

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5774687号
(P5774687)

(45) 発行日 平成27年9月9日 (2015.9.9)

(24) 登録日 平成27年7月10日 (2015.7.10)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 5/08 (2006.01)

C O 7 K 5/08

A 6 1 K 51/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/02

B

G O 1 T 1/161 (2006.01)

A 6 1 K 49/02

C

G O 1 T 1/161

B

請求項の数 13 (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願2013-512534 (P2013-512534)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月24日 (2011.5.24)
 (65) 公表番号 特表2013-533852 (P2013-533852A)
 (43) 公表日 平成25年8月29日 (2013.8.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2011/003801
 (87) 国際公開番号 W02011/149250
 (87) 国際公開日 平成23年12月1日 (2011.12.1)
 審査請求日 平成25年1月8日 (2013.1.8)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0043544
 (32) 優先日 平成23年5月9日 (2011.5.9)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2010-0048289
 (32) 優先日 平成22年5月24日 (2010.5.24)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 513164657
 バイオ イメージング コリア カンパニ
 ー リミテッド
 大韓民国 ソウル カンナムーグ ノンヒ
 ヨンーロ 63-キル 62 #202
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 イ ビョンチョル
 大韓民国 143-817 ソウル クワ
 ンジンーグ クイ-2ドン 47-21
 ヘソン アパート ナンバー102

最終頁に続く

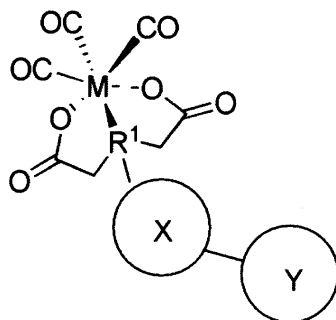
(54) 【発明の名称】 トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体、
 その製造方法及びそれを有効成分として含む新生血管関連疾患の診断または治療用薬学的組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記化学式1で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩：

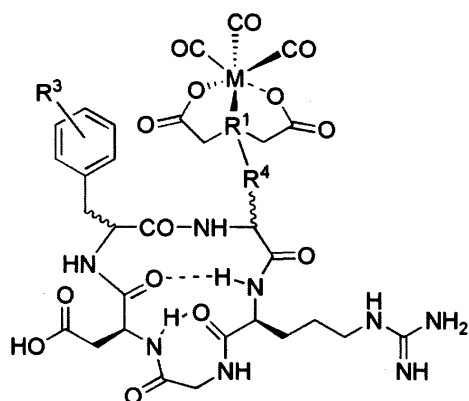
【化1】



【化学式1】

(前記化学式1は、下記の化学式1A、化学式1B、又は化学式1Cを意味する：

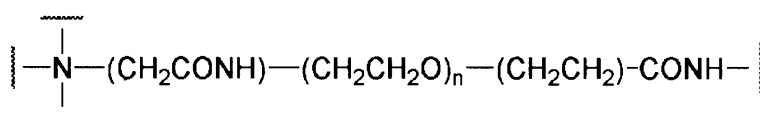
【化 2】



(化学式 1 A)

(化学式 1 A 中、
M は、 ^{99m}Tc 、 ^{188}Re 又は ^{185}Re 、 ^{187}Re であり、
 R^1 は、

【化 3】

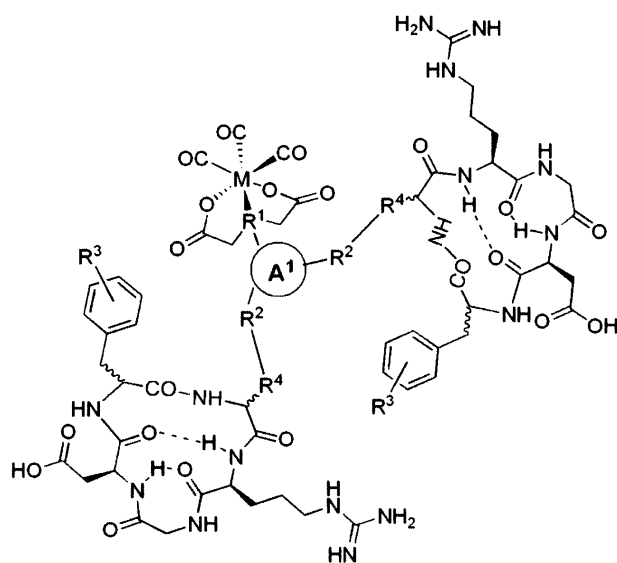


であり、

前記 n は、4 乃至 8 の整数であり、 R^3 は、 $-\text{H}$ 又は $-\text{OH}$ であり、 R^4 は、 $-(\text{CH}_2)_m-$ 又は $-(\text{CH}_2)_m-\text{COO}-$ であり、 m は、1 乃至 8 の整数であり、

前記 R^4 が $-(\text{CH}_2)_m-\text{COO}-$ の場合、酸素原子結合部が R^2 に結合するか又はアルキレン基結合部が R^2 に結合する。)；

【化 4】



(化学式 1 B)

(化学式 1 B 中、
M は、 ^{99m}Tc 、 ^{188}Re 、又は ^{185}Re 、 ^{187}Re であり、
 R^1 は、

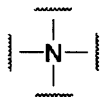
10

20

30

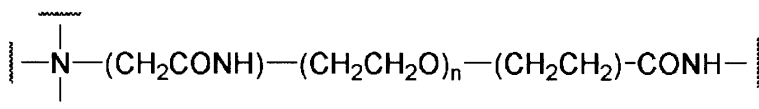
40

【化 5】



又は

【化 6】

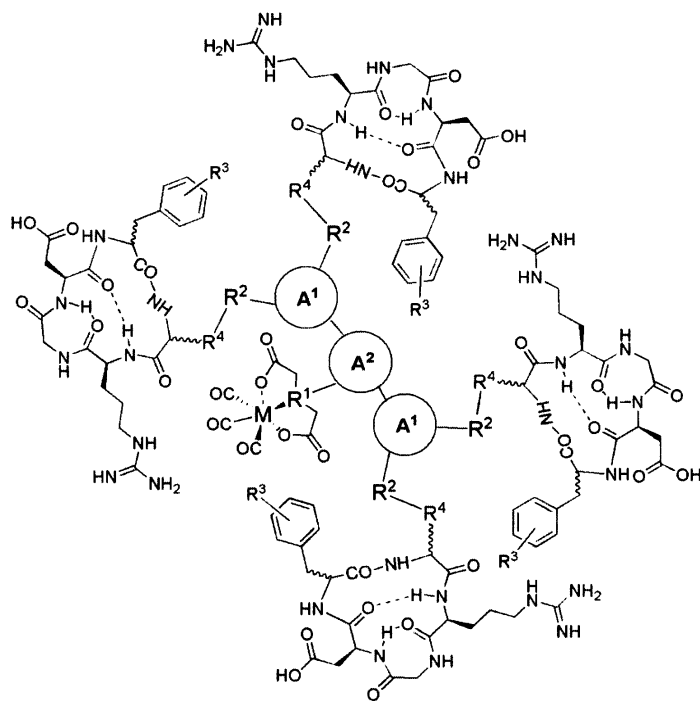


10

であり、

前記 n は、0 乃至 8 の整数であり、 A^1 は、アスパラギン酸、リジン、グルタミン酸、チロシン、システイン、スレオニン及び、セリンからなる群から選択されるアミノ酸であり、 R^2 は、 $-\text{NH}_2$ であり、 R^3 は、 $-\text{H}$ 又は $-\text{OH}$ であり、 R^4 は、 $-(\text{CH}_2)_m-$ 又は $-(\text{CH}_2)_m-\text{COO}-$ であり、 m は、1 乃至 8 の整数であり、前記 R^4 が $-(\text{CH}_2)_m-\text{COO}-$ の場合、酸素原子結合部が R^2 に結合するか又はアルキレン基結合部が R^2 に結合する。)；及び 20

【化 7】



30

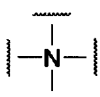
(化学式 1 C)

40

(化学式 1 C 中、

 M は、 ^{99m}Tc 、 ^{188}Re 、又は ^{185}Re 、 ^{187}Re であり、 R^1 は、

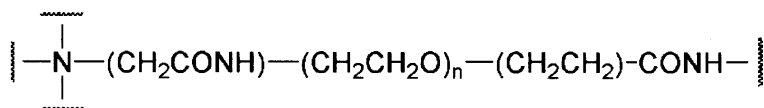
【化 8】



50

又は

【化 9】



であり、

前記 n は、0 乃至 8 の整数であり、

A^1 及び A^2 は、アスパラギン酸、リジン、グルタミン酸、チロシン、システイン、スレオニン、及びセリンからなる群から選択されるアミノ酸であり、

R^2 は、 $-\text{NH}_2$ であり、

R^3 は、 $-\text{H}$ 又は $-\text{OH}$ であり、

R^4 は、 $-(\text{CH}_2)_m-$ 又は $-(\text{CH}_2)_m-\text{COO}-$ であり、

m は、1 乃至 8 の整数であり、

前記 R^4 が $-(\text{CH}_2)_m-\text{COO}-$ の場合、酸素原子結合部が R^2 に結合するか又はアルキレン基結合部が R^2 に結合する。) 。

【請求項 2】

前記化学式 1 で表される化合物が、

4) サイクリック { (トリカルボニル [^{99m}Tc] テクネシウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- NH_2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_4$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -リジン) -アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

5) サイクリック { (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- NH_2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_4$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -リジン) -アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

6) サイクリック { (トリカルボニル [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- NH_2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_4$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -リジン) -アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

7) サイクリック { (トリカルボニル [^{99m}Tc] テクネシウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン- CONH ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_4$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -リジン) -アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

8) サイクリック { (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン- CONH ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_4$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -リジン) -アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

9) サイクリック { (トリカルボニル [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン- CONH ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_4$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -リジン) -アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

10) (トリカルボニル [^{99m}Tc] テクネシウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ 、

11) (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ 、

12) (トリカルボニル [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ 、

13) {トリカルボニル [^{99m}Tc] テクネシウム- N - α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ 、 ($n=0-8$)、

10

20

30

40

50

14) {トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ 、(n=0-8)

15) {トリカルボニル [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ 、(n=0-8)、

16) {トリカルボニル [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - { (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] } $_2$ 、(n=0-8)、

10

17) {トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - { (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] } $_2$ 、(n=0-8)、

18) {トリカルボニル [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - { (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] } $_2$ 、(n=0-8)、

20

19) (トリカルボニル [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、

20) (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、

21) (トリカルボニル [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、

22) {トリカルボニル [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、

30

23) {トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、

24) {トリカルボニル [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、

40

25) {トリカルボニル [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、

26) {トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、及び

27) {トリカルボニル [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシ

50

シカルボニルメチルー（ポリエチレングリコール）_n－アスパラギン酸}－{アスパラギン酸－（ポリエチレングリコール）_n－[サイクリック（リジン－アルギニン－グリシン－アスパラギン酸－D－フェニルアラニン）]₂}₄、（n＝0－8）

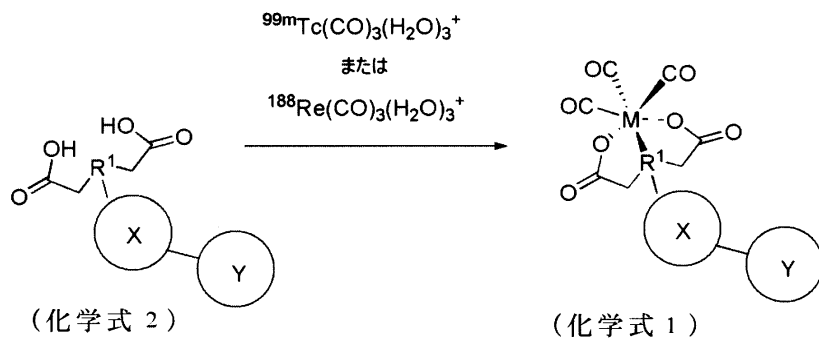
からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 3】

下記スキーム 1 に示すように、

化学式 2 の前駆体化合物にトリカルボニルテクネシウム－99m又はトリカルボニルレニウム－188を反応させる工程を含む、請求項 1 の化学式 1 で表される化合物の製造方法：

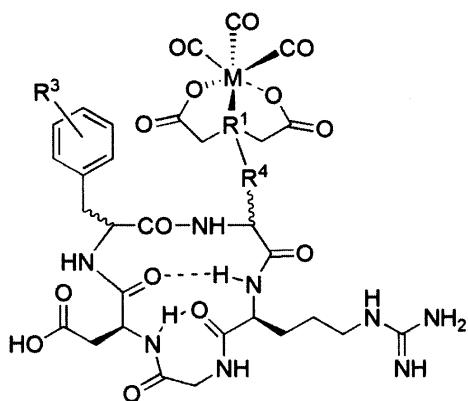
【化 1 0】



スキーム 1

（前記化学式 1 は、下記の化学式 1 A、化学式 1 B、又は化学式 1 Cを意味し、
前記化学式 2 は、下記の化学式 2 A、2 B、又は 2 Bを意味し、
前記化学式 2 が化学式 2 Aを意味する場合、前記化学式 1 は化学式 1 Aを意味し、
前記化学式 2 が化学式 2 Bを意味する場合、前記化学式 1 は化学式 1 Bを意味し、
前記化学式 2 が化学式 2 Cを意味する場合、前記化学式 1 は化学式 1 Cを意味する。）：

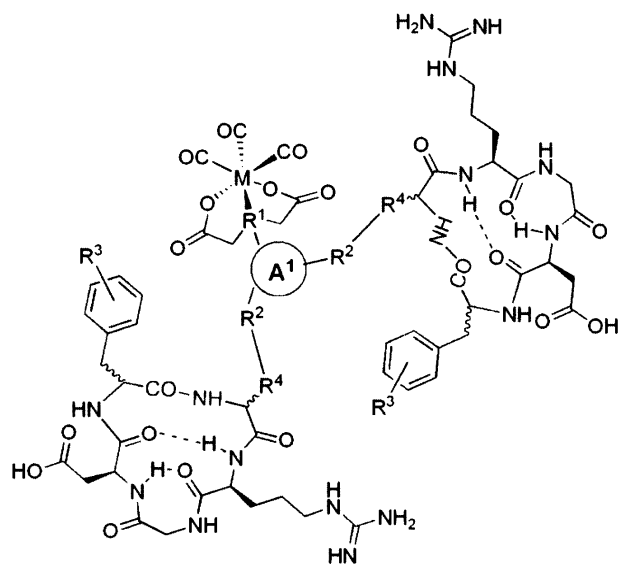
【化 1 1】



（化学式 1 A）

（化学式 1 A 中、
M は、^{99m}Tc 又は ¹⁸⁸Re であり、
R¹、R³、及び R⁴ は請求項 1 の化学式 1 A で定義したものと同様である。）；

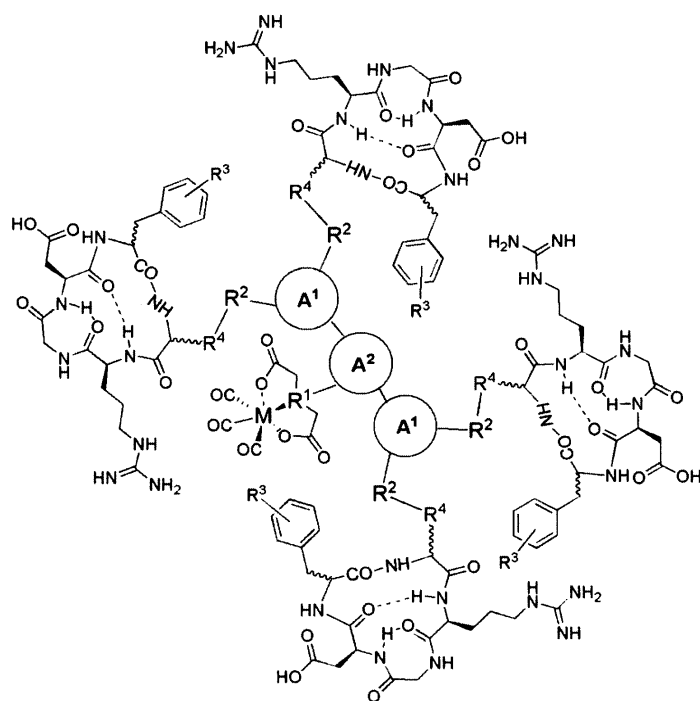
【化 1 2】



(化学式 1 B)

(化学式 1 B 中、
M は、 ^{99m}Tc 又は ^{188}Re であり、
 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び A^1 は、請求項 1 の化学式 1 B で定義したものと同様であ
る。) ;

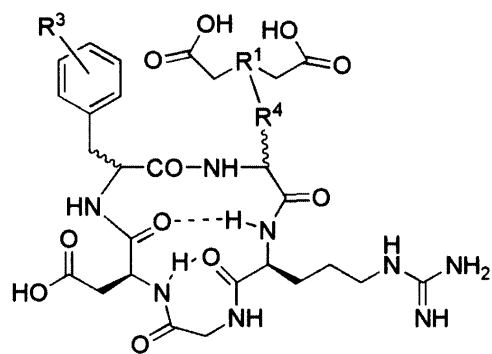
【化 1 3】



(化学式 1 C)

(化学式 1 C 中、
M は、 ^{99m}Tc 又は ^{188}Re であり、
 A^1 、 A^2 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、請求項 1 の化学式 1 C で定義したものと同
様である。) ;

【化 1 4】

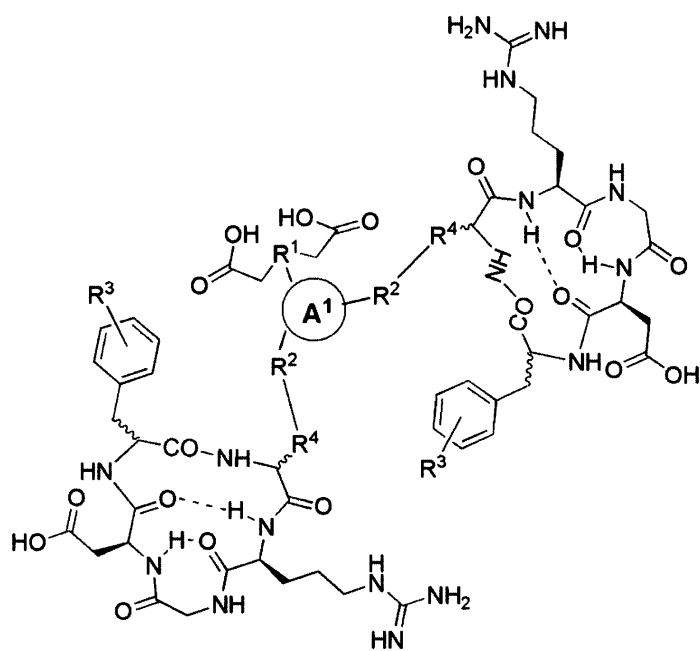


(化学式 2 A)

10

(化学式 2 A 中、 R^1 、 R^3 、及び R^4 は、請求項 1 の化学式 1 A で定義したものと同様である。) ;

【化 1 5】



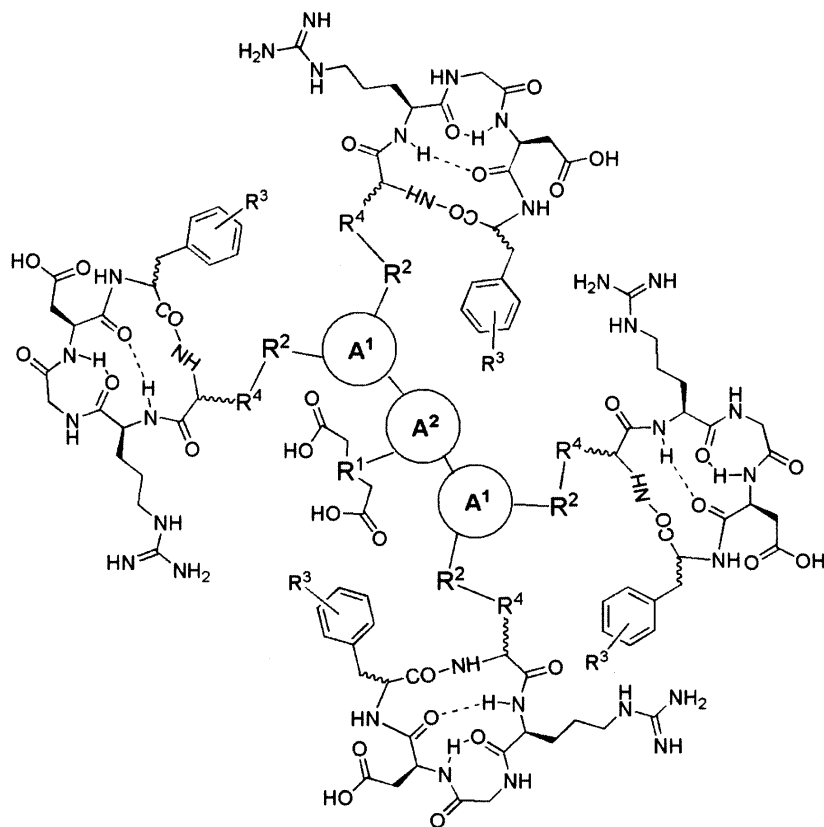
(化学式 2 B)

20

30

(化学式 2 B 中、 A^1 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、請求項 1 の化学式 1 B で定義したものと同様である。) ; 及び

【化 1 6】



(化学式 2 C)

(化学式 2 C 中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 A^1 、及び A^2 は、請求項 1 の化学式 1 C で定義したものと同様である。)

【請求項 4】

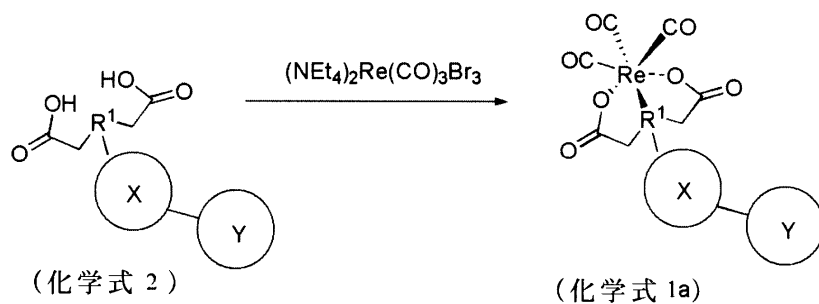
請求項 3 において、前記工程が、トリカルボニルテクネシウム-99m 又はトリカルボニルレニウム-188 を蒸留水溶媒 0.5~5 ml に希釈して、化学式 2 の前駆体が入っている反応容器に入れて、70~80℃で30~60分間加熱して反応させることで、化学式 1 B 又は化学式 1 C で表される化合物を製造することを特徴とする、請求項 3 に記載の製造方法。

【請求項 5】

下記スキーム 2 に示すように、

化学式 2 の前駆体化合物に $(NEt_4)_2Re(CO)_3Br_3$ を入れて反応させて、化学式 1 a のトリカルボニル¹⁸⁵, ¹⁸⁷ Re が導入された化合物を製造する工程を含む、化学式 1 a で表される化合物の製造方法：

【化 1 7】



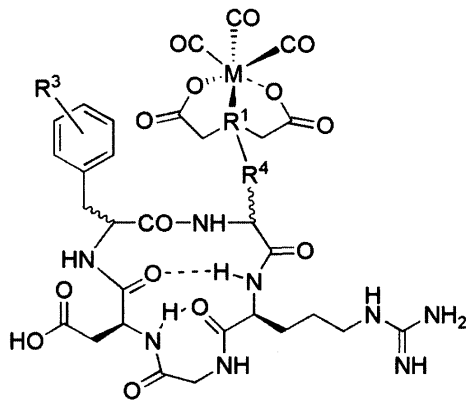
(化学式 2)

(化学式 1a)

スキーム 2

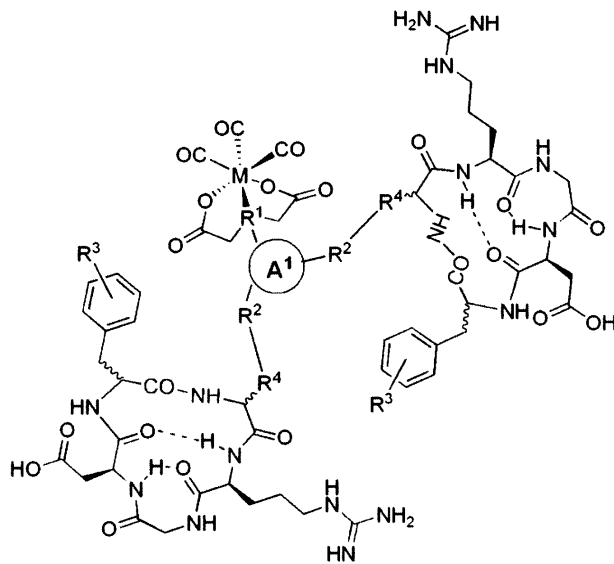
(前記化学式 1 a は、請求項 1 の化学式 1 に含まれ、
前記化学式 1 a は、下記の化学式 1 A、化学式 1 B、又は化学式 1 C を意味し、
前記化学式 2 は、下記の化学式 2 A、2 B、又は 2 B を意味し、

前記化学式 2 が化学式 2 A を意味する場合、前記化学式 1 a は化学式 1 A を意味し、
 前記化学式 2 が化学式 2 B を意味する場合、前記化学式 1 a は化学式 1 B を意味し、
 前記化学式 2 が化学式 2 C を意味する場合、前記化学式 1 a は化学式 1 C を意味する。：
 【化 1 8】



(化学式 1 A)

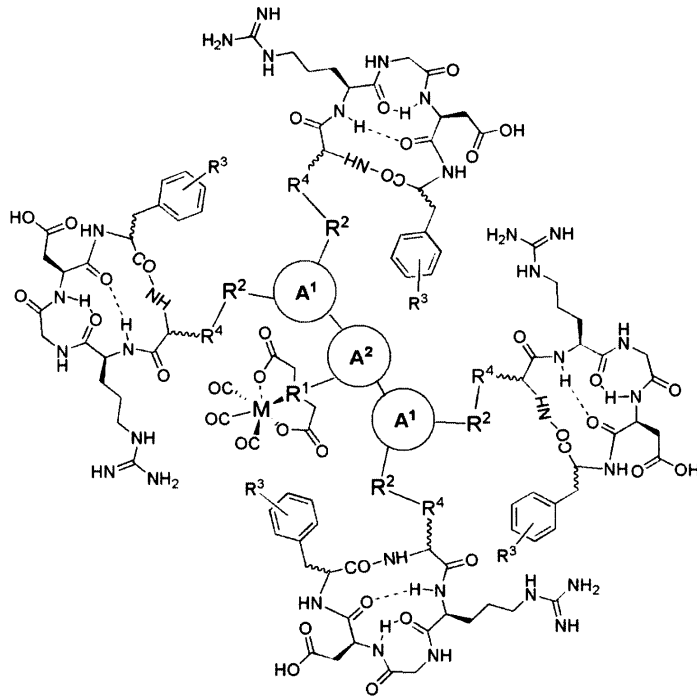
(化学式 1 A 中、
 M は、¹⁸⁵Re、¹⁸⁷Re であり、
 R¹、R³、及び R⁴ は請求項 1 の化学式 1 A で定義したものと同様である。)；
 【化 1 9】



(化学式 1 B)

(化学式 1 B 中、
 M は、¹⁸⁵Re、¹⁸⁷Re であり、
 R¹、R²、R³、R⁴、及び A¹ は、請求項 1 の化学式 1 B で定義したものと同様である。)；

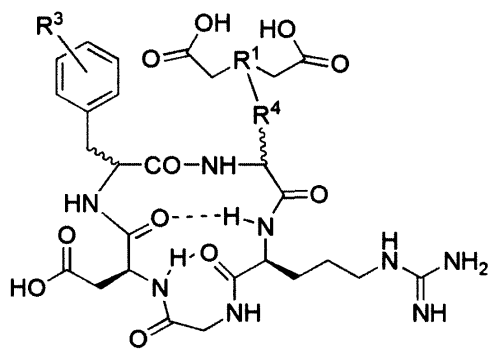
【化 2 0】



(化学式 1 C)

(化学式 1 C 中、
M は、 ^{185}Re 、 ^{187}Re であり、
 A^1 、 A^2 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、請求項 1 の化学式 1 C で定義したものと同
様である。) ;

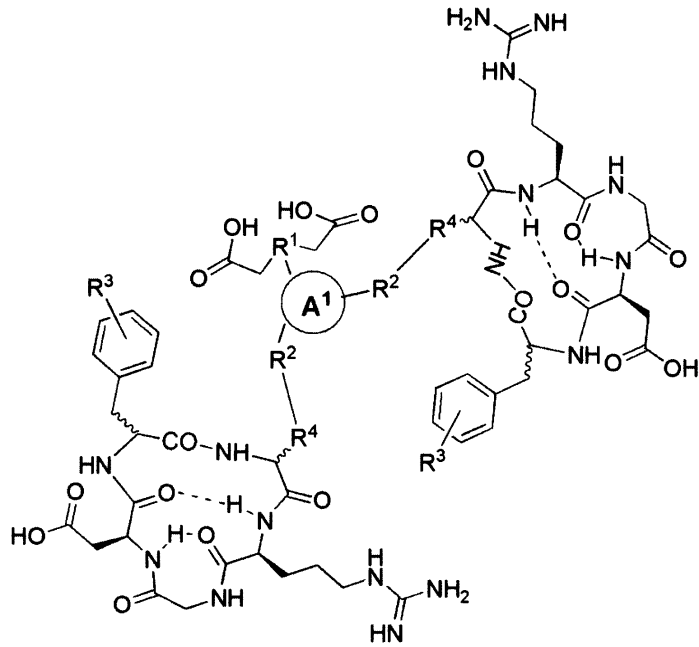
【化 2 1】



(化学式 2 A)

(化学式 2 A 中、 R^1 、 R^3 、及び R^4 は、請求項 1 の化学式 1 A で定義したものと同様
である。) ;

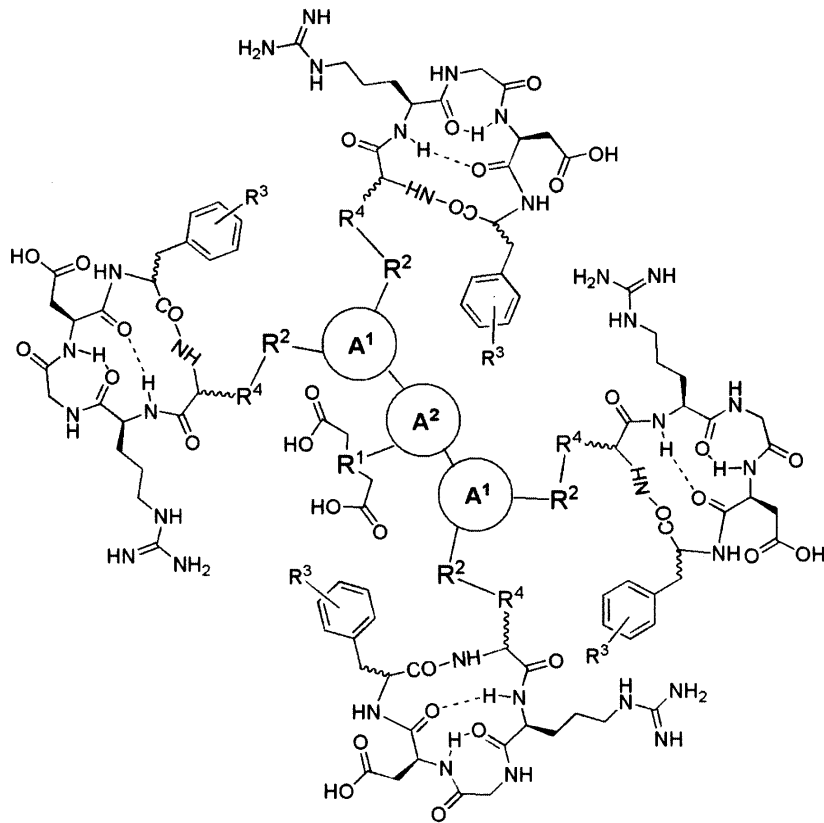
【化 2 2】



(化学式 2 B)

(化学式 2 B 中、 A^1 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、請求項 1 の化学式 1 B で定義したものと同様である。) ; 及び

【化 2 3】



(化学式 2 C)

(化学式 2 C 中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 A^1 、及び A^2 は、請求項 1 の化学式 1 C で定義したものと同様である。)

【請求項 6】

請求項 5 において、前記工程が、試薬 $(NEt_4)_2 Re(CO)_3 Br_3$ を蒸留水溶

10

20

30

40

50

媒 0.5～5 ml に希釈して、化学式 2 の前駆体が入っている反応容器に入れて、70～80℃で55～65分間加熱して反応させることで、化学式 1 a のトリカルボニル¹⁸⁵、¹⁸⁷ Re が導入された化合物を製造することを特徴とする、請求項 5 に記載の製造方法。

【請求項 7】

請求項 1 の化学式 1 で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む新生血管関連疾患診断用薬学的組成物。

【請求項 8】

前記組成物が、対象に静脈注射で投与され、単光子放射型コンピュータ断層撮影によって新生血管関連疾患を診断することを特徴とする、請求項 7 に記載の診断用薬学的組成物。

10

【請求項 9】

前記新生血管関連疾患が、血栓症、心筋虚血、固形化腫瘍及び転移癌からなる群から選ばれる $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが過剰に分布する疾患であることを特徴とする、請求項 7 又は 8 に記載の診断用薬学的組成物。

【請求項 10】

請求項 1 の化学式 1 で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む新生血管関連疾患治療用薬学的組成物。

【請求項 11】

前記組成物が、対象に静脈注射で投与されることを特徴とする、請求項 10 に記載の新生血管関連疾患治療用薬学的組成物。

20

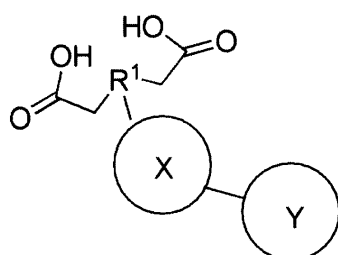
【請求項 12】

前記新生血管関連疾患が、血栓症、心筋虚血、固形化腫瘍及び転移癌からなる群から選ばれる $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが過剰に分布する疾患であることを特徴とする、請求項 10 又は 11 に記載の新生血管関連疾患治療用薬学的組成物。

【請求項 13】

下記化学式 2 で表されるテクネシウム-99m、レニウム-188、又はレニウム-185、¹⁸⁷ Re 標識のための前駆体：

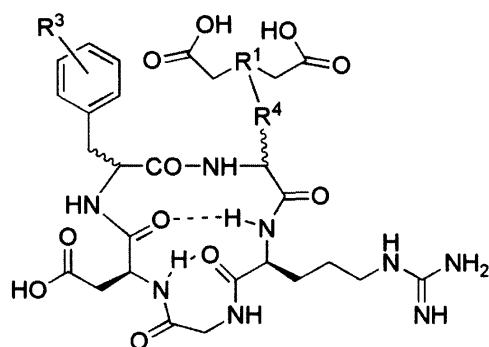
【化 2 4】



(化学式 2)

(化学式 2 は、下記の化学式 2 A、化学式 2 B、又は化学式 2 C を意味する：

【化 2 5】



(化学式 2 A)

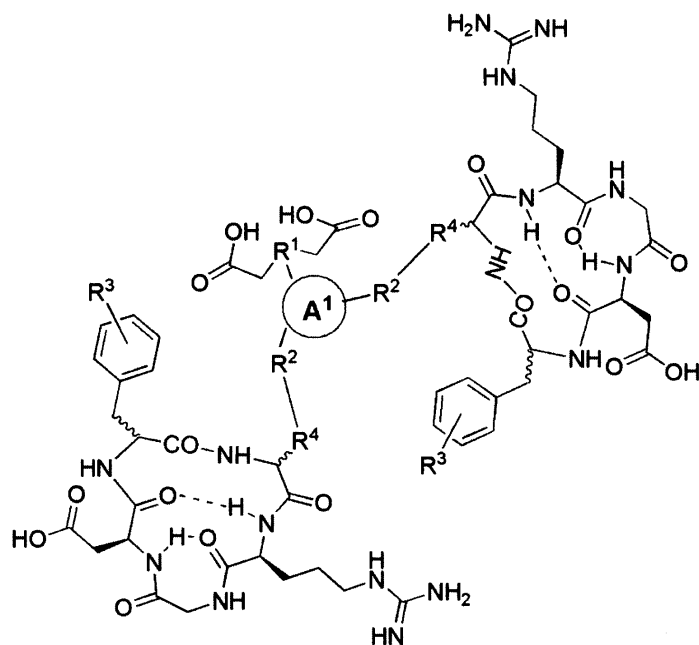
30

40

50

(化学式 2 A 中、 R^1 、 R^3 、及び R^4 は、請求項 1 の化学式 1 A で定義したものと同様である。) ;

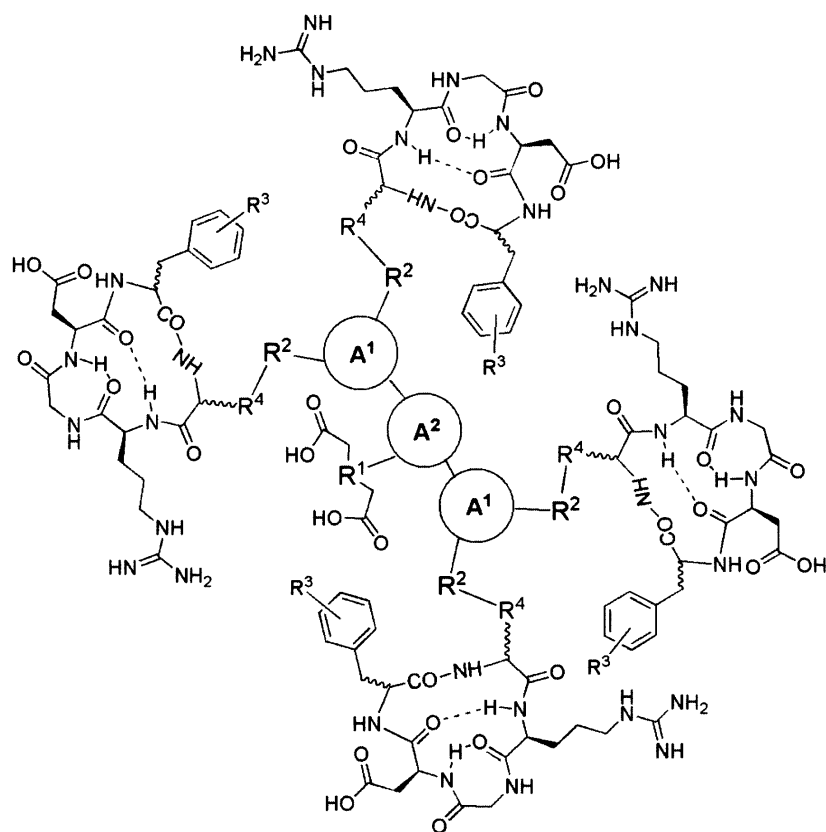
【化 2 6】



(化学式 2 B)

(化学式 2 B 中、 A^1 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は、請求項 1 の化学式 1 B で定義したものと同様である。) ; 及び

【化 2 7】



(化学式 2 C)

(化学式 2 C 中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 A^1 、及び A^2 は、請求項 1 の化学式 1 C で定義したものと同様である。)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体、その製造方法及びそれを有効成分として含む新生血管関連疾患の診断または治療用薬学的組成物に関するものである。

【背景技術】

【0002】

癌の完全治癒が現代医学の重要課題になった時点で、標的分子と特異的に反応する放射性追跡子を用いて、非浸湿的に癌の早期診断及び治療のために疾病の分子水準変化観察が可能な核医学的診断及び治療技術の重要性は広く知られている。

10

【0003】

既存の陽電子放出断層撮影（PET）用放射性医薬品である $[^{18}\text{F}]$ -FDG（2-フルオロ-2-デオキシ-D-グルコース）は、広く体内癌診断で広く使用されているが、脳腫瘍の診断や、炎症と腫瘍との区別ができないというなどの短所があり、また癌の新生血管生成及び転移症候に対する情報を提供するには限界性がある。

【0004】

癌の新生血管作用は、原発性または転移性腫瘍において必須であり、癌組織は新生血管による栄養分と酸素供給がなければ、 $1-2\text{mm}^3$ 以上成長することができない。このように新生血管作用が起きる間、原発性癌細胞が血管内に流入して他の場所に移動して転移癌を形成するようになる。したがって、新生血管映像ターゲットはすべての固形性腫瘍で共通的に使用することができるという可能性を有している。治療面では既存の抗癌化学療法は、癌の細胞が早く成長する特徴を用いた治療であるので、細胞周期が早い骨髄細胞、胃腸関係細胞など正常細胞に毒性を示す一方、新生血管作用ターゲット治療は、長期投与でも比較的少ない副作用と血管細胞が治療の対象という点で耐性を示す可能性が少ない。

20

【0005】

癌の成長メカニズム過程としての新生血管は、癌組織近くの血管内 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン（integrin）の過剰分布を始めとして進行することが知られている。インテグリンは、細胞の付着や移動などに関与する α 及び β サブユニットで構成されたヘテロダイマー細胞膜タンパク質であり、細胞によって多くの種類が存在する。その中で新生血管には、ビトロネクチン受容体とも呼ばれる $\alpha_v\beta_3$ 種が重要で、平常の血管内皮細胞には発現せず、癌による新生血管作用が活性化になった場合にのみ発現する。このインテグリンと相互作用するタンパク質には、共通的にアルギニン-グリシン-アスパラギン酸（Arg-Gly-Asp, RGD）ペプチドシーケンスが存在して結合部位の役割をする。このような化合物を基に $\alpha_v\beta_3$ インテグリン正常機能を防ぐより高い結合親和度を有する拮抗物質として、環形ペプチド構造であるサイクリックRGD（cyclic Arg-Gly-Asp, cRGD）ペプチド化合物があり、今まで多くの国内外の研究機関を通じてこの化合物に多様な放射性同位元素を導入して、癌の新生血管映像化研究が進められてきた。

30

【0006】

多様なサイクリックRGD誘導体に用いた放射性同位元素は、PET用フルオリン-18、ガリウム-68と銅-64等と、SPECT用でテクネシウム-99m、ヨード-123、インジウム-111等が標識核種に使用され、肝組織での排出を早く誘導するために単糖類を付着させることで放射性追跡子の薬物動態を良くしたり、より高い結合親和度を有するようになりするために2個または4個のサイクリックRGDを付着した放射性追跡子が研究された（参照論文：非特許文献1～7）。しかし、多様な放射性同位元素標識サイクリックRGD誘導体が開発されたが、高い肝摂取及び腸での排出速度が遅い短所を有していて、腫瘍組織対正常組織間の蓄積の割合が低く映像の限界性を有していて、治療用放射性同位元素標識放射性追跡子の場合、正常組織にも損傷を及ぼすため、いまだに臨床適用研究が活発ではないのが現状である。

40

50

【0007】

さまざまな放射性同位元素の中で、テクネシウム-99mとレニウム-188は、すべての病院で単光子放射型コンピュータ断層撮影法（Single Photon Emission Computed Tomography；SPECT）スキャナと発生源さえあれば、簡単な標識方法と分離工程を通じてSPECT映像を通じた診断を行なうことができ、活用的、実用的な面で優れた放射性同位元素であり、同じ前駆体を用いて治療目的にレニウムを選択して標識することができる長所を有している。

【0008】

しかし、既存のテクネシウム-99mとレニウム-188標識方法では、標識ポケットのサイズが大きくて体内安定性が低く前駆体合成が容易でないため、効果的な放射性追跡子を開発するのに多くの制約を有している。それとは異なりトリカルボニルテクネシウム-99mとトリカルボニルレニウム-188は、前駆体合成が容易で、標識ポケットが小さくて安定していて、簡単な製造工程の変化で放射性追跡子の電荷を変化させることができる。それとともに体内で安定し、標識された放射性追跡子が体内代謝時に甲状腺に集まらないで早く体外に排出されることによって、相対的に良い映像を提供するなど、効率性が高い同位元素追跡子として重要視されている。このようなトリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188の利用は、まだ微々であるが、新しい放射性医薬品開発のために国内外で研究が進行されている。

【0009】

そこで、本発明者らは癌の新生血管作用の有力バイオマーカーである $\alpha_v\beta_3$ インテグリンターゲット映像及び治療用医薬品として、新しいトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体を合成して、多様な生物学的評価結果を通じて、それらトリカルボニルテクネシウムまたはレニウム標識RGD誘導体が優れた新生血管関連疾患の診断及び治療が可能な物質であることを確認して本発明を完成した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Haubner, R., Wester, H-J., Weber, W.A., Mang, C., Ziegler, S. I., Goodman, S. L., Senekowitsch-Schmidtke, R., Kessler, H., Schwaiger, M., Cancer Res., 2001年,第61巻, p.1781-1785

【非特許文献2】Jeong, J.M., Hong, M.K., Chang, Y.S., Lee, Y.S., Kim, Y.J., Cheon, G.J., Lee, D.S., Chung, J.K., Lee, M.C., J. Nucl. Med., 2008年,第49巻, p.830-836

【非特許文献3】Chen, W., Park, R., Tohme, M., Shahinian, A.H., Bading, J.R., Conti, P.S. Bioconjugate Chem., 2004, 15:41-49

【非特許文献4】Liu, S., Hsieh, W.Y., Kim, Y.S., Mohammel, S. I., Bioconjugate Chem., 2005 年,第16巻, p.1580-1588

【非特許文献5】Haubner, R., Wester, H-J., Reuning, U., Senekowitsch-Schmidtke, R., Diefenbach, B., Kessler, H., Stocklin G., Schwaiger, M., J. Nucl. Med., 1999 年,第40巻, p.1061-1071

【非特許文献6】Janssen, M., Oyen, W.J.G., Dijkgraaf, I., Massuger, L.F.A.G., Frielink, C., Edwards, D.S., Rajopadyhe, M., Boonstra, H., Corsten, F.H.M., Boerman, O.C., Cancer Res., 2002 年,第62巻, p.6146-6151

【非特許文献7】Wu, Y., Zhang, X., Xiong, Z., Cheng, Z., Fisher, D.R., Liu, S., Gambhir, S.S., Chen, X., J. Nucl. Med., 2005 年,第46巻, p.1707-1718

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、新生血管関連疾患の診断または治療に有用に用いることができるトリ

10

20

30

40

50

カルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を提供することにある。

【0012】

本発明の他の目的は、前記トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の製造方法を提供することにある。

【0013】

本発明のまた他の目的は、前記トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の前駆体を提供することにある。

【0014】

本発明のまた他の目的は、前記トリカルボニルテクネシウムまたはレニウム標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む、新生血管関連疾患の診断または治療用薬学的組成物を提供することにある。

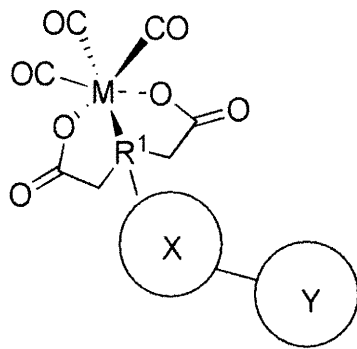
【課題を解決するための手段】

【0015】

前記目的を達成するために、本発明は、下記化学式1のトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【0016】

【化1】



化学式 1

【0017】

(前記式中1、M、R¹、X及びYは本明細書で定義したとおりである)

【0018】

また、本発明は、トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の製造方法を提供する。

【0019】

さらに、本発明は、前記トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の前駆体を提供する。

【0020】

また、本発明は、前記トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む新生血管関連疾患の診断または治療用薬学的組成物を提供する。

【発明の効果】

【0021】

本発明のトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体は、腫瘍によって誘導される新生血管作用で活性化になったビトロネクチン受容体とも呼ばれる $\alpha_v\beta_3$ インテグリンにサブナノモル単位の高い親和度を有し、癌細胞が移植された動物でトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の初期摂取後、高い腫瘍映像を反映して肝臓と腸での摂取率が、既存に知られた放射性同位元素標識サイクリックRGD誘導体に比べて顕著に低くて選択的に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが活性化した癌細胞にのみ作用することが分かり、このような結果を基に、テクネ

シウム-99m標識に使用した同一な前駆体を用いた治療核種であるレニウム-188標識誘導体の場合、生理食塩水のみ注入した腫瘍動物モデルとは異なり、尾静脈注入時に効果的な腫瘍の成長阻害と治療効能を示すことから、あつらえ形新生血管関連疾患の診断または治療用医薬品として有用に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の一実施例によるトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の体内腫瘍モデルマウスでの、腫瘍摂取及び臓器別排出結果を示すグラフである。

【図2】本発明の他の一実施例によるトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の体内腫瘍モデルマウスでの、腫瘍摂取及び臓器別排出結果を示すグラフである。

10

【図3】本発明のまた他の一実施例によるトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の体内腫瘍モデルマウスでの、腫瘍摂取及び臓器別排出結果を示すグラフである。

【図4】本発明の一実施例によるトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の体内腫瘍モデルマウスでの、SPECT映像を撮影した写真である。

【図5】本発明の他の一実施例によるトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の体内腫瘍モデルマウスでの、SPECT映像を撮影した写真である。

【図6】本発明のまた他の一実施例によるトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の体内腫瘍モデルマウスでの、SPECT映像を撮影した写真である。

20

【図7】本発明の一実施例によるトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の体内腫瘍モデルマウスでの、臓器摂取率グラフ及び時間帯別に腫瘍対肝臓、腫瘍対腎臓そして腫瘍対正常細胞の摂取率グラフである。

【図8】本発明の一実施例によるトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の体内腫瘍モデルマウスでの、サイクリックRGD誘導体(cRGDyV)注入後のSPECT映像を撮影した写真である。

【図9】本発明の一実施例によるトリカルボニルレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体のモデルマウスの腫瘍の大きさ及び体重に及ぼす影響を示すグラフである。

30

【図10】本発明の一実施例によるトリカルボニルレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体のモデルマウスの腫瘍の大きさ及び体重に及ぼす影響を示すSPECT映像及び関心領域別臓器の摂取率グラフである。

【図11】本発明の一実施例によるトリカルボニルレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体注入後、モデルマウスの腫瘍の大きさ及びトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD SPECT映像摂取率に及ぼす影響を示し、腫瘍組織スライスをCD-31染色とQ-dot-二個のRGD誘導体を利用した共焦点顕微鏡写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

40

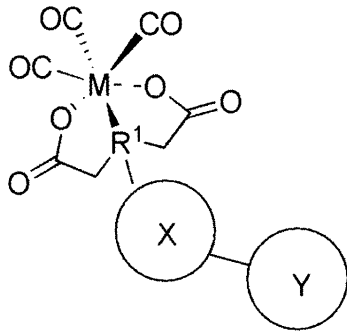
以下、本発明を詳細に説明する。

【0024】

本発明は、下記化学式1で表されるトリカルボニルテクネシウムまたはレニウム標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【0025】

【化 2】



〔化学式 1〕

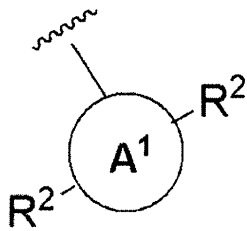
10

【0026】

(前記化学式 1 で、M は ^{99m}Tc 、 ^{188}Re または ^{185}Re 、 ^{187}Re で、 R^1 は、 N 、 $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ または $\text{N}(\text{CH}_2\text{CONH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ で、X は直接結合、

【0027】

【化 3】



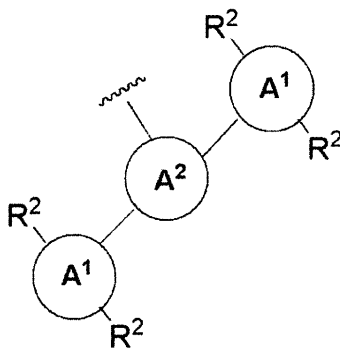
20

【0028】

または、

【0029】

【化 4】



30

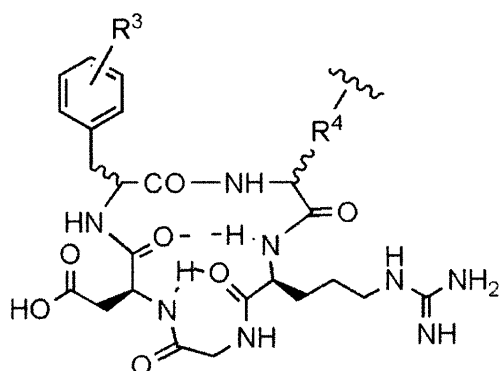
【0030】

で、ここで、 A^1 および A^2 は、各々アスパラギン酸、リジン、グルタミン酸、チロシン、システイン、スレオニンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸で、 R^2 は NH または $\text{NH}(\text{Z})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ で、Z は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ または $-\text{CH}_2\text{CONH}-$ で、n は 0 ないし 8 の整数で、Y は、

40

【0031】

【化 5】



10

【0032】

で、ここで R^3 は H または OH で、 R^4 は $-(CH_2)_m-$ または $-(CH_2)_m-COO-$ で、 m は 1 ないし 8 の整数で、前記 Y は R^1 に直接結合するか、X の中で R^2 に結合する)

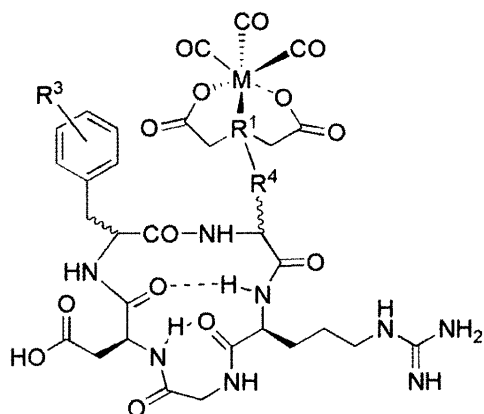
【0033】

好ましくは、前記トリカルボニルテクネシウムまたはレニウム標識サイクリックRGD誘導体は、下記化学式1Aないし化学式1Cで表される化合物の群から選択することができる。

【0034】

20

【化 6】

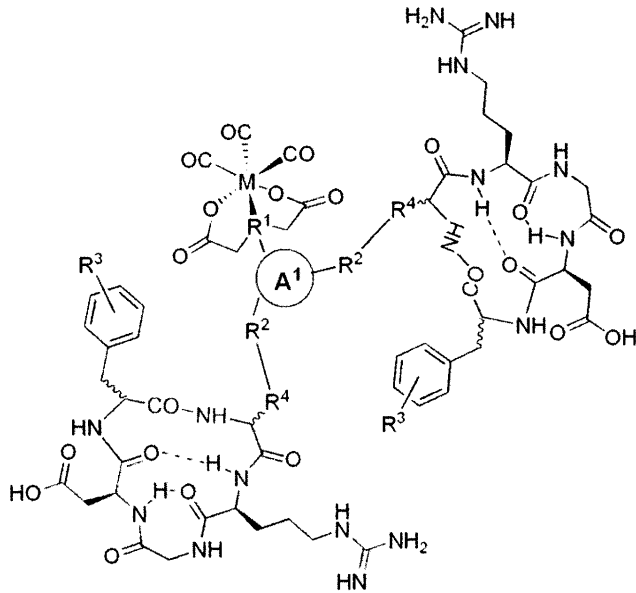


30

化学式 1 A

【0035】

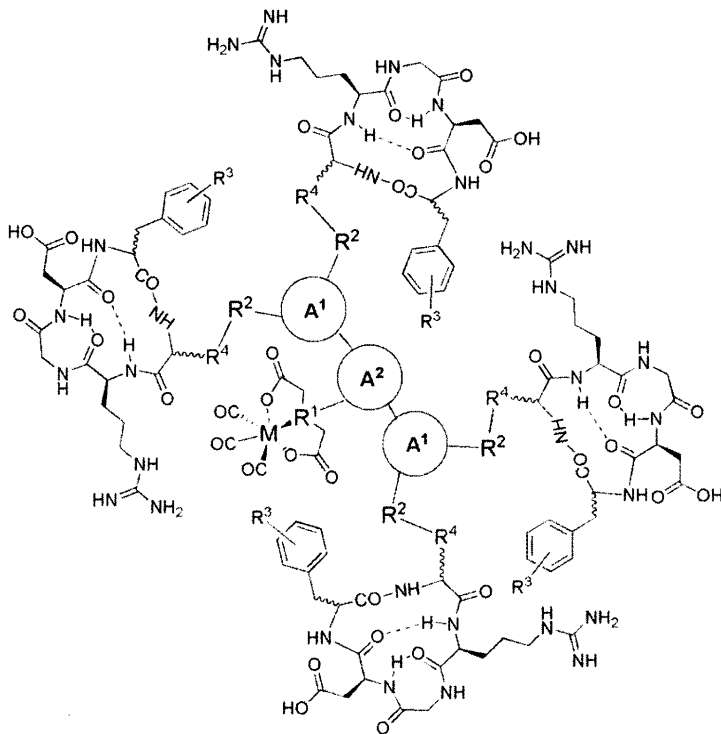
【化 7】



化学式 1 B

【 0 0 3 6】

【化 8】



化学式 1 C

【 0 0 3 7】

(前記化学式 1 A ないし 1 C において、前記 M、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 A^1 および A^2 は、前記化学式 1 で定義したのと同様である)

【 0 0 3 8】

本発明による前記化学式 1 で表されるトリカルボニルテクネシウム-99m または レニウム-188 標識サイクリック RGD 誘導体の好ましい例は、下記に示すとおりである。

【 0 0 3 9】

1) サイクリック { (トリカルボニル [^{99m}Tc] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-リジン) -アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

10

20

30

40

50

2) サイクリック { (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-リジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

3) サイクリック { (トリカルボニル- [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-リジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

4) サイクリック { (トリカルボニル [$^{99\text{mTc}}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-NH₂ (CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

5) サイクリック { (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-NH₂ (CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

6) サイクリック { (トリカルボニル- [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-NH₂ (CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

7) サイクリック { (トリカルボニル [$^{99\text{mTc}}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン-CONH (CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

8) サイクリック { (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン-CONH (CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

9) サイクリック { (トリカルボニル- [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン-CONH (CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}、

10) (トリカルボニル [$^{99\text{mTc}}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂、

11) (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂、

12) (トリカルボニル- [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂、

13) {トリカルボニル [$^{99\text{mTc}}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール)_n-アスパラギン酸} - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂、 (n=0-8)、

14) {トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール)_n-アスパラギン酸} - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂、 (n=0-8)、

15) {トリカルボニル- [$^{185}, ^{187}\text{Re}$] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール)_n-アスパラギン酸} - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂、 (n=0-8)、

16) {トリカルボニル [$^{99\text{mTc}}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール)_n-アスパラギン酸} - { (ポリエチレングリコール)_n - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] }₂、 (n=0-8)、

10

20

30

40

50

17) {トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - { (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_2$ 、(n=0-8)、

18) {トリカルボニル [^{185}Re , ^{187}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - { (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_2$ 、(n=0-8)、

19) (トリカルボニル [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、

10

20) (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、

21) (トリカルボニル [^{185}Re , ^{187}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、

22) {トリカルボニル [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、

20

23) {トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、

24) {トリカルボニル [^{185}Re , ^{187}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、

25) {トリカルボニル [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、

30

26) {トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)、及び

27) {トリカルボニル [^{185}Re , ^{187}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル- (ポリエチレングリコール) $_n$ -アスパラギン酸} - {アスパラギン酸- (ポリエチレングリコール) $_n$ - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] $_2$ } $_4$ 、(n=0-8)。

40

【0040】

本発明による化学式1のサイクリックRGD誘導体は、RGDサイクリックを1個ないし4個含むことができる。

【0041】

本発明による化学式1で表されるサイクリックRGD誘導体は、薬学的に許容可能な塩の形態で使用することができる。前記塩では、薬学的かつ生理学的に許容される多様な有機酸または無機酸によって形成された酸付与塩が有用である。相応しい有機酸では、例えばカルボキシル酸、ホスホン酸、スルホン酸、酢酸、プロピオン酸、オクタン酸、デカン酸、グリコール酸、乳酸、フマル酸、コハク酸、アジピン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン

50

酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、マレイン酸、安息香酸、サリチル酸、フタル酸、フェニル酢酸、ベンゼンスルホン酸、2-ナフタリンスルホン酸、メチル硫酸、エチル硫酸、ドデシル硫酸などを使用することができ、相応しい無機酸としては、例えば塩酸、硫酸またはリン酸などを使用することができる。

【0042】

本発明による前記化学式1で表されるサイクリックRGD誘導体は、薬学的に許容可能な塩だけではなく、通常の方法によって製造され得るすべての塩、水和物及び溶媒化物をすべて含むことができる。

【0043】

また、本発明は、前記化学式1のサイクリックRGD誘導体を製造する方法を提供する。

10

【0044】

具体的に、本発明によるサイクリックRGD誘導体は、下記スキーム1及びスキーム2に示された方法で製造することができる。

【0045】

製法1

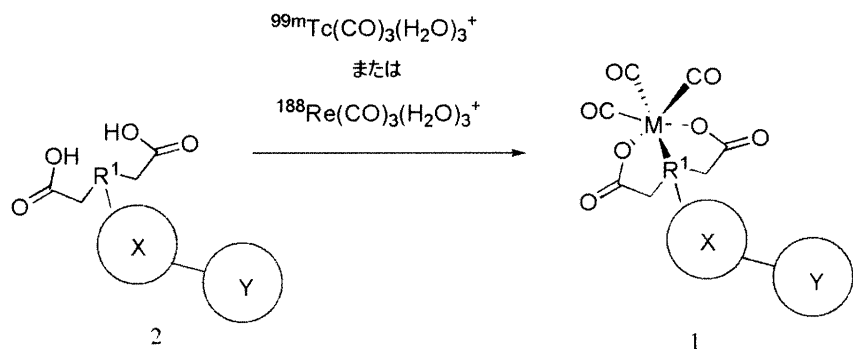
本発明において、放射性同位元素であるトリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188が標識されたサイクリックRGD誘導体は、下記スキーム1に示したように、

化学式2の前駆体化合物にトリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188を反応させて、化学式1のトリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188が標識されたサイクリックRGD誘導体を製造する工程を含む方法で製造することができる。

20

【0046】

【化9】



30

【0047】

(前記スキーム1で、Mは ^{99m}Tc または ^{188}Re で、 R^1 、X及びYは前記化学式1で定義したのと同様である)

【0048】

具体的に、前記トリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188を化合物($^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ または $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$)を蒸留水溶媒0.5~5mlに希釈して、化学式2の前駆体が入っている反応容器に入れて、70~80℃で30~60分間加熱して反応させることで、化学式1のトリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188が標識されたサイクリックRGD誘導体を製造することができる。

40

【0049】

本発明による前記製法1において、前記トリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188化合物は、従来から知られた方法にしたがって合成することができ、好ましくは下記文献による方法を用いることができる。

【0050】

50

参照論文：Alberto, R., Schibli, R., Egli, A., Schubiger, A.P., Abram, U., Kaden, T.A., J. Am. Chem. Soc. 1998年,第120巻, p.7987-7988; Alberto, R., Schibli, R., Schubiger, A.P., Abram, U., Pietzsch, H-P., Johannsen, B., J. Am. Chem. Soc. 1999年,第121巻, p.6076-6077; Schibli, R., Netter, M., Scapozza, L., Birringer, M., Schelling, P., Dumas, C., Schoch, J., Schubiger, P.A., J. Organomet. Chem. 2003年,第668巻, p.67-74; Schibli, R., Schwarzbach, R., Alberto, R., Ortner, K., Schmalle, H., Dumas, C., Egli, A., Schubiger, P.A. Bioconjugate Chem. 2002年,第13巻, p.750-756.

【0051】

製造されたトリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188が標識されたサイクリックRGD誘導体は、さらに、常温に冷却して、tC18 Sep-Pakカートリッジまたは高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）を行なって分離／精製することができる。

10

【0052】

製法2

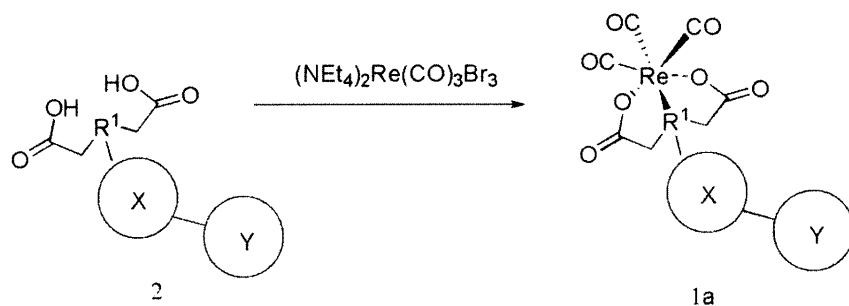
本発明において、非放射性同位元素であるトリカルボニル¹⁸⁵, ¹⁸⁷Reを導入したサイクリックRGD誘導体は、下記スキーム2に示したように、

化学式2の前駆体に $(\text{NEt}_4)_2\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3$ を入れて反応させて、化学式1Aのトリカルボニル¹⁸⁵, ¹⁸⁷Reが導入されたサイクリックRGD誘導体を製造する工程を含む方法で製造することができる。

20

【0053】

【化10】



30

【0054】

（前記スキーム2で、 R^1 、X及びYは前記化学式1で定義したのと同様で、化学式1Aは化学式1に含まれる）

【0055】

具体的に、前記試薬 $(\text{NEt}_4)_2\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3$ を蒸留水溶媒0.5～5mlに希釈して化学式2の前駆体が入っている反応容器に入れて、70～80℃で55～65分間加熱して反応させることで、化学式1Aのトリカルボニル¹⁸⁵, ¹⁸⁷Reが導入されたサイクリックRGD誘導体を製造することができる。

【0056】

前記化学式1Aのトリカルボニル¹⁸⁵, ¹⁸⁷Reが導入されたサイクリックRGD誘導体は、スキーム1のトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188が標識されたサイクリックRGD誘導体の基準物質で、トリカルボニルレニウム-188が標識されたサイクリックRGD誘導体とは同一物質なので高性能液体クロマトグラフィーで同じ保持値を有し、トリカルボニルテクネシウム-99m標識化合物が標識されたサイクリックRGD誘導体とは、1～2分程度の保持値の差を示す。

40

【0057】

製造された¹⁸⁵, ¹⁸⁷Reが導入されたサイクリックRGD誘導体は、追加的に、常温に冷却して、tC18 Sep-Pakカートリッジまたは高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）を行なって分離／精製することができる。

50

【0058】

さらに、本発明は、前記化学式1のトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む、新生血管関連疾患の診断または治療用薬学的組成物を提供する。

【0059】

また、本発明は、対象に前記化学式1のトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を診断学的に有効な量で投与する工程を含む、対象内の新生血管関連疾患の診断方法を提供する。

【0060】

また、本発明は、対象に前記化学式1のトリカルボニルレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を治療学的に有効な量で投与する工程を含む、対象内の新生血管関連疾患の治療方法を提供する。

10

【0061】

本発明による化学式1のサイクリックRGD誘導体は、アミンと2個のヒドロキシカルボニルメチル基からなる標識ポケットにトリカルボニルテクネシウム-99m、トリカルボニルレニウム-188またはトリカルボニルレニウム反応物が結合して、テクネシウム-99mを中心に3個のカルボニル、アミン、2個のヒドロキシ基が八面体構造に形成された化合物である。

【0062】

前記化学式1のサイクリックRGD誘導体は、1個、2個または4個のサイクリックRGDを構成することができ、その中で2個のサイクリックRGDを構成する場合、腫瘍によって誘発された新生血管作用バイオマーカーである $\alpha_v\beta_3$ インテグリンにより高い結合親和度を有して、サイクリックRGDと標識グループ間のリンカーであるアスパラギン酸に多様なポリエチレングリコール鎖を導入して、2個のサイクリックRGDが同時に2個の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合可能な構造(bivalent)を形成することで、より高い腫瘍映像を反映することができ、それを通じた治療効果も増進することができる。このように2個のサイクリックRGDを構成する化合物は、腫瘍が移植されたネズミでの体内分布実験で血管内皮細胞でトリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188サイクリックRGD誘導体に含まれるポケットグループが有する(一)イオンによって肝臓と大腸で早く排出されることによって、腫瘍対比正常臓器の割合が

20

30

【0063】

また、本発明による化学式1のサイクリックRGD誘導体は、4個のサイクリックRGDを構成して腫瘍によって誘発された新生血管作用バイオマーカーである $\alpha_v\beta_3$ インテグリンにより高い結合親和度を有することができ、サイクリックRGDと標識グループ間のリンカーであるアスパラギン酸に多様なポリエチレングリコール鎖を導入して4個のサイクリックRGDが同時にいくつかの $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合可能な構造を形成して高い腫瘍映像を反映することができ、それを通じた治療効果も増進することができる。

【0064】

さらに、4個のサイクリックRGDを構成するサイクリックRGD誘導体も、高い $\alpha_v\beta_3$ インテグリン結合親和度と、血管内皮細胞でトリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188サイクリックRGD誘導体に含まれるポケットグループが有する(一)イオンによって、肝臓と大腸で早く排出され得る。

40

【0065】

したがって、本発明による化学式1のサイクリックRGD誘導体は、腫瘍によって誘導される新生血管作用で活性化になったビトロネクチン受容体とも呼ばれる $\alpha_v\beta_3$ インテグリンにサブナノモル単位の高い親和度を有し、癌細胞が移植された動物で、トリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体初期摂取後、高い腫瘍映像を反映して肝臓と腸での摂取率が既存の知られた放射性同位元素標識サイクリックRGD誘導体に比べて、顕著に低くてより良い映像を提供しながら選択的に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが

50

活性化した癌細胞にのみ作用することが分かり、テクネシウム-99m標識に使用された同一前駆体を使用した治療核種であるレニウム-188標識誘導体の場合、生理食塩水だけを注入した腫瘍動物モデルとは異なり、尾静脈注入時に効果的な腫瘍の成長阻害と治療効能を示すことから、あつらえ形新生血管関連疾患の診断または治療用医薬品として有用に用いることができる。

【0066】

ここで、診断は前記トリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩を対象に、静脈注射で投与して単光子放射型コンピュータ断層撮影法で新生血管関連疾患の診断をすることが好ましく、診断を通じて癌の新生血管映像を取得した場合、同一前駆体が使用されたトリカルボニルレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体を用いてあつらえ形治療を行うことができる。

10

【0067】

本発明において、新生血管関連疾患は、血栓症、心筋虚血、固形化腫瘍または転移癌等、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが過剰に分布する疾患が好ましい。

【0068】

本発明の前記化学式1のサイクリックRGD誘導体またはその薬学的に許容可能な塩は、臨床投与時に静脈注射で投与し、人体に対する投与量は、患者の年齢、体重、性別、投与形態、健康状態及び疾患の程度によって調節することができ、体重が70Kgである成人患者を基準にする時、一般的診断の場合1~20mCi/doseで、好ましくは3~7mCi/doseで、また医師または薬剤師の判断によって一定時間間隔で1日1回ないし数回に分けて投与することもできる。併せて、治療の場合は1~1000mCi/doseで、好ましくは1~500mCi/doseで、また医師または薬剤師の判断によって一定時間間隔で1日1回ないし数回に分けて投与することもできる。

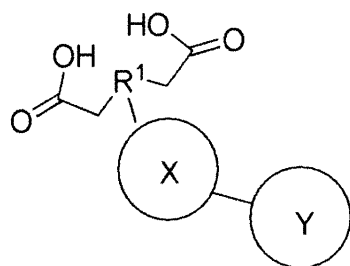
20

【0069】

また、本発明は、下記化学式2で表されるトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識のためのサイクリックRGD誘導体前駆体を提供する。

【0070】

【化11】



2

化学式 2

30

【0071】

(前記化学式2において、 R^1 、X及びYは前記化学式1で定義したのと同様である)

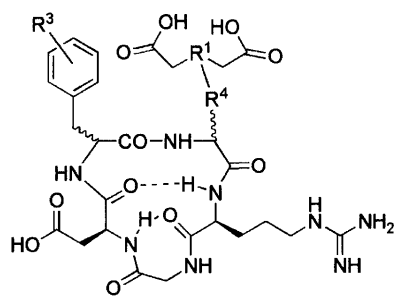
【0072】

好ましくは、前記トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識のためのサイクリックRGD誘導体の前駆体は、下記化学式2Aないし化学式2Cで表される化合物の群から選択することができる。

40

【0073】

【化 1 2】

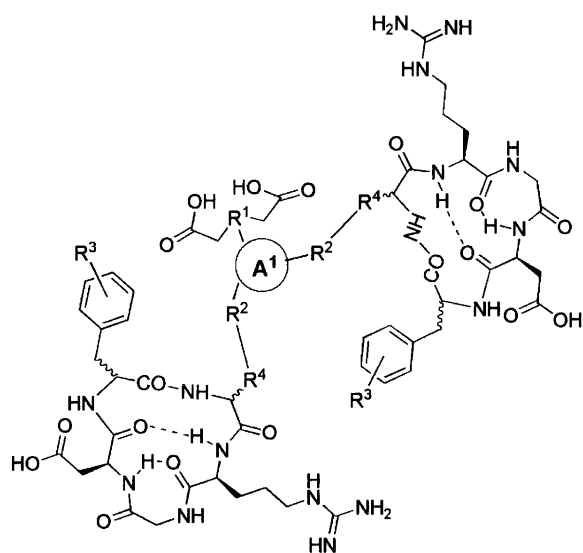


化学式 2 A

10

【0074】

【化 1 3】

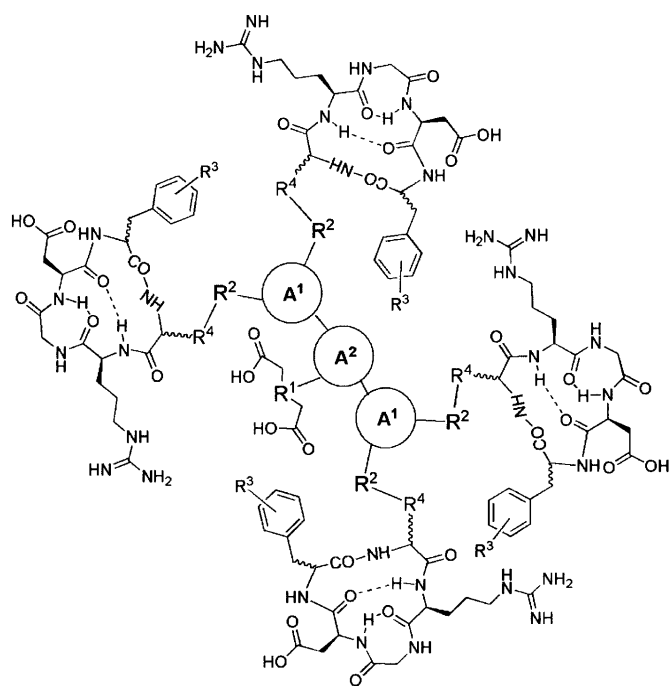


化学式 2 B

20

【0075】

【化 1 4】



化学式 2 C

30

40

【0076】

(前記化学式 2 A ないし 2 C において、前記 M、R¹、R²、R³、R⁴、A¹ および

50

A² は前記化学式 1 で定義したのと同様である)

【0077】

前記トリカルボニルテクネシウムまたはレニウム標識のためのサイクリックRGD誘導体の前駆体は、下記で説明する実施例を通じて製造することができるが、これに制限されない。

【発明を実施するための形態】

【0078】

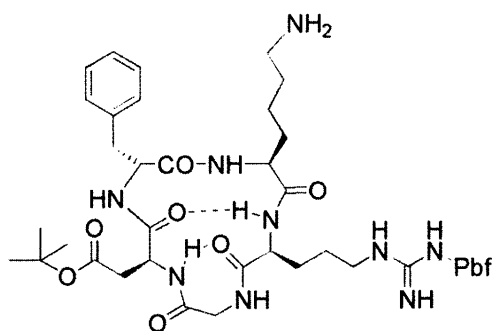
以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。但し、下記の実施例は、本発明の内容が下記の実施例によって限定されるのではない。

【0079】

<製造例1>本発明によるトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の前駆体の出発物質(3)の製造

【0080】

【化15】



【0081】

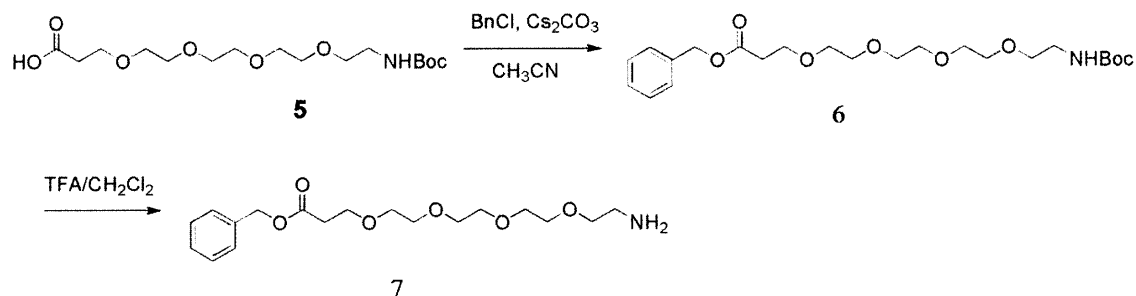
本発明によるトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の前駆体の出発物質に用いる前記化学式3の化合物は、文献(Haubner, R., Wester, H.-J., Reuning, U., Senekowitsch-Schmidtke, R., Diefenbach, B., Kessler, H., Stocklin G., Schwaiger, M., J. Nucl. Med., 1999年,第40巻,p.1061-1071)によって合成した。

【0082】

<製造例2>ベンジル 1-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-オエート(7)の製造

【0083】

【化16】



【0084】

(工程1)

1-(N-(tert-butoxycarbonyl)-アミノ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカノン酸(1-(Boc-amino)-3, 6, 9, 12-tetraoxapentadecanoic acid, 224 mg, 0.61 mmol, 5)をアルゴンガス下でアセトニトリル(5 ml)に溶解してセシウムカーボネート(CsCO₃, 596 mg, 1.83 mmol)とベンジルクロライド(211 μl, 1.83 mmol)

1)を加えた後、80℃下で30分間攪拌させた。反応容器を常温で冷却させて減圧下で溶媒を除去した後、カラムクロマトグラフィーを通じて分離して目的化合物(6)を得た。

【0085】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.30 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 3.77 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.64-3.59 (m, 12H), 3.53 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.30 (m, 2H), 2.65 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.44 (s, 9H)。

【0086】

(工程2)

工程1で得た化学式6の化合物(260mg, 0.57mmol)をメチレンクロライド(10ml)で溶解して、0℃下でトリフルオロ酢酸(TFA, 1ml)を加えた後、室温で1時間攪拌した後、飽和ナトリウムバイカーボネート(saturated NaHCO_3 , 25ml)を加えてメチレンクロライド(100ml $\times$ 3)溶液で抽出した後、有機溶媒層を減圧下で除去して、目的化合物であるベンジル 1-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-オエート(7)を得た。

【0087】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.53 (s, 5H), 5.14 (s, 2H), 3.78 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.65-3.62 (m, 12H), 3.58 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 2.93 (brs, 2H), 2.66 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.51 (brs, 2H)。

【0088】

<製造例3>トリカルボニルテクネシウム-99mまたはトリカルボニルレニウム-188化合物 [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ または $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$]の製造

標識されるトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188化合物は、文献(Alberto, R., Schibli, R., Egli, A., Schubiger, A.P., Abram, U., Kaden, T.A., J. Am. Chem. Soc. 1998年,第120巻,p.7987-7988; Alberto, R., Schibli, R., Schubiger, A.P., Abram, U., Pietzsch, H-P., Johannsen, B., J. Am. Chem. Soc. 1999年,第121巻,p.6076-6077; Schibli, R., Netter, M., Scapozza, L., Birringer, M., Schelling, P., Dumas, C., Schoch, J., Schubiger, P.A., J. Organomet. Chem. 2003年,第668巻,p.67-74; Schibli, R., Schwarzbach, R., Alberto, R., Ortner, K., Schmalte, H., Dumas, C., Egli, A., Schubiger, P.A. Bioconjugate Chem. 2002年,第13巻,p.750-756)に記載された方法を行なって製造した。

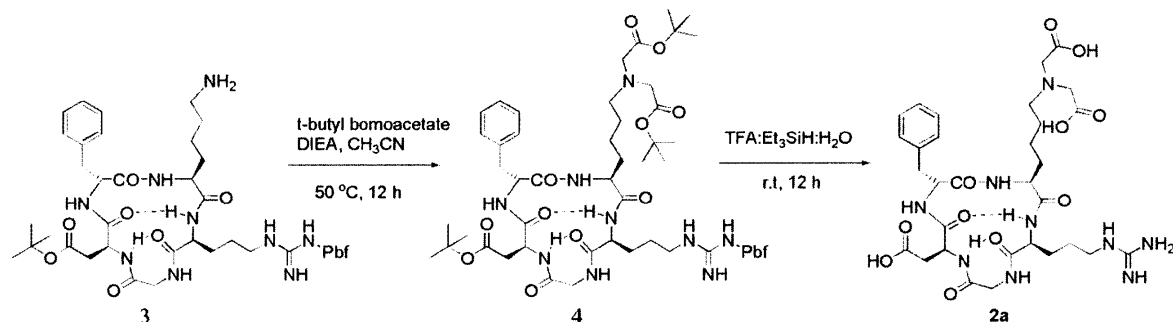
【0089】

<実施例1~5>本発明によるトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の前駆体の製造

<実施例1>サイクリック{(トリカルボニル-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-リジン)-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}(2a)の製造

【0090】

【化17】



【0091】

(工程 1)

前記製造例 1 で製造された化学式 3 の化合物 (240 mg, 0.26 mmol) と *t*-ブチルブロモアセテート (115 μ l, 0.77 mmol) をアセトニトリル (CH_3CN , 5 ml) と *N,N'*-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA, 130 μ l, 0.77 mmol) に溶解して 50 $^{\circ}\text{C}$ 下で 12 時間撹拌させた。反応後、溶媒を減圧下で除去して得られた化合物は、有機溶媒であるメタノールとジクロロメタン (10:90 = $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$) 溶液でカラムクロマトグラフィーを通じて分離して化学式 4 の化合物を得た。

【0092】

MALDI-TOF MS ($\text{M}+\text{Na}^+$) = 1163.4

10

【0093】

(工程 2)

前記工程 1 で製造された化学式 4 の化合物を、 $\text{TFA}:\text{Et}_3\text{SiH}:\text{H}_2\text{O}$ (95:2.5:2.5, 10 ml) に溶解して常温で 12 時間反応させた後、すべての溶液を減圧下でほとんど蒸発させた後に、ジエチルエーテルを添加して得られた固体を口過した。このようにして得られた白色固体を十分にエーテルで洗浄した後、乾燥して化学式 2A の化合物を製造した。

【0094】

MALDI-TOF MS ($\text{M}+\text{Na}^+$) = 720.8

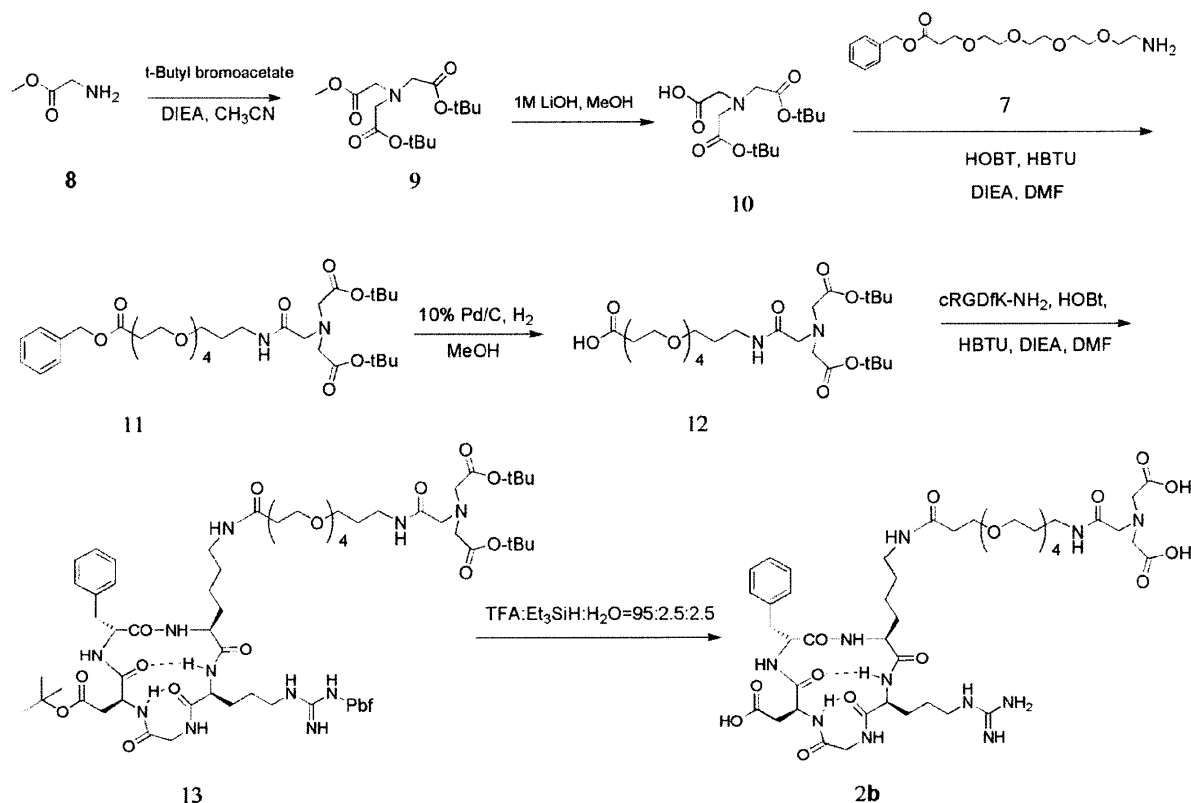
20

【0095】

<実施例 2> サイクリック { (トリカルボニル-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン- $\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -リジン)-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン} (2b) の製造

【0096】

【化 18】



30

40

【0097】

(工程 1)

出発物質として化学式 3 の化合物の代わりに化学式 8 のグリシン-メチルエステル-ヒ

50

ドロクロライドを使用することを除き、前記実施例 1 の工程 1 と同一な方法で行なって化学式 9 の化合物を得た。

【0098】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.71 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 3.53 (s, 4H), 1.44 (s, 18H)。

【0099】

(工程 2)

前記工程 1 で製造された化学式 9 の化合物 (550 mg, 1.73 mmol) をメタノール (MeOH , 10 ml) に溶解した後、1 M 水酸化リチウム (1 M LiOH , 3.4 ml, 3.4 mmol) を加えて 50 °C 下で 1 時間の間攪拌させた後、1 N 塩酸 (1 N HCl , 3.8 ml, 2.2 mmol) を加えて中和させて有機溶媒層を減圧下で除去して化学式 10 の化合物を得た。

10

【0100】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.48 (s, 2H), 3.47 (s, 4H), 1.48 (s, 18H)。

【0101】

(工程 3)

前記工程 2 で製造された化学式 10 の化合物 (60 mg, 0.19 mmol) を N -ヒドロキシベンゾトリアゾール (51 mg, 0.38 mmol)、 O -ベンゾトリアゾール- N,N,N' , N' -テトラメチルーウロニウム-ヘキサフルオロホスファート (144 mg, 0.38 mmol) とともにアルゴン下で、 N,N' -ジメチルホルムアミド (5 ml) に溶解して 30 分間攪拌させた後、前記製造例 2 で製造された化学式 7 の化合物 (47 mg, 0.13 mmol) と N,N' -ジイソプロピルエチルアミン (133 μl , 0.762 mmol) を入れて常温で 16 時間攪拌させた。減圧下で N,N' -ジメチルホルムアミドを除去した後、カラムクロマトグラフィーを通じて分離して目的化合物 (11) を得た。

20

【0102】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (brs), 7.34 (brs, 5H), 5.13 (s, 2H), 3.76-3.36 (m, 22H), 2.65-2.64 (m, 2H), 1.45 (s, 18H)。

【0103】

(工程 4)

反応容器に 10 % パラジウムチャコール (10 % Pd/C , 34 mg, 0.032 mmol) を窒素充填下に入れて前記工程 3 で製造された化学式 11 の化合物 (70 mg, 0.11 mmol) をメタノール (5 ml) に溶解して反応容器に加えた後、反応容器内を水素ガスに転換して常温で水素ガス下で 16 時間の間攪拌させた。セライト (celite) フィルターを通じてパラジウムを除去した後、減圧下でメタノールを除去して目的化合物 (12) を得た。

30

【0104】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.02 (brs), 8.20 (brs), 3.75-3.70 (m, 2H), 3.63-3.56 (m, 14H), 3.52-3.47 (m, 2H), 3.38-3.36 (m, 2H), 2.57 (t, $J = 6.0$ Hz), 1.44 (s, 18H)。

40

【0105】

(工程 5)

反応物質として前記工程 4 で製造された化学式 12 の化合物と前記製造例 1 で製造された化学式 3 の化合物を使用することを除き、前記実施例 2 の工程 5 と同一な方法で行なって目的化合物 (13) を得た。

【0106】

$\text{ESI MS (M+H}^+) = 1444.7$

【0107】

(工程 6)

出発物質として前記工程 5 で製造された化学式 13 の化合物の化合物を使用することを

50

除き、前記実施例 1 の工程 2 と同一な方法で行なって目的化合物 (2 b) を得た。

【0108】

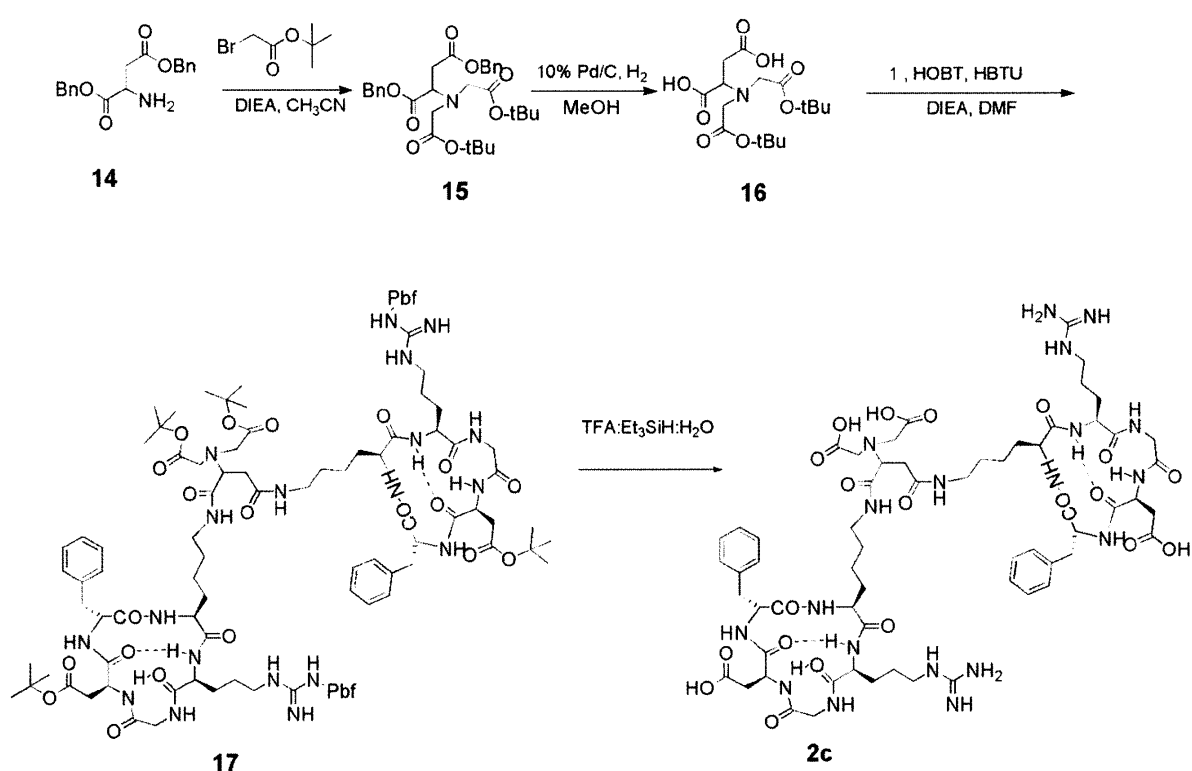
ESI MS ($M+H^+$) = 1024.5.

【0109】

<実施例 3> (トリカルボニル-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂ (2 c) の製造

【0110】

【化19】



【0111】

(工程 1)

出発物質としてO, O'-ダイベンジルアスパラギン酸ヒドロクロライドを使用することを除き、前記実施例 1 の工程 1 と同一な方法で行なって目的化合物 (1 5) を得た。

【0112】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.26 (m, 10 H), 5.14-5.06 (m, 4H), 3.99 (dd, J = 9.2, 5.2 Hz, 1H), 3.61-3.50 (m 4H), 2.94 (dd, J = 16.8, 9.6 Hz, 1H), 2.82 (dd, J = 16.4, 5.6 Hz, 1H), 1.42 (s, 18H).

【0113】

(工程 2)

出発物質として前記工程 1 で製造された化学式 1 5 の化合物を使用することを除き、前記実施例 2 の工程 2 と同一な方法で行なって目的化合物 (1 6) を得た。

【0114】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.60 (brs, 2H), 3.90 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 3.55-3.40 (m, 4H), 2.98 (dd, J = 16.4, 5.2 Hz, 1H), 2.66 (dd, J = 16.8, 7.6 Hz, 1H), 1.46 (s, 18H).

【0115】

(工程 3)

出発物質として前記工程 2 で製造された化学式 1 6 の化合物を使用することを除き、前記実施例 2 の工程 5 と同一な方法で行なって目的化合物 (1 7) を得た。

【0116】

MALDI-TOF MS ($M+Na^+$) = 2171.06

【0117】

(工程4)

出発物質として前記工程3で製造された化学式17の化合物を使用することを除き、前記実施例1の工程2と同一な方法で行なって目的化合物(2c)を得た。

【0118】

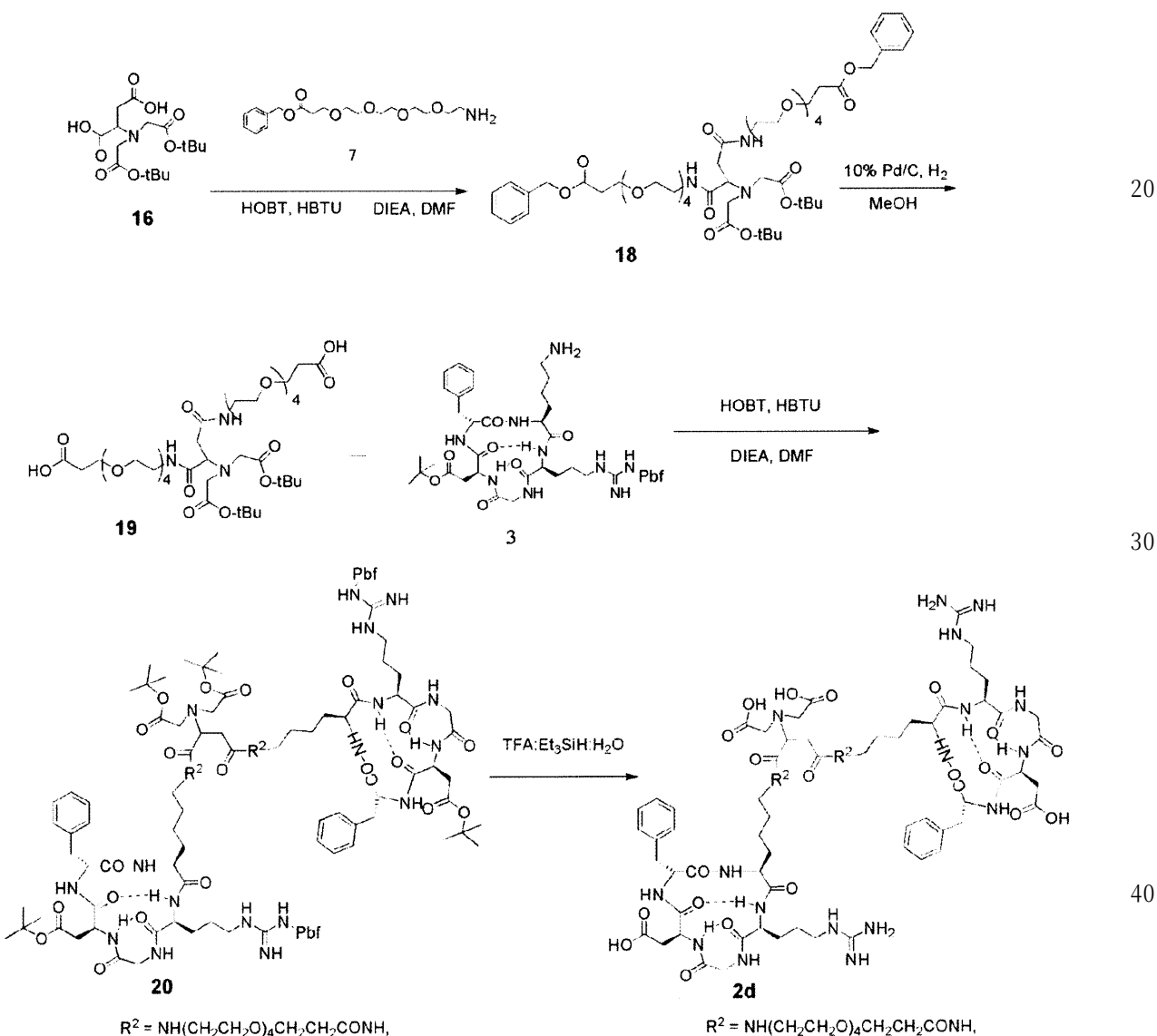
ESI MS ($M+H^+$) = 1420.5

【0119】

<実施例4> {トリカルボニル-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸} - { (ポリエチレングリコール) 4 - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)] }₂ (2d) の製造

【0120】

【化20】



【0121】

(工程1)

出発物質として化学式3の化合物の代わりに化学式16の化合物を使用することを除き、前記実施例2の工程5と同一な方法で行なって化学式18の化合物を得た。

【0122】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (brt, 1H), 7.38-7.30 (m, 10H), 6.84 (brs, 1H),

10

20

30

40

50

5.13 (s, 4H), 3.87 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 3.77 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.63-3.61 (m, 24H), 3.57-3.53 (m 4H), 3.51-3.42 (m 6H), 3.31-3.27 (m, 2H), 2.81 (dd, J = 10.8, 6.4 Hz, 1H), 2.65 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.38 (dd, J = 14.8, 6.4 Hz, 1H), 1.44 (s, 18H)。

【0123】

(工程2)

出発物質として前記工程1で製造された化学式18の化合物を使用することを除き、前記実施例2の工程6と同一な方法で行なって化学式19の化合物を得た。

【0124】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.57 (brt, 1H), 7.82 (brs, 1H), 5.13 (s, 4H), 3.92 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 3.77-3.70 (m, 4H), 3.64-3.55 (m, 31H), 3.47-3.30 (m 2H), 3.34-3.29 (m 3H), 2.81 (dd, J = 22, 7.2 Hz, 1H), 2.59 (t, J = 12 Hz, 4H), 2.46 (dd, J = 20.4, 5.2 Hz, 1H), 1.45 (s, 18H). 10

【0125】

(工程3)

出発物質として前記工程2で製造された化学式19の化合物と前記製造例1で製造された化学式3の化合物を使用することを除き、前記実施例2の工程5と同一な方法で行なって化学式20の化合物を得た。

【0126】

MALDI-TOF MS ($\text{M} + \text{Na}^+$) = 2665.87 20

【0127】

(工程4)

出発物質として前記工程3で製造された化学式20の化合物を使用することを除き、前記実施例1の工程2と同一な方法で行なって目的化合物(2d)を得た。

【0128】

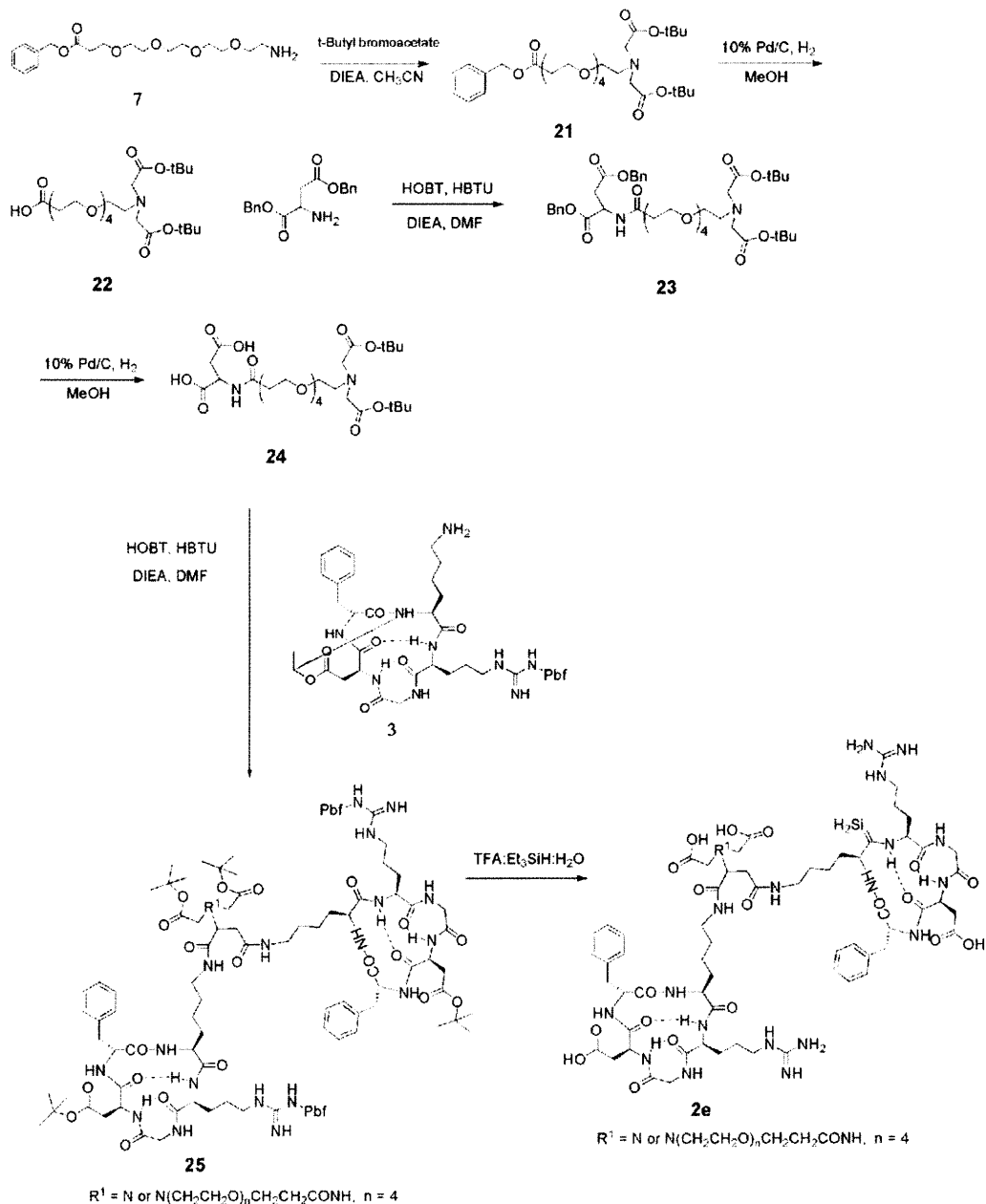
MALDI-TOF MS ($\text{M} + \text{Na}^+$) = 1914.65

【0129】

<実施例5> {トリカルボニル-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-(ポリエチレングリコール) 4-アスパラギン酸} - [サイクリック(リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂ (2e)の製造 30

【0130】

【化 2 1】



10

20

30

【0131】

(工程1)

出発物質として前記製造例2で製造された化学式7の化合物を使用することを除き、前記実施例1の工程1と同一な方法で行なって化学式21の化合物を得た。

【0132】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.34 (m, 5H), 5.14 (s, 4H), 3.77 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.63-3.58 (m, 14H), 3.49 (s, 4H), 2.94 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.65 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.45 (s, 18H)。

【0133】

(工程2)

出発物質として前記工程1で製造された化学式21の化合物を使用することを除き、前記実施例2の工程6と同一な方法で行なって化学式22の化合物を得た。

【0134】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (brs, 1H), 3.74 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.64-3.60 (m, 14H), 3.50 (s, 4H), 2.95 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 2.57 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 1.4

40

50

4 (s, 18H)。

【0135】

(工程3)

出発物質として前記工程2で製造された化学式22の化合物とO, O'-ダイベンジルアスパラギン酸ヒドロクロライドを使用することを除き、前記実施例2の工程5と同一な方法で行なって化学式23の化合物を得た。

【0136】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.27 (m, 10H), 5.13 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 5.06 (d, $J = 0.8$ Hz, 2H), 4.94-4.90 (m, 1H), 3.67 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.64-3.55 (m, 14H), 3.47 (s, 4H), 3.06 (dd, $J = 22, 4.8$ Hz, 1H), 2.94-2.87 (m, 3H), 2.49 (td, $J = 6.8, 2.0$ Hz, 2H), 1.44 (s, 18H)。

10

【0137】

(工程4)

出発物質として前記工程3で製造された化学式23の化合物を使用することを除き、前記実施例2の工程6と同一な方法で行なって化学式24の化合物を得た。

【0138】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.49 (brs, 1H), 7.61 (brd, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.69 (brs, 1H), 3.68-3.41 (m, 20H), 2.99-2.94 (m, 3H), 2.78 (dd, $J = 24, 7.2$ Hz, 1H), 2.52 (brs, 1H), 1.45 (s, 18H)。

【0139】

20

(工程5)

出発物質として前記工程4で製造された化学式24の化合物と前記製造例1で製造された化学式3の化合物を使用することを除き、前記実施例2の工程5と同一な方法で行なって化学式25の化合物を得た。

【0140】

MALDI-TOF MS ($M + \text{Na}^+$) = 2418.70

【0141】

(工程6)

出発物質として前記工程5で製造された化学式25の化合物を使用することを除き、前記実施例1の工程2と同一な方法で行なって目的化合物(2e)を得た。

30

【0142】

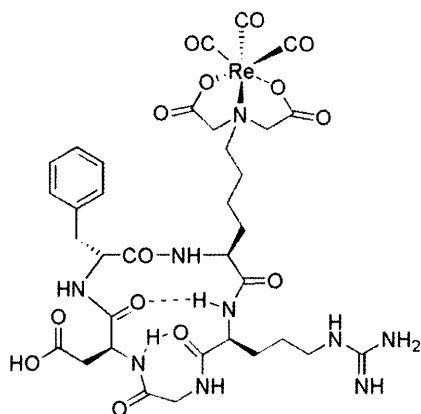
MALDI-TOF MS ($M + \text{H}^+$) = 1667.8

【0143】

<比較例1>サイクリック{(トリカルボニル-[$^{185}, ^{187}\text{Re}$]レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-リジン)-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}の製造

【0144】

【化22】



40

50

【0145】

前記実施例1で製造された化学式2Aの前駆体化合物(2.6mg, 0.002mmol)とビスー(N-テトラエチル)ートリブロモトリカルボニルレニウム((NEt₄)₂ReBr₃(CO)₃, 1.6mg, 0.0025mmol)を水:メタノール(v/v=1/1, 1ml)で溶解して、1時間20分間撹拌させた後、窒素ガスを用いて溶媒を除去して水に溶解して高性能液体クロマトグラフィーを用いて目的化合物を合成し、MALDI-TOF質量分析を用いて目的化合物の質量を分析した(MALDI-TOF MS (M+H⁺)=990.85)。

【0146】

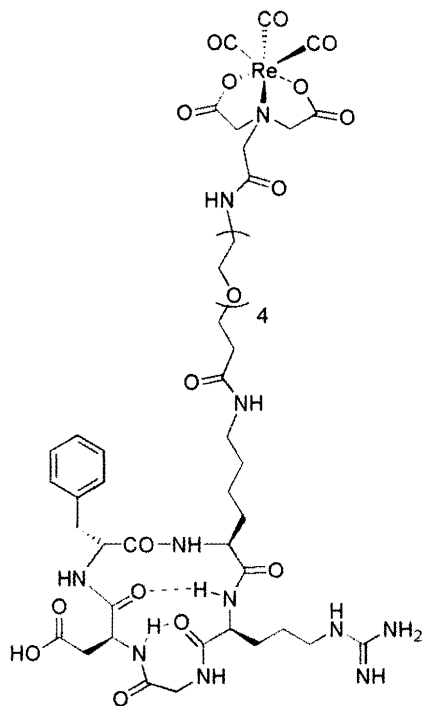
高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、0.1%トリフルオロ酢酸が含まれたアセトニトリル(20%)と蒸留水(80%)を移動相にして最終30分後には90:10割合に増加させる勾配条件を用いて、静止相にはC18カラム(YMC, 5μm, 10×250mm)を用いて分当り2mlで移動相を流して検出器(214nm, UV)で検出した結果、参考例1の目的化合物が21.8分に検出された。

【0147】

<実施例7>サイクリック{(トリカルボニル-[¹⁸⁵, ¹⁸⁷Re]レニウム-N-α-ビスーヒドロキシカルボニルメチル-グリシン-CONH(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン)-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン}の製造

【0148】

【化23】



【0149】

前記実施例1で製造された化学式2Aの前駆体化合物の代わりに前記実施例2で製造された化学式2Bの前駆体化合物を使用することを除き、前記参考例1と同一な方法で行なって目的化合物を合成して、MALDI-TOF質量分析を用いて目的化合物の質量を分析した(MALDI-TOF MS (M+H⁺)=1293.4)。

【0150】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例1と同一な条件で分離し、検出器(214nm, UV)を通じて実施例7の目的化合物が21.6分に検出された。

【0151】

<実施例8>(トリカルボニル-[¹⁸⁵, ¹⁸⁷Re]レニウム-N-α-ビスーヒド

10

20

30

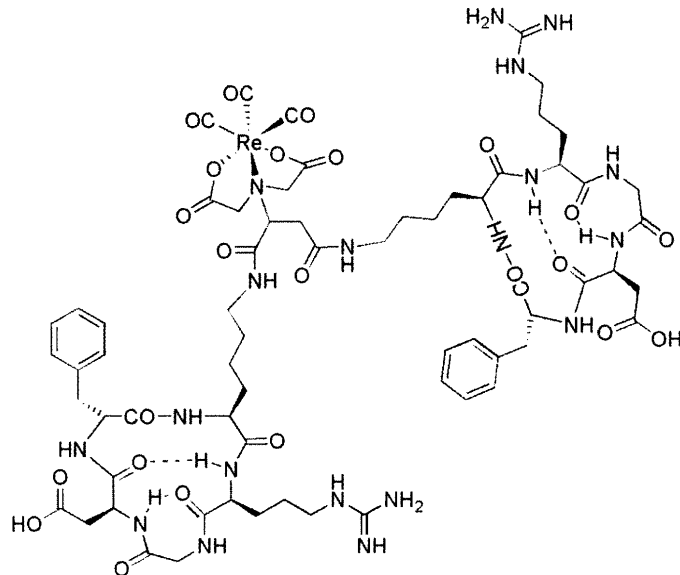
40

50

ロキシカルボニルメチルーアスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂ の製造

【0152】

【化24】



10

20

【0153】

前記実施例1で製造された化学式2Aの前駆体化合物の代わりに前記実施例3で製造された化学式2Cの前駆体化合物を使用することを除き、前記参考例1と同一な方法で行なって目的化合物を合成して、ESI質量分析を用いて目的化合物の質量を分析した(ESI MS ($M+H^+$) = 1688.5)。

【0154】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例1と同一な条件で分離し、検出器(214 nm, UV)を通じて参考例3の目的化合物が19.2分に検出された。

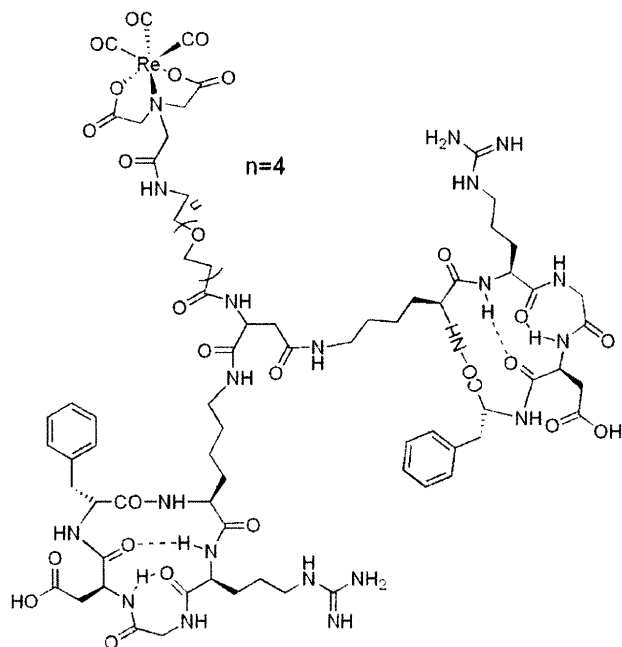
【0155】

<実施例9> (トリカルボニル-¹⁸⁵, ¹⁸⁷Re) レニウム-N-α-ビス-ヒドロキシカルボニルメチルーグリシン-CONH(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン)-[サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂ の製造

【0156】

30

【化 2 5】



10

【0157】

20

前記実施例 1 で製造された化学式 2 a の前駆体化合物の代わりに前記実施例 5 で製造された化学式 2 e の前駆体化合物を使用することを除き、前記参考例 1 と同一な方法で行なって目的化合物を合成して、ESI 質量分析を用いて目的化合物の質量を分析した (ESI MS ($M+H^+$) = 2007.7)。

【0158】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例 1 と同一な条件で分離し、検出器 (214 nm, UV) を通じて実施例 9 の目的化合物が 20.8 分に検出された。

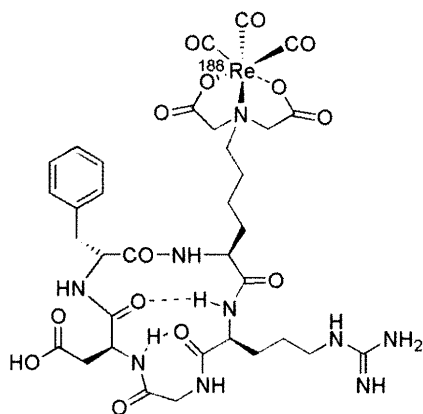
【0159】

<参考例 2> サイクリック { (トリカルボニル- $[^{188}\text{Re}]$ -N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-リジン) -アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン} の製造

30

【0160】

【化 2 6】



40

【0161】

アンモニウムボラン ($\text{NH}_3\text{-BH}_3$ complex, 5 mg) をゴム栓を有する 10 ml バイアルに入れて、CO ガスを 10 分間吹き入れた後、リン酸 (H_3PO_4 , 6 μl) と $^{188}\text{ReO}_4^-$ (10 mCi, 1 ml) を入れて反応中に内部圧力を緩衝するために空の 20 ml 注射器をさして 60°C で 15 分間攪拌した。反応が終わって室温まで冷

50

やした後、100 mM PBS (200 μ l) と飽和されたナトリウムバイカーボネート (50 μ l) で中和して、レニウムトリカルボニル化合物 [$^{188}\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$] を合成し、ラジオ薄層クロマトグラフィー (Radio-TLC) を通じて反応化合物合成を確認した。

【0162】

得られた [$^{188}\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$] と前記実施例1で製造された化学式2Aの前駆体化合物 (0.5 mg) を入れて、75 $^{\circ}\text{C}$ で60分間加熱して氷水に浸して冷やした後、tC18 Sep-Pak カートリッジ分離を通じて精製し、再び高性能液体クロマトグラフィーに注入して目的化合物を精製した。

【0163】

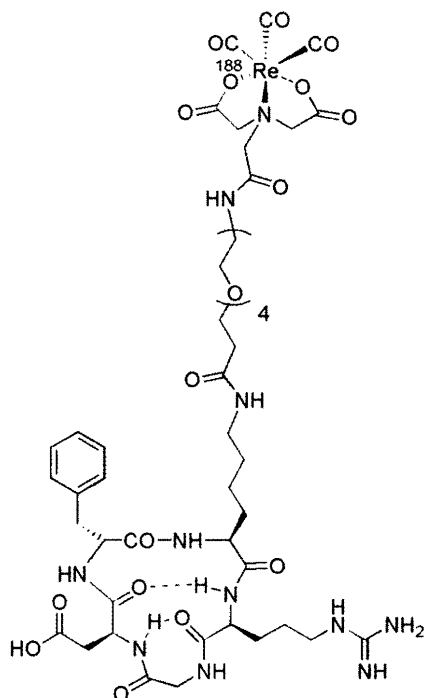
高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例1と同一な条件で分離し、検出器 (gamma-ray, NaI) を通じて参考例2の目的化合物が21.8分に検出された。それは、前記参考例1の化合物の検出器 (UV, 214 nm) での保持時間と一致した。減衰補正された放射化学的収率は50-60%であって、放射化学的純度は97%以上である。

【0164】

<実施例11> サイクリック { (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン-CONH(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン)-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン} の製造

【0165】

【化27】



【0166】

前記実施例1で製造された化学式2aの前駆体化合物の代わりに前記実施例2で製造された化学式2bの前駆体化合物を使用することを除き、前記実施例9と同一な方法で行なって目的化合物を製造した。

【0167】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例1と同一な条件で分離し、検出器 (gamma-ray, NaI) を通じて実施例11の目的化合物が21.6分に検出された。それは、前記実施例7の化合物の検出器 (UV, 214 nm) での保持時間と一致した。減衰補正された放射化学的収率は50-60%であって、放射化学的純度は9

10

20

30

40

50

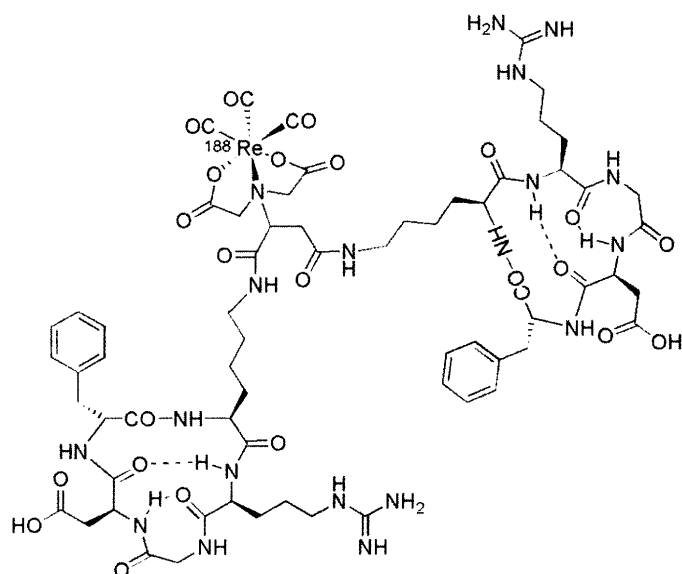
7 % 以上である。

【0168】

<実施例12> (トリカルボニル [^{188}Re] レニウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチルーアスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂ の製造

【0169】

【化28】



10

20

【0170】

前記実施例1で製造された化学式2aの前駆体化合物の代わりに前記実施例3で製造された化学式2cの前駆体化合物を使用することを除き、前記参考例2と同一な方法で行なって目的化合物を製造した。

【0171】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例1と同一な条件で分離し、検出器 (gamma-ray, NaI) を通じて実施例12の目的化合物が19.2分に検出された。それは、前記実施例8の化合物の検出器 (UV, 214nm) での保持時間と一致した。減衰補正された放射化学的収率は50-60%であって、放射化学的純度は97%以上である。

30

【0172】

前記参考例2及び実施例11並びに12の場合、前記参考例1及び実施例9並びに8の化合物に含む非放射性同元素 ^{185}Re , ^{187}Re が放射性同位元素 ^{188}Re に変わった化合物であり、分析方法では質量分析で検証された参考例1、7、及び8の化合物の各々の高性能液体クロマトグラフィーでの保持時間 (t_R) と参考例2及び実施例11並びに12の化合物の保持時間が一致することを通じて、参考例2及び実施例11並びに12で製造された化合物がレニウム-188のみが変わった化合物であることを証明した。

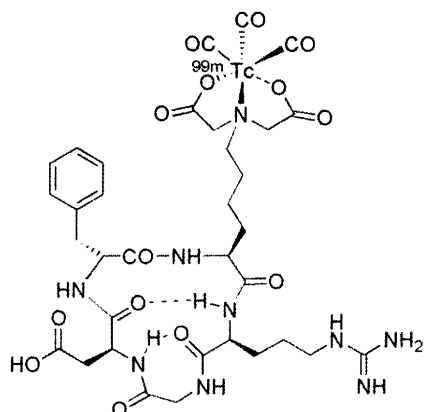
40

【0173】

<参考例3> サイクリック { (トリカルボニル [^{99m}Tc] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチルーリジン) - アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン } の製造

【0174】

【化 29】



10

【0175】

ナトリウムカボネート (Na_2CO_3 , 4 mg)、ナトリウムボロハイドライド (NaBH_4 , 5.5 mg) 及び L-酒石酸ナトリウム二水和物 (5 mg) を 10 ml のゴム栓を有するバイアルに入れて、CO ガスを 10 分間注入した。そこに発生器で得た $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (10 mCi, 1 ml) を注射器で入れて内部圧力を緩衝するために空の 20 ml 注射器を栓に突刺した。バイアルを 75℃ で 25 分間加熱した。以後、前記バイアルを氷水に浸して冷やした後、100 mM PBS (200 μl) と 1 N 塩酸 (1 N HCl, 180 μl) を用いて中性化させた。合成されたトリカルボニルテクネシウム-99m 化合物 [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$] は、ラジオ薄層クロマトグラフィー (Radio-TLC) を通じて確認した。得られた [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$] と前記実施例 1 で製造された化学式 2a の前駆体化合物 (0.5 mg) を入れて、75℃ で 30 分間加熱して氷水に浸して冷やした後、tC18 Sep-Pak カートリッジ分離を通じて精製し、再び高性能液体クロマトグラフィーに注入してトリカルボニルテクネシウム-99m 化合物が標識された化合物を製造した。

20

【0176】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、0.1% トリフルオロ酢酸が含まれたアセトニトリル (20%) と蒸留水 (80%) を移動相にして最終 30 分後には 90:10 の割合に増加させる勾配条件を用いて、静止相では C18 カラム (YMC, 5 μm , 10 × 250 mm) を用いて分当り 2 ml で移動相を流して検出器 (gamma ray, NaI) で検出した結果、前記参考例 3 の目的化合物が 20.6 分に検出された。それは、前記参考例 1 の化合物の検出器 (UV, 214 nm) での保持時間 (21.8 分) と 1 分の差がある。減衰補正された放射化学的収率は 60-70% であって、放射化学的純度は 97% 以上である。

30

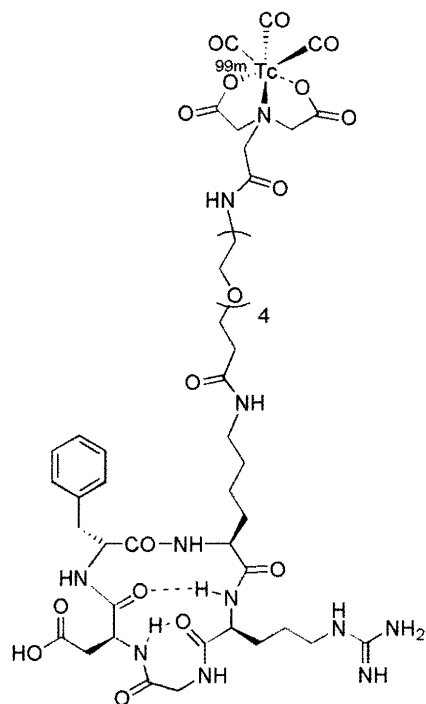
【0177】

<実施例 14> サイクリック { (トリカルボニル [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] テクネシウム-N- α -ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン-CONH(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リジン)-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン } の製造

40

【0178】

【化 3 0】



10

20

【0179】

前記実施例1で製造された化学式2aの前駆体化合物の代わりに前記実施例2で製造された化学式2bの前駆体化合物を使用することを除き、前記参考例3と同一な方法で行なって目的化合物を製造した。

【0180】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例1と同一な条件で分離し、検出器 (gamma-ray, NaI) を通じて参考例3の目的化合物が21.4分に検出された。それは、前記実施例7の化合物の検出器 (UV, 214nm) での保持時間 (21.6分) と0.2分の差がある。減衰補正された放射化学的収率は60-70%であって、放射化学的純度は97%以上である。

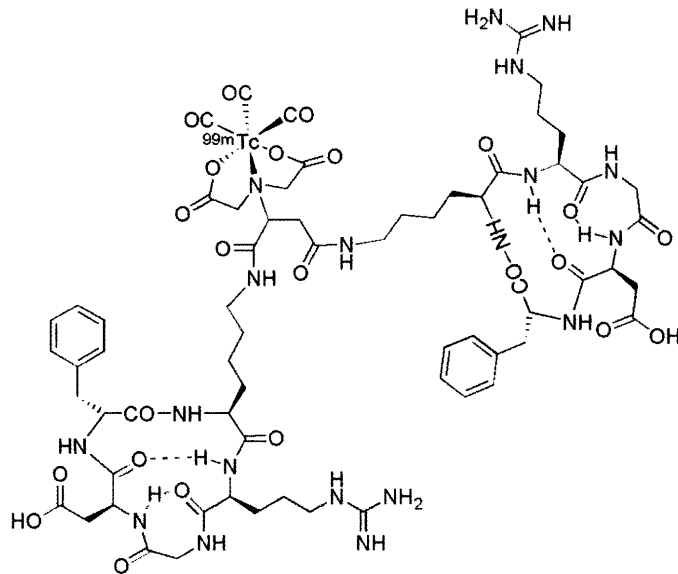
30

【0181】

<実施例15> (トリカルボニル^{99m}Tc] テクネシウム-N-α-ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-アスパラギン酸) - [サイクリック (リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂ の製造

【0182】

【化 3 1】



10

【0183】

前記実施例1で製造された化学式2aの前駆体化合物の代わりに前記実施例3で製造された化学式2cの前駆体化合物を使用することを除き、前記参考例3と同一な方法で行な

20

【0184】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例1と同一な条件で分離し、検出器 (gamma-ray, NaI) を通じて実施例15の目的化合物が18.4分に検出された。それは、前記実施例8の化合物の検出器 (UV, 214nm) での保持時間 (19.2分) と0.8分の差がある。減衰補正された放射化学的収率は60-70%であって、放射化学的純度は97%以上である。

【0185】

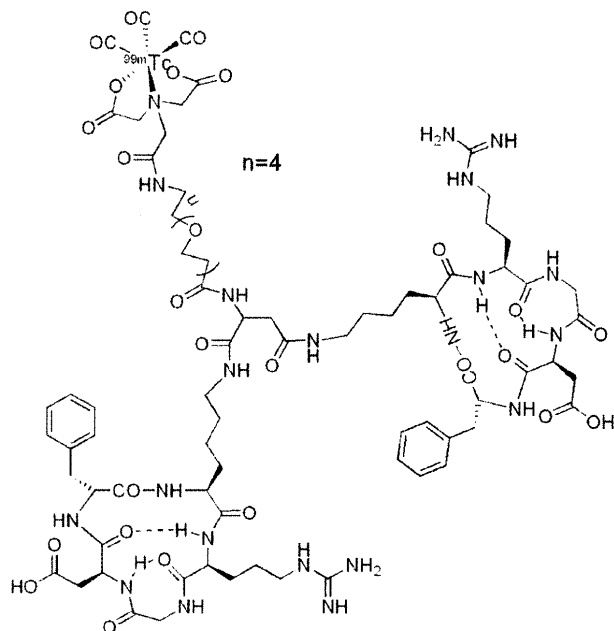
<実施例16> (トリカルボニル^{99m}Tc) テクネシウム-N-α-ビス-ヒドロキシカルボニルメチル-グリシン-CONH(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CONH-リ

30

ジン)-[サイクリック(リジン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-D-フェニルアラニン)]₂の製造

【0186】

【化 3 2】



10

【0187】

前記実施例1で製造された化学式2aの前駆体化合物の代わりに前記実施例5で製造された化学式2eの前駆体化合物を使用することを除き、前記参考例3と同一な方法で行なって目的化合物を合成した。

20

【0188】

高性能液体クロマトグラフィー分離条件は、前記参考例1と同一な条件で分離し、検出器 (gamma-ray, NaI) を通じて実施例16の目的化合物が19.9分に検出された。それは、前記実施例9の化合物の検出器 (UV, 214nm) での保持時間 (20.8分) と0.9分の差がある。減衰補正された放射化学的収率は50-70%であって、放射化学的純度は97%以上である。

【0189】

前記参考例3及び実施例14ないし16の化合物の場合、前記参考例1及び実施例7並びに8の化合物が含む非放射性同位元素¹⁸⁵, ¹⁸⁷Reが、放射性同位元素^{99m}Tcに変わった化合物であり、分析方法では質量分析で検証された参考例1及び実施例7並びに8の化合物の各々の高性能液体クロマトグラフィーでの保持時間 (t_R) と参考例3及び実施例14並びに16の保持時間が1分内外の差が出ながら前駆体の大部分が高い収率で標識されることを通じて、前記参考例3及び実施例14ないし16の化合物がテクネシウム-99mのみ変わった化合物であることを証明した (テクネシウムとレニウムは、周期律表上で同族の金属イオンであって前駆体と同一反応性を有している)。

30

【0190】

<実験例1>トリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の生物学的活性測定

40

<1-1>結合親和力 (IC_{50}) 値測定

本発明によるトリカルボニルテクネシウムまたはレニウム標識サイクリックRGD誘導体の新生血管作用の有力バイオマーカーである $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する結合活性を調べるために、次のような実験を行なった。

【0191】

$\alpha_v\beta_3$ インテグリンが過剰発現したことが知られたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUV EC) を牛胎児血清 (FBS)、ヒドロコチソン、ヒト線維芽細胞基本成長因子 (hFGF-B)、血管内皮成長因子 (VEGF)、R3-IGF-1、アスコルビン酸、人体上皮成長因子 (hEGF)、GA-1000、及びヘパリンが含まれた内皮細胞塩基担体-2 (endothelial cell basal medium-2; EBM-2) に

50

37℃、5%CO₂の条件下で培養した。1×10⁶個のHUVEC細胞をエッペンドルフチューブに分注した後、2μCiのトリカルボニルテクネシウム-99mまたはレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体を添加して、同時に0、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、3、5nMの競争反応基準物質サイクリックRGD(cRGDyV)を各チューブ別に添加して37℃、5%CO₂の条件下で1時間の間結合反応を誘導した。反応が終わったHUVEC細胞を100mMリン酸緩衝食塩水(PBS)で3回水洗した後、ガンマカウンターで競争反応を通じて特異的に結合したトリカルボニルテクネシウムまたはレニウム標識サイクリックRGD誘導体の放射能を測定した。測定された放射エネルギーの値と競争反応を誘導した基準物質サイクリックRGDの濃度別値を用いて、非線形回帰曲線を完成した後、それを基にIC₅₀値を算出した。IC₅₀値の算出は、シグマプロットソフトウェアを用いた。

10

【0192】

前記方法で本発明の化合物のα_vβ₃インテグリンとの結合親和力(IC₅₀)を測定して、その結果を下記表1に示した。

【0193】

【表1】

区分	IC ₅₀ (nM)
参考例2	1.4
実施例12	0.5
参考例3	1.6
実施例14	1.2
実施例15	0.4
実施例16	0.5

20

【0194】

表1に示したように、サイクリックRGDを1個導入した誘導体である参考例3及び参考例2の化合物はそれぞれIC₅₀値が1.6nM、1.4nMを示し、同一前駆体に放射性同位元素のみを変えた場合に、α_vβ₃インテグリンとの結合親和力に差がないことを示した。実施例14の場合もまたPEG連結基を導入した時にも参考例2及び参考例3に比べて大きな影響力がないことを確認しました。サイクリックRGDを2個導入した誘導体である実施例15及び実施例12の化合物はサブナノモルの結合数値である0.4nMと0.5nMを示して最も優れた結合親和力を示し、この場合も同様にテクネシウム-99mとレニウム-188を同じ前駆体に導入するかしないかによる結合親和力に差異がないことが示され、PEG連結基を導入した実施例16の場合にも実施例12と15と同様に結合親和力に格別な影響がありませんでした。

30

【0195】

したがって、本発明によるサイクリックRGD誘導体は、導入するサイクリックRGDが多いほどα_vβ₃インテグリンに高い結合親和力を示すことが分かる。

【0196】

<1-2>体内腫瘍モデルマウスでのトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体の腫瘍摂取及び臓器別排出程度の評価

40

先天的胸腺欠損マウス(7週齢, BALB/c-nu strain、以下ヌードマウス)を用いて本発明で得られた三種類のトリカルボニルテクネシウム-99m標識サイクリックRGD誘導体(参考例3及び実施例14並びに15)の時間による腫瘍モデルマウスの腫瘍と臓器別摂取及び排出程度を実験した。

【0197】

ヌードマウスの腫瘍形成は、ヒト膠芽腫U87-MG細胞株(1×10⁶/100μl in PBS)を皮下注射した後、約2週間の成長期間を経て0.4~0.5ccの大きさの腫瘍形成モデルのみを選別して実験に用いた。

【0198】

50

以後、参考例 3 及び実施例 1 4 並びに 1 5 で製造された化合物を生理食塩水に溶解して各匹当たり 100 μ l (20 μ Ci) ずつ尾静脈を通じて注射した。体内分布時間帯は、10、30、60、120、240 分に決定し、個体数は各時間帯に 4～5 匹を用いた。各時間帯別にマウスを犠牲にして血液、腫瘍及び各臓器（肝臓、肺、脾臓、腎臓、小腸、大腸、甲状腺、筋肉、脳）を摘出して各臓器の重さ (g) 及びガンマカウンターを用いて薬物の臓器摂取率 (radioactivity) を測定した。各臓器の薬物摂取率は、%ID/g (percent injected dose per gram) 単位で計算して、その結果を図 1～3 に示した。%ID/g 値の算出は、下記の数式 1 によって計算した。

【0199】

10

[数 1]

%ID/g = (薬物の摂取率 / 薬物の注射量 $\times$ 100) / 各臓器の重さ (g) $\cdots$ 数式 1

【0200】

測定結果を下記の表 2～4 に示した。

【0201】

【表 2】

参考例 3 の化合物

組織	10 分	30 分	60 分	120 分
血液	0.37 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00
肝	5.12 $\pm$ 0.76	0.92 $\pm$ 0.10	0.45 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.09
肺	1.72 $\pm$ 0.86	0.54 $\pm$ 0.14	0.27 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.46
脾臓	0.56 $\pm$ 0.32	0.19 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.03
腎臓	1.65 $\pm$ 0.48	0.50 $\pm$ 0.09	0.23 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01
小腸	4.41 $\pm$ 1.00	5.59 $\pm$ 0.86	3.95 $\pm$ 0.22	4.00 $\pm$ 0.41
大腸	0.55 $\pm$ 0.37	0.31 $\pm$ 0.06	0.53 $\pm$ 0.81	0.11 $\pm$ 0.01
甲状腺	0.05 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.03
筋肉	0.56 $\pm$ 0.27	0.16 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.02
脳	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.02
腫瘍	1.43 $\pm$ 0.15	0.78 $\pm$ 0.40	0.10 $\pm$ 0.14	0.33 $\pm$ 0.06

20

30

40

【0202】

【表 3】

実施例 14 の化合物

組織	10分	30分	60分	120分	240分
血液	1.43 ± 0.23	0.66 ± 0.09	0.35 ± 0.06	0.17 ± 0.02	0.11 ± 0.01
肝	5.30 ± 0.95	2.62 ± 0.28	1.41 ± 0.21	0.98 ± 0.15	0.64 ± 0.08
肺	3.50 ± 0.18	2.87 ± 0.56	1.52 ± 0.19	0.65 ± 0.08	0.32 ± 0.02
脾臓	2.31 ± 0.36	1.45 ± 0.18	0.77 ± 0.07	0.47 ± 0.10	0.20 ± 0.02
腎臓	7.54 ± 0.46	4.33 ± 1.60	2.80 ± 0.89	1.13 ± 0.11	0.61 ± 0.14
小腸	17.60 ± 2.20	15.56 ± 2.89	4.97 ± 2.13	2.77 ± 0.96	0.37 ± 0.17
大腸	2.06 ± 0.25	1.21 ± 0.20	0.98 ± 0.30	26.78 ± 2.80	28.06 ± 5.82
甲状腺	0.20 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00
筋肉	1.31 ± 0.02	0.97 ± 0.19	0.66 ± 0.13	0.52 ± 0.47	0.07 ± 0.01
脳	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.00
腫瘍	5.43 ± 0.50	4.27 ± 1.15	3.35 ± 1.23	2.63 ± 0.74	1.41 ± 0.24

10

20

【0203】

【表 4】

実施例 15 の化合物

組織	10分	30分	60分	120分	240分
血液	1.16 ± 0.08	0.62 ± 0.11	0.42 ± 0.01	0.26 ± 0.05	0.16 ± 0.02
肝	3.10 ± 0.58	2.24 ± 0.33	2.36 ± 0.21	2.06 ± 0.54	1.24 ± 0.19
肺	4.34 ± 0.69	3.34 ± 0.80	3.55 ± 0.26	2.19 ± 0.35	1.33 ± 0.09
脾臓	3.33 ± 0.89	2.67 ± 0.63	2.92 ± 0.29	2.12 ± 0.32	1.29 ± 0.21
腎臓	11.47 ± 1.36	10.85 ± 1.71	12.09 ± 1.62	10.12 ± 2.82	7.14 ± 0.85
小腸	5.82 ± 0.80	4.10 ± 1.09	3.90 ± 0.48	2.85 ± 0.99	1.62 ± 0.18
大腸	4.42 ± 0.85	3.93 ± 0.57	4.08 ± 0.53	2.63 ± 0.84	1.54 ± 0.20
甲状腺	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.02
筋肉	1.48 ± 0.21	1.49 ± 0.44	2.23 ± 1.44	1.11 ± 0.43	0.64 ± 0.07
脳	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01
腫瘍	12.44 ± 3.89	11.45 ± 1.53	12.31 ± 5.15	9.81 ± 1.92	6.15 ± 0.84

30

40

【0204】

表 2～4 と図 1～3 に示したように、参考例 3 及び実施例 14 並びに 15 の化合物の時間別腫瘍及び臓器の摂取及び排出程度を詳しくみると、参考例 3 の化合物は初期に低い腫

50

瘍摂取と高い肝臓と小腸摂取を有し、すべての臓器で時間が経過することにしたがって早く排出されることを確認することができた。薬物注射後10分に5% ID/gを上位だった肝臓摂取率は時間が経つにつれて早く排出されて2時間後には0.3% ID/gの非常に低い摂取率を示した。肝臓で代謝された薬物は、大部分腸を通じて体外に排出されることが確認され、注射後2時間までも4% ID/g水準を維持することからして活発な腸排出が進行していることを確認することができる。その外、血液を含む脳、筋肉組織での特異的摂取率は示されず、甲状腺の摂取率も0.01~0.05% ID/g水準を維持することからして、生体内で前記薬物の安定性を確認した。腫瘍の摂取率は、注射後10分に1.43% ID/gから2時間後の0.33% ID/gに早い初期摂取率を示す一方、時間が経つにつれて漸次的にその摂取率が減少する様相を確認した。

10

【0205】

サイクリックRGDのリジンにPEG鎖を連結して標識ポケットが有する(一)イオンとサイクリックRGDのアルギニンが有する(十)イオン間の相殺効果を減らすために合成した実施例14の化合物の時間別腫瘍及び臓器の摂取及び排出程度は、薬物注射後10分に5.3% ID/gの摂取率を示し、肝の場合時間が経つにつれて早く代謝されて注射後4時間には0.64% ID/gの非常に低い摂取率を示し、肝臓で代謝された薬物は大部分腸を通じて体外に排出されることが確認することができた。注射後2時間からは、小腸を過ぎた薬物の大腸摂取率が急激に増加することからして、この時期が体外への排出が始まっている時間であることを確認した。少量の薬物は、腎臓でのろ過過程を通じて膀胱に集まってから小便で排出されることが分かった。血液を含む脳、筋肉組織での特異的な

20

【0206】

2個のサイクリックRGDを導入した実施例15の化合物での時間別腫瘍及び臓器の摂取及び排出程度は、薬物注射後10分に3.1% ID/gで非常に低い初期の肝臓摂取率を示し、非常に早い肝代謝速度を示して4時間後には1% ID/g水準まで急激に減少した。肝臓で代謝が進行された前記薬物は、非常に早い速度で腎臓を通じて小便で排出されていることを確認することができ、小便を通じた体外排出に起因した腎臓の最大摂取率は注射後60分に一時12% ID/gを上回った。小腸と大腸を含む前記薬物の腸を通じた排出は5% ID/g台未満で不備な水準であって、投与された大部分の薬物が小便を通じて体外に排出されることが確認した。血液を含む脳、筋肉組織での特異的摂取率は示されず、甲状腺の摂取率も0.1% ID/g水準を持続的に維持することからして、生体内で前記薬物の安定性を確認した。初期10分の腫瘍の摂取率は12.44% ID/gで非常に高く、早い薬物の腫瘍集積能力を示し、注射後1時間までその摂取を維持した。以後、徐々に腫瘍から薬物が抜け出ることを確認することができたが、注射後4時間目にも6% ID/gを越える非常に高い腫瘍摂取率を確認した。

30

【0207】

<1-3>体内腫瘍モデルマウスでのトリカルボニルテクネシウム-99mサイクリックRGD誘導体のSPECT映像評価

40

腫瘍モデルマウスの製作は、前記<1-2>と同一な方法で製作した。腫瘍形成マウスモデルを用いて本発明による参考例3及び実施例14並びに15の化合物(0.5~1mCi)を生理食塩水100μlに溶解して尾静脈に注射して、映像獲得時間の間の動物モデルの麻酔は2%イソフルランガスを用い、注射時間から180分間マウス映像を小動物専用単光子放射型コンピュータ断層撮影機(Bioscan, nanoSPECT/CT)を通じて静止画像を獲得した。映像プロトコルは次のように放射と送信を繰り返した。

【0208】

[20分放射+送信] × 9回

50

【0209】

前記参考例3及び実施例14並びに15の化合物のSPECT映像を図4～6に示した。

【0210】

参考例3の化合物の場合、薬物注射初期10分後から腫瘍に摂取され約1時間まで観察が可能だった。大部分の薬物が肝代謝を経て腸に早く排出されることを確認することができ、一部薬物だけが腎臓を通じて小便で排出されることが分かる。

【0211】

実施例14の化合物の場合、薬物注射初期10分後から腫瘍の高い摂取率を示しそれは約3時間まで観察が可能だった。前記参考例3の化合物と類似に肝代謝を経て腸に早く排出されることを確認することができ、一部薬物だけが腎臓を通じて小便で排出されることが分かる。

10

【0212】

実施例15の化合物の場合、薬物注射初期10分後から非常に高い腫瘍摂取率を示して3時間以上持続することを確認することができた。参考例3及び実施例14の化合物とは相異して肝臓で代謝された薬物を大部分が腎臓を通じて小便で排出されることを確認することができる。図7では、腫瘍を基準で肝臓、腎臓、筋肉の相対的な摂取比率をグラフで表示し、前記結果を通じて表4の実施例15の化合物の腫瘍摂取及び臓器別排出程度評価と、図6での実施例15の化合物のSPECT映像評価実験との間の同一性を観察することができる。

20

【0213】

<1-4>体内腫瘍モデルマウスでの競争反応基準物質サイクリックRGD誘導体(cRGDyV)注入フトリカルボニルテクネシウム-99mサイクリックRGD誘導体のSPECT映像評価

サイクリックRGD誘導体の特異的腫瘍摂取を確認するために、競争反応基準物質サイクリックRGD(cRGDyV)を投与した後、SPECT/CT映像を獲得した。基準物質には、サイクリックRGD-タイロシン-バリン誘導体を18mg/Kgの濃度で尾静脈注射した。基準物質注射後10分後にテクネシウム-99mが標識された実施例15の化合物(1mCi/200μl)を尾静脈に注射した。注射と同時にSPECT/CT映像を獲得し、その条件は下記のとおりである。

30

【0214】

映像獲得時間の間、動物モデルの麻酔は2%イソフルランガスを用い、動物モデルの腫瘍の大きさは0.4ccだった。CT映像は、45Kv、178μAの条件下で4分30秒間撮影し、SPECT映像は、注射と同時に10分おきに総9回(注射後90分)獲得して図8に示した。

【0215】

図8に示したように、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的結合をすると知られたサイクリックRGD(cRGDyV)を注入した後、本発明による実施例15の化合物のSPECT映像が図6の実施例15の化合物の映像対比腫瘍摂取が25分で94%以上減少することを通じて、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的結合を通じた腫瘍映像が反映されることの証拠とした。

40

【0216】

<1-5>体内腫瘍モデルマウスでのトリカルボニルレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の腫瘍成長阻害及び治療性能評価

トリカルボニルレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の腫瘍成長抑制能力を確認するため、治療効果実験を行なった。

【0217】

週1回ずつ4週間総4回、レニウム-188標識サイクリックRGD誘導体である実施例5を注射した。治療効果判定モデルは、300μCiの少ない放射能注射グループと600μCiの多い放射能注射グループに分けて作り、同じ時点に滅菌生理食塩水を注射す

50

る対照群と毎日100 μ gのサイクリックRGD (cRGDyV)を腹腔に注射する比較群とを設定した。実施例11の化合物と滅菌生理食塩水の注射は、尾静脈を通じて投与した。週1回、CT映像を獲得して皮下腫瘍の成長程度及び大きさを映像で測定し、週3回ノギスを用いた腫瘍の実測及び動物モデルの体重を総4週間持続的に測定してグラフに表示して、その結果を図9に示した。

【0218】

図9に示したように、初期0.69、0.7ccの腫瘍の大きさを示した滅菌生理食塩水投与群とサイクリックRGD投与群は、時間が経つにつれて腫瘍の成長速度が急激に増加することを確認した。治療2週目には、それぞれ3.0、3.9ccまで成長し、3週目には2つのグループとも8.0ccまで成長し、治療最後の週にはそれぞれ13.0、12.9ccで非常に早い腫瘍の成長を示した。2つのグループ間の腫瘍成長速度は、有意的差異を有さず体重も初期23gから滅菌生理食塩水投与群が33g、サイクリックRGD投与群が30gで、非常に大きな増加幅を示した。それは、既存の動物の重さから腫瘍が急速に成長したことによる結果であると思慮される。実施例11の300 μ Ci投与群の初期腫瘍は、0.23ccの大きさから週1回ずつ4週間にわたった治療が終わる時点で、0.66ccまで腫瘍の成長を確認した。滅菌生理食塩水投与群とサイクリックRGD投与群に比べて約50%程度の腫瘍成長抑制能力を有していることを確認した。放射エネルギーによる体重の変化は、治療前20gから4週間の治療後25gに増加したが、実際治療過程で動物の重さは減少することが観察され、約5gの重さの増加は成長した腫瘍の重さであると思慮される。より高い放射エネルギーを放出する600 μ Ci投与群の腫瘍成長は、初期0.3ccから2週目0.3cc、3週目0.7cc、最後の治療が終わる時点では1.4ccで、非常に遅い腫瘍成長速度を示し、それは滅菌生理食塩水投与群とサイクリックRGD投与群に比べて約90%、低い放射エネルギー治療群(300 μ Ci)に比べて約79%程度の腫瘍成長抑制能力を示した。4回にわたった投与薬物の高い放射エネルギーに起因した動物の体重変化は、治療前19.9gから漸次的に減少して治療が終わる時点の重さは17.09gで、約14%減少した。それは、生命倫理審議委員会(IRB)が提示する腫瘍の放射治療の前後体重変化が、20%を越えてはいけないという基準において、腫瘍成長抑制を示した結果である。

【0219】

<1-6>体内腫瘍モデルマウスでのトリカルボニルレニウム-188標識サイクリックRGD誘導体の腫瘍成長阻害及び治療性能評価2

同じ腫瘍大きさ(0.3cc)の体内腫瘍モデルマウス二匹を用いて、レニウム-188標識サイクリックRGD誘導体である実施例12の化合物(600 μ Ci/200 μ l)を注射したモデルと注射しない腫瘍モデルを、3日後に実施例15の化合物を用いてSPECT映像撮影した結果を図10に示した。

【0220】

注射時間から60分間マウス映像を小動物専用単光子放射型コンピュータ断層撮影機(Bioscan, nanoSPECT/CT)を通じて、静止画像を獲得した。映像プロトコルは、次のように放射と送信を繰り返した。

【0221】

[10分放射+送信] × 6回

【0222】

実施例12の化合物投与群と正常群間の腫瘍、肝臓、腎臓、筋肉の相対的な摂取割合をグラフにして図10に示し、2つのグループ間の腫瘍を直接除去した後、腫瘍周辺の血管分布を写真に撮影して図11に示した。

【0223】

図10及び図11に示したように、初期0.3ccの腫瘍大きさは、実施例12の化合物を注射したモデルでは0.35ccに育ち、投与しないモデルは0.65ccの腫瘍大きさを示し、腫瘍のSPECT映像比較のためにテクネシウム標識サイクリックRGD誘導体である実施例15の化合物を注入して、二つのグループ間の映像を比較時、腫瘍での

摂取の割合が実施例 1 2 の化合物を投与した群で 5 9 % 減少することを確認することができた。また二つのグループ間の腫瘍写真で、実施例 1 2 の化合物を投与したモデルの腫瘍が、投与しないモデルの腫瘍とは異なり、周辺の血管分布が確実に少なく、腫瘍を取り囲んだ血管の数も急激に減ったことを確認し、摘出した腫瘍組織スライスを C D - 3 1 血管染色した時にも、実施例 1 2 を投与した腫瘍細胞では明確に管が観察されなかった。また、腫瘍組織スライドに Q - d o t が導入された二個の R G D 誘導体を利用した $\alpha_v \beta_3$ インテグリン分布評価実験で、図 1 1 のように実施例 1 2 を投与した腫瘍組織で大部分のインテグリンが損傷されていることを確認できた。

【0224】

したがって、本発明によるトリカルボニルレニウム-188 標識されたサイクリック R G D 誘導体は、腫瘍の成長阻害及び腫瘍の新生血管作用抑制力が優れているので、腫瘍の新生血管作用から誘発される疾病の治療に有用に用いることができる。

【0225】

一方、本発明による前記化合物は、目的によって多くの形態製剤化が可能である。下記には、本発明による前記化合物を活性成分として含むいくつかの製剤化方法を例示するが、本発明がこれに限定されるのではない。

【0226】

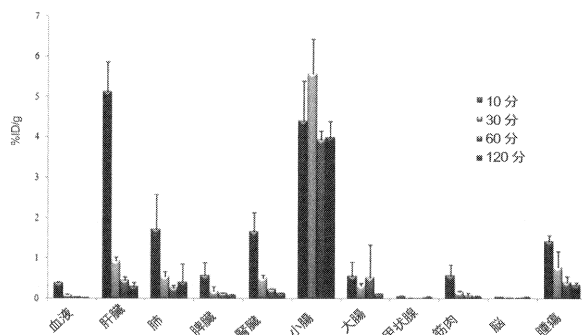
<製剤例>注射剤の製造

本発明の化学式 1 の化合物 5 m C i
エタノール 1 0 0 m g
生理食塩水 2 0 0 0 m g

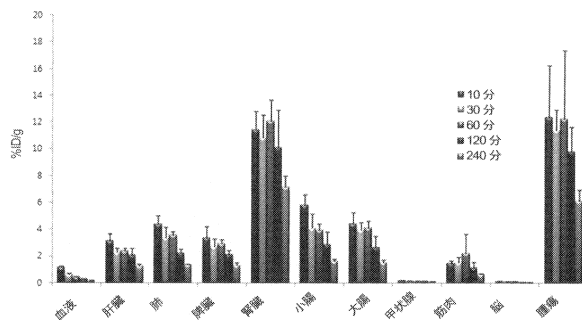
【0227】

本発明の化学式 1 の化合物をエタノールとともに蒸留水に溶解させて、滅菌フィルターを通過させて滅菌バイアルに貯蔵後、通常の方法によって注射剤を製造した。

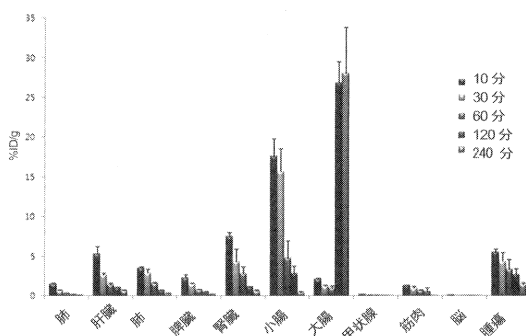
【図 1】



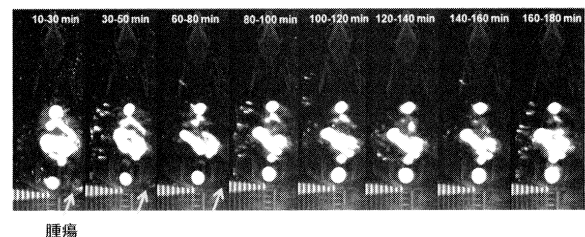
【図 3】



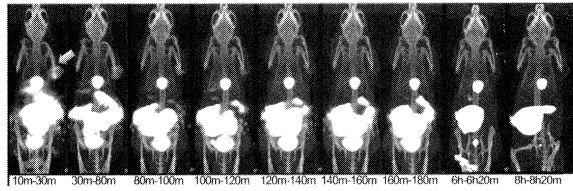
【図 2】



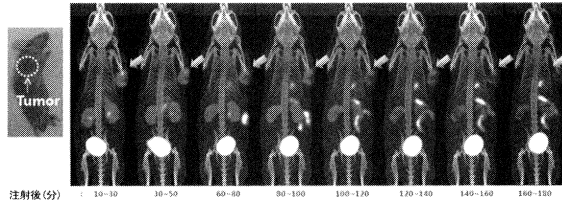
【図 4】



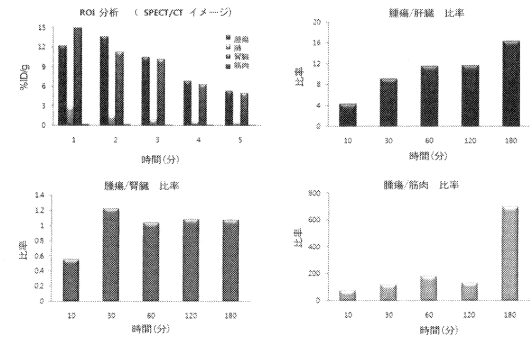
【図 5】



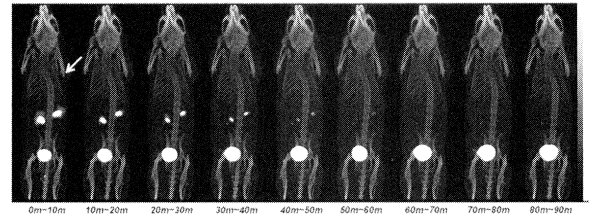
【図 6】



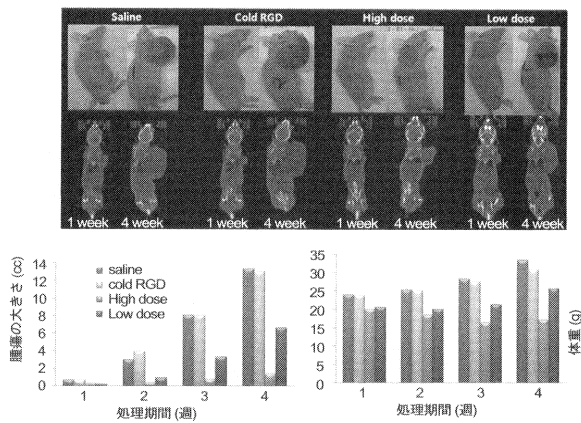
【図 7】



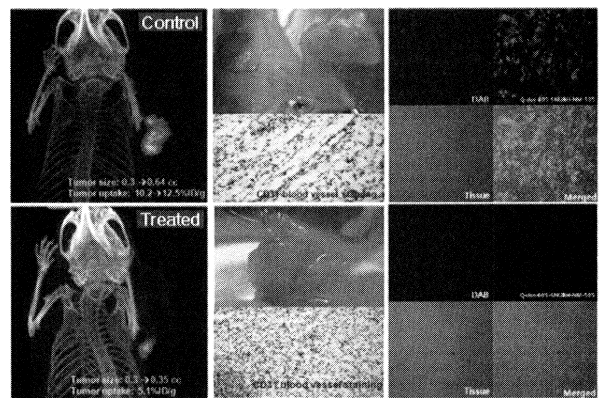
【図 8】



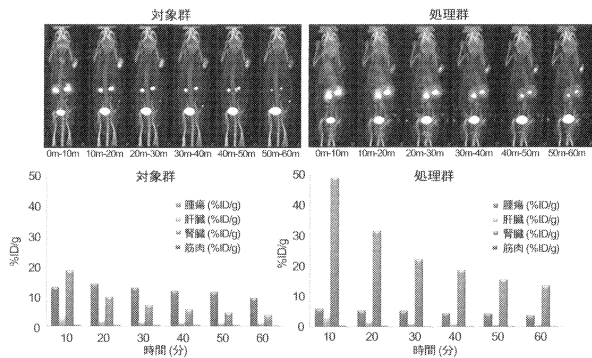
【図 9】



【図 11】



【図 10】



フロントページの続き

(72)発明者 キム サンウン

大韓民国 135-240 ソウル カンナムーグ ケポードン 653 ヒュンダイ 1チャ
アパート ナンバー103-805

(72)発明者 キム ジソン

大韓民国 430-705 キョンギード アニャンーシ マナンーグ ソクスー1ドン テリム
アパート ナンバー102-2302

(72)発明者 ムン ビョンソク

大韓民国 136-863 ソウル ソンブクーグ チョンアムードン 80 サムソン アパー
ト ナンバー116-1001

(72)発明者 ジョン ジェホ

大韓民国 143-819 ソウル クワンジンーグ クイー2ドン 68-10

審査官 田村 聖子

(56)参考文献 Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2007年, Vol.15, P.7755-7764

The Journal of Nuclear Medicine, 2006年, Vol.47, No.12, P.2000-2007

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K, A61K, G01T

CAplus/REGISTRY (STN)