac-diBocNOTA (1.0当量, 10 mg, 0.003 mmol) 及びメタノール (0.5 mL) が計測されてサンプルフラスコに加えられる。続いて、ナトリウムメトキシド (20.0当量, 3.2 mg, 12.5 mmol) が反応フラスコ内に添加され、2時間攪拌された後に白色固体が分離される。続いて、遠心分離が行われ、上澄み液が除去され、且つ少量のメタノール (0.5 mL) が再度添加されて洗浄が行われ、上澄み液が除去され、上述の工程が3回重複して実行される。その後、HPLCにより純化されて分離される (アセトニトリル / 1% TFA = 5% / 95% e アセトニトリル / 1% TFA = 70% / 30%) 。獲得される生成物はHexaLac-NOTA計2mgであり、生成率は25%である。然しながら、diBocNOTAを使用してHexaLac-diBocNOTAを合成する方法において、基の保護工程では、アルカリ性または酸性の反応条件を使用する必要があるため、HexaLac自体に容易に影響が及び、安定性が低く、生成物が容易に分解されて生成物が得られなくなった。このため、他の実施形態では、tert-butyloxycarbonyl保護基のNOTA誘導体を使用しない。

【実施例 3】

【0032】

NHS-NOTAによりヘキサ乳糖 (HexaLac) が結合される

保護を解除する際の反応条件が強烈すぎて反応が失敗することを避けるため、NHS-NOTAが反応試薬として使用される。詳しくは、活性化されたNHS反応端がHexaLacに接続され、よって別途の保護反応が不要となる。HexaLac及びNHS-NOTAの結合合成経路を図4に示す。まず、HexaLac-NH₂ (1当量, 10 mg, 0.003 mmol) がサンプルフラスコに加えられ、ジメチルホルムアミド (1 mL) 、トリエチルアミン (0.002mL) が添加されて溶解される。続いて、N-ヒドロキシコハク酸イミド-トリアゼパン二酢酸 (N-hydroxysuccinimidetriazanone, i.e. NOTA-NHS) (2当量, 0.004 mg, 0.006 mmol) が添加される。2時間攪拌された後、ジエチルエーテルが添加されて生成物が分離される。続いて、遠心分離、上澄み液の除去が行われ、ジエチルエーテルが再度添加されて洗浄が行われ、再度遠心分離、上澄み液の除去が行われ、上述の工程が3回重複して実行される。最後に、MPLCにより純化が行われ、使用されるカラムはRP-18 (MeOH/H₂O = 10% / 90% e MeOH/H₂O = 100% / 0%) である。獲得される生成物はHexaLac-NOTA 計4mgであり、生成率は30%である。然しながら、本実施形態において合成されるHexaLac-NOTAは後続の同位元素標識実験における標識条件において安定性が不足している。

【0033】

10

20

30

40

50

以下、上述の同位元素標識実験について更に説明する。Ga-68によりHexaLac-NOTA放射能標識法が行われ、Yu (2015) (Yu HM, Chen JH, Lin KL, Lin WJ. Synthesis of (68) Ga-labeled NOTA-RGD-GE11 heterodimeric peptide for dual integrin and epidermal growth factor receptor-targeted tumor imaging. J Labelled Comp Radiopharm 2015;58 (7):299-303.) を参照する。まず、0.5mLのGa-68 (~185 MBq) が10μLの0.1MのHEPES緩衝液(pH7-7.6)に添加される。続いて、0.1MのHClにより調整された溶液のpH値が4.0-4.5の範囲になる。続いて、50μgのNOTA-HexaLacが添加され、超音波振動が30分間行われる(他の実施形態では、90°Cで30分間加熱してもよい)。

【0034】

10

本実施形態の標識生成率が90%以上に達するのは難しく、加熱が必要である。マイクロ波により加熱されて標識が補助されると、標識生成率が99%以上まで高まるが、然しながら、標識された生成物は不安定であり、容易に分解される。質量分析計による分析では多くの断裂化合物が対応するピーク値が見られ、標識される生成物が極めて不安定であることを示す。即ち、ヘキサ乳糖キレート物は不安定である。然しながら、室温で標識を行うと、キレート剤NOTAとヘキサ乳糖分子との間の距離が近すぎるため、標識生成率が非常に低くなる。

【実施例4】

【0035】

p-NCS-benzyl-NODA-GAによりヘキサ乳糖(HexaLac)が結合される

20

上述したように、上述の同位元素標識実験の問題を克服するため、以下の実施形態では、p-NCS-NODA-GAをキレート剤として利用する。一方では、NOTAとヘキサ乳糖との間の距離が遠すぎるため、金属がキレートされる際のヘキサ乳糖による立体障害が減少し、もう一方では、ヘキサ乳糖のアミノ基がp-NCS-NODA-GAのイソチオシアネートにより形成されるチオ尿素に結合され、これはワンポットクリックケミストリーに属し、工程が簡略化され、且つ保護工程も不要である。また、六配位結合はNODA-GA及びGa-68のキレートを安定させる(Ga-68及びHexaLac-NCS-Bn-NODA-GAの配位結合は図5に示す)。

【0036】

HexaLac及びp-NCS-Bn-NODA-GAの結合合成経路は図6に示す。まず、HexaLac-NH₂(39.7mg, 12μmol)がトリエチルアミン/ジメチルホルムアミド(0.3mL/3mL)に溶かされる。続いて、チオシアネート-トルエン-トリアザノナンジアセテート-グルタメート(p-NCS-benzyl-NODA-GA, 12.6mg, 24μmol, Chematech, France. FW=521.59)が添加され、反応が発生し、6時間攪拌される。続いて、ジエチルエーテル(30mL)が添加されて固体が分離される。遠心分離された後に上澄み液が除去される。その後、ジエチルエーテル(30mL)が再度添加され、超音波振動が5分間行われる。続いて、遠心分離、上澄み液の除去が行われ、固体の粗生成物が取得される。獲得される粗生成物は自動的に高速に中圧液体クロマトグラフィーが準備されて純化される。続いて、減圧濃縮及び冷凍乾燥された後にHexaLac-NCS-benzyl-NODA-GA(38.0mg, 10μmol)が得られる。本実施形態の生成率は82%である。20mgのHexa-lactoside-NOTAが0.1%のTFA/ddH₂O(0.5mL)に溶かされる。続いて、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置(ABI 4000Q Trap LC/MS/MS)により計測が行われ、得られる信号ピーク値は1266.6[M+3H]³⁺であり、分子量は3797である。

30

【0037】

40

HexaLac-NCS-Bn-NODA-GAの質量分析図を以下に示す。¹H NMR(400 MHz, D₂O,) : 7.34-7.32(d, J = 8.0, 2H, ArH), 7.23-7.21(d, J = 7.6, 2H, ArH), 4.41(d, J = 8.0, 6H, HLac-1), 4.40(d, J = 7.6, 6H, HLac-1), 2.81-3.94(m, 137H), 1.22-2.54(m, 72H). ¹³C NMR(400 MHz, D₂O,) : 178.45(CO), 176.42(CO), 175.60(CO), 174.65(CO), 174.24(CO), 173.23(CO), 172.20(CO), 171.36(CO), 128.71(CH, aromatic), 125.93(CH, aromatic), 103.05(CH, CLac-1), 102.18(CH, CLac-1), 78.64(CH), 75.44(CH), 74.85(CH), 74.59(CH),

50

72.97 (CH), 72.67 (CH), 71.06 (CH), 70.58 (CH₂, CAh-1), 68.66 (CH), 66.95 (CH), 66.39 (CH), 61.09 (CH₂), 60.29 (CH₂), 57.83 (CH₂), 56.03 (CH₂), 51.48 (CH₂), 51.01 (CH), 49.45 (CH₂), 46.80 (CH₂), 42.70 (CH₂), 39.28 (CH₂), 39.15 (CH₂), 37.76 (CH₂), 35.50 (CH₂), 32.81 (CH₂), 28.83 (CH₂), 28.43 (CH₂), 26.00 (CH₂), 25.65 (CH₂), 25.56 (CH₂), 25.04 (CH₂), 24.87 (CH₂), 23.24 (CH₂), 23.09 (CH₂). HSQC: Correlation 128.71 (CH, aromatic) to 7.33 (d, J = 8.0, 2H, ArH), 125.93 (CH, aromatic) to 7.22 (d, J = 7.6, 2H, ArH), 103.05 (CH, CLac-1) to 4.41 (d, J = 8.0, 6H, HLac-1), 102.18 (CH, CLac-1) to 4.40 (d, J = 7.6, 6H, HLac-1) となる。

【0038】

10

Ga-68によりHexaLac-NCS-benzyl-NODA-GAの標識を行う。本標識のフローチャートはKnetsch (2011) の方法 (Knetsch PA, Petrik M, Griessinger CM, Rangger C, Fani M, Kessenheimer C, et al. [68Ga]NODAGA-RGD for imaging alphavbeta3 integrin expression. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2011;38 (7) :1303-12.) を参照する。まず、注射器で0.5 mL (10 ± 1 mCi/mL) の塩化ガリウム (Ga-68) 溶液が抽出される (NODAGA-RGD for imaging alphavbeta3 integrin expression. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2011;38 (7) :1303-12.)。続いて、40 μg のHexaLac-NCS-benzyl-NODA-GAを含む13.61 mg の酢酸ナトリウムが凍結乾燥アンプルに添加されて1~2分間完全に溶解され、15分間静置される。続いて、1.5 mL の生理食塩水が添加されて均等に混合され、後続のサンプリングの分析及び造影が実行される。標識の結果、放射化学的純度の分析は図7 A 及び図7 B に示す。造影の結果は図8 に示す。標識が連続5回実行され、40 mg のNOTA-HL及び5 ± 1 mCi の放射性Ga-68が使用される。その標識効果は安定しており、生成物の放射化学的純度は95%以上に達する。標識生成率の再現性は図9 に示す。安定性の時間経過の結果は図10 に示す。図示するように、標識物の安定性は良好であり、安定剤の添加の有無によらず、標識物は4時間後も90%以上の放射化学的純度を保つ。

20

【実施例5】

【0039】

30

Ga-68-HexaLac-NCS-benzyl-NODA-GAの放射化学的純度検査

10 mL の0.1MのEDTA溶液が現像タンクに添加され、RP-TLC片の1 cm箇所及び5 cm箇所がそれぞれorigin(原点)及びsolvent frontと標示される。その後、少量のサンプル(1-2 μL)が取り出され、RP-TLC片のoriginの箇所に添加され、ピンセットで現像タンクに入れられる。現像液がsolvent frontに達すると、ピンセットで取り出された後に乾燥される。radio-TLC imaging scannerによりITLC-SG片がスキャンされ、スキャン画像が1分間収集される。結果の計算方式は以下のとおりである。

【数1】

$$\text{Radiochemical purity (\%)} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

【0040】

A:The count area of the 68Ga-hexa-lactoside peak (Rf = 0.0-0.2)

40

B:The count area of all peaks

【実施例6】

【0041】

Ga-68-HexaLac-NCS-benzyl-NODA-Ga陽電子造影

Ga-68-HexaLac-NCS-benzyl-NODA GA (15uCi/g) を尻尾からマウスの体内静脈注射し、注射後に即時 PET/CT造影を15分間実行する。造影時にはisofluraneにより実験動物に麻酔をかけ、造影完成後にPET/CT画像と結合され、造影結果は再度図8を参照する。

【0042】

従って、本明細書に開示された実施例は、本発明を限定するものではなく、説明するためのものであり、このような実施例によって本発明の思想と範囲が限定されるものではない

50

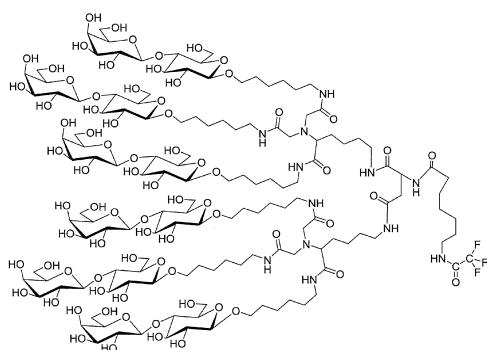
。本発明の範囲は特許請求の範囲により解釈すべきであり、それと同等の範囲内にある全ての技術は、本発明の権利範囲に含まれるものと解釈すべきである。

【符号の説明】

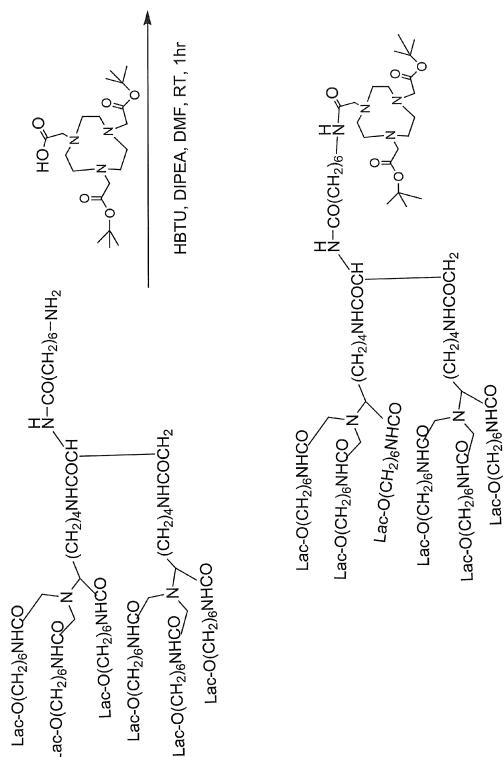
【0043】

なし

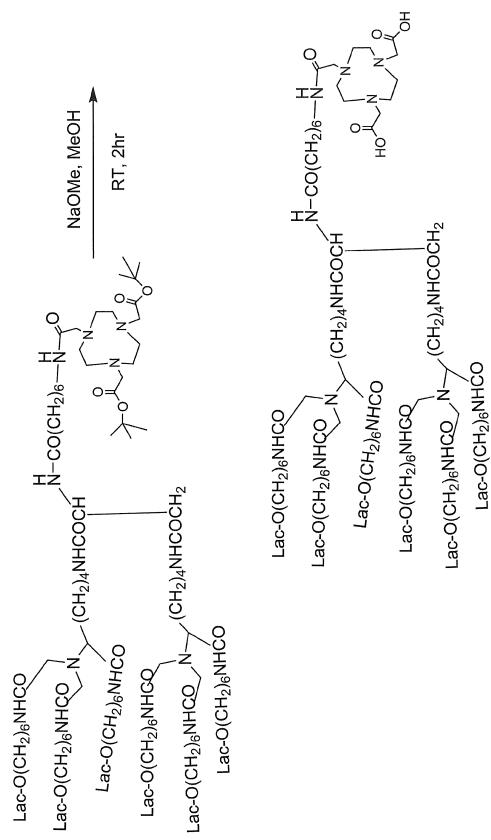
【図1】



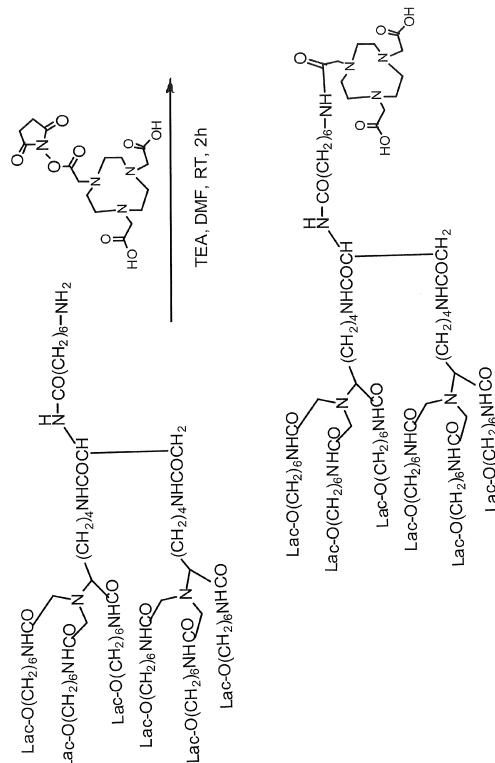
【図2】



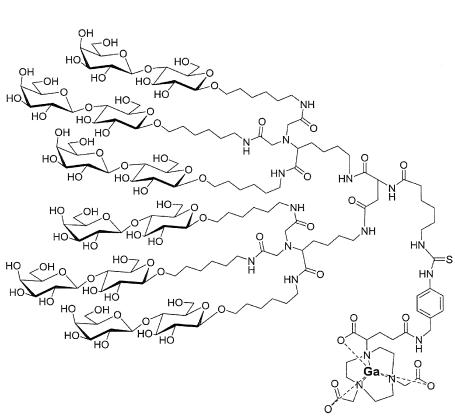
【 四 3 】



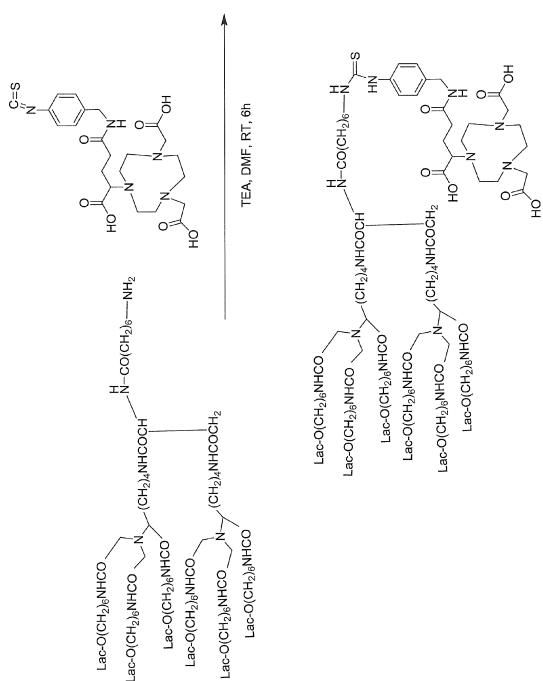
【図4】



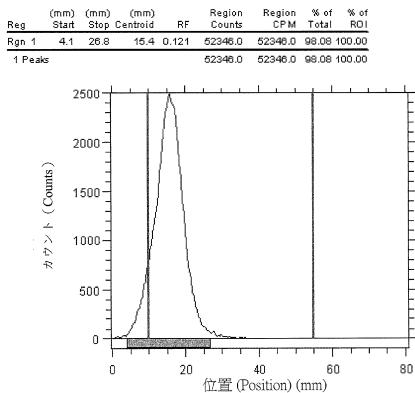
【 四 5 】



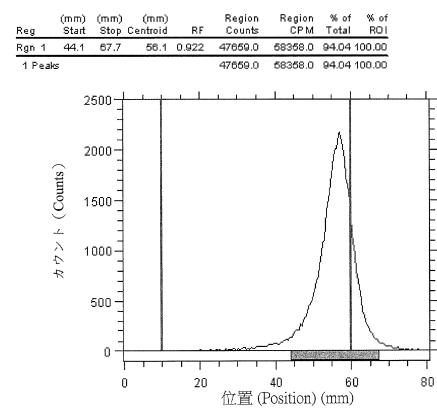
【図6】



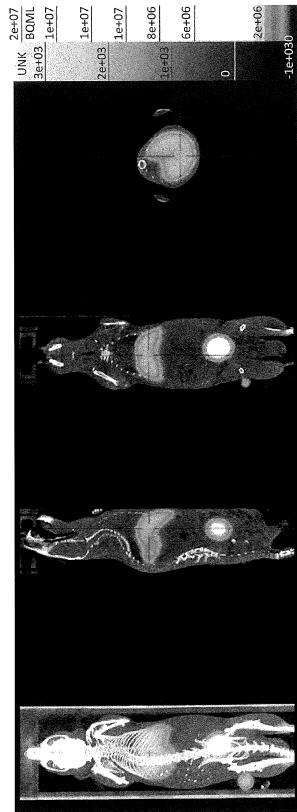
【図7A】



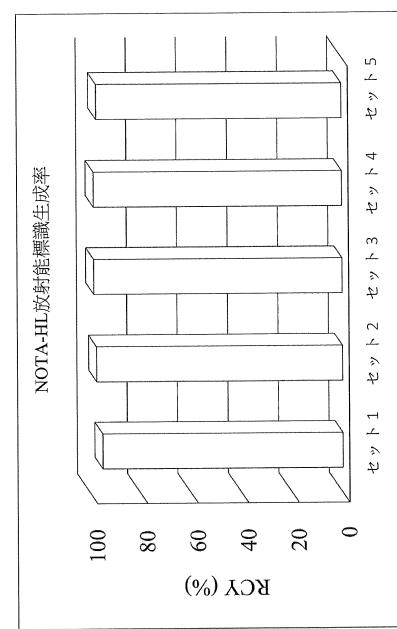
【図7B】



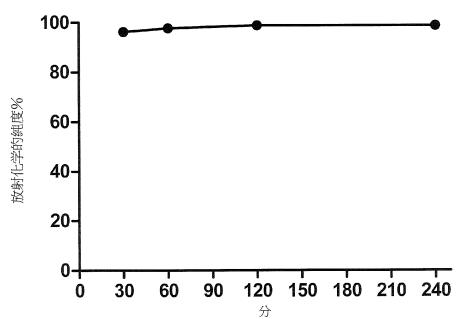
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 王美惠
台灣桃園市龍潭區佳安里文化路1000號
(72)発明者 于鴻文
台灣桃園市龍潭區佳安里文化路1000號
(72)発明者 林昆諒
台灣桃園市龍潭區佳安里文化路1000號
(72)発明者 江 彦 鋒
台灣桃園市龍潭區佳安里文化路1000號
(72)発明者 陳瑞宇
台灣桃園市龍潭區佳安里文化路1000號

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 特開2017-114842(JP, A)
米国特許出願公開第2011/0097265(US, A1)
米国特許第9040017(US, B2)
BANERJEE, S. R. et al., Clinical applications of Gallium-68, Appl. Radiat. Isot., 2013年, Vol. 76, pp. 2-13

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 07K 1/00 - 19/00
A 61K 49/00 - 49/22
A 61K 51/00 - 51/12
J ST P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E
/ B I O S I S / W P I D S (S T N)
P u b M e d