

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6701217号
(P6701217)

(45) 発行日 令和2年5月27日 (2020.5.27)

(24) 登録日 令和2年5月8日 (2020.5.8)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 213/65 (2006.01)

C O 7 D 213/65 Z N A

C O 7 D 215/20 (2006.01)

C O 7 D 215/20

A 6 1 K 51/12 (2006.01)

A 6 1 K 51/12 1 0 0

A 6 1 K 51/04 (2006.01)

A 6 1 K 51/04 1 0 0

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 D

請求項の数 19 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-545878 (P2017-545878)
 (86) (22) 出願日 平成27年11月24日 (2015.11.24)
 (65) 公表番号 特表2018-503679 (P2018-503679A)
 (43) 公表日 平成30年2月8日 (2018.2.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/062502
 (87) 国際公開番号 W02016/086036
 (87) 国際公開日 平成28年6月2日 (2016.6.2)
 審査請求日 平成30年11月12日 (2018.11.12)
 (31) 優先権主張番号 62/084,366
 (32) 優先日 平成26年11月25日 (2014.11.25)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 391015708
 ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
 パニー
 BRISTOL-MYERS SQUIB
 B COMPANY
 アメリカ合衆国08543ニュージャージ
 ー州 プリンストン、ルート206アンド
 ・プロビンス・ライン・ロード
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 睦
 (74) 代理人 100126778
 弁理士 品川 永敏
 (74) 代理人 100162684
 弁理士 呉 英燦

最終頁に続く

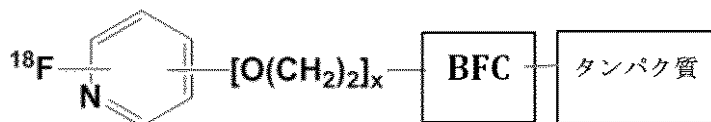
(54) 【発明の名称】 生物学的製剤の ^{18}F -放射性標識方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の構造：

【化1】



〔式中、

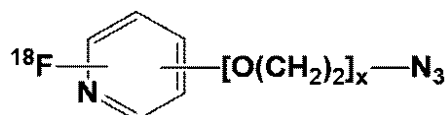
(a) ^{18}F は N 原子に対してオルト位であり、

x は 1 ~ 8 の整数であり、

(b) B F C は、 ^{18}F -放射性標識補欠分子族に共有結合した二価結合性基であり、

ここで、当該共有結合は、以下：

【化2】



の構造を有するアジドと、シクロオクチンに基づく化合物との 1, 3 - 双極子付加環化によって形成され；

(c) BFC は、ポリエチレングリコール (PEG)_y スペーサーアーム [式中、y は 1 ~ 8 の整数である] を含み、ここで、(PEG)_y スペーサーアームは、タンパク質上のアミン、カルボキシル、カルボニル、またはチオール基に共有結合した化学基を含み；

(d) タンパク質は抗体、抗体フラグメントまたはフィブロネクチンベースのスクヤホールドである]

を有する、¹⁸F - 放射性標識補欠分子族、二価結合性 (BFC) 基およびタンパク質を含む、¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ、またはその薬学的に許容可能な塩。

10

【請求項 2】

タンパク質がフィブロネクチン III (Fn3) 型ドメインである、請求項 1 記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

【請求項 3】

[O(CH₂)₂]_x 部位が、ピリジン環の 3 位、ピリジン環の 2 位、またはピリジン環の 4 位に存在する、請求項 1 記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

【請求項 4】

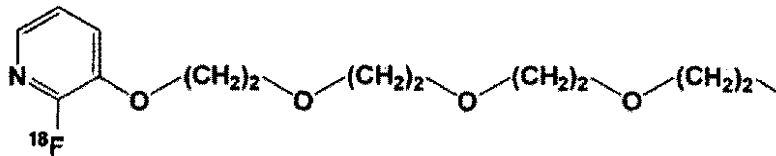
x が 2 ~ 6、3 ~ 5、または 4 の整数である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

20

【請求項 5】

¹⁸F - 放射性標識補欠分子族が構造：

【化 3】



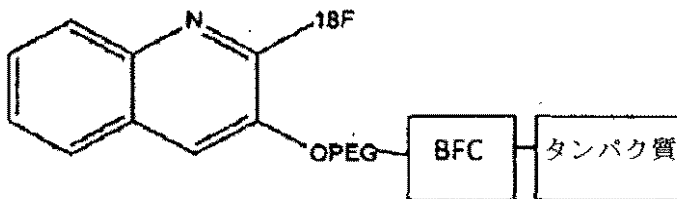
を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

30

【請求項 6】

下記の構造：

【化 4】



40

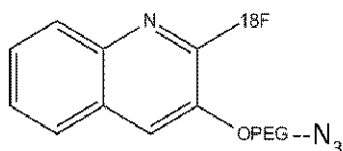
[式中、

(a) 「OPEG」は [O(CH₂)₂]_x であり、

x は 1 ~ 8 の整数であり、

(b) BFC は、¹⁸F - 放射性標識補欠分子族に共有結合した二価結合性基であり、ここで、当該共有結合は、以下：

【化 5】



の構造を有するアジドと、シクロオクチンに基づく化合物との 1, 3 - 双極子付加環化によって形成され；

10

(c) BFC は、ポリエチレングリコール (PEG)_y スペーサーアーム [式中、y は 1 ~ 8 の整数である] を含み、ここで、(PEG)_y スペーサーアームは、タンパク質上のアミン、カルボキシル、カルボニル、またはチオール基と共有結合した化学基を含み；

(d) タンパク質は抗体、抗体フラグメントまたはフィブロンекチンベースのスクキャホールドである]

を有する、¹⁸F - 放射性標識補欠分子族、二価結合性 (BFC) 基およびタンパク質を含む、¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ、またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 7】

タンパク質がフィブロンекチン III (Fn3) 型ドメインである、請求項 6 に記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

20

【請求項 8】

x が 2 ~ 6、3 ~ 5 または 4 の整数である、請求項 6 または 7 に記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ、またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 9】

シクロオクチンに基づく化合物がジベンゾシクロオクチンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

【請求項 10】

シクロオクチンに基づく化合物がアザジベンゾシクロオクチンである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

30

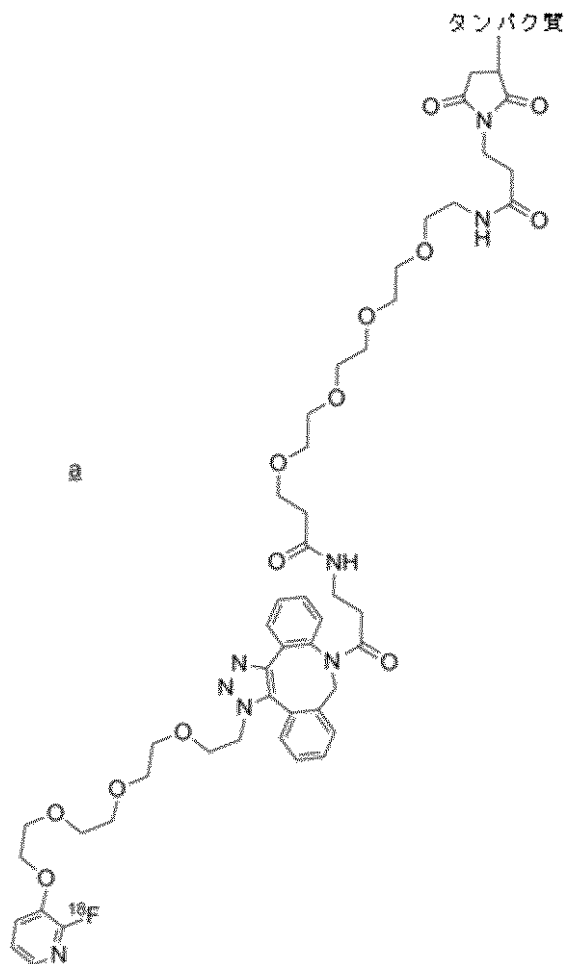
【請求項 11】

シクロオクチンに基づく化合物が DBCO - PEG4 - NHS - エステル、DBCO - スルホ - NHS - エステル、DBCO - PEG4 - 酸、DBCO - PEG4 - アミンまたは DBCO - PEG4 - マレイミドである、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の ¹⁸F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

【請求項 12】

以下の構造：

【化 6】



10

20

[式中、

B F C のマレイミド基はタンパク質のシステイン残基のチオール基に共有結合する]を有する、請求項 1 記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

30

【請求項 1 3】

システイン残基がタンパク質の C 末端に位置する、請求項 1 2 記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

【請求項 1 4】

プロープのタンパク質部位が固形癌、造血癌、血液癌、自己免疫性疾患、神経変性疾患、心血管疾患、および病原性感染から成る群から選択される疾患に関係する生体分子に結合する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

【請求項 1 5】

プロープが腫瘍関連抗原または病原体に存在するタンパク質に結合する、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープ。

40

【請求項 1 6】

対象における疾患の存在の検出に用いるための請求項 1 4 または 1 5 に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープであって、検出が該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープが疾患の存在に関係する標的分子に結合することにより対象の少なくとも 1 部分の放射線画像における当該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープの存在または非存在を検出すること；

を含み、バックグラウンドを超える前記 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープの存在および位置が疾患の存在および位置の指標となる、プロープ。

【請求項 1 7】

50

対象における疾患の進行のモニターに用いるための請求項 1 4 または 1 5 に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープであって、モニターが

(a) 該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープが疾患の存在に係る標的分子に結合することにより、対象の少なくとも 1 部分の画像から、最初の時点において、疾患細胞または組織の量を検出する工程；および

(b) その後の 1 回以上の時点において、対象の少なくとも 1 部分の画像を得る工程を含み、それぞれの時点における疾患細胞または組織の大きさおよび位置が疾患の進行の指標となる、プロープ。

【請求項 1 8】

対象の疾患細胞または組織の定量に用いるための請求項 1 4 または 1 5 に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープであって、定量が当該疾患細胞または組織と共に存在する標的分子に結合した該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープにおける ^{18}F の放射性放射を検出することを含み、疾患細胞または組織における放射性放射の量および分布が疾患細胞または組織の定量的な測定基準となる、プロープ。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 つに記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープおよび薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本願は、米国仮出願第 6 2 / 0 8 4 , 3 6 6 号、表題「生物学的製剤の ^{18}F - 放射性標識のための方法および組成物」(2 0 1 4 年 1 1 月 2 5 日出願) の優先権を主張し、その内容は引用により本明細書に援用される。

【技術分野】

【0 0 0 2】

本発明は ^{18}F - 補欠分子族に関し、体内の様々なプロセスをイメージングするため、疾患病状に関連する分子の位置を検出するため、および疾患の進行をモニターするための、 ^{18}F - 標識組成物の合成および使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

陽電子放出断層撮影 (P E T) は、高い感受性 (フェムトモル) および高分解能 (4 - 1 0 mm) を有し、組織成長を定量化することができる、診断医学および創薬において最も広く用いられる方法のうちの 1 つになっている非侵襲性のイメージング技術である。P E T イメージングによって得られる生体内の生物学的プロセスに関する有益なインビボ機能の情報によって、前臨床および臨床の両方において同じ手段を用いることができるという、固有の翻訳可能な医療上の利点もまた得られる。

【0 0 0 4】

P E T は ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{11}C 、 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{66}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 、 ^{94}mTc 、 ^{86}Y および ^{124}I などの陽電子放出放射性同位体によって標識される分子の設計および合成を利用する。インビボにおいて、これらの放射性トレーサーまたは放射性リガンドは同位体の核から、用いられる同位体に応じてエネルギーの異なる陽電子を放出する。放出された陽電子のエネルギーは、陽電子が電子と衝突して反対方向に 5 1 1 k e V の 2 つのガンマ線を放出する前に、陽電子が移動する平均距離を制御する。この陽電子消滅によって生じるガンマ線が P E T イメージングスキャナーによって検出され、放射性トレーサーの分布を時間関数として明らかにする平面および断層画像が得られる。そのため、P E T イメージングにおいて、対消滅の前の陽電子の移動距離および、ガンマ線、アルファ粒子またはベータ粒子など他の放出によって起こる線量測定問題を最小化するためには、低い放出エネルギーを持つ同位体の純粋な陽電子放射体である同

10

20

30

40

50

位体が好ましい。

【0005】

さらに、PETイメージングに用いられる同位体の半減期は、放射性トレーサー分子の合成および解析、患者への注入、インビボでの局在化、非標的組織からのクリアランス、および鮮明な画像の取得に耐えうる十分な長さでなければならない。 ^{18}F ($^{+63}5\text{keV}$ 97%、 $t_{1/2}$ 110分)は、陽電子放出エネルギーが低く、副次的な放出がなく、適切な半減期であるため、最も広く用いられるPET放出同位体の1つである。

【0006】

昔から、ペプチドおよびタンパク質などの生体分子を ^{18}F によってラベル化することは、当該放射性核種のラベル化に必要とされる厳しい反応条件(高温、有機溶媒、および強塩基条件)による困難があった。 ^{18}F によってタンパク質をラベル化するための1つの方法は、厳しいフッ素付加条件に耐えることができる補欠分子族を用いることである。多数の補欠分子族が報告されてきたが(例えば、Nuc l . Med . Bio . 34 : 5 , 2007において総括される)、これらの ^{18}F -標識補欠分子族の多くは有機溶媒を必要とし、水性媒体でのタンパク質またはタンパク質のような分子のラベル化に適切でない、または他の望ましくない性質を有する。

【0007】

そのため、タンパク質およびペプチドなどの ^{18}F -標識標的部位において、インビボイメージング方法に用いるために十分な特異的活性および安定性を保った放射性トレーサー組成物を生成するための迅速で簡単な方法の継続的な需要は未だに存在する。

【発明の概要】

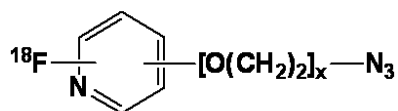
【0008】

本発明は、ポリエチレングリコール(PEG)部位および末端アジドに結合したニトロ-ピリジンを含む ^{18}F -標識補欠分子族の発明の少なくとも1部にに基づき、ここで、補欠分子族は水溶性であり ^{18}F -標識に用いられる他の薬剤よりも揮発性が少なく、当該 ^{18}F -標識補欠分子族を生体分子(例えば、ペプチドおよびタンパク質)に導入する反応はUVによってモニターされうる。これらの有利な特徴によって、生体分子の生物学的な活性を維持する条件下において高効率、迅速および再現可能な ^{18}F -標識-生体分子の生成方法がもたらされる。いくつかの実施態様において、二価結合性(bifunctional conjugating)基(例えば、二価性キレーターなどの環束縛アルキン基)を含む生体分子(例えば、ペプチドおよびタンパク質)は、 ^{18}F -標識補欠分子族の末端アジドと「クリック」生体直交性反応を介して共有結合を形成し、生理学的条件下で安定な放射性標識プローブを生成する。最終産物のUV吸光度はさらに、生成物の放射化学的純度を決定するための実用的、好感度および迅速な解析方法につながる。

【0009】

ある局面において、本明細書では、以下の構造：

【化1】



[式中、

xは1～8の整数である]

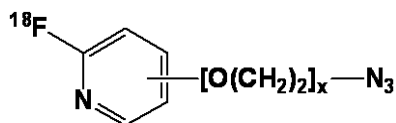
を有する ^{18}F -標識補欠分子族、またはその薬学的に許容可能な塩が示される。いくつかの実施態様において、xは2～6の整数である。いくつかの実施態様において、xは3～5の整数である。いくつかの実施態様において、xは4である。いくつかの実施態様において、 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部位はピリジン環の窒素に対して1～2、1～3または1～4位に存在する。関連する実施態様において、 ^{18}F はN原子に対してピリジン環のオルト位に結合する。いくつかの実施態様において、薬学的に許容可能な塩はフッ化物塩、臭化物塩、塩化物塩およびヨウ化物塩から成る群から選択される。ある実施態様において

、塩はトリフルオロメタンスルホン酸塩である。いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識補欠分子族または薬学的に許容可能な塩は水溶性である。いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識補欠分子族または薬学的に許容可能な塩は不揮発性である。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識化合物は構造：

【化 2】



10

[式中、

x は 1 ~ 8 の整数である]

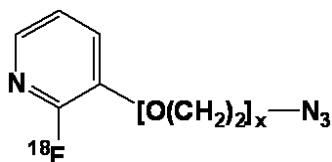
またはその薬学的に許容可能な塩を有する。いくつかの実施態様において、 x は 2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 3 ~ 5 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 4 である。いくつかの実施態様において、 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部位はピリジン環の窒素に対して 1 ~ 2、1 ~ 3 または 1 ~ 4 位に存在する。いくつかの実施態様において、薬学的に許容可能な塩はフッ化物塩、臭化物塩、塩化物塩およびヨウ化塩から成る群から選択される。ある実施態様において、塩はトリフルオロメタンスルホン酸塩

20

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識化合物は構造：

【化 3】



30

[式中、

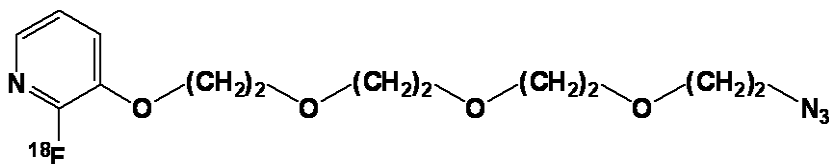
x は 1 ~ 8 の整数である]

またはその薬学的に許容可能な塩を有する。いくつかの実施態様において、 x は 2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 3 ~ 5 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 4 である。いくつかの実施態様において、薬学的に許容可能な塩はフッ化物塩、臭化物塩、塩化物塩およびヨウ化塩から成る群から選択される。ある実施態様において、塩はトリフルオロメタンスルホン酸塩である。いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識補欠分子族または薬学的に許容可能な塩は不揮発性である。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識化合物は構造：

【化 4】



40

またはその薬学的に許容可能な塩を有する。

【 0 0 1 3 】

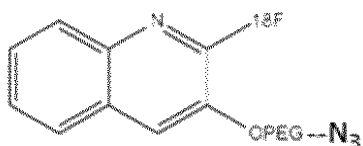
50

いくつかの実施態様において、 ^{18}F -標識補欠分子族のピリジン環は、当該分子のフッ素化反応に干渉しない1つ以上のさらなる置換基を含む。いくつかの実施態様において、さらなる置換基は C_{1-6} アルキルであり、例えばメチル、エチルまたはプロピルである。

【0014】

関連する局面において、本明細書では、構造：

【化5】



10

【式中、

「OPEG」は $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ であり、

x は1～8の整数である]

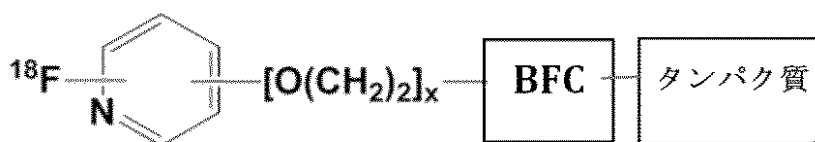
を有する ^{18}F -放射性標識補欠分子族、またはその薬学的に許容可能な塩が示される。いくつかの実施態様において、 x は2～6の整数である。いくつかの実施態様において、 x は3～5の整数である。ある実施態様において、 x は4である。いくつかの実施態様において、 ^{18}F -放射性標識補欠分子族または薬学的に許容可能な塩は不揮発性である。

20

【0015】

いくつかの局面において、本明細書では、本明細書に記載の ^{18}F -放射性標識補欠分子族、二価性のキレーターまたは結合(BFC)基、およびタンパク質を含む、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープが示され、ここで当該放射性標識タンパク質ベースのプロープは以下の構造：

【化6】



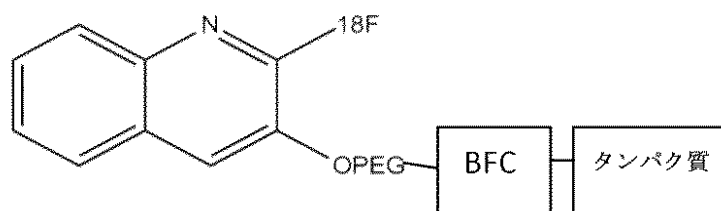
30

またはその薬学的に許容可能な塩を有する。

【0016】

いくつかの局面において、本明細書では、本明細書に記載の ^{18}F -放射性標識補欠分子族、二価性のキレーターまたは結合(BFC)基、およびタンパク質を含む、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープが示され、ここで当該放射性標識タンパク質ベースのプロープは以下の構造：

【化7】



40

またはその薬学的に許容可能な塩を有する。

【0017】

50

いくつかの実施態様において、B F Cはタンパク質上のアミン、カルボキシル、カルボニルまたはチオール官能基と共有結合を形成する反応基を含むシクロオクチンである。いくつかの実施態様において、当該シクロオクチンは、ジベンゾシクロオクチン(D I B O)、ピアリールアザシクロオクチノン(B A R A C)、ジメトキシアザシクロオクチン(D I M A C)およびジベンゾシクロオクチン(D B C O)から成る群から選択される。いくつかの実施態様において、当該シクロオクチンはD B C Oである。

【0018】

いくつかの実施態様において、当該B F Cはポリエチレングリコール(P E G) y スペーサーアームをさらに含み、ここでyは1～8の整数である。いくつかの実施態様において、yは2～6の整数である。いくつかの実施態様において、yは4または5である。

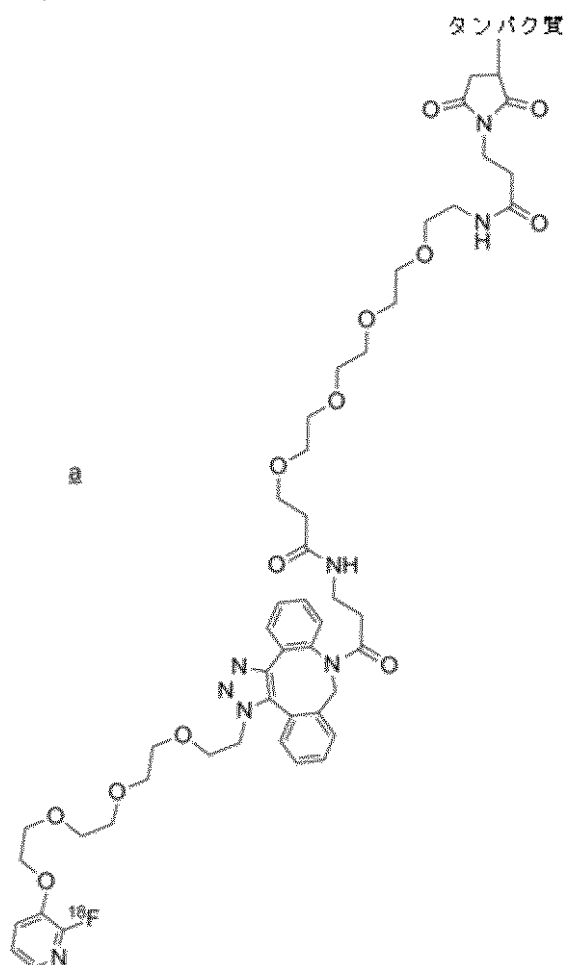
【0019】

いくつかの実施態様において、B F CはD B C O - P E G 4 - N H S - エステル、D B C O - スルホ - N H S - エステル、D B C O - P E G 4 - 酸、D B C O - P E G 4 - アミンまたはD B C O - P E G 4 - マレイミドである。いくつかの実施態様において、当該B F CはD B C O - P E G 4 - マレイミドである。

【0020】

いくつかの実施態様において、本明細書では、以下の構造：

【化8】



を有する ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープが示され、ここで当該B F Cのマレイミド基はタンパク質のシステイン残基のチオール基に共有結合している。いくつかの実施態様において、システイン残基はタンパク質のC末端に位置する。

【0021】

関連する実施態様において、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープのタンパク質部位はリガンドを含む。いくつかの実施態様において、当該プロープのタンパク質部

位は抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施態様において、当該プローブのタンパク質部位はフィブロネクチンベースのスクヤホールド (F B S) を含む。

【 0 0 2 2 】

関連する実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブのタンパク質部位は疾患に関連する生体分子に結合する。いくつかの実施態様において、当該疾患は固形癌、造血癌、血液癌、自己免疫性疾患、神経変性疾患、心血管疾患および病原性感染から成る群から選択される。いくつかの実施態様において、当該プローブは腫瘍関連抗原に結合する。いくつかの実施態様において、当該プローブは病原体、例えばウイルス、細菌または真菌に存在するタンパク質に結合する。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施態様において、本明細書で示される ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブは医薬組成物の形態でありうる。

【 0 0 2 4 】

関連する局面において、本明細書では、本明細書に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブの画像を得る方法であって、以下のステップ：(a) ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブを対象に投与すること；および(b) 陽電子放出断層撮影 (P E T) スキャンによって、当該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブのインビボでの分布をイメージングすることを含む方法が示される。いくつかの実施態様において、当該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブの画像分布は、疾患の存在または非存在を示す。

【 0 0 2 5 】

関連する局面において、本明細書では、対象の疾患の存在を診断する方法であって、以下のステップ：(a) 疾患の存在に係る標的分子に結合する、本明細書に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブを、それを必要とする対象に投与すること；および(b) 当該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブの存在または非存在を検出するために、対象の少なくとも1部分の放射線画像を得ることを含む方法が示され、ここで、バックグラウンドに対する前記 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブの存在および位置は、疾患の存在および位置を示す。

【 0 0 2 6 】

関連する局面において、本明細書では、対象の疾患の進行をモニターする方法であって、以下のステップ：(a) 疾患の存在に係る標的分子に結合する、本明細書に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブを最初の時点において、それを必要とする対象に投与すること、および疾患細胞または組織の量を決定するために、対象の少なくとも1部分の画像を得ること；および(b) 当該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブをその後の1回以上の時点において、対象に投与すること、およびそれぞれの時点において、対象の少なくとも1部分の画像を得ることを含む方法が示され、ここでそれぞれの時点における疾患細胞または組織の体積および位置は疾患の進行を示す。

【 0 0 2 7 】

関連する局面において、本明細書では、対象の疾患細胞または組織を定量する方法であって、以下のステップ：(a) 疾患細胞または組織を有する対象に対して、疾患細胞または組織に位置する標的分子に結合する、本明細書に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブを投与すること；および(b) 当該疾患細胞または組織において、 ^{18}F の放射性放射を検出することを含む方法が示され、ここで、疾患細胞または組織の放射性放射の量および分布は、疾患細胞または組織の定量的な測定基準である。

【 0 0 2 8 】

関連する局面において、本明細書では、疾患を治療するための薬剤のスクリーニング方法であって、以下のステップ：(a) 疾患に関連する標的タンパク質を発現する細胞が、候補薬剤の存在下または非存在下において当該標的タンパク質と結合する、本明細書に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプローブと接触すること；および(b) 当該候補薬剤の存在下または非存在下において、陽電子放出断層撮影 (P E T) を用いて細胞

10

20

30

40

50

のイメージングを行うことを含む方法が示され、ここで、当該候補薬剤の存在において放射性放射量の減少は、当該薬剤が当該標的タンパク質に結合していることを示す。

【 0 0 2 9 】

これらの方法のいくつかの実施態様において、疾患は固形癌、造血癌、血液癌、自己免疫性疾患、神経変性疾患、心血管疾患および病原性感染（例えば、ウイルス、細菌、または真菌感染）から成る群から選択される。

【 0 0 3 0 】

関連する局面において、本明細書では、標的タンパク質を発現している組織または細胞の定量画像を得る方法であって、細胞または組織を、標的タンパク質に結合する、本明細書に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープと接触させるステップ、および、陽電子放出断層撮影（PET）を用いて、標的タンパク質を発現している組織を検出するまたは定量するステップを含む方法が示される。

10

【 0 0 3 1 】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープはリガンドを含む。いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープは抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープはフィブロネクチンベースのスカホールド（FBS）を含む。いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープは、腫瘍関連抗原に結合する。さらに別の実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープは病原体（例えば、ウイルス、細菌または真菌）に存在するタンパク質に結合する。

20

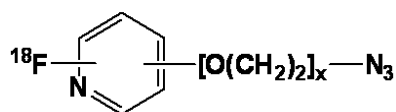
【 0 0 3 2 】

本明細書において、本明細書に記載の ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープを生成するための反応前駆体（例えば、非放射性標識補欠分子族、BFC結合タンパク質プロープおよび生体直交性クリック反応を行うための試薬）、および当該 ^{18}F - 放射性標識タンパク質ベースのプロープを生成するための説明書を含むキットもまた示される。

【 0 0 3 3 】

そのため、ある局面において、本明細書では以下の構造：

【化 9】



30

[式中、

x は 1 ~ 8 の整数]

を有する ^{18}F - 標識補欠分子族を製造する方法であって、以下のステップ：（a）以下の構造：

【化 10】

a



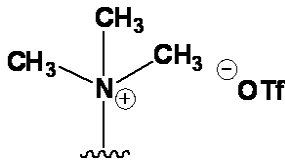
40

[式中、

x は 1 ~ 8 の整数であり、

R は NO_2 、Br、F または

【化 1 1】



であり、ピリジン環のN原子に対しオルト位に存在する]

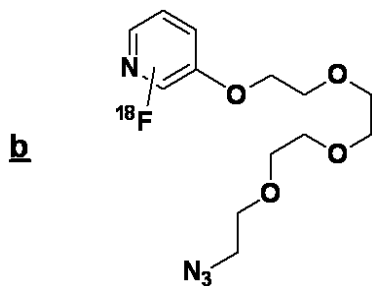
を有する化合物 a の溶液を生成すること；(b) ^{18}F の ^{18}O 水、4, 7, 13, 16, 21, 24 - ヘキサオキサ - 1, 10 - ジアザビシクロ[8.8.8]ヘキサコサン、および弱塩基中の混合物を生成すること；(c) ステップ(b)の混合物を乾燥させ、固形物を生成すること；および(d) ステップ(a)の溶液をステップ(c)の固形物と反応させ、 ^{18}F - 標識化合物を生成すること、を含む方法が示される。

10

【0034】

いくつかの実施態様において、当該方法によって、以下の構造 b：

【化 1 2】



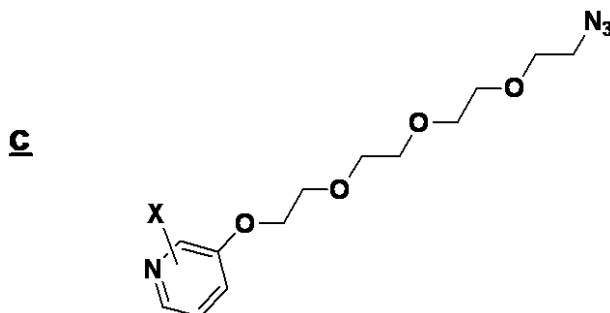
20

[式中、

^{18}F はN原子に対しオルト位である]

を有する ^{18}F - ピリジン補欠分子族が製造され、その方法は以下のステップ(a)以下の構造：

【化 1 3】



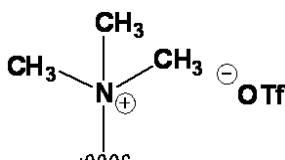
30

[式中、

X はN原子に対しオルト位であり、

X は NO_2 、Br または

【化 1 4】



40

50

である]

を有する化合物の溶液を生成すること；(b) ^{18}F の ^{18}O 水、4, 7, 13, 16, 21, 24 - ヘキサオキサ - 1, 10 - ジアザビシクロ[8.8.8]ヘキサコサン、および弱塩基中の混合物を生成すること；(c) ステップ(b)の混合物を乾燥させ、固形物を生成すること；および(d) ステップ(a)の溶液をステップ(c)の固形物と反応させ、 ^{18}F - 標識化合物を生成すること、を含む。

【0035】

いくつかの実施態様において、前記ステップa)の出発化合物において、Xは NO_2 である。いくつかの実施態様において、XはN原子およびPEG-N₃側鎖に対しオルト位の炭素原子に結合している。いくつかの実施態様において、ステップb)の弱塩基はK₂CO₃、炭酸セシウムまたは水酸化テトラブチルアンモニウムである。ある実施態様において、ステップb)の弱塩基はK₂CO₃である。

10

【0036】

関連する局面において、タンパク質の ^{18}F - 標識方法が示され、その方法は式bの ^{18}F - 放射性標識補欠分子族を、放射性標識をすべきタンパク質と「クリック反応」によって結合させ、 ^{18}F - 放射性標識タンパク質を生成するステップを含む。いくつかの実施態様において、生体直交性クリック反応は金属フリーである（例えば、銅フリークリック反応）。いくつかの実施態様において、タンパク質は二価結合性(bifunctional conjugating)(BFC)基（例えば、二価性キレーター）を含む。いくつかの実施態様において、タンパク質はシクロオクチンBFCを含む。いくつかの実施態様において、タンパク質はDBCO-PEG4-マレイミドを含み、またはそれに共有結合している。

20

【0037】

本開示の別の特徴および利点は以下の詳細な説明および実施例から明らかであり、これらは限定するものとして解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は[^{18}F] - E01 - 4PEG - DBCO - FPPEG Aの化学合成のためのスキームである。当該分子のE01部位は配列番号1に記載された配列を有する。

【0039】

【図2】図2は、ガンマ計測器によってエキスピボで測定された、両側性のPD-L1(+)L2987およびPD-L1(-)HT-29の異種移植片を有するマウスにおける、 ^{18}F - A02放射性トレーサーの組織分布を表す棒グラフである。

30

【0040】

【図3】図3はカニクイサルにおける、 ^{18}F - E01の分布を表す合成画像である。

【0041】

【図4】図4AおよびBは異種移植片およびヒトの肺組織における、 ^{18}F - A02のインビトロオートラジオグラフィ画像を表す。

【0042】

【図5】図5は金属フリーの「クリック反応」を用いた[^{18}F] - 放射性標識 - A02 - PEG - DBCO - FPPEG Aの合成のためのスキームである。

40

【0043】

【図6】図6は[^{18}F] - FPPEG Aの自動合成のためのGETRACERlab FX2 N合成モジュールのスキームである。

【0044】

【図7】図7は[^{18}F] - FPPEG Aの自動合成のためのSynthera合成モジュール(IBA)のスキームである。

【発明を実施するための形態】

【0045】

(詳細な説明)

50

本明細書において、 ^{18}F -補欠分子族および当該 ^{18}F -補欠分子族を製造するための方法が記述される。本明細書において、 ^{18}F -補欠分子族を含む放射性標識組成物、並びに疾患細胞および/または組織および関連する生物学的状態の診断、局在化、モニターおよび/または評価のための、これらの放射性標識組成物の使用もまた記述される。

【0046】

(定義)

本開示がさらに容易に理解されうるために、いくつかの用語を最初に定義する。さらなる定義は詳細な説明に記載される。特に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を持ち、質量分析、NMR、HPLC、タンパク質化学、生化学、DNA組み換え技術および薬理学の従来の方法が用いられる。

【0047】

本明細書で用いられる単数形「a」「an」および「the」は、文脈上明らかに他を指していない限り、複数の指示対象を含む。「または」または「および」の使用は、特に明示されていない限り、「および/または」を意味する。さらに、用語「例えば(including)」並びに「など(include)」、「含む(includes)」および「含まれる(included)」などの他の形態の使用は、限定的なものではない。

【0048】

本明細書で用いられる「約」は、数字の10%増減以内であることを意味する。例えば、「約100」は90から110の間のいずれかの数字を指す。

【0049】

本明細書で用いられる「医療用イメージング」は、臨床的目的(疾患を解明し、診断し、モニターしようとする医療処置)または医学(通常の解剖学または生理学の研究など)のために、対象の体(またはその一部)の画像を得るのに用いられる技術およびプロセスをいう。

【0050】

本明細書で用いられる「陽電子放出断層撮影」または「PET」は、体内のトレーサーの位置の3次元画像を得る、非侵襲性の核医学技術をいう。当該方法は、体内の生物学的に活性な分子に導入された陽電子放出核種(トレーサー)によって、間接的に放出されるガンマ線の対を検出する。PETイメージング方法は前臨床的および臨床的な両方の創薬において、様々な種類の用途があり、助けとなる。応用例としては、標的のインビボでの飽和の直接的な可視化; 毒性または患者ごとの変動を予測するための、正常組織における取り込みのモニター; 疾患組織の定量化; 腫瘍の転移; および薬剤の経時的な効果または経時的な耐性のモニターが挙げられる。

【0051】

用語「生体直交性化学」は、従来の生化学的プロセスに干渉せずに、生物系の内部で起こりうるいずれかの化学反応をいう。当該用語は、生理学的pHまたは水の存在下におけるインビトロで起こる化学反応である化学反応を含む。生体直交性であるためには、反応は選択的であり、出発化合物に存在する他の官能基との副反応を避ける必要がある。さらに、反応相手との間に形成された共有結合は強く、生物学的反応に化学的に不活性でなければならない、目的分子の生物学的活性に影響してはならない。

【0052】

用語「クリックケミストリー」は、新たな化合物および組み合わせライブラリーの迅速な合成のための、確実に選択的な生体直交性反応をいう。クリック反応の性質としては、生理学的条件下で安定な化合物を生成するための、モジュール性、範囲の広さ、高収率、立体選択性、および簡単な生成物の単離(不活性な副生成物の、非クロマトグラフィー的な方法による分離)が挙げられる。放射化学および放射性薬学において、クリック反応は選択的でモジュール式の構成要素を利用し、触媒なしで放射性標識された生物学的に関連のある化合物の化学選択的な連結を可能にする、一連の標識化反応の総称である。「クリ

10

20

30

40

50

ック反応」は銅を用いてもよく、または銅フリーのクリック反応でもありうる。

【0053】

用語「補欠分子族」または「二価性標識薬剤」は、ペプチドまたはタンパク質に結合させることのできる放射性核種（例えば、 ^{18}F ）を含む小さな有機分子をいう。

【0054】

本明細書で、放射性医薬品化学に関して用いられる用語「キレーターリガンド」は、放射性標識補欠分子族を生物学的に活性な標的分子（例えば、ペプチドまたはタンパク質）と共有結合的に結合させる二価性キレーターまたは二価結合性（BFC）基（本明細書において交互に用いられる）をいう。BFCはカルボン酸またはアミドカップリングのための活性化エステル、チオ尿素カップリングのためのイソチオシアネート、およびチオールカップリングのためのマレイミドなどの官能基を利用する。

10

【0055】

本明細書で用いられる、一般的に「生物学的標的」と呼ばれる「標的」は、細胞、組織（例えば、癌または腫瘍）、病原性微生物（例えば、細菌、ウイルス、真菌、植物、プリオン、原生生物またはその一部）または組織の炎症、プラーク形成などの生物学的経路もしくは生物学的現象に関連する他の分子をいう。

【0056】

用語「標的リガンド」、「標的薬剤」または「標的分子」は、他の分子に結合する、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質などの分子を指すために交互に用いられる。いくつかの実施態様において、標的薬剤は、特定の細胞、組織、病原体または生物学的経路に関連する分子を「標的」にするために、当該 ^{18}F -補欠分子族に結合している。

20

【0057】

本明細書で用いられる「ポリペプチド」は、長さ、翻訳後修飾、または機能を問わない2つ以上のアミノ酸のいずれかの配列をいう。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は本明細書において交互に用いられる。ポリペプチドは天然アミノ酸および引用により本明細書に援用される、米国特許第6,559,126号において記述されるもののような、非天然アミノ酸を含みうる。ポリペプチドはまた、様々な一般的な化学的手法のいずれかによって修飾されうる（例えば、アミノ酸は保護基によって修飾されうる；アミノ酸のカルボキシ末端は末端のアミド基を形成しうる；末端のアミノ基は、例えば親油性を上昇させるような基によって修飾されうる；またはポリペプチドは化学的に糖化されうるか、そうでなければ安定性もしくはインビボでの半減期を上昇させるような修飾を受けうる）。ポリペプチドの修飾は環状化合物または他の分子などの他の構造をポリペプチドに結合させることを含み得、立体配置の変化した（すなわち、RもしくはS；またはLもしくはD）1つ以上のアミノ酸もまた含みうる。

30

【0058】

「単離された」ポリペプチドは自然環境の一成分から同定、分離および/または回収されたものである。自然環境からの混入成分は、ポリペプチドの診断または治療的使用に干渉しうる物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を含みうる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは（1）ローリー法によって決定されるポリペプチドの重量が、95%より大きく、最も好ましくは重量が99%より大きく、（2）少なくともN末端または内部のアミノ酸配列の残基を、スピニング・カップ・シークエネーターを用いて得るのに十分な程度であり、または（3）クーマシーブルーまたは好ましくは銀染色を用いて、還元または非還元条件下でSDS-PAGEによって均一化されるまで精製される。単離されたポリペプチドは、当該ポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、組み換え細胞内の原位置のポリペプチドを含む。通常は、しかしながら、単離されたポリペプチドは少なくとも1回の精製ステップによって得られる。

40

【0059】

本明細書で交互に用いられる用語「特異的に結合」、「特異的結合」、「選択的結合」、および「選択的に結合」は、これらに限定はされないが、スキャチャード解析および/

50

または競合結合測定（例えば、競合ELISA、BIACOREアッセイ）などの当技術分野において利用可能な技術を用いて測定される、生物学的標的に対する親和性を発揮するが、他の分子に対する有意な結合を示さない（例えば、約10%未満の結合）ペプチドまたはポリペプチドをいう。

【0060】

本明細書で用いられる用語「選択的な結合」は、これらに限定はされないが、スクチャード解析および/または競合結合測定（例えば、競合ELISA、BIACOREアッセイ）などの当技術分野において利用可能な技術を用いて測定される、ペプチドまたはタンパク質が異なる生物学的標的に結合するよりも少なくとも約20%より多く、選択された生物学的標的に結合することをいう。

10

【0061】

本明細書で用いられる用語「 K_D 」は、表面プラズモン共鳴アッセイまたは細胞結合アッセイを用いて測定される、タンパク質-タンパク質相互作用（例えば、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープ-標的分子）の平衡解離定数、または ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープの標的タンパク質に対する親和性をいうことが意図される。本明細書で用いられる「望ましい K_D 」は想定された目的にとって十分である ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープの K_D をいう。例えば、望ましい K_D は、インビボイメージングアッセイまたはインビトロアッセイ、例えば、細胞ベースのルシフェラーゼアッセイにおいて、機能効果を導き出すのに必要な ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープの K_D を指しうる。

20

【0062】

本明細書で用いられる用語「 k_{ass} 」は、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープが ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープ/標的タンパク質の複合体を形成するための結合速度定数をいうことが意図される。

【0063】

本明細書で用いられる用語「 k_{diss} 」は、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープが ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープ/標的タンパク質の複合体から解離するための解離速度定数をいうことが意図される。

【0064】

本明細書で用いられる用語「 IC_{50} 」は、インビトロまたはインビボアッセイのいずれかにおいて、最大の阻害反応の50%、すなわち最大の阻害反応および未反応の中間の水準まで反応を阻害する、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープの濃度をいう。

30

【0065】

用語「PK」は「薬物動態」の頭文語であり、例えば対象による吸収、分布、代謝および排出などの化合物の性質を含む。本明細書で用いられる「PK調節タンパク質」または「PK部位」は、生物学的に活性な分子に結合している、またはそれと併用投与される場合に、生物学的に活性な分子の薬物動態特性に影響するいずれかのタンパク質、ペプチドまたは部位をいう。PK調節タンパク質またはPK部位の例としては、PEG、ヒト血清アルブミン（HSA）結合剤（米国出願第2005/0287153号および2007/0003549号、PCT出願第WO2009/083804号およびWO2009/133208号に開示される）、ヒト血清アルブミンおよびそのバリエーション、トランスフェリンおよびそのバリエーション、FcまたはFcフラグメントおよびそれらのバリエーション、並びに糖（例えば、シアル酸）が挙げられる。

40

【0066】

タンパク質または化合物の「血中半減期」は、例えば、自然機構による、配列もしくは化合物の分解、および/または配列もしくは化合物のクリアランスもしくは隔離などによって、インビボでのポリペプチドの血清濃度が50%まで減少するのに必要な時間と一般に定義されうる。当該半減期は薬物動態解析などのそれ自体が周知のいずれかの方法によって決定されうる。適切な技術は当業者にとって明らかであり、例えば、本明細書のアミ

50

ノ酸配列または化合物の適切な用量を対象に適切に投与するステップ；対象から定期的に血液サンプルまたは他のサンプルを回収するステップ；前記の血液サンプルにおいて、本明細書のアミノ酸配列または化合物の量または濃度を決定するステップ；および前記で得られたデータ（の一部）から、本明細書のアミノ酸配列または化合物の量または濃度が、投与時の初期量と比較して50%まで減少するまでの時間を計算するステップを一般的に含みうる。例えば、Kenneth, A. et al., Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for pharmacists、およびPeters et al., Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (1996)などの標準的な便覧を参照されたい。Gibaldi, M. et al., 2nd Rev. Edition, Marcel Dekkerもまた参照されたい。

10

【0067】

半減期は $t_{1/2}$ -アルファ、 $t_{1/2}$ -ベータ、 HL -ラムダ z 、および血中濃度時間曲線下面積（AUC）などを用いて表されうる。本明細書において、「半減期の増加」とはこれらのパラメーターのいずれか1つ、これらのパラメーターのいずれか2つ、これらのパラメーターのいずれか3つ、またはこれらのパラメーターの4つ全てにおける増加をいう。「半減期の増加」は特に、 $t_{1/2}$ -ベータ、および/または HL -ラムダ z の増加をいい、 $t_{1/2}$ -アルファおよび/またはAUCまたはその両方の増加を伴っても伴わなくてもよい。

【0068】

20

本明細書で用いられる用語「結合した」は2つ以上の分子の結合をいう。当該結合は共有結合または非共有結合でありうる。当該結合はまた、遺伝子的（例えば、遺伝子組み換えによって結合されたもの）でもありうる。このような結合は、化学的接合および組み換えタンパク質生成などの当技術分野で認められる様々な種類の技術を用いて達成されうる。

【0069】

用語「診断」または「検出」は交互に用いられうる。診断は通常、組織の特定の組織学的状態を定義することをいう一方で、検出は、特定の検出可能な標的を含む組織、病変または生物を認識し、見つけ出す。

【0070】

30

用語「検出可能」はバックグラウンドのシグナルに対して、シグナルを検出することができることをいう。本明細書でイメージング剤および診断の文脈において用いられる用語「検出可能なシグナル」は、これに限定はされないが、陽電子放出断層撮影（PET）などの非侵襲性のイメージング技術によって生じるシグナルである。検出可能なシグナルは検出可能であり、対象から発生しうる他のバックグラウンドシグナルと区別できる。言い換えれば、検出可能シグナルとバックグラウンドの間に、測定可能および統計的に有意な違いが存在する（例えば、統計的に有意な違いは、検出可能なシグナルおよびバックグラウンドを区別するのに十分な違いであり、例えば検出可能なシグナルおよびバックグラウンドの違いが約0.1%、1%、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、または40%またはそれ以上である）。検量線および/または校正曲線が、検出可能なシグナルおよび/またはバックグラウンドの相対強度を決定するために用いられうる。

40

【0071】

本明細書に記載のイメージング剤を含む組成物の「検出可能な有効量」は、臨床的使用が可能な装置を用いて、許容可能な画像を得るのに十分な分量と定義される。本明細書で提供されるイメージング剤の検出可能な有効量は、1回以上の注射によって投与されうる。検出可能な有効量は、個体の感受性の程度、個体の年齢、性別および体重、個体の特異体質反応などの因子によって変化しうる。イメージング組成物の検出可能な有効量はまた、用いられる機器および方法に従って変化しうる。このような因子の最適化は、十分に当分野の技術の範囲内である。

【0072】

50

本明細書においてイメージング剤に関連して用いられる「投与する」は、当業者にとって周知の様々な方法および送達システムのいずれかを用いて、イメージング剤を含む組成物を対象に物理的に導入することをいう。本明細書に記載のイメージング剤の好ましい投与経路としては、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、脊髄または、例えば注射もしくは点滴などによる他の非経口経路による投与が挙げられる。本明細書で用いられる用語「非経口投与」は、経腸および局所投与以外の、通常は注射による投与方法を意味し、例として、これら限定はされないが、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、髄腔内、リンパ内、病巣内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および点滴、並びにインビボエレクトロポーションが挙げられる。あるいは、本明細書に記載のイメージング剤は、局所、上皮または粘膜経路による投与など、例えば鼻腔内、経口、腔内、直腸内、舌下または局所投与などの、非 - 非経口投与 (non-parenteral) によって投与されうる。投与はまた、例えば、1回、複数回で、および/または1回以上の長期間にわたって実行されうる。

10

【0073】

本明細書で用いられる用語「併用投与」などは、選択された医薬品を1人の患者に投与することを含むことを意味し、当該薬剤が同じもしくは異なる投与経路によって、または同じもしくは異なる時点において投与されるレジメンを含むことが意図される。

【0074】

用語「患者」および「対象」は、本明細書に記載のイメージング剤を含む組成物を与えられるヒトまたは非ヒト動物のいずれかをいう。インビトロ診断および応用研究などのインビトロでの応用のために、前記の対象の血液、尿または組織サンプルなどの、体液および細胞サンプルは使用に適している。

20

【0075】

用語「サンプル」は組織サンプル、細胞サンプル、液体サンプルなどを表しうる。当該サンプルは対象から採取されうる。組織サンプルとしては、髪（毛根を含む）、口腔粘膜検体、血液、唾液、精液、筋肉、またはいずれかの内臓からのサンプルが挙げられる。液体サンプルは、これらに限定はされないが、尿、血液、腹水、胸膜液、髄液などでありうる。体内組織としては、これらに限定はされないが、皮膚、筋肉、子宮内膜、子宮、および頸部組織が挙げられる。

【0076】

用語「同位体的に純粋な」とは、ある同位体が他の同位体に対してより多くの割合で含まれる成分、化合物または組成物を意味する。いくつかの実施態様において、当該成分、化合物、または組成物は約40%、50%、または60%を超えて同位体的に純粋である。

30

【0077】

本明細書で用いられるように、標的分子の画分を出発混合物と比較して濃縮するために、標的分子が部分的にまたは全体的に非標識分子から分離される場合に、標的分子が「精製」される。「精製」された標的分子は、標識および非標識分子を、これらに限定はされないが、約5:95; 10:90; 15:85; 20:80; 25:75; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40; 70:30; 75:25; 80:20; 85:15; 90:10; 95:5; 97:3; 98:2; 99:1または100:0などのほとんどいずれかの割合で有する混合物を含みうる。

40

【0078】

「OTf」基は式 CF_3SO_3 またはトリフルオロメタンスルホン酸を有するトリフレートをいう。

【0079】

用語「ハロ」または、その代わりの「ハロゲン」もしくは「ハライド」はフルオロ、クロロ、ブロモまたはヨードを意味する。

【0080】

本明細書全体にわたって、基およびその置換基は、安定な部位および化合物、並びに薬

50

学的に許容可能な化合物として利用可能な化合物、並びに／または薬学的に許容可能な化合物の製造において利用可能な中間化合物を提供するように、当業者によって選択される。

【 0 0 8 1 】

本明細書に記載の様々な局面は、下記のサブセクションにおいてさらに詳細に記載される。

I . ^{18}F 放射性標識補欠分子族

【 0 0 8 2 】

ある局面において、本明細書では、アジドおよびシクロオクチン間の 1, 3 - 双極性環化付加に関する、耐水性条件下で選択的に進行する生体直交性反応に用いるための補欠分子族を含む ^{18}F - 放射性標識化合物が示される。本発明の ^{18}F - 放射性標識補欠分子族は、100%の水に可溶であり、当該補欠分子族をペプチドまたはタンパク質分子に結合させるために有機相を必要としない。多くの生体分子（例えば、ペプチドまたはタンパク質）は少量の有機溶媒に対してであっても持ちこたえることができず、分解および凝集の問題が生じるため、この特徴は特に有利である。

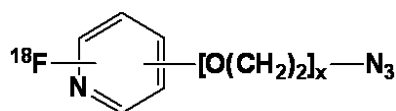
【 0 0 8 3 】

さらに、脂肪族補欠分子族と異なり、本補欠分子族を用いて、 ^{18}F フッ素化反応を UV によってモニターすることができる。本明細書に記載の ^{18}F - 放射性標識補欠分子族は揮発性ではない。さらに、記載される ^{18}F - 放射性標識補欠分子族は、例えば、実施例に記載されるような、銅フリーのクリックケミストリーを用いて、生体分子に導入され得、それによって銅介在クリックケミストリーが用いられる場合に、いくつかの生体分子において観測される安全性の問題を回避することができる。

【 0 0 8 4 】

ある局面において、本明細書では、以下の構造：

【 化 1 5 】



[式中、

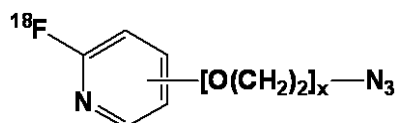
x は 1 ~ 8 の整数である]

を有する、アジドに対して共有結合的に付加された PEG 化 ^{18}F - ピリジン、またはその薬学的に許容可能な塩が示される。いくつかの実施態様において、x は 2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施態様において、x は 3 ~ 5 の整数である。いくつかの実施態様において、x は 4 である。関連する実施態様において、 ^{18}F はピリジンの N 原子に対してオルト位に結合している。いくつかの実施態様において、 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部位はピリジン環の窒素原子に対して 1 ~ 3 位に存在する。いくつかの実施態様において、 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部位はピリジン環の窒素に対して 1 ~ 2 位に存在する。別の実施態様において、 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部位はピリジン環の窒素に対して 1 ~ 4 位に存在する。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識化合物は、構造：

【 化 1 6 】



[式中、

x は 1 ~ 8 の整数である]

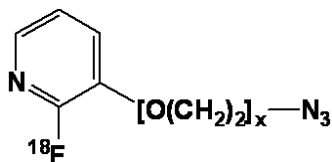
またはその薬学的に許容可能な塩を有する。いくつかの実施態様において、x は 2 ~ 6 の

整数である。いくつかの実施態様において、 x は 3 ~ 5 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 4 である。いくつかの実施態様において、 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部位はピリジン環の窒素原子に対して 1 ~ 3 位に存在する。いくつかの実施態様において、 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部位はピリジン環の窒素に対して 1 ~ 2 位に存在する。別の実施態様において、 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部位はピリジン環の窒素に対して 1 ~ 4 位に存在する。

【0086】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識化合物は、構造：

【化17】



10

[式中、

x は 1 ~ 8 の整数である]

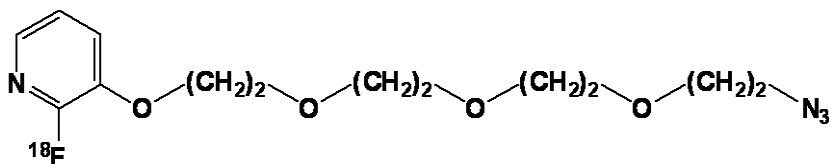
を有する。いくつかの実施態様において、 x は 2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 3 ~ 5 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 4 である。

【0087】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識化合物は $[^{18}\text{F}]$ - 3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジン (^{18}F - FPPEGA) であり、構造：

20

【化18】



を有する。

30

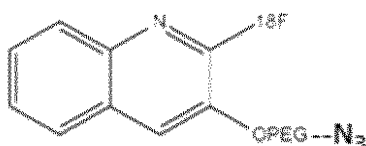
【0088】

別の実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識補欠分子族は、ピリジン環上にフッ素化反応に干渉しないさらなる基を含みうる。いくつかの実施態様において、ピリジン環への付加物としては、 C_{1-6} アルキル基、例えばメチル、エチルおよびプロピルが挙げられる。

【0089】

さらに別の実施態様において、 ^{18}F - 放射性標識補欠分子族は環系に結合し、以下の構造：

【化19】



40

[式中、

「OPEG」は $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ であり、

x は 1 ~ 8 の整数である]

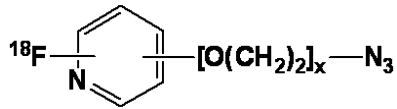
を有する。いくつかの実施態様において、 x は 2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 3 ~ 5 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 4 である。

50

【 0 0 9 0 】

関連する局面において、本明細書では、以下の構造：

【化 2 0 】



[式中、

x は 1 ~ 8 の整数である]

を有する、アジドに対して共有結合的に付加された PEG 化 ^{18}F - ピリジンの製造方法 10
 であって、以下のステップを含む方法が示される：

(a) 以下の構造：

【化 2 1 】

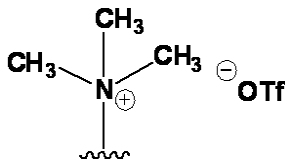
a

[式中、

x は 1 ~ 8 の整数であり、

R は NO_2 、 Br 、 F または

【化 2 2 】



であり、ピリジン環の N 原子に対してオルト位である]

を有する化合物 a の溶液を生成する；

(b) ^{18}F の ^{18}O 水、4, 7, 13, 16, 21, 24 - ヘキサオキサ - 1, 10 - ジアザピシクロ [8 . 8 . 8] ヘキサコサン、および弱塩基中の混合物を供する；

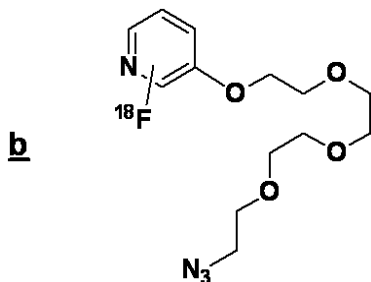
(c) ステップ (b) の混合物を乾燥させ、固形物を生成する；および

(d) ステップ (a) の溶液をステップ (c) の固形物と反応させ、 ^{18}F - 標識化合物を生成する。

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施態様において、当該方法によって、以下の構造 b：

【化 2 3 】



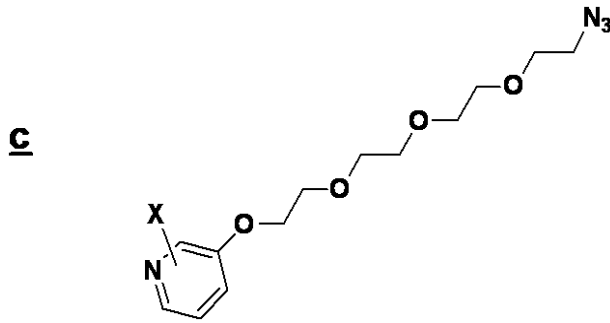
[式中、

^{18}F は N 原子のオルト位である]

を有する ^{18}F - ピリジン補欠分子族が製造され、その方法は以下のステップを含む：

(a) 構造：

【化 2 4】



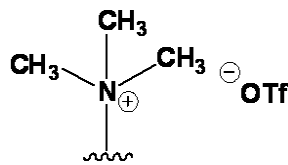
10

[式中、

X は N 原子に対してオルト位であり、

X は NO_2 、Br または

【化 2 5】



20

である]

の化合物の溶液を生成する；

(b) ^{18}F の ^{18}O 水、4, 7, 13, 16, 21, 24 - ヘキサオキサ - 1, 10 - ジアザピシクロ [8 . 8 . 8] ヘキサコサン、および K_2CO_3 などの弱塩基中の混合物を生成する；

(c) ステップ (b) の混合物を乾燥させ、固形物を生成する；および

(d) ステップ (a) の溶液をステップ (c) の固形物と反応させ、 ^{18}F - 標識化合物を得る。

30

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施態様において、当該方法は以下の構造 a：

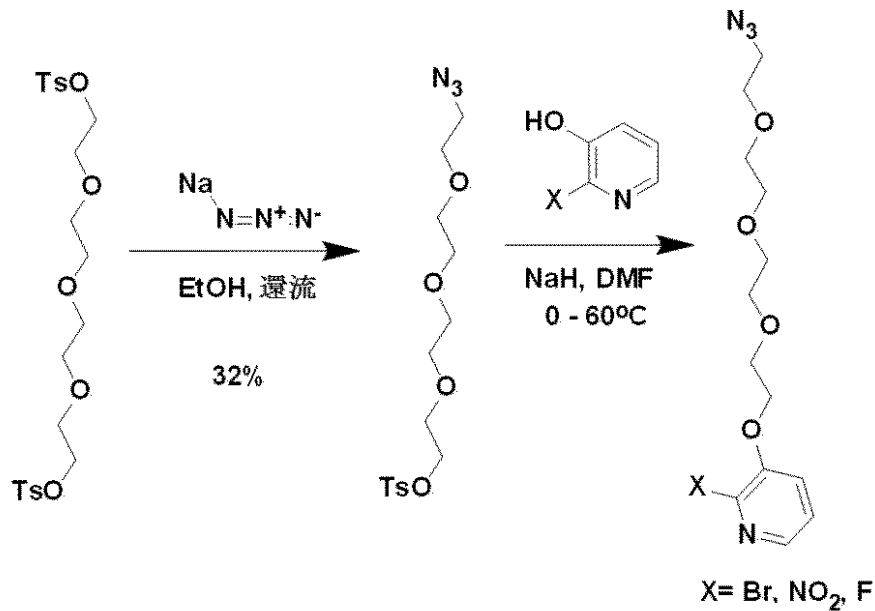
【化 2 6】



40

を有する化合物を、下記のスキーム I：

【化 2 7】



10

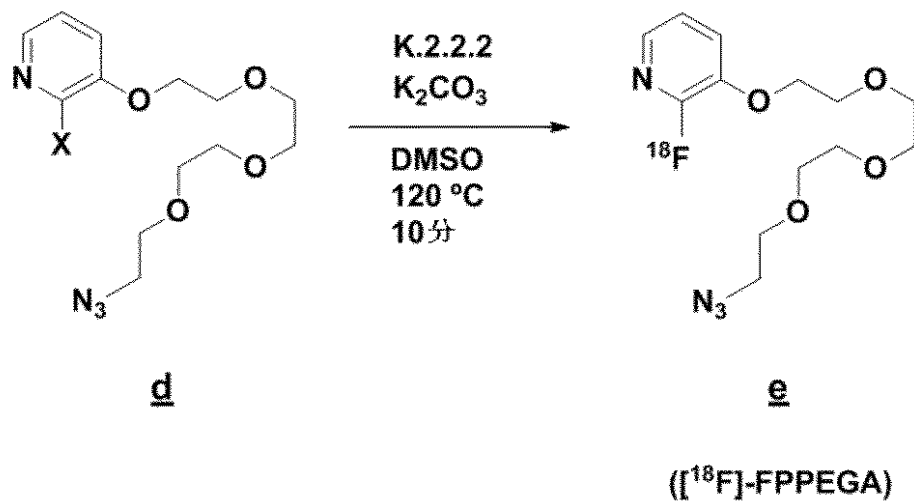
に従って製造するステップをさらに含む。

20

【 0 0 9 3】

いくつかの実施態様において、当該方法は ^{18}F -ピリジン補欠分子族である、 $[\text{}^{18}\text{F}]$ -3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジン (^{18}F -FPPEGA)、すなわち e を d から、以下の反応条件：

【化 2 8】



30

40

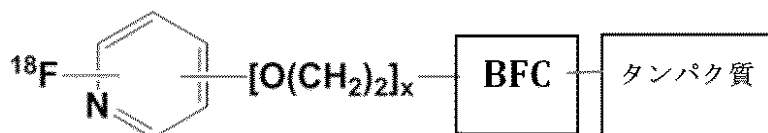
に従って製造することを含む。

【 0 0 9 4】

II. ^{18}F -放射性標識生物学的プローブ

いくつかの局面において、本明細書では、以下の構造：

【化 29】



[式中、

x は 1 ~ 8 の整数である]

を有する ^{18}F - 放射性標識プローブまたは薬剤が示される。いくつかの実施態様において、 x は 2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 3 ~ 5 の整数である。いくつかの実施態様において、 x は 4 である。

【 0095】

B F C

本明細書において開示される放射性標識組成物において用いられうる二価性キレーターまたは結合性 (B F C) 基は、市販 (例えば、Sigma Aldrich ; クリックケミストリーツール) であるか、または周知の化学反応に従って合成されうる。

【 0096】

いくつかの実施態様において、当該 B F C はシクロオクチンに基づく化合物 (例えば、DBCO、DIBO)、DFO、DOTA およびその誘導体 (CB - DO2A、3p - C - DEPA、TCMC、Oxo - DO3A)、TE2A、CB - TE2A、CB - TE1A1P、CB - TE2P、MM - TE2A、DM - TE2A、ジウムサル (diamsar) およびその誘導体、NODASA、NODAGA、NOTA、NETA、TACN - TM、DTPA、1B4M - DTPA、CHX - A' - DTPA、TRAP (PRP9)、NOPO、AAZTA およびその誘導体 (DATA)、 H_2 デドパ (H_2 dedpa)、 H_4 オクタパ (H_4 octapa)、 H_2 アザパ (H_2 azapa)、 H_5 デカパ (H_5 decapa)、 H_6 ホスパ (H_6 phospa)、HBED、SHBED、BPCA、CP256、PCTA、HEHA、PEPA、EDTA、TETA、並びに TRITA に基づくキレート剤、並びにそれらの近縁の類似体および誘導体から選択される。キレート剤および放射性核種の適切な組み合わせは、Price et al., Chem Soc Rev 2014 ; 43 : 260 - 90 において広範囲にわたって記述される。

【 0097】

いくつかの実施態様において、当該 B F C は標的タンパク質またはペプチド上のアミン、カルボキシル、カルボニルまたはチオール官能基と共有結合を形成する反応基を含むシクロオクチンである。シクロオクチン上の反応基としては、エステル、酸、ヒドロキシル基、アミノオキシ基、マレイミド、 α - ハロゲンケトンおよび α - ハロゲンアセトアミドが挙げられる。

【 0098】

いくつかの実施態様において、当該 B F C はジベンゾシクロオクチン (DIBO)、ピアリールアザシクロオクチノン (BARAC)、ジメトキシアザシクロオクチン (DIMAC) およびジベンゾシクロオクチン (DBCO) などのシクロオクチンである。いくつかの実施態様において、当該シクロオクチンは DBCO である。

【 0099】

いくつかの実施態様において、当該シクロオクチンは親水性のポリエチレングリコール (PEG)_y スペーサーアームを含み、ここで、 y は 1 ~ 8 の整数である。いくつかの実施態様において、 y は 2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施態様において、 y は 4 または 5 である。

【 0100】

いくつかの実施態様において、当該 B F C は 1 級アミン (例えば、リシン残基の側鎖ま

10

20

30

40

50

たはアミノシラン被覆表面)と選択的および効率的に反応する、 $\text{DBCO} - \text{PEG}4 - \text{NHS} - \text{エステル}$ または $\text{DBCO} - \text{スルホ} - \text{NHS} - \text{エステル}$ である。いくつかの実施態様において、当該BFCは、安定なアミド結合を形成する活性剤(例えばEDC)の存在下で、1級または2級アミンと反応しうる末端カルボン酸($-\text{COOH}$)を有する $\text{DBCO} - \text{PEG}4 - \text{酸}$ である。いくつかの実施態様において、当該BFCは活性剤(例えばEDCまたはDDC)の存在下でカルボキシル基と、または安定なアミド結合を形成する活性化エステル(例えばNHSエステル)と反応する $\text{DBCO} - \text{PEG}4 - \text{アミン}$ である。

【0101】

いくつかの実施態様において、当該BFCはシステイン残基、例えばポリペプチドのC末端付近のシステイン残基において、スルフヒドリル基と反応する $\text{DBCO} - \text{PEG}4 - \text{マレイミド}$ である。

10

【0102】

いくつかの実施態様において、タンパク質を標識するために、当該タンパク質は補欠分子族を結合させるためのシステインを組み込むようにあらかじめ改変されている。例えば、システインはタンパク質のC末端に付加されうる。いくつかの実施態様において、 $\text{P} \times \text{C} \text{y}$ がタンパク質のC末端に付加され、ここで、Pはプロリン、Cはシステイン、xは少なくとも0である整数(例えば、0、1または2)、およびyは少なくとも1である整数である。タンパク質を改変する方法は当技術分野において周知である。

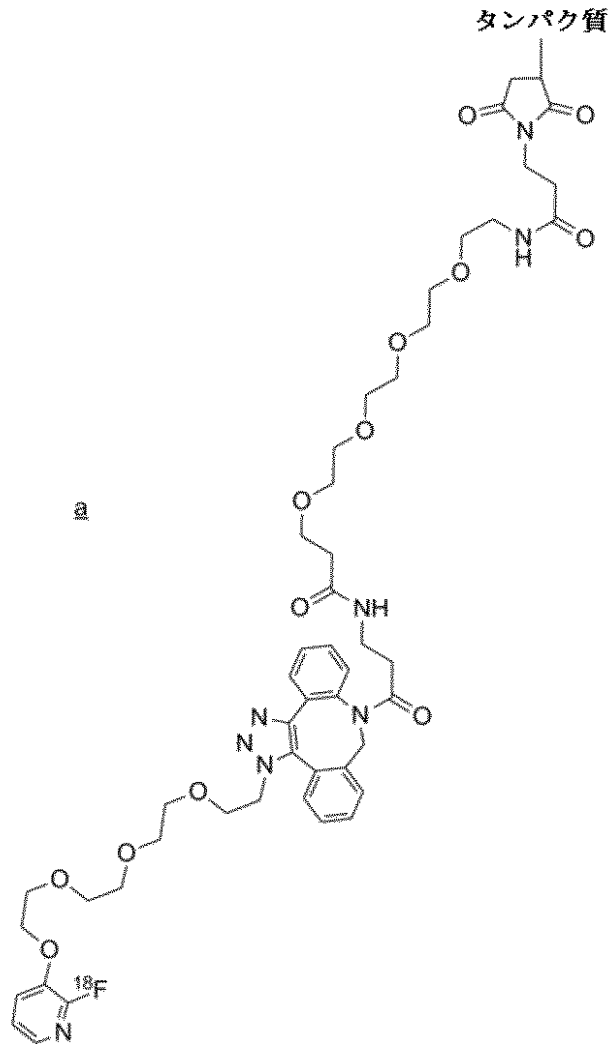
【0103】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F -放射性標識プローブまたは薬剤は以下の構造a

20

:

【化 3 0】



10

20

30

を有し、ここで、B F Cはシステイン残基においてタンパク質に結合する。

【 0 1 0 4】

本明細書に記載の ^{18}F -放射性標識標的薬剤は、インビボで直接使用するのに適切な溶媒（例えば生理食塩水）において、本明細書に記載の手順に従い、生体直交性で金属フリーのクリックケミストリーを用いて製造されうる。

【 0 1 0 5】

III. タンパク質 / ペプチド標的分子

本明細書に示される ^{18}F -補欠分子族は、標的分子とインビボでの生物学的標的（例えば細胞または組織）の間の相互作用に影響することなしに改変されうる誘導体化基を含むものであれば、実質的にあらゆる標的分子に結合されうる。

40

【 0 1 0 6】

いくつかの実施態様において、当該標的分子は、これらに限定はされないが、抗体、抗体フラグメント、フィブロネクチンベースの分子、およびリガンド（例えば、ホルモン、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキンおよび血管新生因子）などのペプチドまたはタンパク質である。いくつかの実施態様において、当該標的分子は、関連腫瘍もしくは自己免疫性抗原などの疾患もしくは病状に関連する標的、またはウイルス、細菌、真菌もしくは原生生物などの病原体が提示するタンパク質に対する、1つ以上の結合部位を含む。

【 0 1 0 7】

50

いくつかの実施態様において、当該 ^{18}F -標識ペプチドまたはタンパク質は、イメージングおよび/または検出のための標的細胞、組織、病原体または他の標的に対して直接結合するように選択されうる。別の実施態様において、 ^{18}F 標識タンパク質またはペプチドはインビボの標的分子に直接または間接的に結合するように選択されうる。例えば、第一タンパク質またはペプチドが対象に投与され、次いで第一タンパク質またはペプチドに結合する第二 ^{18}F -標識分子が投与されてもよい。

【0108】

ペプチド

わずか2個のアミノ酸残基、好ましくは2から10個の残基を有するペプチドが用いられてもよく、また他の部位に結合されてもよい。標的可能な構築物はまた、当該ペプチドのインビボでの安定性を向上させるため、骨格構造に非天然アミノ酸、例えばD-アミノ酸を含みうる。別の実施態様では、非天然アミノ酸またはペプチドから構築されるような、他の骨格構造が用いられうる。

【0109】

いくつかの実施態様において、用いられうるペプチドとしては、リガンド、ペプチドワクチンおよびエピトープが挙げられる。標的可能な構築物として用いられるペプチドは、固相担体並びに反復直交性の脱保護およびカップリングの標準的な技術を用いて、ペプチド自動合成器によって便利に合成される。N末端残基は血清中の安定性を向上させるためにアセチル化されうる。このような保護基は当業者にとって周知である。Greene and Wuts *Protective Groups in Organic Synthesis*, 1999 (John WileyおよびSons, N.Y.)を参照されたい。

【0110】

抗体

いくつかの実施態様において、本明細書に記載の放射性トレーサー組成物に用いられる標的分子は抗体である。本明細書で用いられる用語「抗体」は、抗体全体、およびいずれかの抗原結合性フラグメント（すなわち、「抗原-結合部位」）またはそれらの一本鎖を含みうる。例えば、「抗体」は自然発生的および非自然発生的抗体；モノクローナルおよびポリクローナル抗体；キメラおよびヒト化抗体；ヒトおよび非ヒト抗体；二重特異性抗体；全合成抗体；および1本鎖抗体のいずれをもを指しうる。本明細書で用いられる用語「抗原」は、タンパク質、ペプチドまたはハプテンなどの、いずれかの天然または合成免疫原性物質をいう。

【0111】

本明細書に記載の標的分子は、疾患の状態または病状に関連する標的抗原に対する特異的結合を持つことが当技術分野において周知である、いずれかの抗体またはフラグメントに導入されうる。標的分子として用いることのできる抗体は、様々な供給源（例えば、ATTC、Manassas、VA）から市販のものを得ることができ、および/または、可変領域の配列が公表されており、組み換え技術として当技術分野において知られている技術に従って製造されうる。いくつかの実施態様において、当該方法において用いるための抗体の例としては、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PDL-1抗体、抗OX40（CD134、TNFRSF4、ACT35および/またはTXGP1Lとしても知られている）抗体、または抗LAG-3抗体が挙げられる。

【0112】

本明細書に記載の組成物および方法に用いられる抗体は、様々な既知の技術を用いて製造されうる。免疫脾細胞の単離のための免疫方法および技術は、当技術分野において確立されている。KohlerおよびMilstein、*Nature* 256:495 (1975)において記述された、通常の体細胞融合技術を用いたモノクローナル抗体の生産、並びにBリンパ球のウイルス性または発癌性形質転換、ヒト抗体遺伝子ライブラリーを用いたファージディスプレイ技術もまた、通常のものである。さらに、キメラおよびヒト化抗体を製造するための標準的な方法は、容易に用いられる（例えば、Cabillyら

による米国特許第4,816,567号;Winterによる米国特許第5,225,539号;Queenらによる米国特許第5,530,101号;5,585,089号;5,693,762号および6,180,370号を参照されたい)。

【0113】

いくつかの実施態様において、当該放射性トレーサー組成物に用いられる標的分子は抗原結合性フラグメントである。本明細書で用いられる用語、抗体の「抗原-結合部位」は、抗原に特異的に結合する能力を持つ1つ以上の抗体フラグメントをいう。用語、抗体の「抗原-結合部位」に含まれる結合性フラグメントの例としては、(i)Fabフラグメント、すなわちV_L、V_H、CLおよびCH1ドメインから成る一価フラグメント; (ii)F(ab')₂フラグメント、すなわちヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって結合した2つのFabフラグメントから成る二価フラグメント; (iii)V_HおよびCH1ドメインから成るFdフラグメント; (iv)抗体の1本鎖のV_LおよびV_Hドメインから成るFvフラグメント、(v)V_Hドメインから成るdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546); および(vi)単離された相補性決定領域(CDR)または(vii)適宜、合成リンカーに結合されていてもよい、2つ以上の単離されたCDRの組み合わせが挙げられる。さらに、Fvフラグメントの2つのドメインであるV_LおよびV_Hは別の遺伝子にコードされているが、組み換え技術を用いた、V_LおよびV_H領域の対が1本鎖Fv(scFv)として知られる一価の分子を形成する、1つのタンパク質鎖を生産することが可能な合成リンカーによって、結合されうる; 例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; およびHouston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照されたい。このような1本鎖抗体もまた、用語、抗体の「抗原結合部位」に含まれることが意図される。これらおよび他の可能性のある構成体は、Chan & Carter (2010) Nat. Rev. Immunol. 10: 301において記述される。これらの抗体フラグメントは当業者に周知の通常の技術を用いて得られ、当該フラグメントは完全な抗体の場合と同様の方法によって、有用性をスクリーニングされる。抗原結合部位はDNA組み換え技術によってまたは、完全な免疫グロブリンを酵素的もしくは化学的に切断することによって製造されうる。

【0114】

いくつかの実施態様において、用いられる抗体は、本明細書に記載の医療用イメージングに用いるために、例えば抗体の半減期を減少させるまたはクリアランスを迅速にするなどの調節のために改変される。I253A(Hornick et al. (2000) J. Nucl. Med. 41: 355) およびH435A/R I253AまたはH310A(Kim et al. (2000) Eur. J. Immunol. 29: 2819)などのヒトIgG1のFcにおける改変は、FcRnの結合を減少させうる。Kenano v a et al. (2005) Cancer Res. 65: 622もまた参照されたい。クリアランスを向上させるための別の方法としては、本発明の抗原結合部位を、Fabフラグメントなどの、FcRnに結合する能力が欠如した抗体フラグメントの形態にすることが挙げられる。このような改変は、抗体の循環半減期を数週間から数時間減少させうる。そのため、抗体フラグメントの選択的PEG化は、必要に応じて抗体フラグメントの半減期を微調節する(少しずつ増やす)ために用いられうる。Chapman et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17: 780。

【0115】

抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む放射性トレーサー組成物は、インビトロおよび/またはインビボにおける特異的結合性の保持について評価されうる。様々な抗体組成物の結合親和性、交差反応性、および結合反応速度を解析する方法としては、例えば、ELISA、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、およびBIACORE(登録商標)2000 SPR機器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を用いたBIACORE(登録商標)表面プラズモン共鳴(SPR)解析などの当

技術分野において周知の通常のアッセイが挙げられる。

【0116】

本明細書に記載の放射性標識プローブに用いられるタンパク質の例としては、アドネクチンなどの、標的に特異的に結合し、無関係の標的に有意に交差反応する既知の抗体または別の足場タンパク質が挙げられる。

【0117】

フィブロネクチンベースのタンパク質 (FBS)

いくつかの実施態様において、本明細書に記載の放射性トレーサー組成物に用いられる標的分子はFBSタンパク質である。一般に、FBSタンパク質分子は本質的に急速な血液クリアランス速度を示すため、非関連組織からのプローブのバックグラウンドシグナルに必要な時間を最小化することによって、¹⁸Fイメージング技術の使用に有利でありうる。急速にクリアランスされるプローブによって、プローブが注入されるのと同じ日に高コントラスト画像を得ることが可能になり、特に重要なことには、対象に対する全体の放射線被曝を軽減させることができる。

【0118】

本明細書で用いられる「フィブロネクチンベースのスカホールド」または「FBS」タンパク質または部位は、フィブロネクチンIII型(「Fn3」)繰返しに基づくタンパク質または部位をいう。Fn3は、免疫グロブリン(Ig)フォールド構造(すなわち、7つのβ-ストランドおよび6つのループから成る、Ig様β-サンドイッチ構造)を有する、小さな(約10kDa)ドメインである。フィブロネクチンは18個のFn3繰返しを有し、当該繰返し間の配列相同性は低い一方で、それらは全て三次構造において高い類似性を共有している。Fn3ドメインはまた、接着分子、細胞表面分子、例えばサイトカイン受容体および糖結合ドメインなどの、フィブロネクチン以外の多くのタンパク質内にも存在する。総括として、Bork et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(19):8990-8994(1992); Bork et al., J. Mol. Biol., 242(4):309-320(1994); Campbell et al., Structure, 2(5):333-337(1994); Harpez et al., J. Mol. Biol., 238(4):528-539(1994)を参照されたい。用語「FBS」タンパク質または部位は、他のタンパク質(すなわち、非フィブロネクチン分子)のFn3ドメインに基づくスカホールドを含むことが意図される。

【0119】

Fn3ドメインは小さく、単量体、可溶性および安定である。ジスルフィド結合を持たず、そのため還元条件下で安定である。Fn3ドメインは、N末端からC末端の順に、β-シートまたはβ-様ストランド、A; ループ、AB; β-シートまたはβ-様ストランド、B; ループ、BC; β-シートまたはβ-様ストランド、C; ループ、CD; β-シートまたはβ-様ストランド、D; ループ、DE; β-シートまたはβ-様ストランド、E; ループ、EF; β-シートまたはβ-様ストランド、F; ループ、FG; およびβ-シートまたはβ-様ストランドG、を含む。7つの逆平行β-ストランドは、安定なコアを形成する2つのβ-シートに配置され、同時に、β-シートまたはβ-様ストランドに連結するループから成る2つの「面」が生じる。ループAB、CDおよびEFは1つの面(「南極」)に位置し、ループBC、DE、およびFGは反対の面(「北極」)に位置する。ヒトフィブロネクチンには少なくとも15個の異なるFn3モジュールが存在し、当該モジュール間の配列相同性は低い一方で、それらは全て三次構造において高い類似性を共有している。

【0120】

Fn3分子におけるループは、抗体の相補性決定領域(CDR)に構造的に類似しており、改変された場合、Fn3分子が標的、例えば標的タンパク質に対して結合することに関与しうる。β-シートまたはβ-様ストランド、およびN末端またはC末端領域などの、Fn3分子の他の領域もまた、改変された場合、標的に対する結合に関与しうる。ループAB、BC、CD、DE、EFおよびFGのいずれかまたは全てが、標的に対する結合に

関与しうる。ベータまたはベータ様ストランドのいずれかが、標的に対する結合に関与しうる。Fn3ドメインはまた、1つ以上のループおよび1つ以上のベータまたはベータ様ストランドを介して標的に結合しうる。結合にはまた、N末端またはC末端領域が必要とされうる。タンパク質において使用するためのFBSドメインは、全てのループ、全てのベータもしくはベータ様ストランド、またはそれらの一部のみを含み得、ここで、FBSドメインが標的特異的に結合する場合には、いくつかのループおよび/またはベータもしくはベータ様ストランドおよび/またはN-もしくはC末端領域は改変（または変更）されている。例えば、FBSドメインは1、2、3、4、5または6個のループ、1、2、3、4、5、6、7、または8個のベータストランド、並びに適宜N末端および/またはC末端領域を含み得、ここで、1つ以上のループ、1つ以上のベータストランド、N末端領域および/またはC末端領域は、野生型FBSドメインに対して改変されている。

10

【0121】

ヒト¹⁰Fn3ドメインに基づくFBSタンパク質の例としては、アドネクチン(Bristol-Myers Squibbの子会社が完全に所有する、Adnexus)が挙げられる。アドネクチンは、¹⁰Fn3ドメインのCDR様ループ領域、-ストランド、N末端および/またはC末端領域が、目的の化合物に結合できるタンパク質を進化させるために改変された、¹⁰Fn3分子である。例えば、米国特許第7,115,396号において、BC、DE、およびFGループの改変によってTNF結合剤に対する高い親和性を生じる、¹⁰Fn3ドメインタンパク質が記述される。米国特許第7,858,739号において、BC、DE、およびFGループの改変がVEGFR2結合剤に対する高い親和性を生じる、Fn3ドメインタンパク質が記述される。

20

【0122】

いくつかの実施態様において、FBS部位は、フィブロネクチン、例えばヒトフィブロネクチンのIII型ドメインの10回目の繰り返し以外の、Fn3繰り返しである。例えば、FBS部位は、他のフィブロネクチンIII型の繰り返し、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17および18回目のFn3繰り返しのいずれかに類似しうる。さらに別の実施態様において、FBS部位は、フィブロネクチン以外の分子に由来しうる。例えば、FBS部位は、フィブロネクチンにおいて見られるものと同様の配列類似性を互いに有する、15個のFn3ドメインから成るタンパク質であるテネインに由来しうる。これらの繰り返しは、例えば、Jacobs et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25:107(2012)において記述される。フィブロネクチン分子およびテネイン分子における繰り返しの相同性に基づき、これらの相同性に基づく人工分子が創造されている。フィブロネクチン分子中のドメインの相同性に基づくアミノ酸の共通配列を含むタンパク質は、フィブコン(Fibcon)およびフィブコンB(WO2010/093627およびJacobs et al.(2012)supra.)と称され、テネイン分子中のドメインの相同性に基づくものは、テンコン(Tencon)(WO2010/051274、WO2010/051310およびWO2011/137319、これらは引用により本明細書に明確に援用される)と称される。フィブコン、フィブコンBまたはテンコン部位、またはそれらのパリアントに結合する標的は、それ自体であっても、または異なる部位に結合していても、本明細書に記載されるように融合されうる。他のタンパク質、例えば細胞表面ホルモンおよびサイトカイン受容体、シャペロニンおよび糖結合ドメインなどに由来するFn3ドメインは、本明細書に記載のように結合されうる。

30

40

【0123】

目的の標的分子のいずれかに特異的なFBSタンパク質は、当技術分野において承認されている方法を用いて製造および評価されうる。FBSタンパク質の結合特性を評価するための方法もまた既知である。例えば、特異的結合特性を有するFn3ドメインを迅速に製造および評価するための方法の1つは、Adnexus, Bristol-Myers Squibb R & D Companyによる核酸-タンパク質融合技術である。本開示

50

は、タンパク質への結合に重要な、新たなポリペプチドおよびアミノ酸モチーフを特定するために、核酸 - タンパク質融合体 (RNA - および DNA - タンパク質融合体) を用いる、「プロフュージョン (PROFUSION)」と称されるインビトロ発現および標識技術を利用する。核酸 - タンパク質融合技術は、タンパク質とそれをコードする遺伝情報を共有結合させる技術である。RNA - タンパク質融合技術およびフィブロネクチンベースのスクヤホールドタンパク質ライブラリースクリーニング方法に関する詳細な記述については、以下を参照されたい: S z o s t a k らによる、米国特許第 6, 258, 558 号、6, 261, 804 号、6, 214, 553 号、6, 281, 344 号、6, 207, 446 号、6, 518, 018 号および 6, 818, 418 号; R o b e r t s e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 1997; 94: 12297 - 12302; および K u r z e t a l . , M o l e c u l e s , 2000; 5: 1259 - 64、これのすべては引用によって本明細書に援用される。

【0124】

FBS タンパク質または部位の例としては、これらに限定はされないが、メソテリアン (mesothelium)、グリピカン (glypican)、TL1A、CD8、ミオスタチン、LPA1 受容体、TNF - アルファ、VEGFR2、PCSK9、IL - 23、EGFR または IGF1R に結合するもの、および、例えば、WO2010/093627、WO2011/130324、WO2009/083804、WO2009/133208、WO02/04523、WO2012/016245、WO2009/023184、WO2010/051310、WO2011/020033、WO2011/051333、WO2011/051466、WO2011/092233、WO2011/100700、WO2011/130324、WO2011/130328、WO2011/137319、WO2010/051274、WO2009/086116、WO09/058379、WO2013/067029 および WO2012/016245 において記述されるものが挙げられる (これらの全ては引用によって本明細書に具体的に援用される): これらの公表文献に記述される FBS タンパク質または部位のいずれかは、本明細書に記載されるように用いられうる。

【0125】

いくつかの実施態様において、FBS タンパク質は PDL - 1 に結合する。いくつかの実施態様において、FBS タンパク質は配列番号: 1 または配列番号: 2 のアミノ酸配列を含む。

【0126】

いくつかの実施態様において、例えば FBS タンパク質を含むイメージング剤は、例えばイメージングのコントラストを少し増強させることによって血液の PK を上昇させる、または ^{18}F - 標識標的薬剤の親和性を向上させるなどの、調節を行う部位に結合している。いくつかの実施態様において、哺乳動物 (例えば、マウス、ラットまたはヒト) におけるポリペプチドのクリアランス速度は、未修飾 FBS タンパク質に対して、2 倍以上、3 倍以上、4 倍以上または 5 倍である、または上昇する。タンパク質の血液からのクリアランスを減速させる部位、本明細書においては「PK 部位」と称されるが、この部位としては、ポリオキシアルキレン部位 (例えば、ポリエチレングリコール)、糖 (例えば、シアル酸)、および耐容性良好なタンパク質部位 (例えば、Fc およびフラグメントおよびそれらのバリエーション、トランスフェリンまたは血清アルブミン) が挙げられる。当該 FBS タンパク質はまた、米国出願第 2007/0048282 号に記載のように、アルブミンまたはアルブミンのフラグメント (一部) もしくはバリエーションに融合されていてもよく、または本明細書に記載のように、FBS タンパク質に結合した 1 つ以上の血清アルブミンに融合されていてもよい。

【0127】

本発明に用いることのできる他の PK 部位は、K o n t e r m a n n e t a l . , (Current Opinion in Biotechnology 2011; 22: 868 - 76 において記述されるものを含み、引用により本明細書に援用される。このよう

な P K 部位としては、これらに限定はされないが、ヒト血清アルブミン融合体、ヒト血清アルブミン複合体、ヒト血清アルブミン結合剤（例えば、アドネクチン P K E、A l b u d A b、A B D）、X T E N 融合体、P A S 融合体（すなわち、プロリン、アラニン、およびセリンの3つのアミノ酸に基づく組み換え P E G 模倣体）、炭水化物複合体（例えば、ヒドロキシエチルデンプン（H E S））、糖鎖付加体、ポリシアル酸複合体、および脂肪酸複合体が挙げられる。

【0128】

いくつかの実施態様において、本発明はポリマー糖である P K 部位に融合された ¹⁸F - 標識 F B S タンパク質を示す。いくつかの実施態様において、P K 部位はポリエチレングリコール部位である。P E G は、周知の水溶性ポリマーであり、市販されている、または当技術分野において周知の方法（S a n d l e r a n d K a r o , P o l y m e r S y n t h e s i s , A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k , V o l . 3 , p a g e s 138 - 161）に従い、エチレングリコールの開環重合によって製造される。

【0129】

用語 P E G は、大きさまたは P E G の末端の修飾に関わらず、あらゆるポリエチレングリコール分子を広く含むように用いられ、式： $X - O(CH_2CH_2O)_n - CH_2CH_2OH$ によって示され得、ここで、n は 2 以上、例えば 20 から 2300 であり、X は H または末端の修飾、例えば、C₁₋₄ アルキルである。P E G は、当該分子の化学合成に由来する；または当該分子の一部を最善の距離に保つためのスペーサーとして働く、結合反応に必要なさらなる化学基を含みうる。さらに、このような P E G は、互いに結合された 1 つ以上の P E G 側鎖から成りうる。1 つ以上の P E G 鎖を有する P E G は、多岐または分岐型 P E G と称されうる。分岐型 P E G は、例えば、欧州公開出願第 473084 A 号、および米国特許第 5,932,462 号において記述される。

【0130】

1 つ以上の P E G 分子は、タンパク質の異なる部位に結合されていてもよく、このような結合はアミン、チオールまたは他の適切な反応基との反応によって達成されうる。アミン部位は、例えば、ポリペプチドの N 末端に存在する 1 級アミン、またはリシンまたなアルギニンなどのアミノ酸に存在するアミン基でありうる。いくつかの実施態様において、P E G 部位は、以下から成る群から選択されるポリペプチド上の部位に結合される：a) N 末端；b) N 末端と、最も N 末端側のベータストランドまたはベータ様ストランドの間；c) 標的結合部位の反対側のポリペプチド面に位置するループ；d) C 末端と、最も C 末端側にあるベータストランドまたはベータ様ストランドの間；および e) C 末端。

【0131】

P E G 化は、部位特異的な P E G 化によって達成され得、ここで、P E G 化が選択的に生じる部位を創出するために、適切な反応基が当該タンパク質に導入される。いくつかの実施態様において、当該タンパク質は目的の部位にシステイン残基を導入するように改変され、これによってシステイン上での部位特異的な P E G 化が可能になる。変異は、システイン残基を生じるようにタンパク質コード配列に導入されうる。これは、例えば、1 つ以上のアミノ酸残基をシステインに変異させることによって達成されうる。システイン残基に変異されるのに好ましいアミノ酸としては、セリン、スレオニン、アラニンおよび他の親水性残基が挙げられる。好ましくは、システインに変異される残基は、表面に露出された残基である。一次配列またはタンパク質に基づき、残基の表面への到達性を予測するためのアルゴリズムは当技術分野において周知である。あるいは、結合性ポリペプチドの設計および進化の基盤となる骨格の結晶構造が解明され（H i m a n e n e t a l . , N a t u r e 2001 ; 414 : 933 - 8 を参照されたい）、そのため表面に露出している残基が特定されたことから考えれば、表面の残基は結合性ポリペプチドのアミノ酸配列を比較することによって予測されうる。システイン残基の P E G 化は、例えば P E G - マレイミド、P E G - ビニルスルホン、P E G - ヨードアセトアミド、または P E G - オルトピリジルジスルフィドを用いて実行されうる。

【0132】

PEGは一般に、ポリペプチドの目的の部位に結合させるのに適切な、適当な活性基によって活性化される。PEG化方法は当技術分野において周知であり、さらに以下において記述される：Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), および Zalipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16: 157 - 182.

10

【0133】

PEGは分子量においてばらつきが大きくてもよく、分岐または直鎖状でありうる。一般に、PEGの重量平均分子量は約100ダルトンから約150,000ダルトンである。PEGの重量平均分子量の例としては、約1,000ダルトン、約2,000ダルトン、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約40,000ダルトン、約60,000ダルトン、および約80,000ダルトンが挙げられる。いくつかの実施態様において、PEGの分子量は約5,000ダルトンである。前記のいずれかの総分子量を有する分岐型PEGもまた用いられうる。いくつかの実施態様において、PEGは2つの分岐を有する。別の実施態様において、PEGは4つの分岐を有する。ある実施態様において、PEGはビス-PEG (NOF Corporation, DE-200MA) である。

20

【0134】

抗体と同様に、アドネクチンの選択的PEG化は、必要に応じてアドネクチンの半減期を微調節する（少しずつ増やす）ために用いられうる。

【0135】

サイズ排除（例えば、ゲル濾過）およびイオン交換クロマトグラフィーなどの、当技術分野において周知の通常分離および精製技術は、PEG化FBSタンパク質を精製するために用いられうる。生成物はまた、SDS-PAGEによっても分離されうる。分離されうる生成物としては、モノ-、ジ-、トリ-、ポリ- および非ペグ化アドネクチン、並びに遊離のPEGが挙げられる。当該組成物中のモノ-PEGの割合を増加させるために、モノ-PEG化複合体の割合は、溶出ピーク周辺の広範な画分を回収することによって制御されうる。約90%のモノ-PEG化複合体は、収率および活性の良好なバランスを示す。

30

【0136】

IV. 標的

本明細書に記載の ^{18}F -標識プローブに結合する、インビボでの標的分子の例は、悪性疾患、心血管疾患、感染性疾患、炎症性疾患、自己免疫性疾患、または神経性疾患などの様々な疾患または病状に関連するものである。

【0137】

^{18}F 標識イメージング剤、例えば [^{18}F] - 基 - 4PEG-DBCO-FPPEG A が本明細書に示され、ここで、当該基はヒト細胞の表面の標的タンパク質などの標的分子に特異的に結合する。いくつかの実施態様において、当該基はペプチド；抗体、またはその抗原結合部位、または抗体のバリエーション；FBS、例えばヒト $^{10}\text{Fn3}$ ドメイン、などのFn3（例えばヒトFn3）のような、別のスキャホールドである。いくつかの実施態様において、当該基は、例えば腫瘍細胞、または腫瘍内に存在する腫瘍浸潤リンパ球などの腫瘍内の細胞における細胞表面分子などの、細胞表面分子に結合する。いくつかの実施態様において、当該基は免疫細胞、例えばT細胞（例えば、Treg細胞）、Teff細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞またはランゲルハンス細胞などにおける、細胞表面分子に結合する。

40

【0138】

50

いくつかの実施態様において、 ^{18}F 標識イメージング剤は、免疫細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）上の共刺激性受容体または、免疫細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）上の阻害剤などの、癌免疫標的（受容体またはリガンド）に特異的に結合する部位を含み、その部位は免疫応答を調節することを目的とする。ある実施態様において、当該部位は以下の分子またはリガンドまたはそれらの受容体のうちの1つに結合する：免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）のメンバー；B7ファミリーのメンバー、例えば、B7-1、B7-2、B7-H1（PD-L1）、B7-DC（PD-L2）、B7-H2（ICOS-L）、B7-H3、B7-H4、B7-H5（VISTA）、およびB7-H6；TNF受容体スーパーファミリーメンバーまたはそのリガンド、例えばCD40、CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、GITR、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT α R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEG1/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、リンホトキシン β /TNF、TNFR2、TNF α 、LT α R、リンホトキシン α 1-2、FAS、FASL、REL γ T、DR6、TROY、NGFR（例えば、Tansey（2009）Drug Discovery Today 00:1を参照されたい）；免疫細胞を阻害するタンパク質（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）、例えばCTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、およびLAG-3、TIM-3、ガレクチン9、CEACAM-1、BTLA、CD69、ガレクチン-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、CD73、PD1H、LAIR1、TIM-1、TIM-4、CD39；免疫応答を促進するタンパク質、例えば、B7-1、B7-2、CD28、4-1BB（CD137）、4-1BBL、GITR、GITRL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、CD27、CD40、DR3およびCD28H；以下の細胞表面分子のいずれか：KIR、サイトカインまたはインターロイキン受容体、IL-6、IL-10、TGF- β 、VEGF、CSF-1R、CD25およびIDO。

【0139】

いくつかの実施態様において、標的分子は、これらに限定はされないが、真菌、ウイルス、寄生虫および細菌などの病原体の抗原または受容体に結合する。本明細書に記載の方法によって検出可能な病原性ウイルスの例としては、HIV、肝炎（A、B、またはC）、ヘルペスウイルス（例えば、VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、およびCMV、エプスタイン・バーウイルス）、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器多核体ウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクチニアウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、ラブドウイルス、JCウイルスおよびアルボウイルス性脳炎性ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、セロウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、ヒト血清パルボ型ウイルス、シミアンウイルス40、呼吸器多核体ウイルス、マウス乳癌ウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT-細胞白血病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水胞性口炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、イボウイルス、ブルータングウイルスが挙げられる。細菌および真菌の例としては、ストレプトコッカス・アガラクティアエ、レジオネラ・ニューモフィラ、ストレプトコッカス・ピオゲネス、大腸菌、淋菌、髄膜炎菌、肺炎レンサ球菌、ヘモフィルス・インフルエンザ菌B、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、緑膿菌、らい菌、ウシ流産菌、結核菌および破傷風菌が挙げられる。

10

20

30

40

50

本明細書に記載の方法によって検出可能な感染を引き起こす病原性細菌のいくつかの例としては、クラミジア、リケッチア細菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、レンサ球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌および淋菌、クレブシエラ菌、プロテウス菌、セラチア菌、シュードモナス菌、レジオネラ菌、ジフテリア菌、サルモネラ菌、桿菌、コレラ菌、破傷風菌、ボツリヌス菌、炭疽菌、ペスト菌、レプトスピラ、およびライム病細菌が挙げられる。

【0140】

本明細書に記載の方法によって検出可能な感染を引き起こす病原性真菌のいくつかの例としては、カンジダ（アルビカンズ、クルセイ、グラブラータ、トロピカリス、など）、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、アスペルギルス（フミガーツス、ニジェール、など）、ムコラーレス属（ムコール、アブシジア、リゾプス）、スポロトリックス・シェンキイ、プラストマイセス・デルマチチジス、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス、コクシジオイデス・イミティスおよびヒストプラズマ・カプスラーツムが挙げられる。

10

【0141】

本明細書に記載の方法によって検出可能な感染を引き起こす病原性寄生虫のいくつかの例としては、赤痢アメーバ、大腸バランチジウム、ネグレリアフォーレリ、アカントアメーバ *s p .*、ランブル鞭毛虫、クリプトスポリジウム *s p .*、ニューモシスチス・カリニ、三日熱マラリア原虫、バベシア・ミクロチ、ブルーストリパノソーマ、クルーズトリパノソーマ、リーシュマニア・ドノバンリ、トキソプラズマ原虫、ブラジル鉤虫が挙げられる。

【0142】

20

V．生物物理学的および生物化学的特性

本明細書に記載のタンパク質標的分子の標的分子への結合は、平衡定数（例えば、解離、 K_D ）から、および速度定数（例えば、結合速度定数、 k_{on} および解離速度定数、 k_{off} ）から評価されうる。 k_{off} が十分に小さい、または k_{on} が十分に大きい場合には、大きな K_D 値は許容されうるが、タンパク質標的分子は一般に K_D が 500 nM、100 nM、10 nM、1 nM、500 pM、200 pM、または 100 pM 未満で標的分子に結合する。

【0143】

タンパク質標的分子の結合親和性を決定するためのアッセイの例としては、これらに限定はされないが、結合平衡除外法（KinExA）（Blake et al., JBC 1996; 271: 27677-85; Drake et al., Anal Biochem 2004; 328: 35-43）、Biacore システム（Uppsala, Sweden）を用いた表面プラズモン共鳴（SPR）（Welford et al., Opt. Quant. Elect 1991; 23: 1; Morton and Myszk a, Methods in Enzymology 1998; 295: 268）、および均一性時間分解蛍光（HTRF）法（Newton et al., J Biomol Screen 2008; 13: 674-82; Patel et al., Assay Drug Dev Technol 2008; 6: 55-68）などの液相法が挙げられる。

30

【0144】

いくつかの実施態様において、生体分子の相互作用は、表面の屈折率を最大 300 nm 変化させるための補助ガラス上の金薄膜上の表面における光の共鳴角の変化を検出する SPR を用いた、Biacore システムによって、リアルタイムでモニターされうる。Biacore 解析によって、結合速度定数、解離速度定数、平衡解離定数、および結合定数が得られる。結合親和性は、Biacore 表面プラズモン共鳴システム（Biacore, Inc.）を用いて、結合および解離速度定数を評価することによって得られる。バイオセンサーチップが標的の共有結合に対して活性化される。次いで、標的を希釈し、チップ上に注入することで、固定化された物質の応答ユニットにおいてシグナルが得られる。応答ユニット（RU）におけるシグナルは固定化された物質の質量に比例するため、これはマトリックスにおける固定化された標的の密度の範囲を表す。結合および解離データは、1:1 の二分子相互作用のための正味の発現率を解明するための網羅的解析に同時

40

50

に適應され、 k_{on} 、 k_{off} および R_{max} (飽和時の最大応答) の最適値が得られる。結合の平衡解離定数、 K_D は SPR 測定から k_{off} / k_{on} として計算される。

【0145】

いくつかの実施態様において、本明細書に記載のタンパク質標的分子は、SPR 親和性アッセイにおいて、500 nM 以下、400 nM 以下、300 nM 以下、200 nM 以下、150 nM 以下、100 nM 以下、90 nM 以下、80 nM 以下、70 nM 以下、60 nM 以下、50 nM 以下、40 nM 以下、30 nM 以下、20 nM 以下、15 nM 以下、10 nM 以下、5 nM 以下、または 1 nM 以下の K_D を示す。

【0146】

当然のことながら、本明細書において上述のアッセイは例示的なものであり、タンパク質間の結合親和性を決定するための当技術分野において周知のあらゆる方法 (例えば、蛍光エネルギー移動 (FRET)、酵素結合免疫吸着アッセイ、および競合結合測定 (例えば、放射免疫アッセイ)) が、本明細書に記載のタンパク質標的分子の結合親和性を評価するために用いられる。

【0147】

VI. 製剤

薬学的に許容可能な担体と共に製剤化される、本明細書に記載の ^{18}F -標識標的薬剤のうちの1つ、またはそれらの組み合わせを含む、組成物、例えば医薬組成物がさらに示される。このような組成物は、本明細書に記載の薬剤のうちの1つ、またはそれらの組み合わせ (例えば、2つまたはそれ以上) を含む。例えば、本明細書に記載の医薬組成物は、 ^{18}F -標識標的薬剤および薬物の組み合わせを含む。

【0148】

本明細書で用いられる「薬学的に許容可能な担体」は、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張化および吸収遅延剤など、生理学的に適合性のあるもののいずれかおよび全てを含む。好ましくは、担体は静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または上皮投与 (例えば、注射または点滴による) に適切である。投与経路に従って、 ^{18}F -標識標的薬剤は、当該化合物を酸および、当該化合物を不活性化しうる他の自然条件の働きから保護する物質によってコーティングされる。

【0149】

本明細書に記載の薬学的に許容可能な化合物は、1つ以上の薬学的に許容可能な塩を含む。「薬学的に許容可能な塩」は、元の化合物の望ましい生物学的活性を保持し、いずれの望ましくない毒性効果も与えない塩をいう (例えば、Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19 を参照されたい)。そのような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの非毒性無機酸に由来するもの、並びに脂肪族モノ-およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などの非毒性有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属に由来するもの、並びに N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの非毒性有機アミンに由来するものが挙げられる。

【0150】

本明細書に記載の医薬組成物はまた、薬学的に許容可能な抗酸化剤を含む。薬学的に許容可能な抗酸化剤の例としては、以下が挙げられる：(1) アスコルビン酸、システイン塩酸、硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウムなどの、水溶性の抗酸化剤；(2) パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロールなどの、脂溶性の抗酸化剤；および(3) クエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの、金属キレート剤。

【0151】

本明細書に記載の医薬組成物に用いられうる適切な水性および非水性の担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、並びにオレイン酸エチルなどの注入可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング物質を用いることによって、分散の場合には必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって、維持されうる。

【0152】

これらの組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバンドを含みうる。微生物の生存を防ぐことは、前記の滅菌処置、並びに、例えばパラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノールなどの様々な抗細菌および抗真菌剤を含有することの両方によって確保されうる。また、糖、塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物中に含むことが望ましい。さらに、注入可能な剤形の吸収遅延は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤を含有することによってもたらされうる。

【0153】

薬学的に許容可能な担体としては、無菌水溶液または分散液、および注入可能な無菌溶液または分散液を即時調製するための無菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためのこのような溶媒および薬剤の使用は、当技術分野において既知である。通常の溶媒または薬剤のいずれかが、当該活性化化合物に対して不適合である場合を除いて、本明細書に記載の医薬組成物中のこれらを使用することが考慮される。さらなる活性化化合物もまた、当該組成物に含まれうる。

【0154】

医薬組成物は、一般に製造および保管状態において、無菌および安定でなければならない。当該組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または、高い薬物濃度に適切な他の秩序構造として製剤化されうる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒でありうる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを用いることによって、分散液の場合は必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持されうる。多くの場合において、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物中に含むことが好ましい。注入可能な組成物の吸収遅延は、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンなどの吸収遅延剤を組成物中に含有することによってもたらされうる。

【0155】

注入可能な無菌溶液は、必要な分量の¹⁸F-標識標的薬剤を適切な溶媒中に、必要に応じて前記で列挙される成分のうちの1つまたはそれらの組み合わせと共に加え、精密濾過によって滅菌を行うことによって製造されうる。一般に、分散液は、活性化化合物を標準的な分散媒および前記で列挙される他の必要な成分を含む無菌溶媒中に加えることによって製造される。注入可能な無菌溶液を調製するための無菌粉末の場合は、好ましい製造方法は真空乾燥およびフリーズ・ドライ（凍結乾燥）であり、活性成分に加えて、あらかじめ濾過された無菌溶液中のさらに必要ないずれかの成分を含む粉末が得られる。

【0156】

単一剤形を生成するために担体物質と組み合わせられうる¹⁸F-標識標的薬剤の分量は、治療される対象および特定の投与方法に応じて変化する。単一剤形を生成するために担体物質と組み合わせられうる¹⁸F-標識標的薬剤の分量は、一般に検出可能な効果が得られる当該組成物の分量である。一般に、百分率で、この分量は薬学的に許容可能な担体との組み合わせにおいて、約0.01パーセントから約99パーセントの活性成分、好ましくは約0.1パーセントから約70パーセント、最も好ましくは約1パーセントから約30パーセントの活性成分に及ぶ。

【0157】

VII. 投与およびイメージング

本明細書に記載の ^{18}F -標識標的薬剤は、様々なインビボイメージングの応用（例えば、組織または全身のイメージング）において有用である。いくつかの実施態様において、 ^{18}F -標識標的薬剤は、例えば標的発現性腫瘍などの標的-陽性細胞または組織をイメージングするために用いられうる。例えば、標識された ^{18}F -標識標的薬剤は、対象の組織に ^{18}F -標識標的薬剤が取り込まれるのに十分な分量において、対象に投与される。対象は次いで、PETなどのイメージングシステムを用いて、 ^{18}F 放射性核種に必要な時間にわたってイメージングされる。標的物質を発現している細胞または組織に結合した ^{18}F -標識標的薬剤が、次いでイメージングシステムによって検出される。

【0158】

一般に、イメージングのために、単一の静脈内注入として約1mgから200mgの範囲のタンパク質またはペプチドの用量を患者に投与することが望ましいが、低容量または高容量もまた状況に応じて投与されうる。一般に、典型的な大人に対して、体表面積の平方メートルあたり約1mgから10mgのタンパク質またはペプチドの範囲の用量を患者に投与することが望ましいが、低容量または高容量もまた状況に応じて投与されうる。イメージングの目的のためにヒトの対象に投与されうるタンパク質またはペプチドの用量の例としては、約1から200mg、約1から70mg、約1から20mg、約1から10mgが挙げられるが、高容量または低容量もまた用いられうる。

【0159】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F -放射性標識-タンパク質の分量は、1日に約0.005 μg /体重kgから約50 μg /体重kgの間、通常は0.02 μg /体重kgから約3 μg /体重kgの間で投与される。PETトレーサーに関連する質量は、自然同位体の形態、すなわち ^{18}F -PETトレーサーにおいて ^{19}F のものである。本発明の組成物の特定の分析用量としては、約0.5 μg から約100 μg の ^{18}F -放射性標識タンパク質が挙げられる。用量は通常は約1 μg から約50 μg の ^{18}F -放射性標識タンパク質である。

【0160】

用量レジメンは、 ^{18}F -標識標的薬剤を取り込む組織または細胞の鮮明なイメージを得るために最適化された検出可能な分量を提供するように調整される。特に有利であるのは、簡便な投与および用量の均一性のために、非経口組成物を単位剤形として製剤化することである。本明細書で用いられる単位剤形は、 ^{18}F -標識標的薬剤が投与される対象に対して均一な用量として適合された、物理的に個別の単位をいう。本明細書に記載の単位剤形のための仕様(specification)は、以下によって決定および直接影響される：(a) ^{18}F -標識標的薬剤の標的部位固有の特性；(b)標的とされる組織または細胞；(c)用いられるイメージング技術固有の制約。

【0161】

^{18}F -標識標的薬剤の投与のために用いられる用量は、疾患の種類、用いられる標的化合物、対象の年齢、健康状態および性別、疾患の程度、診察される部位などによって変化する。特に、対象の照射線量についての十分な配慮を行わなければならない。好ましくは、 ^{18}F の飽和用量が患者に投与される。例えば、 ^{18}F -標識標的薬剤の放射線量は通常、3.7メガベクレルから3.7ギガベクレル、好ましくは、18メガベクレルから740メガベクレルに及ぶ。あるいは、用量は、例えばミリキュリーによって測定されうる。いくつかの実施態様において、イメージング実験のために投与される ^{18}F イメージング剤の分量は、5から10mCiである。別の実施態様において、有効量は約1-5mCiの範囲の放射を生じるのに十分な化合物の分量である。

【0162】

本明細書に記載の医薬組成物における活性成分の実際の用量段階は、特定の患者の細胞または組織、組成物、および投与方法において、患者に毒性がなく、 ^{18}F -標識標的薬剤の望ましい取り込みが生じるのに有効な活性成分の分量を得るために変化する。当然のことながら、しかしながら、本開示の ^{18}F -標識標的薬剤の1日の総用量は、健全な医学的判断の範囲で、主治医または他の担当の専門家によって決定される。いずれかの特

10

20

30

40

50

定の対象に固有の有効な用量段階は、例えば、用いられる特定の組成物の活性；用いられる特定の組成物；患者の年齢、体重、全体的な健康状態、性別、および食生活；投与時間；投与経路；用いられる特定の化合物の排出率；治療の継続時間；用いられる特定の組成物との組み合わせにおいて使用される、他の薬剤、化合物および/または物質、治療患者の年齢、性別、体重、病状、全体的な健康状態、および以前の病歴、並びに医療分野において周知の因子などの、様々な因子によって変化する。いくつかの実施態様において、ヒトの対象に投与される、イメージングに必要な ^{18}F -放射性標識プローブの分量は、処方医によって決定され、一般に当該用量は ^{18}F -放射性核種からの放射量に従って変化する。

【0163】

本明細書に記載の組成物は、当技術分野において周知の様々な方法の1つ以上を用いて、1つ以上の投与経路によって投与されうる。当業者によって理解されるように、投与経路および/または方法は、求められる結果に従って変化する。本明細書に記載の ^{18}F -標識標的薬剤の好ましい投与経路としては、例えば注射もしくは点滴による、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口投与が挙げられる。本明細書で用いられる用語「非経口投与」は、通常は注射による、経腸および局所投与以外の投与方法を意味し、例として、これらに限定はされないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管の、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および点滴が挙げられる。いくつかの実施態様において、 ^{18}F -放射性標識標的化合物は静脈内投与される。

【0164】

あるいは、本明細書に記載の ^{18}F -標識標的薬剤は、局所、上皮または粘膜、例えば、鼻腔内、経口、膣内、直腸内、舌下または局所などの投与経路によって非-非経口(non-parenteral)投与されうる。

【0165】

いくつかの実施態様において、本明細書に記載の ^{18}F -標識標的薬剤は、インビボで適切に分布されるように製剤化されうる。例えば、血液脳関門(BBB)は多くの高親水性化合物を排除する。薬剤は、例えばリポソーム内に製剤化されることによってBBBを通過しうる。リポソームを製剤化する方法としては、例えば、米国特許第4,522,811号；5,374,548号；および5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器に選択的に輸送される1つ以上の部位を含み得、そのため薬物の標的送達を向上させうる(例えば、V.V.Ranade(1989)J.Clin.Pharmacol.29:685を参照されたい)。標的部位の例としては、葉酸またはビオチン(例えば、米国特許第5,416,016号、Low et al.を参照されたい)；マンノシド(Umezawa et al., (1988)Biochem.Biophys.Res.Comm.153:1038)；抗体(P.G.Bloeman et al.(1995)FEBS Lett.357:140；M.Owais et al.(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180)；サーファクタントタンパク質A受容体(Briscoe et al.(1995)Am.J.Physiol.1233:134)；p120(Schreier et al.(1994)J.Biol.Chem.269:9090)が挙げられ、K.Keinanen；M.L.Laukkanen(1994)FEBS Lett.346:123；J.J.Killion；I.J.Fidler(1994)もまた参照されたい。

【0166】

以下の実施手順は、診療所において、PETイメージングを用いて患者を診察する際に用いられうる。患者は実施日のしばらく前に、非標識タンパク質を前投与され、少なくとも12時間は絶食し、水を自由摂取することは許可される。放射性トレーサーの投与を血液内に集中させるため、20G2-インチ静脈カテーテルが対側尺骨静脈に挿入される。

【0167】

患者をPETカメラに配置し、 $[^{18}\text{F}]$ 実施例9化合物($<20\text{mCi}$)などの、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープのPETトレーサーのトレーサー量が静脈カテーテルを通して投与される。未代謝のPETトレーサーである、血漿中の $[^{18}\text{F}]$ 実施例2化合物の割合を解析および定量するために、動脈または静脈血液サンプルのいずれかが、PETスキャンの間の適切な時間間隔において採取される。画像は最大で120分にわたって得られる。放射性トレーサーの注射の10分以内およびイメージング時間の終わりに、PETトレーサーの前に投与され得た非標識タンパク質の血漿濃度を決定するため、1mLの血液サンプルが採取される。

【0168】

画像再構成から断層画像が得られる。放射性トレーサーの分布を決定するため、関心領域(ROI)が、これらに限定はされないが、肺、肝臓、心臓、腎臓、皮膚または他の臓器または組織などの再構成画像上に描かれる。これらの領域における放射性トレーサーの経時的な取り込みは、試験される様々な投与パラダイムにおいて、あらゆる治療介入の非存在下、または非標識タンパク質の存在化で得られる時間放射能曲線(TAC)を作成するために用いられる。データは、単位容量あたりの単位時間あたりの放射能($\mu\text{Ci}/\text{cc}/\text{注入用量のmCi}$)として表される。TACデータは当技術分野において周知の様々な方法によって処理され、非占有標的陽性組織の密度に比例する結合能(BP)または体積分布(V_T)などの定量パラメーターが得られる。

【0169】

VIII. キットおよび製品

本明細書に記載の ^{18}F -放射性標識標的組成物の生成のためのキットおよび使用のための説明書もまた示される。キットには、一般に、所定量の試薬と説明書のパッケージ化された組み合わせおよびキットの内容物の意図される用途を表すラベルが含まれる。用語ラベルには、キットに組み込まれたまたはキットに含まれる、またはそうでなければ、キットに付随する、あらゆる文書または記録されたものが含まれる。

【0170】

例えば、いくつかの実施態様において、キットは補欠分子族が ^{18}F によって当該部位でフッ素化され、次いで投与前に放射性標識補欠分子族がBFC-結合標的分子(例えば、タンパク質またはペプチド)に結合する条件において必要な試薬を含む。

【0171】

いくつかの実施態様において、キットは、本明細書においてさらに記述されるPD-L1アドネクチン-PEG4-DBCO- ^{18}F などの、 ^{18}F 標識抗PD-L1アドネクチンインビボイメージング剤を形成するのに必要な1つ以上の試薬を含む。例えば、キットは抗PD-L1アドネクチン-PEG-4-DBCOを含む第一のバイアル、および $[^{18}\text{F}]$ FPPEGAを含む第二のバイアルを含みうる。キットは、抗PD-L1アドネクチン-PEG-4-DBCOを含む第一バイアル、4-PEG-トシル-アジドを含む第二バイアル、および O^{18} 水中の ^{18}F を含む第三バイアルを含みうる。キットはさらに、バイアル、溶液および適宜PD-L1アドネクチン-PEG4-DBCO- ^{18}F の生成に必要な追加の試薬を含みうる。

【0172】

いくつかの実施態様において、キットはさらに、少なくとも1つの追加の試薬(例えば、薬学的に許容可能な担体)を含みうる。いくつかの実施態様において、当該キットは、本明細書において開示される方法に従って標識プロープを生成するために用いられる反応前駆体を含む。キットの成分は、本明細書に記載されるような、モニターされる特定の生物学的条件に合わせて調整されうる。宿主細胞または宿主生物に、前記で列挙される成分の様々な組み合わせを投与するために、キットはさらに当技術分野において周知の適切な緩衝液および試薬を含みうる。イメージング剤および担体は、溶液または凍結乾燥された形態で提供されうる。キットのイメージング剤および担体が凍結乾燥された形態である場合、キットは適宜、水、生理食塩水、緩衝生理食塩水などの、無菌および生理学的に許容可能な再構成溶媒を含んでもよい。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シ

リンジおよび試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたは樹脂などの様々な物質から形成されうる。さらに、商業上および利用者の観点から望ましい他の物質、例えば、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジおよび使用説明書に付随する添付文書もまた挙げられる。

【0173】

IX. 使用

^{18}F -標識標的薬剤を用いたイメージング方法が本明細書において示される。 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのPETプローブなどの陽電子放出断層撮影(PET)トレーサーは、インビトロおよびインビボでの画像診断および診断の応用において使用するための、現在利用可能なPET技術と共に用いられうる。PETスキャンによる ^{18}F イメージングのためのイメージング技術および装置は、当技術分野において周知であり(例えば、米国特許第6,358,489号;6,953,567号;Page et al., Nuclear Medicine and Biology, 21:911-919, 1994;Choi et al., Cancer Research 55:5323-5329, 1995;Zalutsky et al., J. Nuclear Med., 33:575-582, 1992を参照されたい)、このような周知のPETイメージング技術または装置のいずれかが用いられうる。

【0174】

本明細書に示されるイメージング方法のインビボでの応用としては、疾患の診断、疾患の進行のモニター、予後、対象の治療への応答の可能性の決定、治療への適格性の決定、治療への臨床的応答のモニター、治療化合物の臨床的評価および用量選択、動物モデルにおける潜在的な候補薬物の前臨床試験、並びに、組織および臓器における標的分子の局所分布および濃度の観測が挙げられる。インビトロでの応用としては、細胞アッセイ(例えば、競合アッセイ、親和性アッセイ、など)における候補薬物のスクリーニングが挙げられる。

【0175】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F -標識標的薬剤は、候補治療化合物による組織占有度と患者の臨床効果の関係を決定するため;長期間の臨床試験の開始前に、候補薬物の臨床試験のための用量選択を決定するため;および、異なる候補薬物の有効性を比較するために用いられうる。

【0176】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F -放射性標識標的化合物は、正常または疾患組織および/または臓器(例えば、肺、心臓、腎臓、肝臓、および皮膚)のインビボイメージングのための方法において用いられる。例えば、 ^{18}F -放射性標識標的化合物は、対象の細胞または組織に ^{18}F -放射性標識標的化合物の取り込みが生じるのに有効な分量において、対象に投与される。対象は次いで、適切なイメージングシステム(例えば、PETシステム)を、 ^{18}F -放射性標識標的化合物を検出できる十分な時間にわたって受ける。 ^{18}F -放射性標識標的化合物から検出されたシグナルの位置は、対象の細胞または組織の位置に関連しうる。いくつかの実施態様において、当該位置の範囲もまた決定されうる。インビボイメージングは本明細書において記述される。以下もまた参照されたい:米国特許第6,126,916号;6,077,499号;6,010,680号;5,776,095号;5,776,094号;5,776,093号;5,772,981号;5,753,206号;5,746,996号;5,697,902号;5,328,679号;5,128,119号;5,101,827号;および4,735,210号、それぞれは引用により本明細書に援用される。

【0177】

そのため、いくつかの局面において、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプローブの画像を得る方法であって、対象に ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプローブを投与すること、およびPETによる ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプローブのインビボでの分布をイメージングすることを含む方法が示される。

【0178】

いくつかの実施態様において、対象は哺乳動物、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、類人猿、サル、ラットまたはマウスである。

【0179】

いくつかの局面において、対象における疾患の存在を診断する方法であって、疾患の存在に係る標的分子に結合する、 ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプローブを、それを必要とする対象に投与すること、および ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプローブの存在または非存在を検出するために、対象の少なくとも1部分の放射線画像を得ることを含む方法が示される。

【0180】

いくつかの実施態様において、疾患は固形癌、造血癌、血液癌、自己免疫性疾患、神経変性疾患、心血管疾患または病原性感染である。

【0181】

^{18}F -放射性標識標的化合物を用いたPETイメージングは、標的化合物を定性的または定量的に検出するために用いられうる。 ^{18}F -放射性標識標的化合物イメージング剤はバイオマーカーとして用いられ得、対象の陽性シグナルの存在もしくは非存在は、例えば、対象が癌治療などの所定の治療に対して応答すること、または対象が治療に応答するかどうかを示しうる。

【0182】

いくつかの実施態様において、当該方法のステップは、疾患の位置および/または大きさが、時間および/または治療に応じてモニターされうるように、所定の間隔において繰り返されうる。いくつかの実施態様において、 ^{18}F -放射性標識標的化合物は、治療（例えば、化学療法など）を受けている対象の、治療に対する応答を可視化することを補助するために用いられうる。例えば、患者の疾患の進行または退縮をモニターするために、 ^{18}F -放射性標識標的化合物は一般に、治療前、および治療中定期的に（例えば、毎日、毎週、毎月、それらの間の間隔、など）、可視化および測定される。

【0183】

そのため、いくつかの実施態様において、それを必要とする対象における疾患の進行をモニターする方法であって、疾患の存在に係る標的分子に結合する ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプローブを、最初の時点において対象に投与すること、および疾患細胞または組織の分量を決定するために、対象の少なくとも1部分の画像を得ること、および ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプローブをその後の1回以上の時点において、対象に投与すること、およびその後のそれぞれの時点において、対象の少なくとも1部分（例えば、最初の時点と同じ部分）の画像を得ることを含む方法が示される。

【0184】

いくつかの実施態様において、癌治療（例えば、化学療法、放射線療法）を受けている対象において、腫瘍の大きさがモニターされ得、腫瘍の退縮度合いが、 ^{18}F -放射性標識腫瘍標的の検出に基づいてリアルタイムでモニターされうる。

【0185】

いくつかの実施態様において、本明細書の方法は、治療に対する患者の応答を評価するために用いられる。いくつかの実施態様において、当該方法は、治療化合物の用量を選択または修正するために用いられる。いくつかの実施態様において、当該方法は、毒性または患者ごとの差異を分析するために、正常組織における ^{18}F -放射性標識標的化合物の取り込みをモニターするために用いられる。いくつかの実施態様において、当該方法は、薬効をモニターするため、または薬物耐性を検出するために用いられる。

【0186】

いくつかの実施態様において、放射性標識化合物は、標準的な薬務に従って、単体でまたは薬学的に許容可能な担体または希釈剤との組み合わせのいずれかの医薬組成物において、哺乳動物、好ましくはヒトに投与される。このような組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、直腸および局所投与経路などの、経口または非経口投与されうる。いくつか

10

20

30

40

50

の実施態様において、投与は静脈内投与である。いくつかの実施態様において、当該放射性標識化合物は、合成から 1 時間未満の間に静脈内注射される。

【0187】

いくつかの実施態様において、 ^{18}F -放射性標識標的薬剤のインビボでの生物学的活性は、臓器特異的な取り込みに関して、生体内分布観測、および適切な動物モデルにおける小動物 PET 動的イメージングによって測定されうる。例えば、生体内分布観測のために、動物群は ^{18}F -放射性標識標的薬剤を注射され、その小集団を 1 回以上の時間間隔（例えば、5 分、10 分、30 分、60 分、2 時間）において犠死させる。対象の臓器および組織は迅速に切除および重量測定され、放射能が決定される。臓器および選択された組織において蓄積された放射能は、注入量の割合（%ID）として算出される。

10

【0188】

いくつかの実施態様において、本明細書において示される ^{18}F -放射性標識標的薬剤は、治療組織または細胞において用いるための化合物を選択するスクリーニング手段としてインビトロで用いられる。例えば、いくつかの実施態様において、疾患細胞は、1 つ以上の候補薬物に晒される間またはその後に、 ^{18}F -放射性標識標的化合物と共に培養される。候補薬物が疾患に作用する能力は、 ^{18}F -放射性標識標的化合物を用いて経時的にイメージングされうる。

【0189】

例えば、インビトロでの ^{18}F -放射性標識標的薬剤の生物学的活性の統合性は、選択された標的分子への特異的結合および放射性標識組成物の取り込みに関して、標的分子を発現している細胞株において評価される。結合および細胞結合アッセイのために、細胞は 4 または 37 において、適切な時間にわたり、 ^{18}F -放射性標識標的組成物と共に培養される。過剰の非標識標的薬剤を加えることによって、非特異的結合が観測される。特異的結合の程度は、全結合から非特異的結合を差し引くことによって算出される。取り込みは、タンパク質のマイクログラムあたりの、細胞へ添加された標的薬剤の総用量の割合（%ID / μg 細胞タンパク質）として表される。

20

【0190】

関連する局面において、本発明は ^{18}F -放射性標識タンパク質ベースのプロープ、および薬学的に許容可能な担体を含む、インビボまたはインビトロのための診断または放射性医薬組成物を提供する。

30

【0191】

引用による援用

特許文献およびウェブサイトなどの、本明細書に記載の全ての文書および参考文献は、本明細書において全体または一部が記載された場合と同じ程度に、引用により個別に本明細書に援用される。

【0192】

本発明は以下の実施例を参照することによって記述され、実施例は例証するのみであり、本発明を限定するものではない。本発明は詳細に、およびそれらの特定の実施態様に関連して記述されているが、様々な変化および変更が、それらの趣旨および範囲から逸脱することなくなされうるということが当業者には明らかであろう。

40

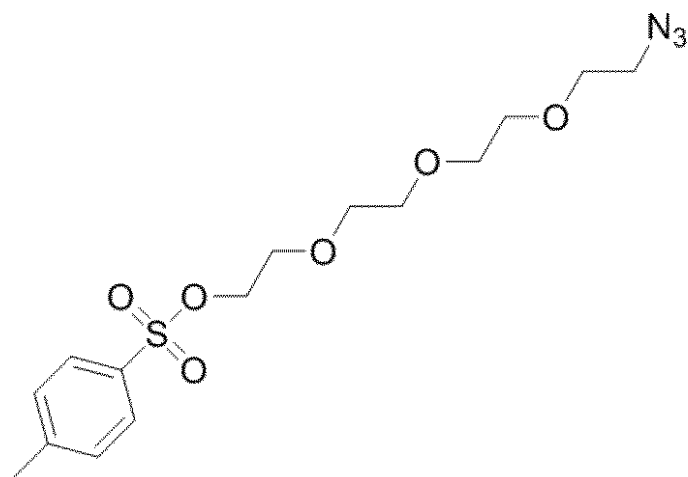
【実施例】

【0193】

実施例 1

2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホネートの合成

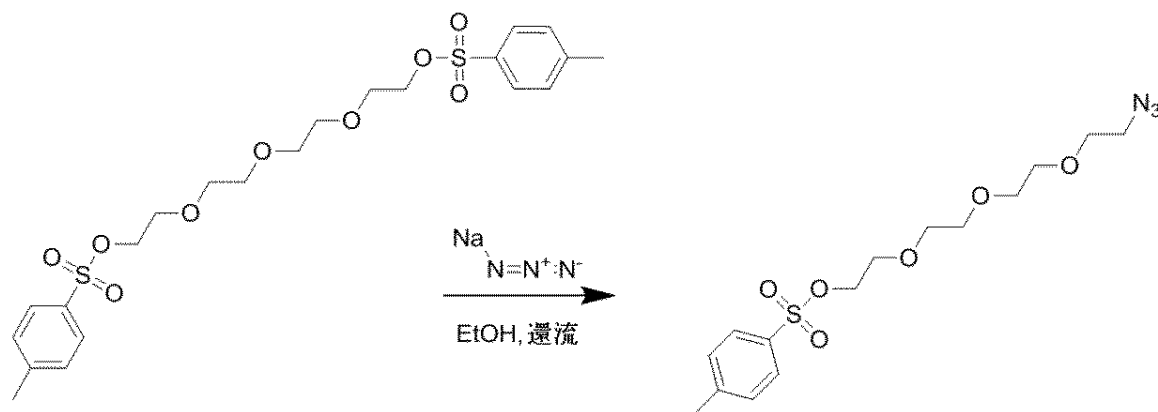
【化 3 1】



2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ)
エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホネート

10

【化 3 2】



2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ)
エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホネート

20

30

((オキシビス(エタン - 2 , 1 - ジイル)) ビス(オキシ)) ビス(エタン - 2 , 1 - ジイル) ビス(4 - メチルベンゼンスルホネート) (5 g , 9 . 9 5 m m o l) およびアジ化ナトリウム (0 . 6 4 7 g , 9 . 9 5 m m o l) の混合物を、エタノール (5 0 m L) に溶解し、反応液を 9 0 で 1 7 時間 にわたり還流した。溶媒を部分真空によって除去し、次いで 4 0 グラムのシリカカートリッジに加え、フラッシュクロマトグラフィー (I s c o C o m b i F l a s h - ヘキサン中の 1 0 % 酢酸エチルからヘキサン中の 9 0 % 酢酸エチルまでの、4 5 分間の直線状勾配によって溶出) を用いて精製した。回収した画分を T L C によって確認し、合わせて、2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホネートを無色の油状物として得た。2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホネート生成物の反応特性によって、当該物質はさらなる特性評価をすることなく、そのまま用いられた。

【 0 1 9 4 】

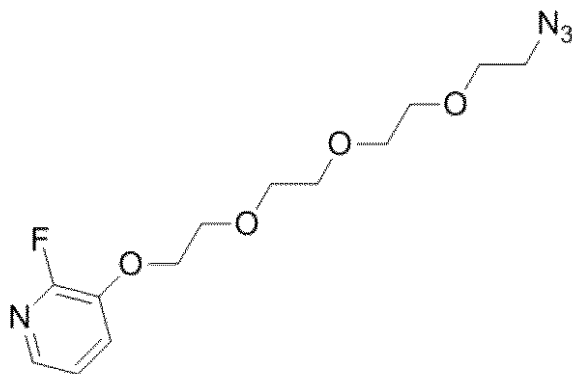
40

50

実施例 2

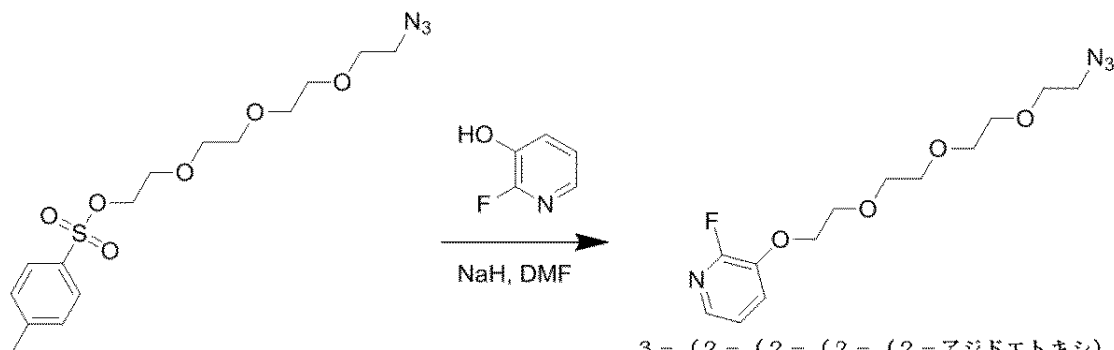
3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジンの合成

【化 3 3】



3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジン

【化 3 4】



3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジン

0 の水素化ナトリウム (0 . 1 2 9 g 、 3 . 2 1 m m o l) の D M F (1 0 m L) 中の懸濁液に、2 - フルオロピリジン - 3 - オール (0 . 3 6 3 g 、 3 . 2 1 m m o l) の D M F (5 m L) 中の攪拌溶液を滴下によって加え、次いで 2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホネート (1 . 0 0 g 、 2 . 6 8 m m o l) の D M F (5 m L) 溶液を滴下によって加えた。懸濁液を 0 で 1 0 分間保ち、次いで 1 時間常温まで昇温させ、次いで 6 0 で 4 時間加熱した。溶媒を真空で留去した。1 0 0 m L の酢酸エチルを加え、次いで濃縮ブライン溶液によって 3 回に分けて洗浄抽出を行った。有機層を硫酸ナトリウムによって乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗製物質をフラッシュクロマトグラフィー (I s c o C o m b i F l a s h - ヘキサン中の 1 0 - 5 0 % E t O A c によって溶出) によって精製し、無色の油状物を得た。3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジン (7 0 2 m g 、 2 . 2 3 3 m m o l 、 収率 8 3 %) を透明な油状物として単離した。¹ H N M R (4 0 0 M H z 、 クロロホルム - d) 7 . 7 5 (d t , J = 4 . 9 , 1 . 6 H z , 1 H) 、 7 . 3 3 (d d d , J = 1 0 . 0 , 8 . 1 , 1 . 5 H z , 1 H) 、 7 . 1 0 (d d d , J = 7 . 9 , 4 . 9 , 0 . 7 H z , 1 H) 、 4 . 3 0 - 4 . 1 6 (m , 2 H) 、 3 . 9 5 - 3 . 8 3 (m , 2 H) 、 3 . 8 0 - 3 . 6 1 (m , 1 0 H) 、 3 . 3 8 (t , J = 5 . 1 H z , 2 H) 1 3 C N M R (1 0 1 M H z 、 クロロホルム - d) d 1 4 2 . 3 , 1 3 7 . 7 , 1 3 7 . 5 , 1 2 3 . 4 , 1 2 3 . 4 , 1 2 1 .

10

20

30

40

50

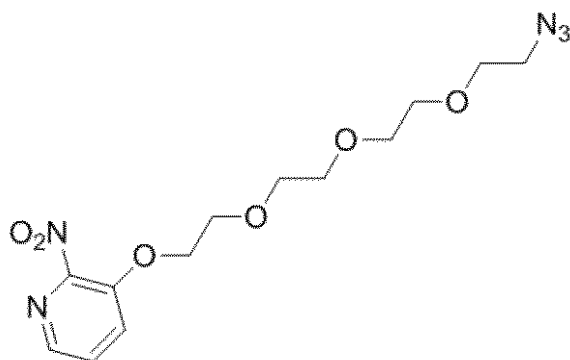
7, 121.6, 77.3, 76.7, 70.9, 70.7, 70.6, 70.0, 69.4, 69.0, 50.6 19F NMR (400 MHz, クロロホルム-d) - 83.55. HRMS (ESI) 理論値: C₁₃H₂₀FN₄O₄ + m/z 315.464; 観測値 315.1463

【0195】

実施例 3

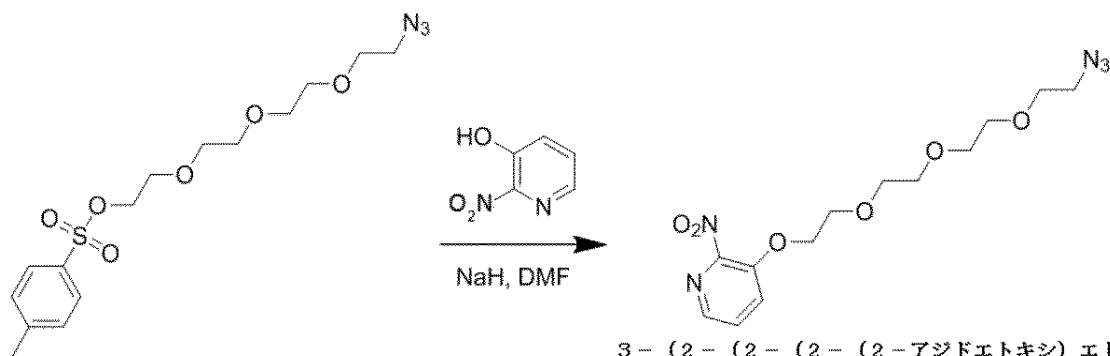
3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - ニトロピリジンの合成

【化35】



3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - ニトロピリジン

【化36】



3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - ニトロピリジン

水素化ナトリウム (0.121 g、3.01 mmol) (オイル中の60%懸濁液) を DMF (7.0 mL) に溶解し、得られた懸濁液を0 に冷却した。2 - ニトロピリジン - 3 - オール (0.384 g、2.74 mmol) の DMF (1.5 mL) 溶液をゆっくりと加え、次いで DMF (1.5 mL) 中の 2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホネート (1.023 g、2.74 mmol) を滴下によって加えた。懸濁液を0 で10分間保ち、次いで常温まで2時間昇温させ、次いで60 で72時間加熱した。反応を10 mL の DI 水でクエンチし、次いで酢酸エチル抽出を行った (3 × 10 mL)。回収した EtOAc 抽出物を、濃縮ブライン溶液 (10 mL) によって洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥させ、濾過し、減圧下で留去し、淡黄色の油状物を得た。粗製物をフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。24 g のシリカカートリッジを用い、25 mL / 分で、ヘキサン中の10%酢酸エチルから始め、ヘキサン中の50%酢酸エチルにまで25分間で直線的に変化させた。その後、勾配を当該溶媒組成において10分間保ち、次いで10分間で100%酢酸エチルに変化させた。3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ)

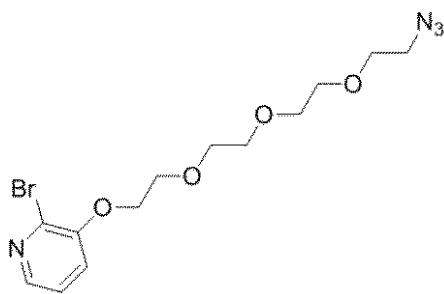
エトキシ) - 2 - ニトロピリジンは、クロマトグラムの 30 - 40 分の間に溶出し、回収した画分を減圧、次いで真空で 2 時間留去し、3 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - ニトロピリジン (687 mg、1.973 mmol、収率 72.0%) を淡黄色の油状物として得た。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) 8.11 (dt, J = 4.9, 1.6 Hz, 1H)、7.60 (ddd, J = 10.0, 8.1, 1.5 Hz, 1H)、7.52 (ddd, J = 7.9, 4.9, 0.7 Hz, 1H)、4.30 - 4.16 (m, 2H)、3.95 - 3.83 (m, 2H)、3.80 - 3.61 (m, 10H)、3.38 (t, J = 5.1 Hz, 2H) ¹³C NMR (101 MHz, クロロホルム-d) d 147.3, 139.5, 128.4, 124.4, 71.1, 70.7, 70.6, 70.0, 69.9, 69.3, 50.7. HRMS (ESI) 理論値: C₁₃H₂₀N₅O₆ + m/z 342.1408; 観測値 342.1409

【0196】

実施例 4

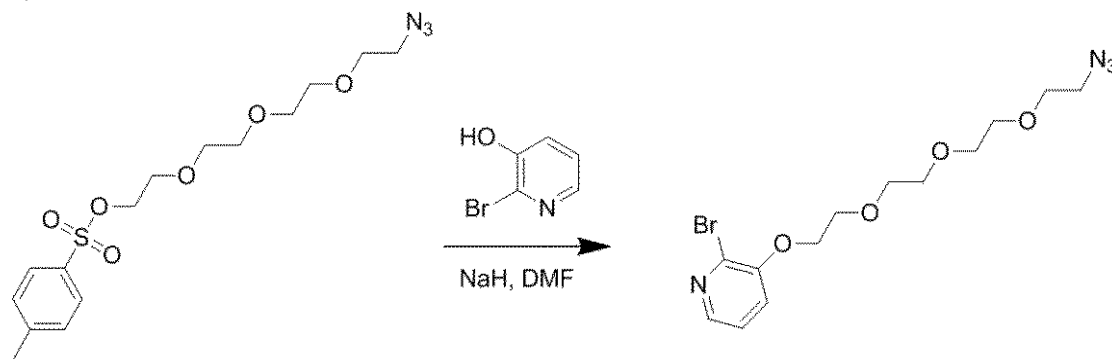
3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - プロモピリジンの合成

【化 37】



3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - プロモピリジン

【化 38】



0 の水素化ナトリウム (NaH、25.7 mg、0.643 mmol) のジメチルホルムアミド (DMF、5 mL) 中の懸濁液に、2 - プロモピリジン - 3 - オール (112 mg、0.643 mmol) の DMF (1 mL) 溶液を滴下によって加え、次いで 2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル 4 - メチルベンゼンスルホネート (200 mg、0.536 mmol) の DMF (1 mL) 溶液を滴下によって加えた。懸濁液を 0 で 10 分間保ち、次いで常温に昇温させ 1 時間保ち、次いで 60 で 4 時間加熱した。加熱が完了すると、粗製反応混合液の溶媒を真空で留去した。粗製反応物を、50 mL の酢酸エチルに再溶解し、2 × 50 mL のブライン溶液で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗製反応物を、逆相 HPLC

LCを用いて精製し、3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-ブロモピリジン、TFA(112mg、0.229mmol、収率42.7%)を淡黄色の油状物として得た。HRMS ESI m/z ($M+H$)、理論値 $C_{13}H_{20}BrN_4O_4$ 375.0664 観測値 375.0662; 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) 7.97(dd, $J=4.6, 1.5$ Hz, 1H)、7.54(dd, $J=8.2, 1.6$ Hz, 1H)、7.40(dd, $J=8.1, 4.6$ Hz, 1H)、4.24(dd, $J=5.3, 3.9$ Hz, 2H)、3.85-3.78(m, 2H)、3.68-3.62(m, 2H)、3.62-3.52(m, 8H)、3.42-3.34(m, 2H)。

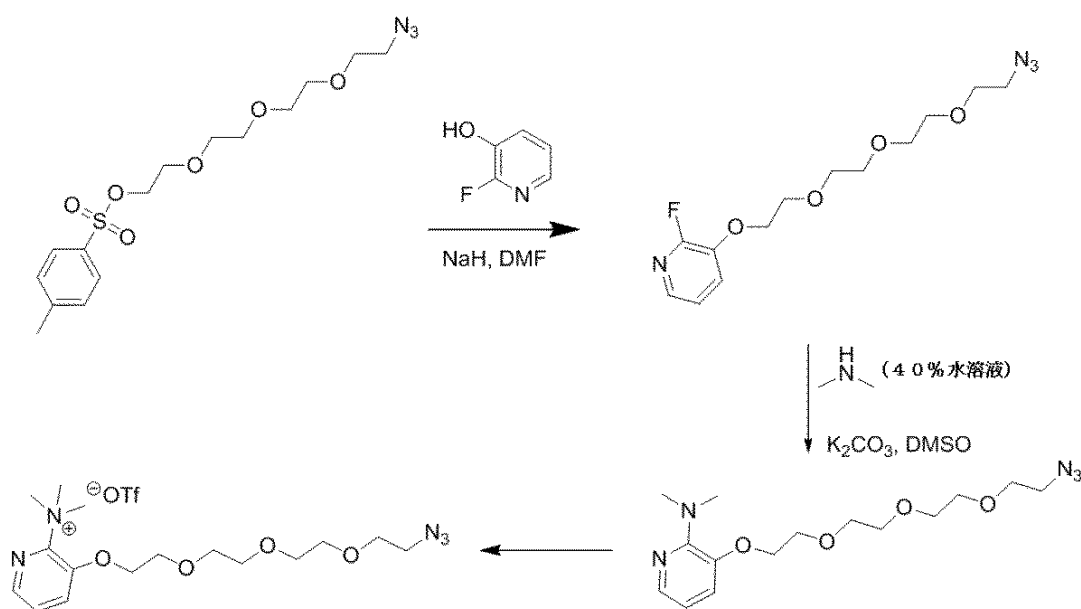
【0197】

10

実施例 5

トリメチルアニリウム(trimethylanilium)化合物の合成のためのスキーム

【化39】



20

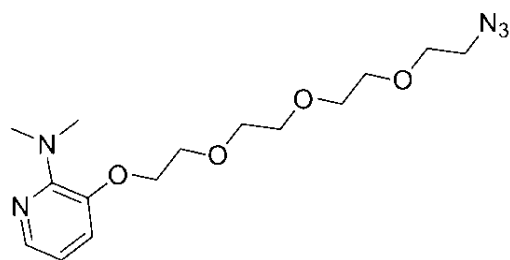
30

3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N,N-トリメチルピリジン-2-アミニウム

実施例 6

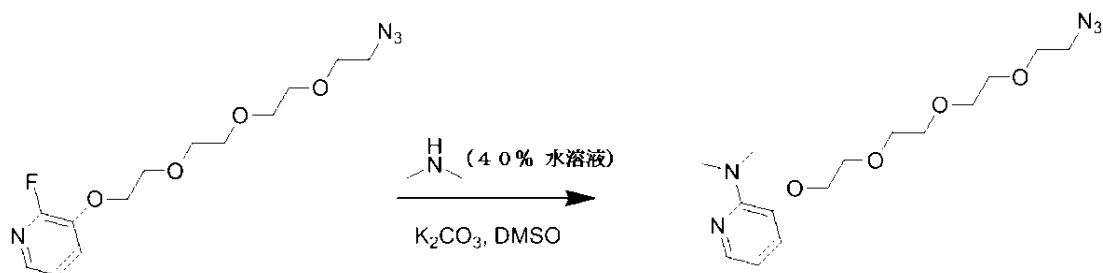
3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N,N-ジメチルピリジン-2-アミンの合成

【化 40】



3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N-ジメチルピリジン-2-アミン

10



20

3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N-ジメチルピリジン-2-アミン

3-(2-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジン(160 mg、0.509 mmol)、炭酸カリウム(K_2CO_3 、84 mg、0.611 mmol)、およびジメチルアミン(水中40%、0.097 mL、0.764 mmol)のジメチルスルホキシド(DMSO、2.5 mL)中の混合物を、密閉された耐圧容器において110℃で14時間加熱した。加熱が完了すると、粗製反応混合物の溶媒を真空で留去した。粗製反応物を50 mLの酢酸エチルに再溶解し2×50 mLのブライン溶液で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、真空で濃縮した。粗製反応物を、順相クロマトグラフィーを用いて精製し、3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N-ジメチルピリジン-2-アミン(140 mg、0.413 mmol、収率81%)を無色の油状物として得た。¹H NMR(400 MHz, クロロホルム-d) 7.86(dd, J=4.9, 1.5 Hz, 1H)、7.02(dd, J=7.8, 1.5 Hz, 1H)、6.73(dd, J=7.8, 4.9 Hz, 1H)、4.20-4.07(m, 2H)、3.98-3.86(m, 2H)、3.81-3.61(m, 9H)、3.38(t, J=5.1 Hz, 2H)、3.13-2.94(m, 6H)、1.69(s, 2H)。HRMS(ESI)理論値: $C_{15}H_{26}N_5O_4 + m/z$ 340.1980; 観測値 340.1979。

30

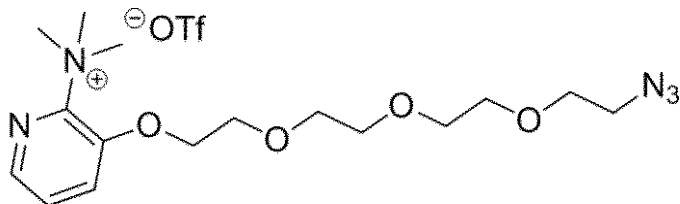
40

【0198】

実施例7

3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N-トリメチルピリジン-2-アミニウムの合成

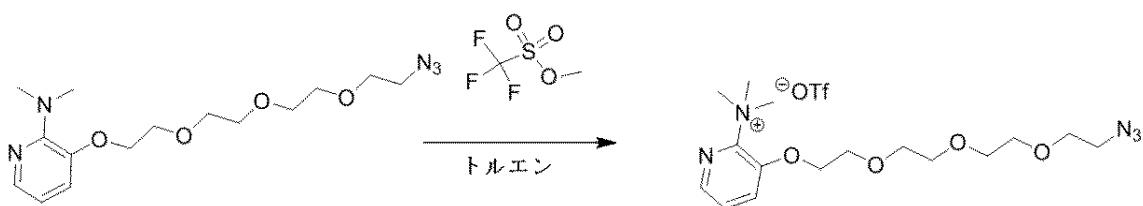
【化 4 1】



3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N,N-トリメチルピリジニウム
ニウム

10

【化 4 2】



3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N,N-トリメチルピリジニウム
ニウム

20

トリフルオロメタンスルホン酸メチル(0.065 mL、0.589 mmol)を、3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N,N-ジメチルピリジン-2-アミン(40 mg、0.118 mmol)のトルエン(1.5 mL)溶液に、窒素の安定気流の下で密閉された容器において加えた。反応混合物を室温で14時間にわたり攪拌した。溶媒を除去し、生じた残留物を2×10 mLのエーテルで洗浄し、2×1 mLのジクロロメタンによって共沸によって乾燥させ、高圧真空下で一晩乾燥させ、3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N,N-トリメチルピリジン-2-アミニウム、トリフルオロメタンスルホン酸塩を、無色の高粘度の油状物として定量的収率で得た。LCMS m/z 354.33; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) 8.24-8.17(m, 1H)、7.98(d, J=8.3 Hz, 1H)、7.75(ddd, J=8.2, 4.6, 3.2 Hz, 1H)、4.44(br.s., 2H)、3.88(d, J=3.9 Hz, 2H)、3.69-3.45(m, 21H)。

30

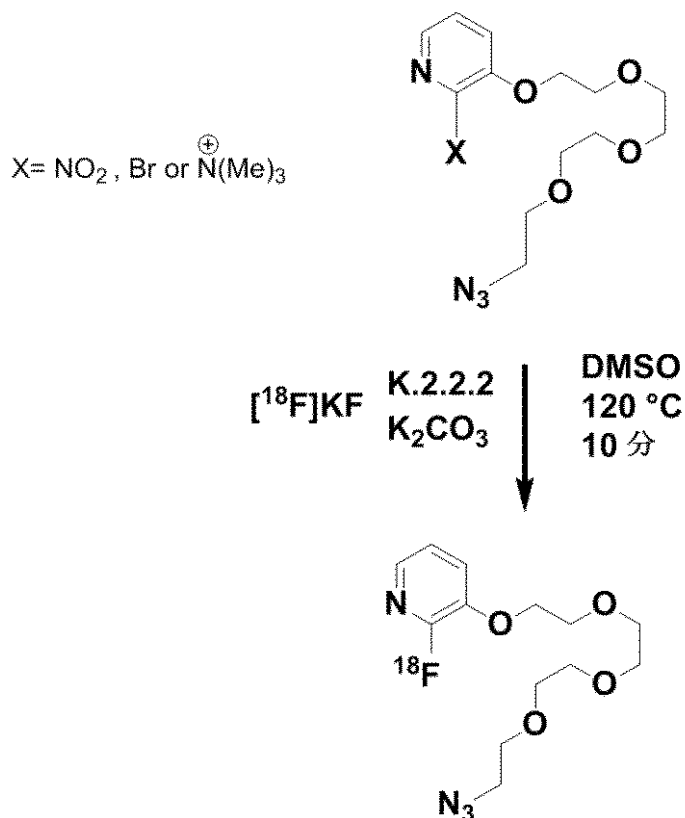
【0199】

実施例 8

3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-N,N,N-トリメチルピリジン-2-アミニウム、トリフルオロメタンスルホン酸塩を用いた、[¹⁸F]-3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジンの合成

40

【化 4 3】



$[\text{}^{18}\text{F}]$ - 3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジンの合成

$[\text{}^{18}\text{F}]$ - フルオライドの水溶液 (2 . 0 ml , 33 . 3 GBq / 900 mCi) を、ペンシルベニア州ウエスト・ポイント、P . E . T . Net (登録商標) P h a r m a c e u t i c a l s から購入し、直接 Sep - Pak light QMA に移した [Sep - Pak light QMA カートリッジは、使用前に、5 ml の 0 . 5 M の炭酸水素カリウム、5 ml の脱イオン水、および 5 ml の MeCN の順で前処理を行った]。移行が終了すると、炭酸カリウム (15 mg / ml ; 0 . 1 ml)、次いで、炭酸カリウム (30 mg / ml、0 . 1 ml)、4 , 7 , 13 , 16 , 21 , 24 - ヘキサオキサ - 1 , 10 - ジアザピシクロ [8 . 8 . 8] ヘキサコサン (15 mg、0 . 04 mmol) および 1 . 2 ml の MeCN の混合物を逐次添加することによって、 $[\text{}^{18}\text{F}]$ フルオライド水溶液が QMA Sep - Pak から溶出した。溶媒を 90 の窒素の緩やかな気流の下でおよび真空で留去した。共沸乾燥を、1 ml のアセトニトリルによって 2 回繰り返し、無水 K . 2 . 2 . 2 / K $[\text{}^{18}\text{F}]$ F 複合体を得た。3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - N , N , N - トリメチルピリジン - 2 - アミニウム、トリフルオロメタンスルホン酸塩 (2 mg、5 . 6 μmol) を、500 マイクロリットルの DMSO に溶解し、乾燥クリプタンドに加えた。この溶液を 120 で 10 分間加熱した。その後、粗製反応混合物を 3 ml の DI 水で希釈した。次いで、粗製反応混合物の全量を、逆相 HPLC に移し、ロードし、以下の条件で精製した：HPLC カラム：Luna C18 250 x 10 溶媒 A：0 . 1 % TFA を含む DI 水；溶媒 B：0 . 1 % TFA を含むアセトニトリル、流速 4 . 6 ml / 分、32 % の B の定組成メソッドを用い、UV は 280 nm においてモニターされた。 $[\text{}^{18}\text{F}]$ - 3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジンを、クロマトグラムの 24 分のピークにおいて単離し、2 分間回収した。この生成物を 10 ml の DI 水を含む 100 ml のフラスコに回収し、全ての内容物を Waters の Sep - Pak Vac tC18 6 cc 1 g sep pack に移した。6 . 1 GBq /

10

20

30

40

50

164 mCi の $[^{18}\text{F}]$ -3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジンはこの反応液から単離した。これは3 mLのエタノールによってsep-pakから回収され、この溶液を98°C熱源、窒素の安定な気流、および真空によって15分間、当該バイアルにフィルムのみが残るまで蒸発させた。最終生成物を100%の1×PBS緩衝液に再溶解し、37°Cで1時間以上は当溶媒に安定である。

【0200】

$[^{18}\text{F}]$ -3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジンは、 ^{18}F 標識生物学的製剤を生成するために、アルキンを含む適切な生物製剤との「クリック」アジド-アルキン反応を利用することで用いられる。

10

【0201】

実施例9

「クリックケミストリー」を用いた ^{18}F -放射性標識タンパク質の製造

本例において、図1および5に説明されるように、 $[^{18}\text{F}]$ -3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジンは、標的タンパク質を放射性標識するために用いられた。

【0202】

4-PEG-トシル-アジド前駆体のフッ素化による、 $[^{18}\text{F}]$ -FPPEGAの生成
900 mCi の ^{18}F の ^{18}O 水 (3 mL) の放射能 (IBA Molecular から購入) を、4, 7, 13, 16, 21, 24-ヘキサオキサ-1, 10-ジアザピシクロ[8.8.8]ヘキサコサン (2.8 mg、7.44 μmol) および炭酸カリウム (1.7 mg、0.012 mmol) を含むマイクロバイアル (no QMA) に直接移した。追加の2.0 mLのアセトニトリルをこの粗製反応混合物に加え、全ての混合物を共沸によって乾燥させた。98°Cのオイルバスを用いて溶液を蒸発させることによって、並びに N_2 の穏やかな気流を加えることおよび部分真空によって、乾燥を完了させた。溶液の体積は約2 mLに減少した。追加の2 mLのアセトニトリルを加え、このプロセスを40分にわたり3回繰り返した。液体の体積が0.3 mL未満まで減少した時、0.7 mLの分取量のアセトニトリルを加え、溶液をさらに共沸蒸留することで体積を~0.1 mLにまで減少させた。追加の0.9 mLのアセトニトリルを加え、このプロセスを白色の固形物が生成するまで行った。このプロセスには~55分要した。最後の手順の間は、溶液が乾燥する前にバイアルをオイルバスから外し、バイアル中の残留物を20分間室温で、完全真空 (窒素気流なし) 下に設置した。 $[^{18}\text{F}]$ -FPPEGAクリプタンド混合物の移行および乾燥に要した合計時間は65分であった。

20

30

【0203】

乾燥 $[^{18}\text{F}]$ -FPPEGAクリプタンド混合物に、3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-ニトロピリジン (2 mg、5.86 μmol) の、500マイクロリットルのDMSO溶液を加え、この混合物を120°Cで10分間加熱した。その後、粗製反応混合物を3 mLのDI水で希釈し、次いで全ての溶液を、以下のHPLCカラムおよび条件において、移行およびロードした：HPLCカラム：Luna C18 250×10 mm；溶媒A：0.1% TFAを含むDI水；溶媒B：0.1% TFAを含むアセトニトリル；流速4.6 mL/分；圧力1820 PSI；定組成メソッド 32%B；UV-280 nm。 $[^{18}\text{F}]$ -3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジン ($[^{18}\text{F}]$ -FPPEGA) 生成物を、クロマトグラムの24分のピークにおいて単離し、2分間回収した。この生成物を、15 mLのDI水を含む100 mLフラスコに回収し、全ての内容物をSep Pak Vac tC18 6cc 1g sep packに移した。PNWAT036795。2.5 mLのエタノールを用いて $[^{18}\text{F}]$ -FPPEGAをSep Pakから回収し、この溶液を乾燥するまで、98°Cの N_2 および真空によって15分間留去した。この化合物を0.1 mLの1×PBS (リン酸緩衝化食塩水) に溶解

40

50

させた。この生成物を V a r i a n H P L C を用いて解析した：H P L C カラム L u n a C 1 8 (2) 4 . 6 × 1 5 0 m m 溶媒 A : 0 . 1 % T F A を含む D I 水；溶媒 B : 0 . 1 % T F A を含むアセトニトリル；流速 1 . 0 m l / 分；勾配メソッド 0 分 9 0 % A 1 0 % B ; 1 5 分 3 0 % A 7 0 % B ; 1 7 分 3 0 % A 7 0 % B ; 1 8 分 9 0 % A 1 0 % B ; 2 0 分 9 0 % A 1 0 % B ; U V - 2 8 0 n m 。 2 2 0 m C i の [¹⁸F] - F P P E G A が単離された。

【 0 2 0 4 】

B . E 0 1 - 4 P E G - D B C O の合成

C 末端アミノ酸 P C を含む、以下のアミノ酸配列；

G V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S W R A Q L S P S F Y Y R I T Y G E T
G G N S P V Q E F T

10

V P N D V M T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T T H G V Y F Y S P I S I N
Y R T P C (E 0 1 ; 配列番号 : 1)

を有する F B S タンパク質、E 0 1 アドネクチンが用いられた。

【 0 2 0 5 】

標的タンパク質を P E G 4 - D B C O に結合させるために、マレイミドケミストリーが用いられたため、E 0 1 アドネクチンは、最初にプロリンを追加することで改変され、次いで所定の組み換え技術を用いて C 末端のシステインを生成した。4 等量以上のマレイミド - P E G 4 - D B C O (C l i c k C h e m i s t r y T o o l s) を D M S O に溶解し、精製された改変 E 0 1 アドネクチンを、1 m M T C E P の存在下で加えた。D M S O の最終濃度は、結合混合物中の 5 % を超えていなかった。質量スペクトル解析の前に、結合混合物を室温で 1 時間放置した。結合を M S で確認した後、P B S p H 7 . 2 で平衡化された H i L o a d 2 6 / 6 0 S u p e r d e x 7 5 カラム (G E H e a l t h c a r e) を用いて、サンプルをサイズ - 排除クロマトグラフィーによって精製した。

20

【 0 2 0 6 】

C . [¹⁸F] - F P P E G A のアドネクチンへの結合

0 . 2 m l の 5 . 4 m g / m l の E 0 1 - 4 P E G - D B C O アドネクチン溶液 (セクション B で記述されるように生成された) を、1 × P B S 緩衝液中の 2 0 0 m C i の 0 . 1 m l の [¹⁸F] - F P P E G A (実施例 1) と共にインキュベートした。粗製反応液を上下に数回ピペッティングすることによって溶液を穏やかに混合させ、4 5 または室温で 4 5 分間共にインキュベートした。この粗製反応混合液の内容物を、S E C カラムを用いて精製した。S u p e r d e x 2 0 0 0 . 5 m l / 分 1 × P B S 緩衝液および [¹⁸F] - E 0 1 - 4 P E G - D B C O - F P P E G A 生成物を、クロマトグラムの 3 7 分のピークにおいて 2 分間単離した。

30

【 0 2 0 7 】

[¹⁸F] - E 0 1 - 4 P E G - D B C O - F P P E G A は、非放射性スタンダードの同時注入を伴う S E C 、 P L R P S カラムを用いた R P H P L C 、およびゲル電気泳動によって解析された。

【 0 2 0 8 】

サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) は、以下のパラメーターを用いて行われた：S u p e r d e x 2 0 0 カラム；溶媒 1 0 0 % 1 × P B S 緩衝液；0 . 5 m l / 分 2 8 0 U V ；

40

逆相 H P L C

カラム：P L R P S 8 m i c r o n 1 0 0 0 A 4 . 6 × 2 5 0 m m

溶媒 A : D I 水中の 0 . 1 % ギ酸

溶媒 B : アセトニトリル

流速：1 m l / 分

圧力：1 3 5 1 P S I

勾配：

50

0 分 9 0 % A 1 0 % B
 3 0 分 4 5 % A 5 5 % B
 3 2 分 2 5 % A 7 5 % B
 3 6 分 2 5 % A 7 5 % B
 5 0 分 9 0 % A 1 0 % B

【 0 2 0 9 】

1 5 m C i の $[^18\text{F}]$ - E 0 1 - 4 P E G - D B C O - F P P E G A が単離され、反応が 4 5 で行われた場合に、S E C および R P H P L C の計算によって > 9 9 % の放射化学的純度 (R C P)、および 0 . 6 m C i / n m o l の特異的活性を有した。反応が室温で行われた場合、5 . 7 2 m C i が得られた。反応が 4 5 または室温で行われた場合はそれぞれ、合成の 3 時間において、 $[^18\text{F}]$ - F P P E G A の特異的活性は 0 . 5 1 2 m C i / n m o l および 8 5 . 7 % の R C P であった。特異的活性は N a n o d r o p (<http://www.nanodrop.com> を参照されたい) によって測定した。生成物は S E C および P L R P S の両方において、非放射性スタンダードと共に溶出した。ゲル電気泳動によって、 ^18F 生成物が 1 1 k D a の分子量標準と一致することを確認した。

10

【 0 2 1 0 】

^18F - 放射性標識 E 0 1 - 4 P E G - D B C O は、診断イメージング、基礎研究および放射性治療応用などの様々なインビトロおよび/またはインビボイメージング応用において用いられうる。診断イメージングおよび放射性治療応用の可能な特定の例としては、哺乳動物、またはそれらの臓器もしくは組織サンプルにおける、P D - L 1 陽性腫瘍の位置、相対的な活性および/または定量化の決定、P D - L 1 陽性腫瘍の放射免疫アッセイ、並びに P D - L 1 陽性腫瘍の分布を決定するためのオートラジオグラフィーが挙げられる。

20

【 0 2 1 1 】

特に、 ^18F - 放射性標識 E 0 1 - 4 P E G - D B C O は、ヒトおよび実験動物の肺、心臓、腎臓、肝臓および皮膚および他の臓器における、P D - L 1 陽性腫瘍の陽電子放出断層撮影 (P E T) イメージングに有用である。 ^18F - 放射性標識 E 0 1 - 4 P E G - D B C O を用いた P E T イメージングは、以下の情報を得るために用いられうる：P D - L 1 腫瘍 - 候補治療剤の組織占有度および患者の臨床効果の関係；長期間の臨床試験の開始前に、P D - L 1 腫瘍 - 治療剤の臨床試験のための用量選択；構造的に新しい P D - L 1 腫瘍 - 治療剤の相対的な有効性；P D - L 1 腫瘍 - 治療剤を用いた臨床的標的の治療の間の、P D - L 1 腫瘍 - 治療剤のインビボでの輸送体親和性および密度への影響の調査；有効および非有効治療の間の、P D - L 1 陽性腫瘍の密度および分布の変化。

30

【 0 2 1 2 】

例えば、P D - L 1 の阻害は、未治療の状態における B P または V_T と比較して、様々な用量パラダイムにおける P D - L 1 腫瘍 - 治療剤の存在下での平衡分析による B P または V_T の変化に基づいて計算されうる。阻害曲線は、前記のデータ対 P D - L 1 腫瘍 - 治療剤の用量 (濃度) をプロットすることによって生成される。P D - L 1 陽性腫瘍の阻害は、次いで、 E_{max} 、 T_{max} または T_{min} において遮断薬によって得られうる P E T 放射性リガンド V_T または B P の最大の減少量、並びに、未治療の状態の B P または V_T と比較して、様々な用量パラダイムにおける P D - L 1 腫瘍 - 治療剤の存在下での分布 (V_{ND}) の非特異的体積および B P の変化に基づいて計算される。I D 5 0 値は、用量 - 速度 / 阻害曲線のカーブフィッティングによって得られる。

40

【 0 2 1 3 】

実施例 1 0

抗 P D - L 1 アドネクチンイメージング剤を用いた、P D - L 1 - 陽性細胞の P D - L 1 - 陰性細胞とのインビトロでの識別

本実験において、 ^18F - 放射性標識 E 0 1 - 4 P E G - D B C O の、インビトロにおける P D - L 1 - 陽性細胞および P D - L 1 - 陰性細胞を識別する能力について試験した。

50

【0214】

1×10^6 の PD-L1 - 陽性 L2987 ヒト肺癌細胞または PD-L1 - 陰性 HT-29 ヒト結腸直腸腺癌細胞を 5 mL 培養チューブに入れた（条件ごとに $n = 3$ チューブ）。 ^{18}F -放射性標識 E01-4PEG-DBCO 溶液を、PBS + 0.5% BSA 中に、 $300 \text{ nCi} / 200 \mu\text{L}$ の濃度で調整した。この溶液の一部を、冷却（非標識）E01 アドネクチンまたは冷却（非標識）アドネクチン（コントロール）のいずれかに加え、最終濃度を 450 nM にした。細胞サンプルを 5 分間 $200 \times g$ で遠心分離し、次いで $200 \mu\text{L}$ の適切な ^{18}F -放射性標識 E01-4PEG-DBCO 溶液に再懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞サンプルを $200 \times g$ で遠心分離し、上清を捨てた。細胞ペレットを 1 mL の PBS + 0.5% の BSA に再懸濁し、洗浄の手順を合計 3 回繰り返した。最終の洗浄の後に、細胞を再び $200 \times g$ で遠心分離し、上清を捨てた。残存する細胞ペレットの放射能を、次いで、ガンマ計測器によって観測した。

10

【0215】

結果は、PD-L1 - 陰性 HT-29 細胞と比較して、PD-L1 - 陽性 L2987 細胞と ^{18}F -放射性標識 E01-4PEG-DBCO の結合が異なることから明らかなように、全ての標識が特異的であることが示された（細胞関連放射能は、PD-L1 - 陽性 L2987 細胞において $44.6 \times$ 高かった）。特異性はさらに、過剰量の 450 nM の冷却（非標識）E01 アドネクチンと共にインキュベートした場合に、細胞関連 ^{18}F -放射性標識 E01-4PEG-DBCO において顕著な減少（ 99.6% 減少）が見られたことから確認された。細胞を 450 nM の冷却（非標識）非 PD-L1 結合性アドネクチンと共にインキュベートした場合には、細胞関連 ^{18}F -E01 は最小の減少（ 9.9% の減少、非有意）であった。

20

【0216】

まとめると、これらの結果は ^{18}F -放射性標識 E01-4PEG-DBCO がインビトロにおいて PD-L1 (+) と PD-L1 (-) 細胞を識別することのできる能力を示す。

【0217】

実施例 11

抗 PD-L1 アドネクチンイメージング剤を用いた、PD-L1 - 陽性腫瘍の PD-L1 - 陰性腫瘍とのインビボでの識別

30

本実験において、以下のアミノ酸配列：

EVVAATPTSLLSWSYDGPIDRYYRITYGETGGNSPVQEF
TVPPDQKKTATISGLKPGVDYTITVYAVRLEEAHYNREFPI
SINRYRTPC (A02；配列番号：2)

を有する ^{18}F -放射性標識 PD-L1 アドネクチンが、実施例 9 に示されるように合成され、マウスにおける PD-L1 - 陽性腫瘍および PD-L1 - 陰性腫瘍を識別する能力を試験した。

【0218】

両側性の異種移植腫瘍を有するマウスは、マウスの両側に 1×10^6 の PD-L1 (+) L2987 ヒト肺癌細胞および 1.5×10^6 の PD-L1 (-) HT-29 ヒト結腸癌細胞を皮下注射することによって作られた。腫瘍がおよそ 300 mm^3 に達すると（細胞移植後、およそ 2 - 3 週間）、イメージングのために動物が選択された。イメージングのために、動物は 2% イソフルランを用いた麻酔下に置かれ、尾静脈カテーテルが導入された。マウスは次いで、4 匹の動物を収容できるカスタム動物ホルダーに入れられ、そこで研究の継続時間の間、麻酔下に保たれた。動物ホルダーを microPET（登録商標）F120TM スキャナー（Siemens Preclinical Solution is, Knoxville, TN）に移した。この機器の軸方向視野は 7.6 cm である。この制限によって、動物は、スキャン領域が目の直前からおよそ尾の付け根までであるように配置された。

40

50

【0219】

最終的なPET画像を減衰補正するために、 ^{57}Co の点光源を用いて10分の透過像を最初に得た。透過スキャンに続いて、あらかじめ導入された尾静脈カテーテルを介して放射性トレーサー溶液を投与し、2時間のエミッション画像を得た。注入された放射性トレーサー溶液は、約 $200\mu\text{Ci}$ の ^{18}F -放射性標識A02または、最終濃度が $3\text{mg}/\text{kg}$ の冷却、非標識A02アドネクチン（個々の動物の体重に基づく）を含む $200\mu\text{Ci}$ の ^{18}F -放射性標識A02のいずれかから構成された。全ての注射剤は、注射の前に $200\mu\text{L}$ の食塩水中に製剤化された。正確な注入量は、製剤化された用量を直接計測し、シリンジおよび尾静脈カテーテルに残った放射能を差し引くことによって計算した。

【0220】

画像は、得られた透過像を用いた減衰補正をした最大事後（MAP）アルゴリズムによって再構築し、放射性同位体の崩壊について補正した。最終的な画像において、ASIPソフトウェア（Siemens Preclinical Solutions）を用いて、腫瘍の境界付近に関心領域（ROI）を引いた。それぞれのROIについて時間放射曲線を算出し、2時間のエミッション画像の経過における腫瘍体積中の放射性トレーサーの定量画像を得た。最終的な比較のために、個々の時間放射能曲線は、それぞれの特定の動物に対して注入された放射性トレーサーの用量に基づいて標準化した。放射性トレーサーの取り込みを、それぞれの時間放射能曲線の最後の10分（放射性トレーサーの注入後1時間50分から2時間）を用いて、腫瘍全域にわたって比較した。この手法を用いて、PD-L1（+）L2987異種移植片における放射性トレーサーの取り込みは、 ^{64}Cu -A01放射性トレーサーのみを受けた動物のPD-L1（-）HT-29異種移植片に見られるものに対して $3.05\times$ であった。 ^{18}F -放射性標識A02放射性トレーサーおよび $3\text{mg}/\text{kg}$ の非標識A02アドネクチンを共に注入された動物において、PD-L1（+）L2987異種移植片における取り込みは、PD-L1（-）HT-29異種移植片において見られるものに対してわずかに $1.04\times$ であった。

【0221】

いくつかの実験において、動物は頸椎脱臼によって犠死され、その直後にイメージングが行われた。当該動物において、次いで解剖が行われ、個々の組織（血液、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉、胃、骨、L2987腫瘍、およびHT-29腫瘍）を、あらかじめ秤量したチューブに回収した。全ての組織を、次いで再度秤量し、それぞれの組織の重量を決定した。次いで、それぞれの組織における放射能を、Perkin-Elmer Wizard 3 ガンマ計測器を用いてエキスピボで直接計測した。全ての組織について、カウント毎分（CPM）における計測値を、個々の動物に注入された放射性量に対して標準化し、放射性崩壊について補正した。これらの結果をプロットし、図2において示される放射性トレーサーの生体内分布を示した。

【0222】

これらの結果は、PD-L1（-）HT-29異種移植片と比較してPD-L1（+）L2987異種移植片において、放射性トレーサーの取り込みが明らかに異なることを示す。さらに、PD-L1の高い取り込みが見られる唯一の組織は腎臓であったが、これは ^{18}F -放射性標識A02-4PEG-DBCOアドネクチンが分子の分子量に基づいて腎臓濾過を通過すると予測されるクリアランスのためだと考えられる。

【0223】

まとめると、これらの結果は、インビボにおいてPD-L1（+）とPD-L1（-）の異種移植腫瘍を識別する直接的な可視化を示す。特異性は、さらに、 $3\text{mg}/\text{kg}$ の非標識、抗PD-L1A02アドネクチンを共に注入することによって検証され、PD-L1（+）腫瘍における放射性トレーサーの取り込みは、PD-L1（-）異種移植片における程度にまで減少した。最大の放射性トレーサー取り込み比、hPD-L1（+）L2987異種移植片対hPD-L1（-）HT-29異種移植片において $3.53:1$ が、 ^{18}F -A02アドネクチン放射性トレーサーを用いて得られた。このことはさらに、PETイメージングを用いてPD-L1の組織発現を可視化するために、抗PD-L1アド

ネクチンを使用することの正当性を立証する。放射性核種として ^{18}F を用いる同様の実験がマウスにおいて行われ、同様の結果が得られた。reaching

【0224】

実施例12

カニクイサルにおけるインビボイメージング

カニクイサルにおいて行われた場合、 ^{18}F -放射性標識E01イメージング剤はまた同様の結果を示した。これらの実験において、実施例9に記載されるように合成された ^{18}F -E01抗PD-L1は、カニクイサルにおいて高コントラスト画像が得られるかを試験された。本明細書に記載の抗PD-L1アドネクチンは、カニクイサルPD-L1に対して高い親和性を維持する（しかし、齧歯類PD-L1に対しては低い親和性を持つ）。さらに、カニクイサルは、マウスモデルにおいて見られるようなPD-L1(+)腫瘍を有していないため、イメージング性能は、内因性PD-L1発現（バックグラウンドが低いため、PD-L1(+)組織の高感度検出が可能になる）に関連する画像において測定される、バックグラウンド量に基づいて第一に評価される。これらの実験において、得られたPET画像におけるバックグラウンド量は極めて低く、顕著な放射性トレーサーの蓄積は主に腎臓、脾臓、および膀胱に見られた。

【0225】

あらかじめ血管アクセスポート(VAP)を導入したオスのカニクイサルを、 0.02 mg/kg のアトロピン、 5 mg/kg のテラゾールおよび 0.01 mg/kg のブプレノルフィンI.M.によって麻酔した（全てを単一のシリンジから注入した）。次いで、イメージング手順の間水和を維持する点滴投与のために、静脈カテーテルを頭部血管に設置した。動物を気管内チューブ-通常は 3.0 mm と共にインキュベートし、microPET（登録商標）F220TM PET機器（Siemens Preclinical Solutions、Knoxville、TN）の撮影台に移した。イメージング処置の間、麻酔をイソフルランおよび酸素によって維持し、静脈内輸液(LRS)を 6 ml/kg/時間 の速度で投与した。microPET（登録商標）F220TM機器の軸方向視野はわずか 7.6 cm であるため、心臓の直上からおよそ骨盤までの動物の合成画像を作成するために、5つの異なる台の位置における画像が得られた。

【0226】

それぞれの視野において、最終的なPET画像を減衰補正するために、 ^{57}Co の点光源を用いて10分の透過像を最初に得た。全ての台の位置において透過像が得られた後、およそ 1.5 mCi （およそ 0.015 mg/kg ）の ^{18}F -E01アドネクチン放射性トレーサーを、導入されたVAPを介して投与した。次いで、動物の心臓の中心付近のポジション1から始まり、骨盤に向かって動く、5分の継続したエミッションスキャンを、それぞれの台の位置で順に行った。それぞれの位置（1から5）において画像を得た後、撮影台をポジション1の台に戻し、手順を繰り返した。この手順を用いて、イメージング実験の継続時間にわたって、それぞれの台の位置について合計5つの異なる画像を得た。

【0227】

個々の画像は、得られた透過像を用いて減衰補正したフィルター逆投影(FBP)アルゴリズムを利用して再構築および、補正された放射性同位体崩壊を用いる減衰補正と共に、フィルター逆投影(FBP)アルゴリズムを利用して再構築されたについて補正した。最終的な合成画像は、次いで、イメージング実験の継続時間の間、1回の通過によって得られた全ての5つの台の位置の画像を整列させることによって得られた（すなわち、1つの合成画像は、台の位置1から5の逐次的な画像のそれぞれのセットから生成された）（図3）。最終的な画像は、放射性トレーサーの取り込みが可視の領域（すなわち、脾臓、腎臓、膀胱）およびバックグランド組織（筋肉）を指摘するために、視覚的に調査された。 ^{18}F -E01アドネクチンのバックグラウンドの蓄積は極めて低く、筋肉などのバックグランド組織において、わずかなシグナルしか可視化されなかった。さらに、PD-L1(+)がmRNA発現に基づくと考えられる脾臓において、取り込みが検証された

。このように、カニクイサルにおける実験によって、内因性PD-L1に関連する、高感度のPD-L1イメージングの可能性が示される。

【0228】

概して、齧歯類およびカニクイサルにおけるPET実験において、本明細書に記載の方法によって生成される ^{18}F 標識タンパク質は、標的の発現量が低い組織の高感度検出を可能にする、インビボでの標的陽性組織の標識のための強力な特異的なプローブを提供することが示される。

【0229】

実施例13

[^{18}F]-A02抗PD-L1アドネクチンを用いたインビトロオートラジオグラフィ

10

ヒトの肺腫瘍組織をOCTに設置し、2-メチルブタン中で2-5分間、冷凍するまで冷却した。使用までサンプルを-80℃の冷凍庫に保存した。ヒトの異種移植片組織もまた、当該アッセイにおいてインキュベートした。両側性の異種移植片を有するマウスは、 4×10^6 のPD-L1(+)L2987細胞および 1.5×10^6 のPD-L1(-)HT-29t細胞を、nu/nuマウスの両側に皮下投与することで生成した。異種移植腫瘍が適切な大きさ(およそ200-300mm³)に到達した後に、マウスを2%イソフルランによって麻酔し、頸椎脱臼によって犠死させた。新たな腫瘍組織を切除し、OCTに浸し、2-メチルブタン中で2-5分間、冷凍するまで冷却した。次いで組織をfoil/ZIPLOC(登録商標)袋に包み、使用まで-80℃で保存した。全ての組織(ヒトの肺腫瘍および異種移植片)について、5μmの厚さの切片(2切片/スライドを回収した)を低温保持装置を用いて切り取り、顕微鏡のガラススライド上で解凍し、およそ30分間空気乾燥させた。

20

【0230】

0.025nM、0.25nM、2.5nMおよび25nMのそれぞれの冷却(非標識)A02アドネクチン、並びに25nMの非PD-L1結合性アドネクチンを用いたブロッキング実験が、以下の条件を用いて行われた。濃度につき1つの個々のスライドをプラスチック性スライドカセットに設置し、Dakoの血清-フリータンパク質ブロック溶液中で30分間、前培養した。スライドを次いで、ガラススライドインキュベーションチャンバーに移し、さらにインキュベートした。これとは別に、0.25nMの ^{18}F -A02アドネクチンのストック溶液を、10.6μLの元の放射性リガンドのストック溶液(実験時に7064nM)を300mLのPBS+0.5%BSAで希釈することで生成した。このストック溶液から、40mLをそれぞれのインキュベーションチャンバーに加えた。これらのチャンバーのうちの1つは、放射性リガンド緩衝溶液のみを含み、これは総結合切片と称される。他のインキュベーションチャンバーは40mLの当該ストック溶液を、関連濃度(0.025nM、0.25nM、2.5nM、もしくは25nMの非標識A02アドネクチン、または25nMの非標識アドネクチン)のブロッキング化合物と共に加えた。スライドを、最大の結合に達するまで、室温で1時間、個々の緩衝溶液中でインキュベートした。インキュベートの後、それぞれの処理群のスライドを培養溶液から取り出し、氷冷された洗浄緩衝液(PBS+0.5%BSA)中に、3分間設置し、4回に分けて浸した。スライドを次いで、冷気流下で、およそ30分間乾燥させた。空気乾燥したスライドを、イメージングプレート(BAS-SR3545S)上に設置し、室温で一晩曝露した。イメージングプレートを、バイオイメージングアナライザー(FujiFilmFluorescentImageAnalyzer、FLA-9000)を用いてスキャンした。オートラジオグラム画像の画素サイズは100μmであった。マルチ-ゲージソフトウェアを用いて、画像解析を行った。全ての試験群において、腫瘍組織全体を包囲するように、関心領域(ROI)を引いた。組織に関連する放射能によるオートラジオグラフィシグナルを、これらのROIから定量した。

30

40

【0231】

ヒトの肺腫瘍切片並びにヒトの異種移植片切片の両方において、非標識A02アドネク

50

チンの4つの異なる濃度(0.025 nM、0.25 nM、2.5 nMおよび25 nM)について、総結合切片と比較した場合の ^{18}F -A02アドネクチン放射性リガンドの明らかな転移が測定された。非標識A02アドネクチンの添加に伴う、用量に依存した ^{18}F -A02の転移が、全ての組織切片において観測された。全ての組織において、25 nMの非PD-L1結合性アドネクチンは、総結合切片と比較して最小の障害を示した(図4)。

【0232】

当該サンプルにおけるPD-L1抗原の発現量を確認するために、それぞれの組織からの一連の5 μm の組織切片を、抗ヒト-PD-L1免疫組織化学的方法に用いた(図4B)。

【0233】

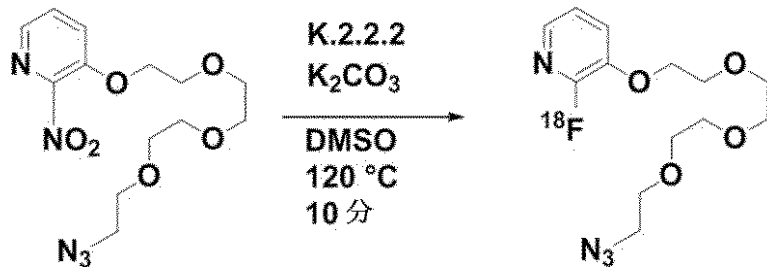
まとめると、これらの結果は、ヒトの肺腫瘍サンプル並びにヒトの異種移植片組織の両方において、PD-L1の直接的な可視化を示す。個々の組織に結合する放射性リガンドの量は、IHCによって冷凍切片を染色されたPD-L1の量と一致する。さらに、非標識抗PD-L1 A02アドネクチンを用いた、用量に依存した受容体の障害(および、非標識非PD-L1結合性アドネクチンを用いた障害の欠如)は、PETイメージングを用いたPD-L1組織発現の可視化のための ^{18}F -A02の使用の正当性をさらに立証する。

【0234】

実施例14

市販のGE TRACERlab FX2 N合成ユニットを用いた、放射性合成のための一般的な方法による、 $[\text{}^{18}\text{F}]$ -3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジンの自動合成

【化44】



手順：

非カセット型のGE TRACERlab FX2 N合成モジュールを用いて、 $[\text{}^{18}\text{F}]$ -3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジンの自動合成を行った。合成ユニットの配置は表1および図6にまとめられる。 $[\text{}^{18}\text{F}]$ -フルオリド水溶液(2.0 ml、29.6 GBq/800 mCi)が、Sep-Pak light QMAに移された[Sep-Pak light QMAカートリッジは使用前に、5 mlの0.5 Mの炭酸水素カリウム、5 mlの脱イオン水、および5 mlのアセトニトリルの順で前処理を行った]。この移動が完了すると、反応容器に溶出混合液を加えることによって(「V1」から)、 $[\text{}^{18}\text{F}]$ フルオリド水溶液をQMA Sep-Pakから溶出させた。溶媒を窒素の穏やかな気流および真空下で留去した。前駆体の溶液を(「V3」から)乾燥クリプタンド残留物に加え、この反応混合物を120 で10分間加熱した。次いで、4 mlの蒸留水を(「V4」から)反応容器中の粗製反応混合物に加え、混合物を、ローディングの終わりを制御する液体センサーを介して、セミ-分取HPLCの5 mlサンプル注入ループに移した。混合物をセミ-分取HPLCカラム(Luna C18(2).250 x 10 mm、Phenomenex)にロードした。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液中の35%アセトニトリルの混合液

を、毎分 4 . 6 m l の速度でカラムに通した。生成物をこの H P L C カラムから、1 5 m l の蒸留水を含む希釈フラスコに回収し、全ての内容物を、t C 1 8 1 グラムの固相抽出カートリッジに移した。3 m l のエタノールによって、このカートリッジから 3 5 2 m C i (1 3 G B q) の [^{18}F] - 3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジンが溶出され (「 V 1 4 」 から) 、アルキンを含む適切な生体分子との「クリック」アジド - アルキン反応を利用した ^{18}F 標識生物学的製剤の生成に用いられうる。

【表 1】

表 1

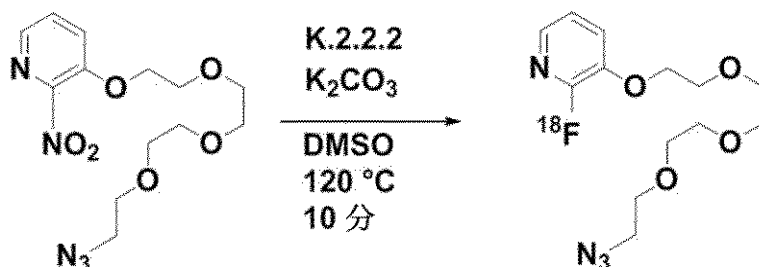
バイアル 1 (V 1)	0. 1 m l の蒸留水および 1. 4 m l のアセトニトリルに溶解した、1 6 m g の K. 2. 2. 2、3 m g の炭酸カリウム
バイアル 3 (V 3)	0. 5 m l の DMSO 中の、2 m g の 3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - ニトロピリジン
バイアル 4 (V 4)	4 m l の蒸留水
バイアル 1 4 (V 1 4)	3 m l の 1 0 0 % エタノール
希釈フラスコ	1 5 m l の蒸留水
カートリッジ 1 (C 1)	t C 1 8 6 c c 1 g の s e p p a c k
H P L C カラム	L u n a C 1 8 (2) 、2 5 0 × 1 0 m m、5 μ m、P h e n o m e n e x
H P L C 溶媒	0. 1 % トリフルオロ酢酸水溶液中の、3 5 % アセトニトリル
H P L C 流速	4. 6 m l / 分

【 0 2 3 5 】

実施例 1 5

市販の I B A S y n t h e r a 合成ユニットを用いた、放射性合成のための一般的な方法による、[^{18}F] - 3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジンの自動合成

【化 4 5】



手順：

カセット型の I B A S y n t h e r a 合成モジュールおよび適切に組み立てられた流体プロセッサ-積算キットを用いて、[^{18}F] - 3 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 2 - フルオロピリジンの自動合成を行った。この合成のために、流体プロセッサ-積算 (I F P) キットは適切な前駆体とともにロードされ、表 2 にまとめられる。精製は、V a r i a n の H P L C ユニットにおいて行わ

れた。HPLCの注入ループの充填は、HPLCユニットの安定窒素気流によってコントロールされた。両方の自動装置の組み立ては、表2にまとめられる。[^{18}F]-フルオリド水溶液(2.0 ml、29.6 GBq/800 mCi)が、Sep-Pak light QMAに移された[Sep-Pak light QMAカートリッジは使用前に、5 mlの0.5 Mの炭酸水素カリウム、5 mlの脱イオン水、および5 mlのアセトニトリルの順で前処理を行った]。この移動が完了すると、反応容器に溶出混合液を加えることによって(「V1」から)、[^{18}F]フルオリド水溶液をQMA Sep-Pakから溶出させた。溶媒を窒素の穏やかな気流および真空下で留去した。前駆体の溶液を(「V2」から)乾燥クリプタンド残留物に加え、この反応混合物を120 で10分間加熱した。次いで、3 mlの蒸留水を(「V4」から)反応容器中の粗製反応混合物に加え、混合物を、ローディングの終わりを制御する液体センサーを介して、セミ-分取HPLCの5 mlサンプル注入ループに移した。混合物をセミ-分取HPLCカラム(Luna C18(2)、250×10 mm、Phenomenex)にロードした。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液中の35%アセトニトリルの混合液を、毎分4.6 mlの速度でカラムに通した。生成物をこのHPLCカラムから、15 mlの蒸留水を含む希釈フラスコに回収し、全ての内容物を、tC18 1グラムの固相抽出カートリッジに移した。3 mlのエタノールによって、このカートリッジから352 mCi(12 GBq)の[^{18}F]-3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-フルオロピリジンが溶出され、アルキンを含む適切な生体分子との「クリック」アジド-アルキン反応を利用した ^{18}F 標識生物学的製剤の生成に用いられうる。

【表2】

表2

バイアル1 (V1)	0.3 mlの蒸留水および0.3 mlのアセトニトリルに溶解した、22 mgのK. 2, 2, 2, 4 mgの炭酸カリウム
バイアル2 (V2)	0.5 mlのDMSO中の、2 mgの3-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-2-ニトロピリジン
バイアル4 (V4)	3 mlの蒸留水
希釈フラスコ	15 mlの蒸留水
カートリッジ1 (C1)	tC18 6 cc 1 gのsep pack
HPLCカラム	Luna C18(2)、250×10 mm、5 μm、Phenomenex
HPLC溶媒	0.1%トリフルオロ酢酸水溶液中の、35%アセトニトリル
HPLC流速	4.6 ml/分

均等

当業者は、本明細書に記載の特定の実施態様の多くの均等物を認識し、単なる通常の実験だけで確認することができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

【図 5】

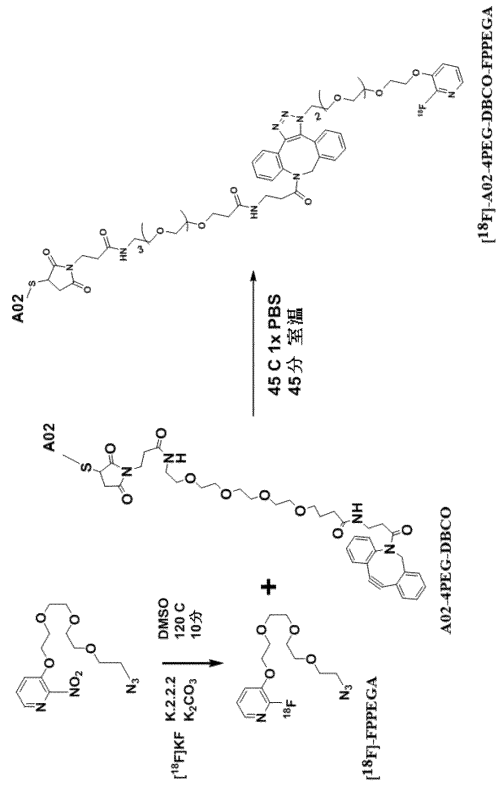


図 5

【図 6】

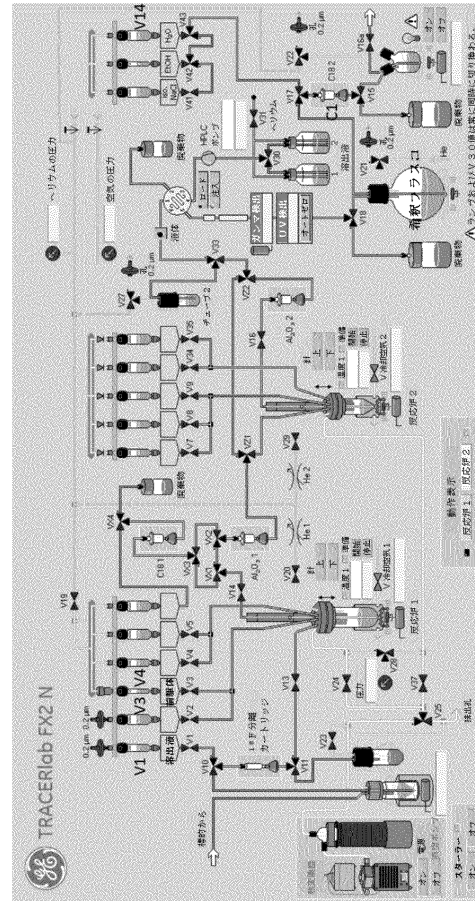


図 6

【図 7】

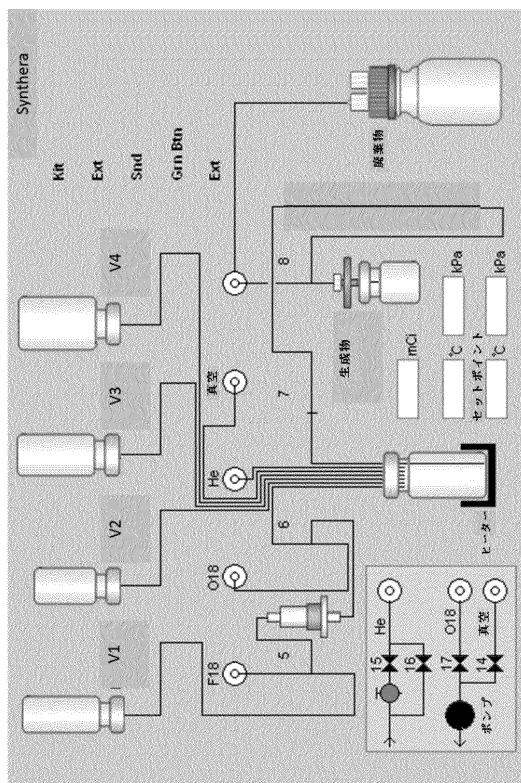


図 7

【配列表】

0006701217000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	R
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	S
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
C 0 7 K 1/13 (2006.01)	A 6 1 K 51/12	2 0 0
G 0 1 N 33/534 (2006.01)	A 6 1 K 51/04	2 0 0
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
	C 0 7 K 1/13	
	G 0 1 N 33/534	
	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/15	Z
	C 0 7 K 16/00	

(74)代理人 100156155

弁理士 水原 正弘

(72)発明者 デイビッド・ドネリー

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンズ・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

審査官 伊藤 幸司

(56)参考文献 LACHLAN S CAMPBELL-VERDUYN, STRAIN-PROMOTED COPPER-FREE "CLICK" CHEMISTRY FOR 18F RADIOLABELING OF BOMBESIN, ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, ドイツ, 2 0 1 1 年 1 月 1 8 日, VOL:50, NR:47, PAGE(S):11117 - 11120, U R L, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201105547>

KUHNAST B, PEG-[18F]FPYZIDE AND PEG-[18F]FPYKYNE, TWO NEW FLUOROPYRIDINE-BASED REAGENTS FOR THE 以下備考, JOURNAL OF LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS, 2 0 0 9 年 6 月 1 7 日, PAGE(S):S184, FLUORINE-18 LABELING OF MACROMOLECULES USING CLICK CHEMISTRY, U R L, <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/jlcr.1640/asset/1640ftp.pdf?v=1&t=ikpgmdsg&s=e9ba4c2af16fa5105e6dcb8955514fcc1ee23567>

Bioconjugate Chemistry, 2 0 1 2 年, 23, pp.1680-1686

Journal of Medicinal Chemistry, 2 0 1 2 年, 55, pp.223-232

Journal of Medicinal Chemistry, 2 0 1 1 年, 54, pp.939-948

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 0 7 D

A 6 1 K

A 6 1 P

C 0 7 K

G 0 1 N

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)