

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5043271号  
(P5043271)

(45) 発行日 平成24年10月10日(2012.10.10)

(24) 登録日 平成24年7月20日(2012.7.20)

(51) Int.Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

F 1

C07K 7/06 ZNA

請求項の数 9 (全 60 頁)

(21) 出願番号	特願2001-575615 (P2001-575615)
(86) (22) 出願日	平成13年4月6日 (2001.4.6)
(65) 公表番号	特表2003-531835 (P2003-531835A)
(43) 公表日	平成15年10月28日 (2003.10.28)
(86) 國際出願番号	PCT/N02001/000146
(87) 國際公開番号	W02001/077145
(87) 國際公開日	平成13年10月18日 (2001.10.18)
審査請求日	平成20年4月2日 (2008.4.2)
(31) 優先権主張番号	0009042.3
(32) 優先日	平成12年4月12日 (2000.4.12)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)
(31) 優先権主張番号	0025070.4
(32) 優先日	平成12年10月12日 (2000.10.12)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

(73) 特許権者	396019387 ジーイー・ヘルスケア・アクスイエ・セル スカブ ノルウェー國 O 4 O 1 · オスロ ニイダ レン ピーオーボックス・4 2 2 0 ニイ コペイエン 2
(74) 代理人	100137545 弁理士 荒川 聰志
(72) 発明者	クスパートソン、アラン ノルウェー國、エヌ-0 4 O 1 オスロ、 トルショフ、ピー・オー・ボックス 4 2 2 0、ニイコペイエン 1-2、アマシャ ム・ヘルス・エーエス内

最終頁に続く

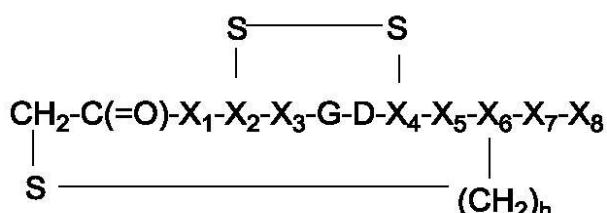
(54) 【発明の名称】ペプチドベースの化合物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

インテグリン受容体に対する親和力を有する一般式(I)の化合物又はその薬学的に許容される塩。

## 【化 1】



10

(I)

式中、G はグリシンであり、

D はアスパラギン酸であり、

h は 1 又は 2 の正の整数であり、X<sub>1</sub> は 1 又は 2 個のアミノ酸残基であって、該アミノ酸残基は各々独立して任意に、i )

リンカーバイド基、又は i i ) キレート剤、又は i i i ) キレート剤に結合したリンカーバイド

20

(L)基を介してインヴィヴォ像形成に適した放射性核種リポーター(R)基と結合しており、

X<sub>2</sub>及びX<sub>4</sub>は独立にシスティン又はホモシスティン残基であり、

X<sub>3</sub>はアルギニン又はN-メチルアルギニンであり、

X<sub>5</sub>はチロシン、フェニルアラニン、3-ヨード-チロシン又はナフチルアラニン残基である、

X<sub>6</sub>は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-基と一体でシスティン又はホモシスティン残基から選択されるチオール含有アミノ酸残基を表し、

X<sub>7</sub>は1個以上のエチレングリコール単位を含有するリンカー(L)基であり、

X<sub>8</sub>は放射性核種リポーター(R)基又は-NH<sub>2</sub>であるか、或いは存在せず、

X<sub>1</sub>及びX<sub>7</sub>におけるLは独立に1個以上のエチレングリコール単位を含有するリンカー基である。

【請求項2】

X<sub>1</sub>がアスパラギン酸、チロシン、チロシン-アスパラギン酸、リジン、グルタミン酸、アセチル-リジン、アスパラギン、セリン、トレオニン又はグルタミンである、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

X<sub>5</sub>がフェニルアラニン又は3-ヨード-チロシン残基である、請求項1又は請求項2に記載の化合物。

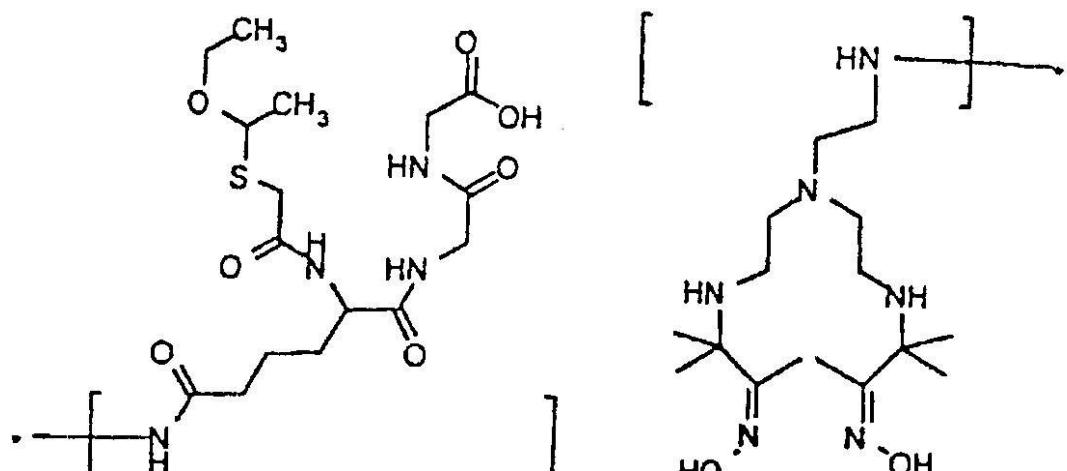
【請求項4】

以下のいずれかのキレート剤を含有する、請求項1乃至請求項3のいずれか1項に記載の化合物。

10

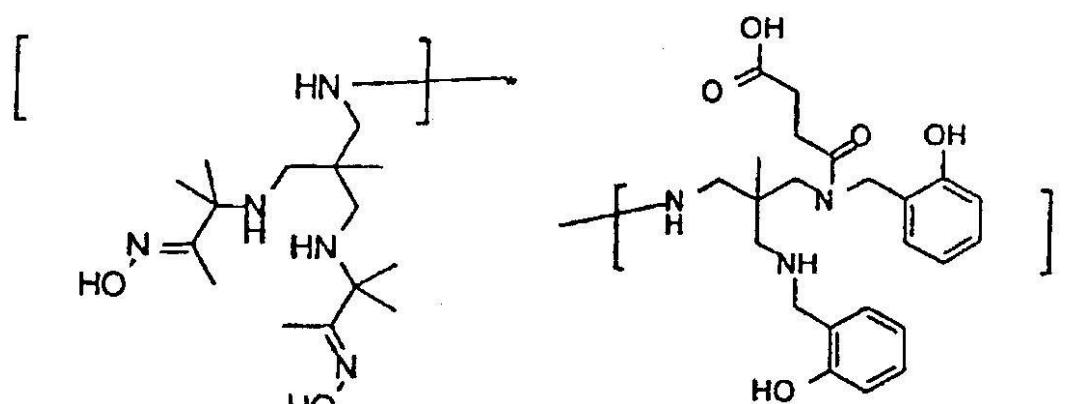
20

## 【化 2】



(a)

(b)



(c)

(d)

30

## 【請求項 5】

キレート剤が放射性核種に結合することができる、請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

## 【請求項 6】

テクネチウム、ヨウ素又は  $\text{Cu}$  の放射性同位体、又は  $^{18}\text{F}$  同位体に結合することができる、請求項 5 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

アミノ酸残基のいずれかが独立して天然に存在するアミノ酸である、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

40

## 【請求項 8】

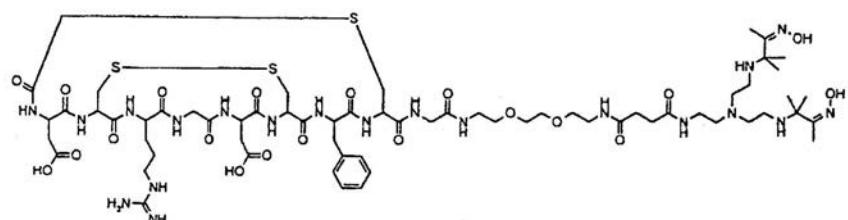
アミノ酸残基のいずれかが独立して D 又は L 立体配座である、請求項 7 に記載の化合物。

## 【請求項 9】

以下のいずれかの式で規定される、請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

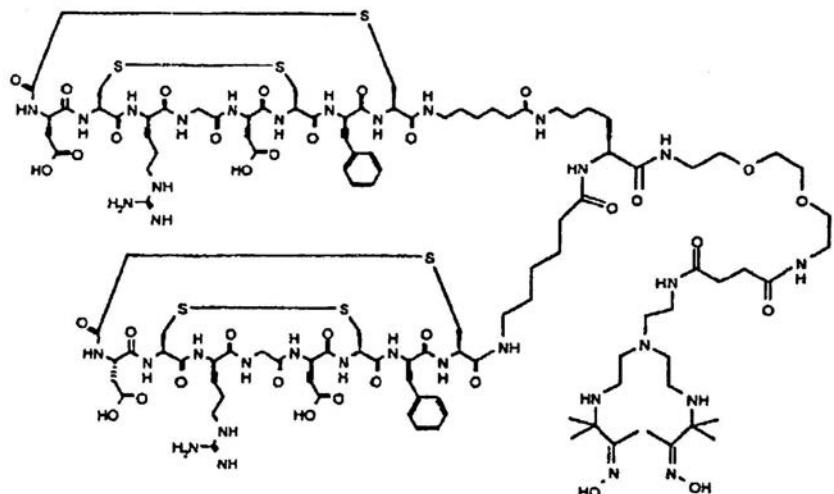
## 【化 3】

化合物V



## 【化 4】

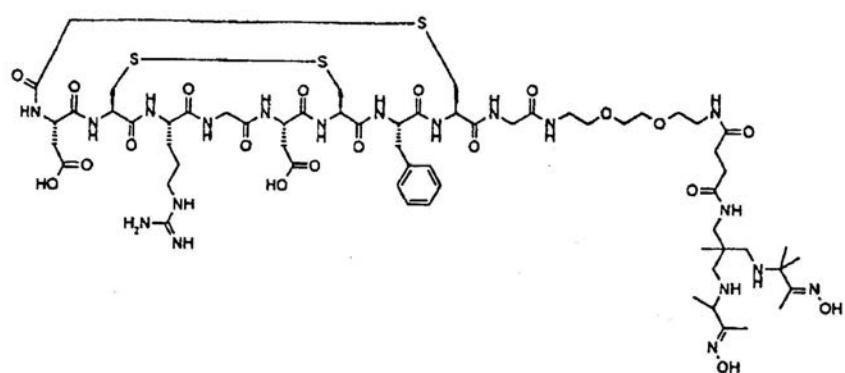
化合物VIII



30

## 【化 5】

化合物IX



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

50

本発明は新規なペプチド系化合物、並びに治療的に有効な処置および診断撮像技術におけるにおけるその使用に関する。より詳細に言えば、本発明は血管新生に関連した受容体、特にインテグリン受容体（例えば  $\alpha_3\beta_3$  インテグリン受容体）に結合するターゲッティングベクターとして使用される、ペプチド系化合物の使用に関する。従って、このような造影剤は、例えば悪性疾患、心疾患、炎症関連疾患、リューマチ性関節炎およびカポシ肉腫の診断のために使用することができる。更に、このような薬剤は、これら疾患の治療にも使用することができる。

#### 【 0 0 0 2 】

新たな血管は、二つの異なる機構、即ち、血管形成または血管新生によって形成され得る。血管新生は、既存の血管からの分岐による新たな血管の形成である。このプロセスのための主な刺激は、組織内細胞への不十分な栄養および酸素（低酸素症）の供給である。細胞は、血管新生因子を分泌することにより応答し、該因子には多くのものが含まれる。その一例は、屢々、血管内皮増殖因子（VEGF）と称されるものである。これらの因子は、基底膜のタンパク質を分解するタンパク質分解酵素、およびこれらの潜在的に有害な酵素の作用を制限する阻害因子の分泌を開始させる。血管新生因子の他の顕著な効果は、内皮細胞を転移および分割することである。内腔の反対側において、血管周囲の連続的なシートを形成する基底膜に結合する内皮細胞は有糸分裂を受けない。付着性の喪失および血管新生因子受容体からの信号の喪失の組合された効果により、内皮細胞は転移し、増殖し、再配列され、最終的には新たな血管の回りに基底膜を合成する。

#### 【 0 0 0 3 】

血管新生は、創傷治癒および炎症プロセスを含む組織の成長および再建において顕著である。腫瘍は、その増殖速度を維持するために、それらがミリメータサイズに達したときには血管新生を開始させなければならない。血管新生は、内皮細胞およびその環境における特徴的な変化によって達成される。これら細胞の表面は、転移の準備のために再構築され、隠れた構造が、基底膜が分解する場所に露出され、加えてタンパク質分解に影響し且つこれを制御する種々のタンパク質に露出される。腫瘍の場合、通常は、得られる血管網は鋭いキンクおよび動静脈シャントの形成と共に無秩序化される。また、血管新生の阻害は、抗腫瘍療法のための有望な戦略であると思われる。また、血管新生を伴う変質は診断のために非常に有望であり、その明白な例は悪性疾患であるが、その概念は、アテローム硬化症を含む炎症および種々の炎症関連疾患にも有望であり、初期アテローム硬化病巣のマクロファージは血管新生因子の潜在的な供給源である。これらの因子はまた、心筋梗塞部位における血管再生にも関与し、これは短時間のうちに狭窄が解除されるときに生じる。

#### 【 0 0 0 4 】

血管再生または血管新生、新たな血管の発生または増殖に関連した望ましくない症状の更なる例は、以下に示すとおりである。この点に関しては、W098/47541も参照される。

#### 【 0 0 0 5 】

血管新生に関連した疾患および兆候は、例えば、乳癌、皮膚癌、直腸結腸癌、肺臓癌、前立腺癌、肺癌、または卵巣癌のような、癌および転移の異なる形態である。他の疾患および兆候は、炎症（例えば慢性炎症）、アテローム硬化症、リューマチ性関節炎、および歯肉炎である。

#### 【 0 0 0 6 】

血管新生に関連した更なる疾患および兆候は、動静脈奇形、星細胞腫、絨毛癌、グリア芽細胞腫、神経膠腫、血管腫（小児、毛細管）、肝細胞腫、子宮内膜肥厚、虚血性心筋症、カポシ肉腫、黄斑変性症、メラノーマ、神経芽細胞腫、閉塞性末梢動脈疾患、骨関節炎、乾癬、網膜症（糖尿病性、増殖性）、強皮症、および潰瘍性大腸炎である。

#### 【 0 0 0 7 】

血管新生には、内皮細胞および周囲組織に特有の受容体が関与する。これらのマーカーは、VEGFおよびインテグリン科の受容体を含んでいる。免疫組織化学的研究により、種々のインテグリン類（おそらく最も重要なのは  $\alpha_3\beta_3$  型）が血管頂部表面に発現され [Conforti,

10

20

30

40

50

G., et al. (1992) Blood 80: 37-446]、循環するリガンドによるターゲッティングに利用可能であること [ Pasqualini, R., et al. (1997) Nature Biotechnology 15: 542-546] が示された。 5 1は、フィプロネクチンマトリックスの組立て促進、およびフィプロネクチンへの細胞付着の開始に重要なインテグリンである。それはまた、細胞転移 [ Bauer, J.S., (1992) J. Cell Biol. 116: 477-487]、並びに腫瘍の浸潤および転移 [ Gehlsen, K.R., (1988) J. Cell Biol. 106: 925-930] において重要な役割を果たす。

#### 【 0 0 0 8 】

インテグリン  $\nu$  3は、血管新生に関連することが知られた受容体の一つである。  $\nu$

3インテグリン受容体の拮抗剤 / リガンドの相互作用はアポトーシスを誘起し、血管増殖を阻害するから、刺激された内皮細胞はこの受容体に依存して、血管新生の厳しい期間を生き延びるものと思われる。 10

#### 【 0 0 0 9 】

インテグリンはヘテロ二量体分子であり、その および サブユニットが細胞膜の脂質二重層を貫通する。 サブユニットはその細胞骨格上に四つのCa<sup>2+</sup>結合ドメインを有しており、 サブユニットはシステインに富む多くの細胞外ドメインを有している。

#### 【 0 0 1 0 】

細胞付着に関する多くのリガンド（例えばフィプロネクチン）は、アルギニン - グリシン - アスパラギン酸のトリペプチド配列（RGD）を含んでいる。このRGD配列は、該配列を提示するリガンドと細胞表面受容体との間の主要な認識部位として作用すると思われる。該リガンドおよび受容体の間の二次的相互作用は、この相互作用の特異性を向上することが一般に信じられている。これらの二次的相互作用は、リガンドと前記RGD配列に直ぐ隣接した受容体との間、または前記RGD配列から離れた部位で生じるであろう。 20

#### 【 0 0 1 1 】

RGDペプチド類は、或る範囲のインテグリン受容体に結合し、臨床的条件における応用に重要な多くの細胞内事象を調節する能力を有している。（Ruosahti, J. Clin. Invest., 87: 1-5 (1991)）。おそらく、RGDペプチドおよびその擬似物の最も広範に研究された効果は、それらが血小板インテグリンGpIIbIIIaをターゲッティングする場合の、抗血栓剤としてのそれらの使用に関するものである。

#### 【 0 0 1 2 】

$\nu$  3または  $\nu$ ベータ5拮抗剤の投与による組織での血管新生の阻害は、例えば抗体またはRGD含有ペプチドを使用したWO 97/06791およびWO 95/25543に記載されている。EP 578083は、一連の単環状RGD含有ペプチドを記載しており、またWO 90/140103はRGD抗体を特許請求の範囲に記載している。Haubner et al.は、J. Mucr. Med. (1999); 40: 1061-1071において、単環状RGD含有ペプチドに基づく腫瘍ターゲッティングのための新規な分類のトレーサを記載している。しかし、全身オートラジオグラフィー撮像を用いた生体内分布の研究によって、「<sup>123</sup>I-標識したペプチドは、非常に迅速な血液クリアランス速度および主に肝胆排泄ルートを有し、高いバックグラウンドを生じることが明らかになった。

#### 【 0 0 1 3 】

また、複数の架橋を含む環状RGDペプチド類が、WO 98/54347およびWO 95/14714に記載されている。インビボ・バイオパンニング (WO 97/10507) から誘導されたペプチドは、種々のターゲッティング適用のために使用されてきた。配列CDCRGDCFC (RGD-4C) は、その架橋位置が特定されていないが、ドキシリビシン (WO 98/10795) のような薬物、核酸およびアデノウイルスを細胞にターゲッティングするために使用されてきた (WO 99/40214、WO 99/39743、WO 98/54347、WO 98/54346、US 5846782参照)。しかし、複数のシステイン残基を含むペプチドは、複数のジスルフィド異性体を生じ得る欠点を有している。RGD-4Cのような四つのシステイン残基をもったペプチドは、三つの異なるジスルフィド折り畳み形態を形成する可能性を有する。これらの異性体は、RGDファルマコフォアが三つの異なるコンホメーションを取るので、インテグリン受容体について種々の親和性を有するであろう。 40

## 【0014】

従って、血管新生に関連したインテグリン受容体のインピボでの効率的なターゲッティングおよび撮像は、化学的に頑丈で安定な、選択的高親和性RGD系ベクターを必要とする。更に、バックグラウンドに関する問題を低減するためには、排泄ルートは撮像剤を設計するときの重要な因子である。これらの厳格な条件は、本発明に記載した二環系構造によつて満たされる。

## 【0015】

一つの側面において、本発明は、式Iによって定義される新規なペプチド系化合物を提供する。これらの化合物は、インテグリン受容体に対する親和性、例えばインテグリンV3に対する親和性をもつたベクターとしての有用性を有する。

10

## 【0016】

式Iの化合物は少なくとも二つの架橋を有し、一方の架橋はジスルフィド結合を形成し、他方の架橋はチオエーテル(スルフィド)結合を形成し、これら架橋は「入れ子状態の」(nested)配置中にベクター部を含む。

## 【0017】

従つて、本発明の化合物は、ベクター部当たり最大一つのジスルフィド架橋を有する。本発明により規定される化合物は、驚くべきことに、インヴィヴィオにおいてラベル付けの間、例えばテクネチウムを用いたラベル付けの間に使用される状況下において安定である。

## 【0018】

これらの新規化合物は、像を造る目的と同様、治療学的に有効な処置において使用され得る。

20

## 【0019】

$R_1$ および $X_{1-8}$ の定義により、式Iは、任意にL部および/またはR部を伴う(V)k部を有する化合物を含有する。

## 【0020】

Vは二環式ベクターであり、Lはリンカー(linker)部であり、Rは検出可能な部(リポーター(reporter))、例えば像形成処置において検出可能、であり、例えば、ヒト又は血管化のヒト以外の動物体(例えば、哺乳類、鳥類又は爬虫類体)のインヴィヴィオにおいて像を造る(V)kLR構成のような造影剤として、あるいは治療薬として使用される。

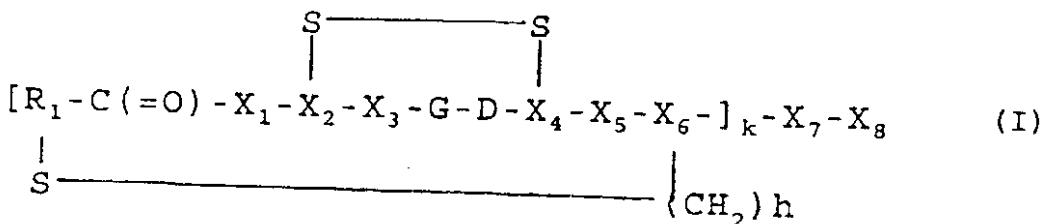
30

## 【0021】

本発明により提供される新規なペプチドベースの化合物は式Iにより規定される化合物、およびその薬学的に許容されるすべての塩である。

## 【0022】

## 【化6】



40

式中、Gはグリシンを表し、

Dはアスパラギン酸を表し、

$R_1$ は $-(CH_2)_n-$ 又は $-(CH_2)_n-C_6H_4-$ 、好ましくは $-(CH_2)_n-$ を表し  
(式中、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10を表す。)、

hは1又は2の正の整数を表し、

$X_1$ は結合又は1、2、3、4もしくは5個のアミノ酸残基、好ましくは1又は2個のアミノ酸残基を表すものであつて、該アミノ酸残基は各々独立して任意に前記薬剤の薬物動態もしくは血液クリアランス速度を適切に変更する官能基側鎖(例えば炭水化物基)で

50

誘導されていてもよく、前記側鎖は好ましくは、血清アルブミンに対する親和力を有する  $C_{1-22}$ -アルキル又は  $C_{1-22}$  パーフルオロアルキル鎖、ポリエチレンジリコールポリマー及び/又は疎水性基であり、該アミノ酸残基は各々独立して任意に、i) リンカー (L) 基、又は i i) キレート剤、又は i i i) キレート剤に結合したリンカー (L) 基を介してインヴィヴォ像形成に適したリポーター (R) 基と結合していてもよい。

## 【0023】

$X_1$  は、好ましくはアスパラギン酸、チロシン、チロシン-アスパラギン酸、リジン、グルタミン酸、アセチル-リジン、アスパラギン、セリン、トレオニン、またはグルタミン、もしくはこれらの誘導体である。

## 【0024】

$X_2$  および  $X_4$  は独立に、ジスルフィド結合を形成し得るアミノ酸残基を表し、好ましくはシステイン又はホモシステイン残基である。

## 【0025】

$X_3$  はアルギニン、N-メチルアルギニン又はアルギニン模倣体を表し、好ましくはアルギニン又はN-メチルアルギニン残基である。

## 【0026】

$X_5$  は疎水性アミノ酸又はその誘導体を表し、好ましくはチロシン、フェニルアラニン、3-ヨード-チロシン、またはナフチルアラニン残基であり、より好ましくはフェニルアラニン又は3-ヨード-チロシン残基である。

## 【0027】

$X_6$  はチオール含有アミノ酸残基を表し、好ましくはシステイン又はホモシステイン残基である。

## 【0028】

$k$  は正の整数 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 を表し、好ましくは正の整数 1、2、3 又は 4 であり、より好ましくは正の整数 1 である。

## 【0029】

$X_7$  はリンカー (L) 基又は 1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個のアミノ酸残基 (任意にリンカー (L) 部の一部であってもよい。) を表し、好ましくは  $X_7$  は 1 個のアミノ酸残基であって、

該アミノ酸残基は各々独立して任意に前記薬剤の薬物動態もしくは血液クリアランス速度を適切に変更する官能基側鎖 (例えば炭水化物基) で誘導されていてもよく、前記側鎖は好ましくは、血清アルブミンに対する親和力を有する  $C_{1-22}$ -アルキル又は  $C_{1-22}$  パーフルオロアルキル鎖、ポリエチレンジリコールポリマー及び/又は疎水性基であり、該アミノ酸残基は各々独立して任意に、i) リンカー (L) 基、又は i i) キレート剤、又は i i i) キレート剤に結合したリンカー (L) 基を介してインヴィヴォ像形成に適したリポーター (R) 基と結合していてもよく、或いは  $X_7$  は存在しない。

## 【0030】

好ましくは、少なくとも 1 のリンカー (L) 部は 1 又は 2 以上のエチレンジリコールユニットを含有し、および/または、好ましくは  $X_7$  は、グリシン残基を含有するか、あるいは存在しない。

## 【0031】

$X_8$  はリポーター (R) 部または -NH<sub>2</sub> を表し、もしくは存在しない。

## 【0032】

特に好ましいキレート試薬は、以下に示す式 a、b、c および d により規定されるが、式 Iにおいて規定される化合物は、表 1 に規定されるキレート試薬もまた含有し得る。

## 【0033】

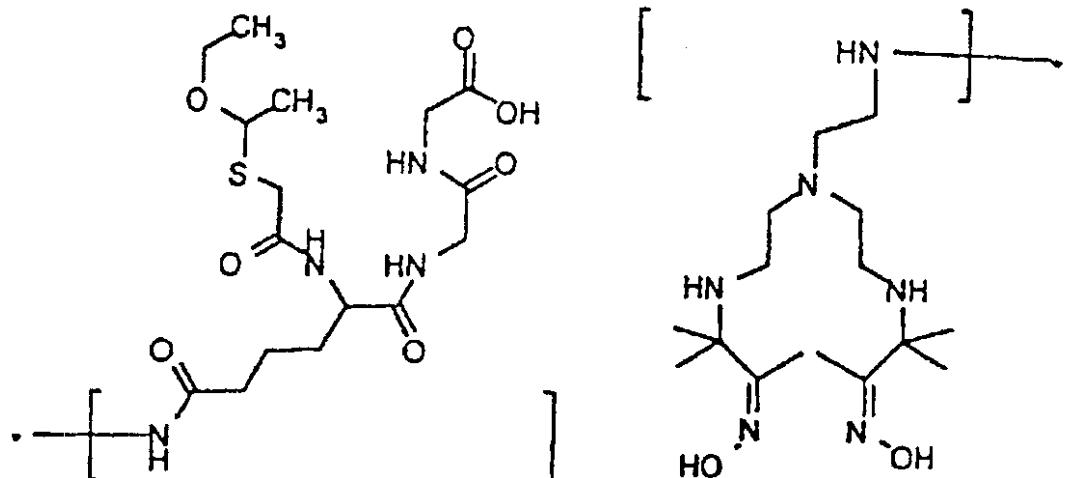
## 【化 7】

10

20

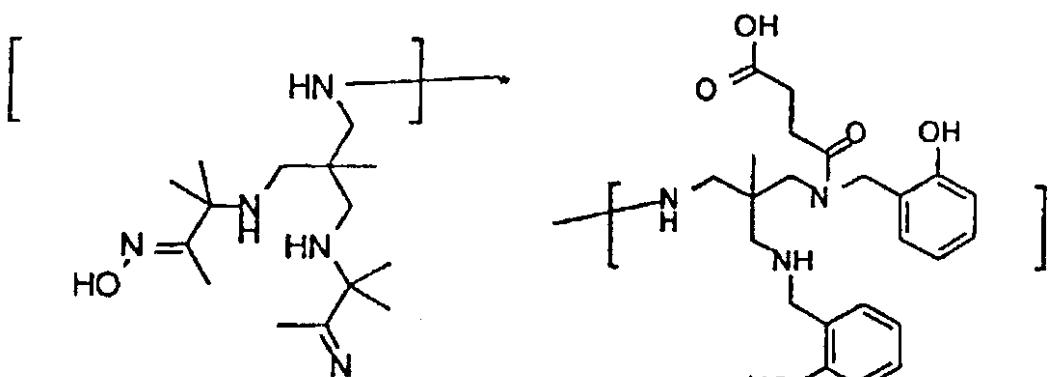
30

40



(a)

(b)



(c)

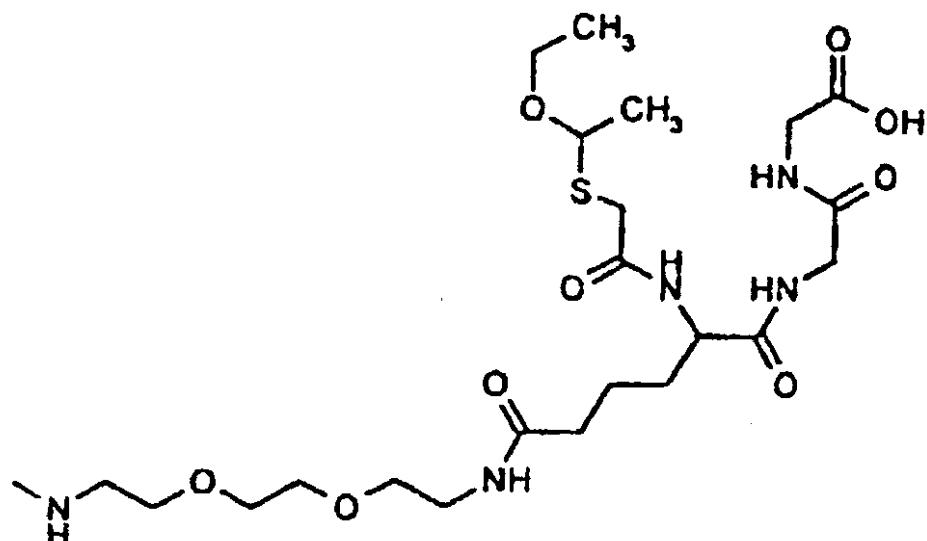
(d)

好みしいキレート試薬およびリンカーユニットの例は式 e および f として示される。

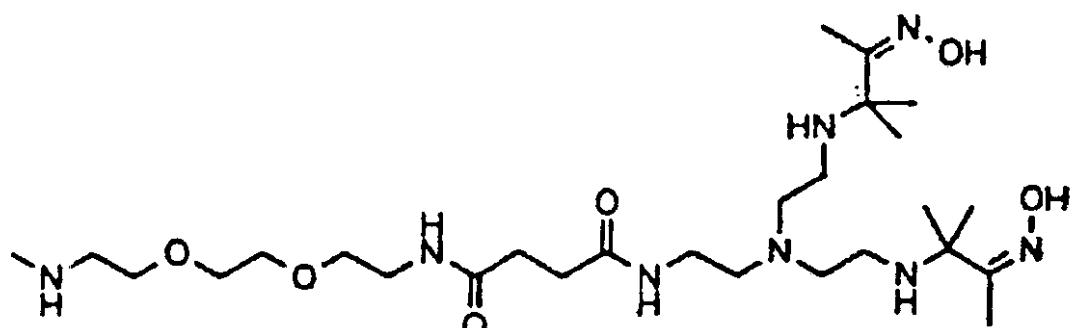
【0034】

【化8】

30



(e)



(f)

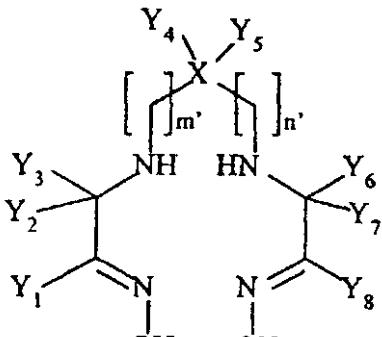
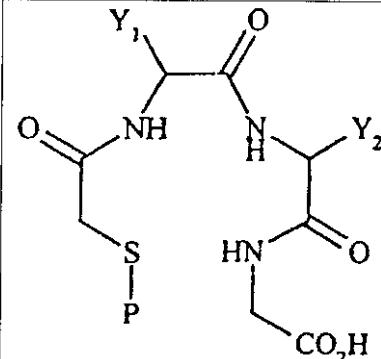
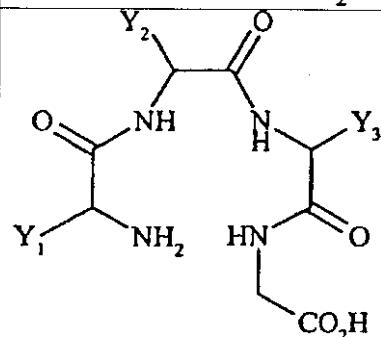
本発明のある側面において、キレートは放射性核種に結合する、あるいは結合することが可能な官能基部分である。ヌクレオチドの錯形成反応において好ましく規定されるキレート試薬（好ましくは<sup>99m</sup>テクネチウム）を以下の表1に列挙する。

【0035】

【表1 - 1】

30

表I:

リガンドの種類	構造	定義
アミンオキシム		<p>Y1-8 は、H、アルキル、アリル、又はこれらの組合せであり得る。</p> <p>またY4又はY5は、ペプチドベクターに共役され得るような適切な機能性を含む。一例えは好ましくはアルキルアミン、硫化アルキル、アルコキシ、カルボン酸アルキル、アリルアミン、硫化アリル、又はα-ハロアセチル等。</p> <p>m'=n'=1 のとき X=C 又は N</p> <p>m'=n'=2 のとき X=N</p>
MAG3型		<p>P=保護基 (好ましくはベンゾイル、アセチル、EOE);</p> <p>Y1、Y2は、ペプチドベクターに共役され得るような適切な機能性を含む;好ましくは H(MAG3)、又は任意のアミノ酸の、L形またはD形の側鎖。</p>
G4型リガンド		<p>Y1、Y2、Y3は、ペプチドベクターに共役され得るような適切な機能性を含む; 好ましくは H、又は任意のアミノ酸の、L形またはD形の側鎖。</p>

【 0 0 3 6 】

【表 1 - 2 】

リガンドの種類	構造	定義
テトラアミンリガンド		<p>Y1-Y6 は、H、アルキル、アリル、又はこれらの組合せであり得る。      ここで Y1-6 基は、キレートがベクターに共役され得るような1又は複数の機能部位を含む。      一例えは好ましくはアルキルアミン、硫化アルキル、アルコキシ、カルボン酸アルキル、アリルアミン、硫化アリル、又は <math>\alpha</math>-ハロアセチル。</p>
Cylam 型リガンド		<p>Y1-5 は、H、アルキル、アリル、又はこれらの組合せであり得る。また、Y1-5 基は、キレートがベクターに共役され得るような1又は複数の機能部位を含む。      一例えは好ましくはアルキルアミン、硫化アルキル、アルコキシ、カルボン酸アルキル、アリルアミン、硫化アリル又は <math>\alpha</math>-ハロアセチル。</p>
ジアミンジフェノール		<p>Y1、Y2-H、アルキル、アリル。またここで Y1 又は Y2 基は、キレートがベクターに共役され得るような機能部位を含む。      一例えは好ましくはアルキルアミン、硫化アルキル、アルコキシ、カルボン酸アルキル、アリルアミン、硫化アリル、又は <math>\alpha</math>-ハロアセチル。      W=C、N      m'=n'=1 又は 2</p>

【0037】

【表1-3】

リガンド の種類	構造	定義
HYNIC		V=ベクターへのリンカー、又はベクター自体。
アミド チオール		P=保護基 (好ましくは、ベンゾイル、アセチル、EOE); Y1-5=H、アルキル、アリル; 又はY3は、L又はDアミノ酸側鎖、又はグリシンであり、カルボン酸は、アミド結合を介したベクターとの共役のために用いてよい。代替的には、R15基は、キレートがベクターに共役され得るような付加的な機能を含んでもよい。 一例えればアルキルアミン、硫化アルキル、アルコキシ、カルボン酸アルキル、アリルアミン、硫化アリル又はα-ハロアセチル。

本発明のある側面において、キレートは、求核性置換または求電子付加反応のいずれかにより、あるいはキレート試薬の使用により<sup>1-8</sup>Fの同位体、又はCuの同位体に結合する、あるいは結合することが可能な官能基部分である。従って、生成する化合物は、陽電子放射断層撮影法(PET)イメージングにおいて使用され得る。

#### 【0038】

本明細書において記載されたベクター共役のベクター構成要素は、好ましくは遊離アミノ又は遊離カルボキシル末端を有さない。これによりこれらの化合物に、酵素の分解に対する抵抗に有意な増加がもたらされ、結果として多くの公知の遊離ペプチドと比較してインヴィヴォにおける安定性が増加する。

#### 【0039】

リポーターRは、X<sub>1</sub>および/またはX<sub>7</sub>を介してV(Lを介して)に連結し得る。好ましくは、連結点は、ターゲットに対するVの生物学的活性又はVの結合親和力が実質的にあるいは有意に減少しないよう選択される(RなしのVと比較した場合におけるVの生物学的活性又は結合親和力に関して)。最も好ましくは、RはVに連結される。

#### 【0040】

本明細書において使用する「アミノ酸」なる用語は、最も広い意味に用いられ、L-アミノ酸、D-アミノ酸、化学修飾されたアミノ酸、N-メチル、C-メチル及びアミノ酸側鎖模倣体、及びナフチルアラニン等の天然には存在しないアミノ酸を言い、好ましくは、天然に存在するアミノ酸又は天然アミノ酸の模倣体である。

#### 【0041】

式Iの化合物の好ましい態様を、以下に化合物II~IXにより例示する。

#### 【0042】

10

20

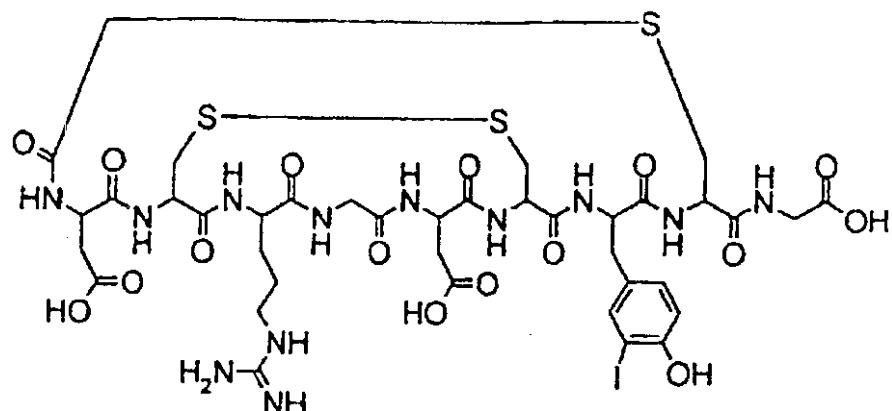
30

40

50

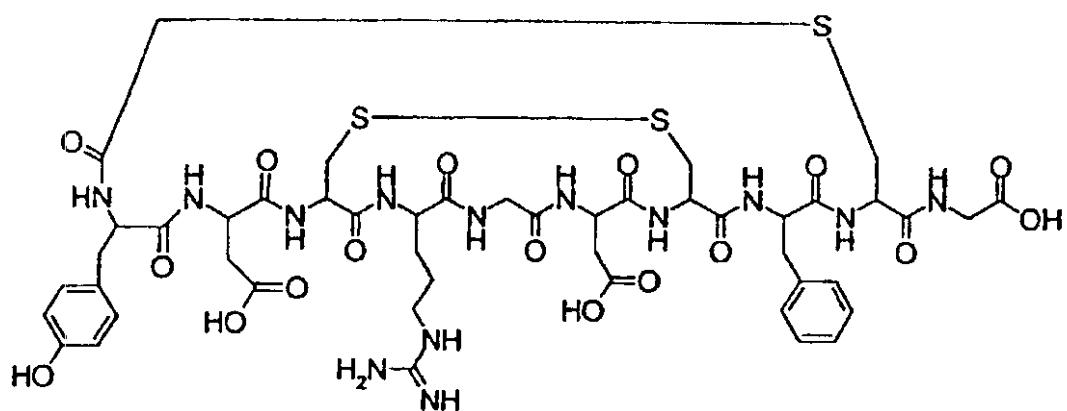
【化 9】

化合物 II



10

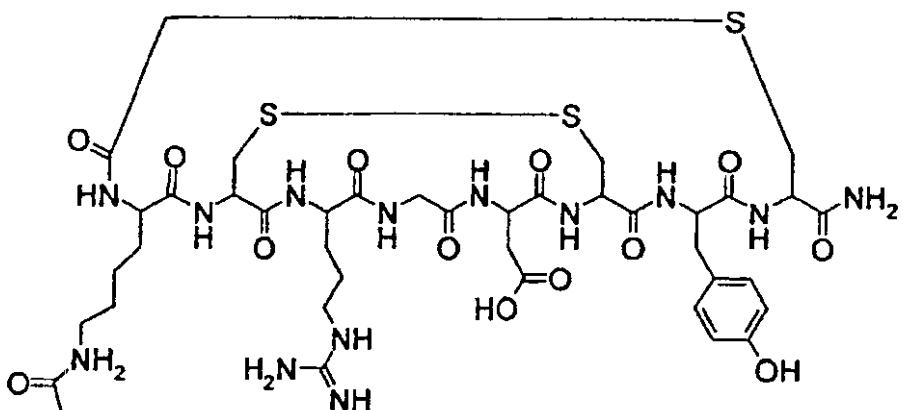
化合物 III



20

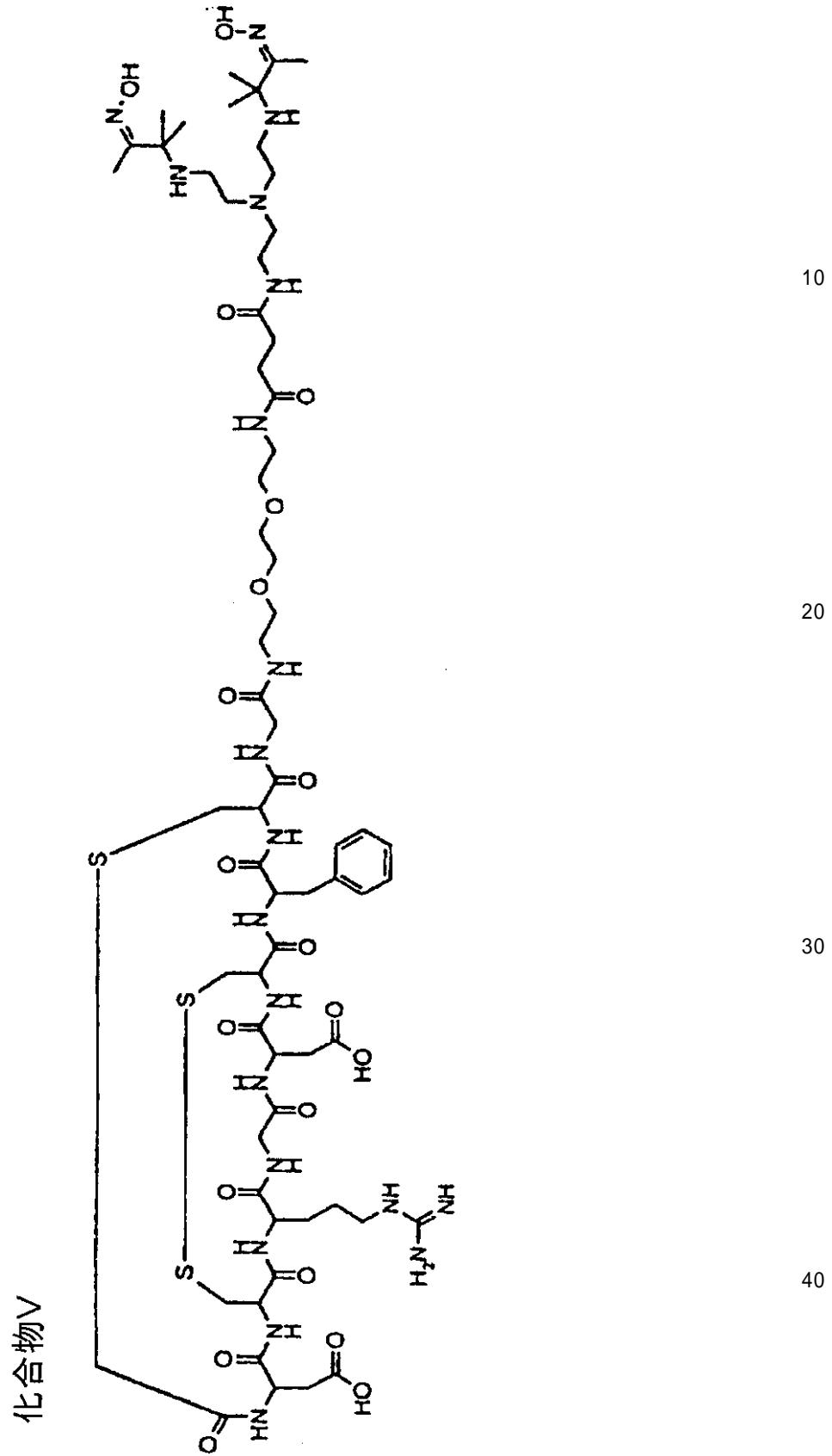
30

化合物 IV

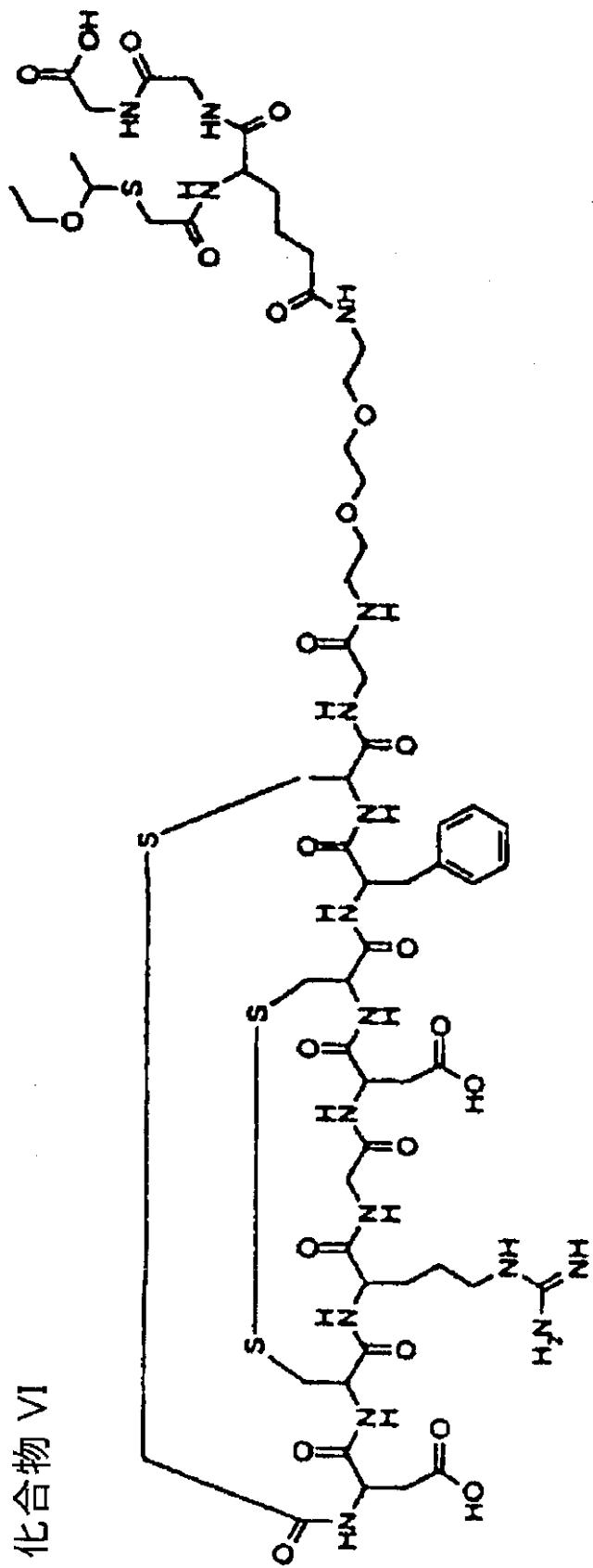


40

【化 10】



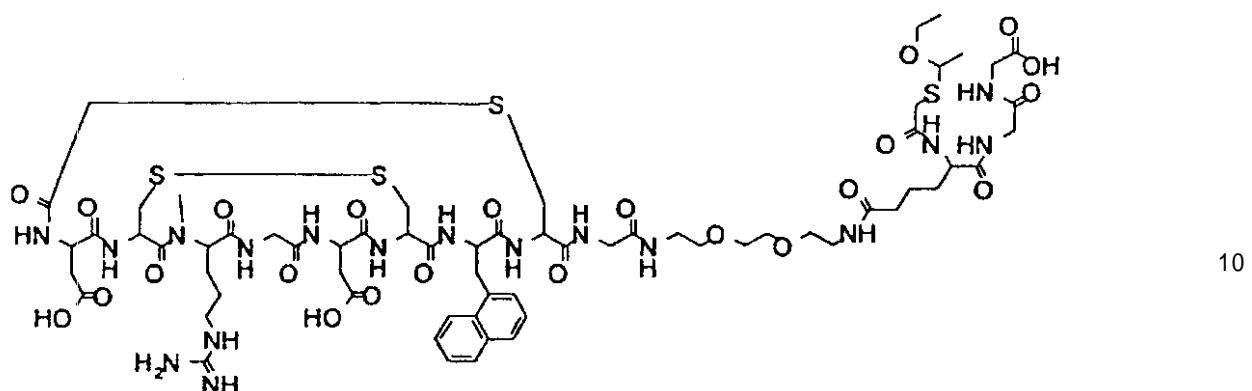
【化 1 1】



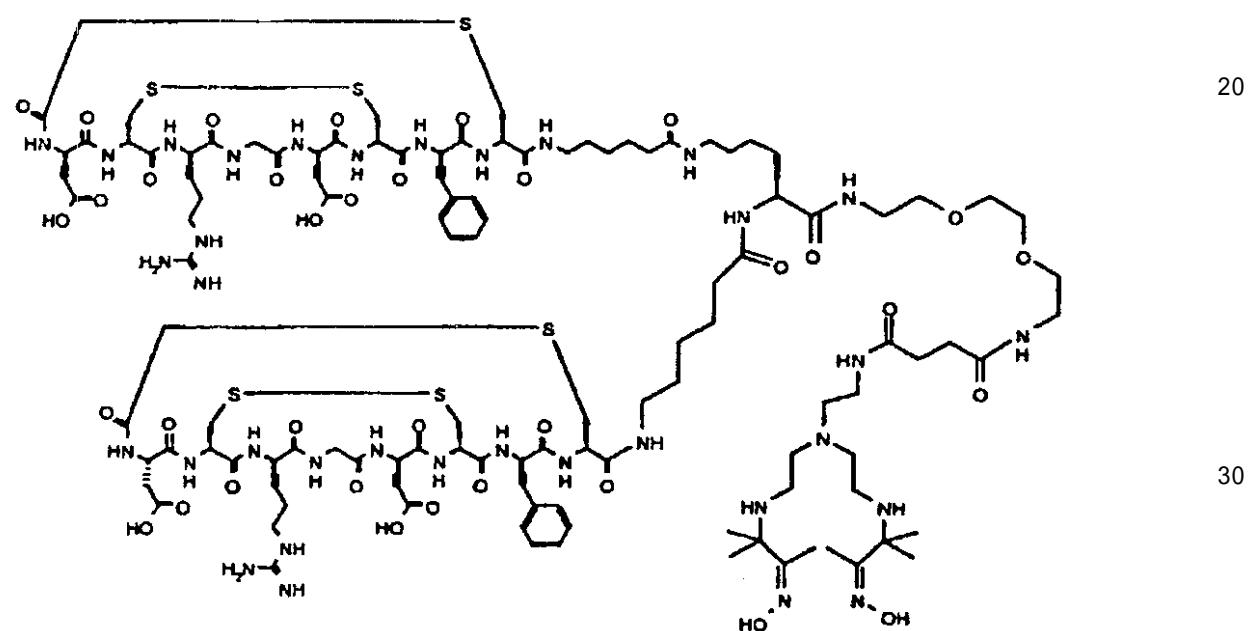
化合物 VI

【化 1 2】

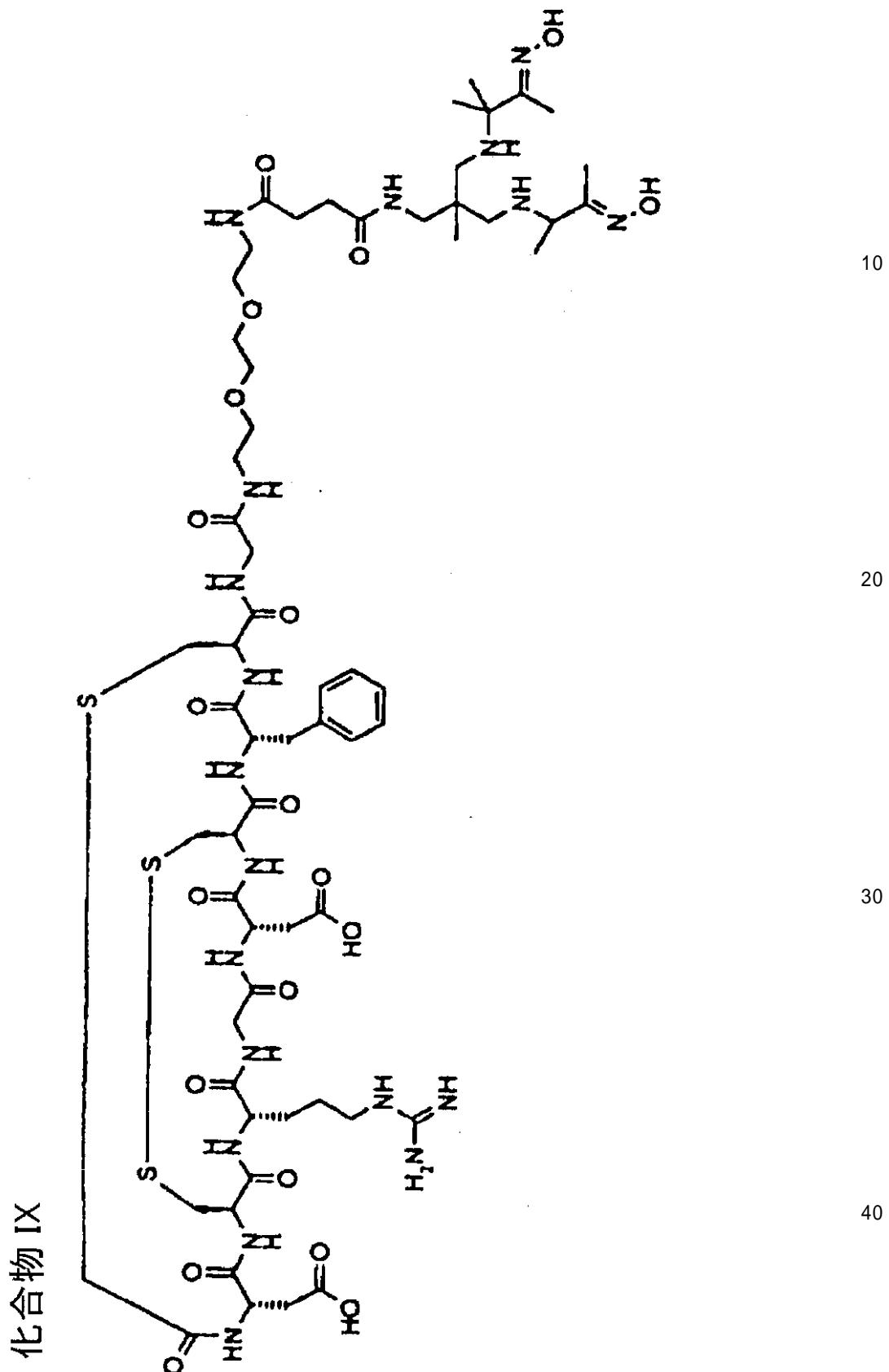
化合物 VII



化合物 VIII



【化 1 3】



ここで、化合物Vおよび化合物VIはテクネチウムのラベル付けに好適であり、化合物II  
Iはヨードの放射性同位体をラベル付けされ得、化合物IIIはヨードの放射性同位体の  
ラベル付けに好適なチロシン残基を有する。化合物VI Iは、アルギニンおよびフェニル  
アラニン残基が各々、ベクター構成要素の酵素安定性を増加させるN - メチルアルギニン

およびナフチルアラニンで置換されるベクター-キレート共役を含む。化合物Ⅴは、ヨードの放射性ラベル付けに、フェニルアラニンの代わりにチロシンを含み、C-末端グリシンは除去され、カルボキシペプチダーゼによるベクターの分解を減少させるためにアミド結合により酸官能基が置換されている。

【0043】

規定される式Ⅰは1又は複数のベクター(Ⅴ)を含む。

【0044】

ここで、 $X_1$ は結合、または1、2、3、4又は5のアミノ酸残基を表し、ここでアミノ酸残基は各々独立して任意に前記薬剤の薬物動態もしくは血液クリアランス速度を適切に変更する官能基側鎖で誘導され、

10

$X_{2-6}$ は式Ⅰにおいて規定した通りであり、

$X_7$ は1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のアミノ酸残基を表し、もしくは存在せず、

$X_8$ は存在しない。

【0045】

多くの場合において、ベクターⅤにおけるアミノ酸はL-形態であることが好ましい。しかしながら、本発明におけるいくつかの態様においては、ベクターⅤにおける1、2、3又はそれ以上のアミノ酸は好ましくはD-形態である。かかるD-形態アミノ酸の包含は、ベクターの血清安定性に関して重大な影響を有し得る。 $X_1$ の位置にD-チロシンを有するベクターに関して特に参照される。

20

【0046】

本発明によると、式Ⅰに規定されるアミノ酸残基のいずれかは、好ましくは天然に存在するアミノ酸を表し、独立にD又はL立体配座である。

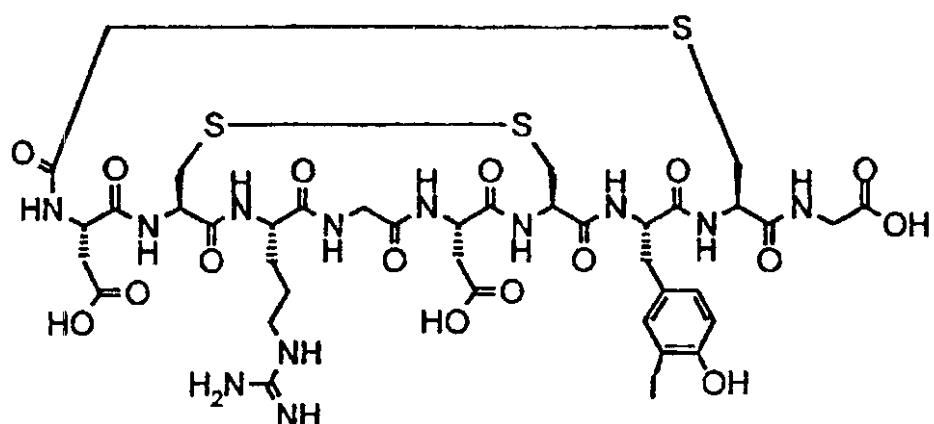
【0047】

化合物Ⅱ～ⅤⅡは、好ましくは以下に示すような立体特異性配座を有する。

【0048】

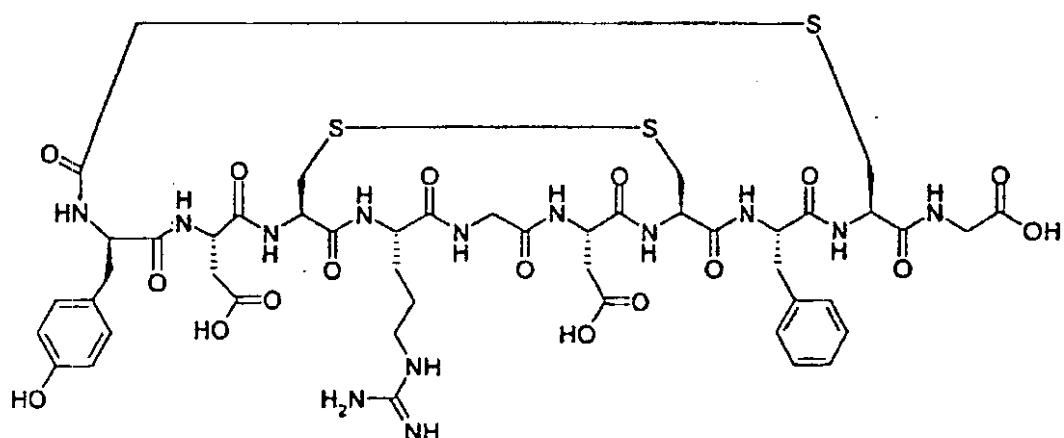
【化14】

化合物 IIa



10

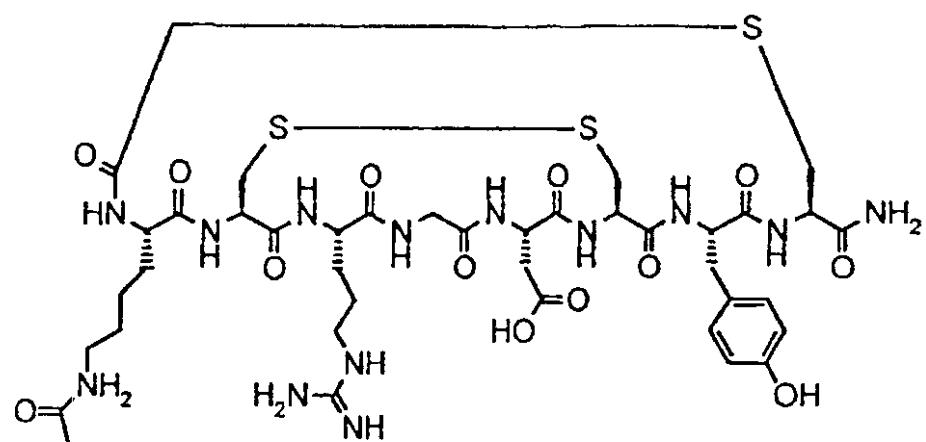
化合物 IIIa



20

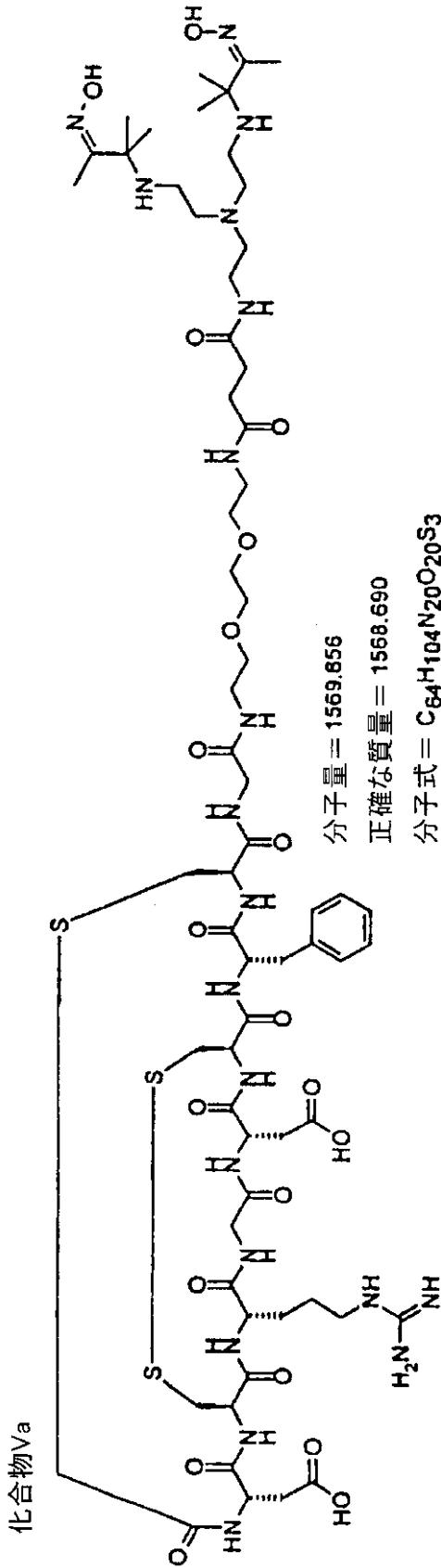
30

化合物 IVa



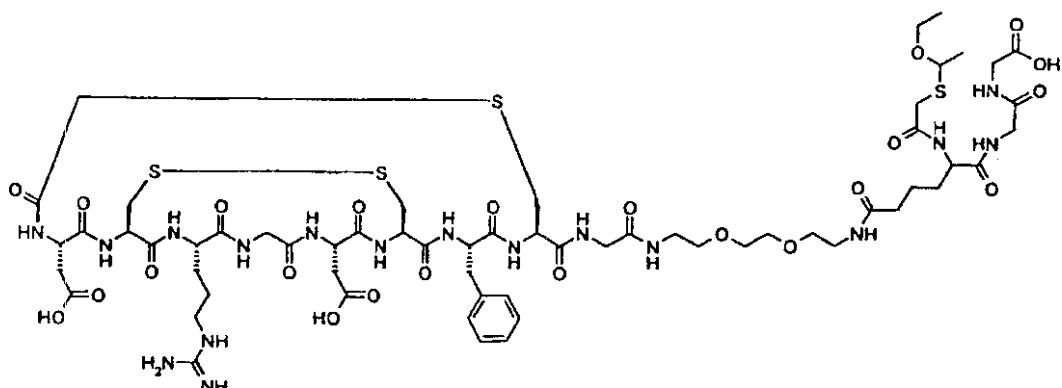
40

【化15】



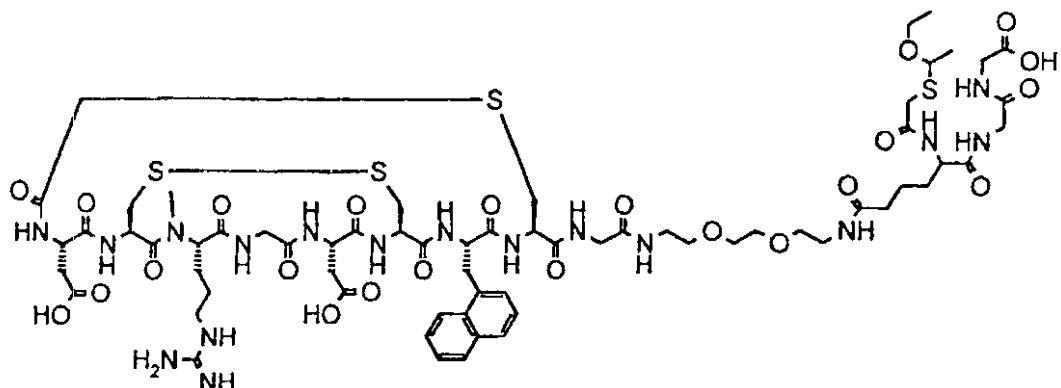
【化16】

## 化合物 VIa



10

## 化合物 VIIa



20

本発明の化合物のいくつかは、高親和性 RGD ベースのベクターである。本明細書において用いる用語「高親和性 RGD ベースのベクター」とは、v 3インテグリンに関する競合結合測定法において、100 nM 未満、好ましくは 10 nM 未満、最も好ましくは 5 nM 未満の  $K_i$  を有する化合物を言い、そこで  $K_i$  値は公知の高親和性リガンドエチスタチン (echistatin) との競合により決定された。このような競合測定の実行は、当該分野において周知である。

30

## 【0049】

本発明はまた、1又は2以上の薬学的に許容される補助薬、賦形剤又は希釈剤と共に、一般式(I)の化合物またはその塩を有効量(例えば、インヴィヴォで像をつくる際に像コントラストを増強するために有効な量)含有する医薬組成物を提供する。

40

## 【0050】

本発明は更に、1又は2以上の薬学的に許容される補助薬、賦形剤又は希釈剤と共に、一般式(I)の化合物、又はその酸添加塩を有効量含有する、疾患の治療のための医薬組成物を提供する。

## 【0051】

上述した通り、式Iの化合物はベクター、リンカーおよびリポーター部を有し得る。リンカー部は1つのベクターを1つのリポーターに結合する役割を果たし得、あるいは1より多くのベクターおよび/または1より多くのリポーターと一緒に結合する役割を果たし得る。同様に、リポーター又はベクターは1より多くのリンカーに結合され得る。この方法における複数のリポーター(例えば1ベクターに連結した数個のリンカー-リポーター部)の使用は、造影剤の検出性を増加させることを可能とし得(例えばその放射性不透明度

50

、エコー発生性、リラキシビティ (relaxivity) を増加させることによる）、あるいは 1 より多くの像形成モダリティにおいて検出されることを可能とし得る。この方法における複数のベクターの使用は、例えば、造影剤のターゲット効率を増加させ得、あるいは造影剤 / 治療薬が 1 よりも多くのサイト（例えば異種受容体を有する薬剤につき異なった受容体）をターゲットとすることを可能とし得る。

【 0 0 5 2 】

生物分解性リンカーおよび生物ポリマーを含む、幅広いリンカーを使用し得る。

【 0 0 5 3 】

造影剤のリンカー構成要素は、最も単純なところにおいて、ベクターおよびリポーター部間の結合である。しかしながら、より一般的にはリンカーは、1 又は 2 以上のベクターと 1 又は 2 以上のリポーターとを電子対を共有して、あるいは電子対を共有せず結合しているモノ - 又はマルチ分子骨格構造（例えば、直線状、環状、枝分かれ状又は網状の分子構造）であって、電子対を共有して、あるいは電子対を共有せず結合している（例えば、同等に結合している）、もしくはかかる部分をカプセルに入れ、とらえ、あるいはしっかりと固定して内部に組み込まれた、又は付属性基を有する分子構造を提供し得る。本発明の一つの好ましい態様において、式中、1 又は複数のアミノ酸が個々のリンカー構成要素の一部である式 I の化合物が提供される。

10

【 0 0 5 4 】

このように、リポーターユニットと所望のベクターとの結合は、電子対を共有した、あるいは電子対を共有せず結合する手段により達成され得、通常、リポーターおよび / またはベクターに位置する 1 又はそれ以上の官能基を有する相互作用を含む。本目的のために使用され得る化学的反応性官能基の例としては、アミノ、ヒドロキシリ、メルカブト基、カルボキシリ、およびカルボニル基と共に、炭水化物基、ビシナルジオール、チオエーテル、2 - アミノアルコール、2 - アミノチオール、グアニジニル、イミダゾリルおよびフェノール基が含まれる。

20

【 0 0 5 5 】

リポーターおよびベクターの電子対を共有するカップリングは、故に係る官能基と反応することが可能な反応性部分を含む結合剤（linking agent）の使用に影響され得る。

【 0 0 5 6 】

リポーターおよび / またはベクター中の官能基が所望により反応に先立ち他の官能基に変換され得ることは理解され得る。

30

【 0 0 5 7 】

膜挿入の媒介となり得る構成要素を含むペプチド、リポ - オリゴ糖類又はリポペプチドリンカーにカップリングされるベクターもまた有用となり得る。

【 0 0 5 8 】

追加の結合物質を添加することなく直接的な電子対を共有する二つの反応性化学性基の結合を引き起こす（例えば、カルボジイミドを用いて、あるいは酵素的に引き起こされたアミド結合の形成）、いわゆるゼロ長（zero-length）結合剤は、所望により本発明において使用され得、該結合剤は、例えば電子対を共有しないリポーター - ベクター結合を引き起こすビオチン / アビジン系のような試薬であり得、また静電気的相互作用を引き起こす試薬であり得る。

40

【 0 0 5 9 】

しかしながら、最も一般的には、該結合剤はスペーサー構成要素により接続された 2 又はそれ以上の反応性部（例えば、上述したような）を含有し得る。かかるスペーサーの存在により、二官能リンカーが特定の官能基と一分子内でもしくは異なる二つの分子間で反応することを可能とし、これによりこれら二つの構成要素間ににおける結合が生成し、リポーター - ベクター共役への外因性リンカー誘導物質がもたらされる。結合剤における反応性部は同じであってもよいし（ホモ二官能試薬）、異なっていてもよく（ヘテロ二官能試薬又は、ヘテロ多官能試薬（いくつかの異なる反応性部が存在する。））、分子内又は分子間のいずれかにおいて、いくつかの化学種間における電子対を共有する結合をもたらし得

50

る多様性のあるポテンシャル試薬を提供する。

**【 0 0 6 0 】**

結合剤によりもたらされる外因物質の性状は、ターゲット能および最終生成物の一般的安定性に重大な関係を有し得る。従って、化学結合を起こしやすい結合を導入することが好ましく、例えば生物分解性又は化学的感度のよい、もしくは酵素による結合開裂サイトを包含するスペーサーアームを含むことができる。あるいは、該スペーサーはポリマー成分を含有し得、該ポリマー成分は、例えば界面活性剤として作用し試薬の安定性を強化するものであることができる。スペーサーはまた反応性部分（例えば上述したような表面架橋結合を強化するもの）を含むことができる。スペーサー構成要素はまた、デキストラン、好ましくはポリ（エチレングリコール）（一般的に P E G と言われる）等の高分子構造を含有し得る。スペーサー構成要素に加えて、P E G はまた、ベクターのインヴィヴォにおける特性を修正するために用いられ得る。10

**【 0 0 6 1 】**

他の典型的スペーサー構成要素は、酵素による結合開裂サイトを含み得、又は含まない、構造多糖類、貯蔵多糖類、ポリアミノ酸とそのメチル並びにエチルエステル、ポリペプチド、オリゴ糖類およびオリゴヌクレオチドを含む。

**【 0 0 6 2 】**

好ましい結合基は、以下から選択される（但し、これらは限定するものではない。）ベクター反応性基から誘導される。

**【 0 0 6 3 】**

ベクターにおいて、カルボキシル、アルデヒド、アミン（N H R）、アルコール、メルカプト基、活性メチレン等と直接的に反応し得る基、例えば活性ハロゲン含有基、ベクター反応性基を含む修飾されたベクター分子、すなわち、例えばベクターを酸化してアルデヒド又はカルボン酸にするなど、反応性基を含むように修飾された反応性基を含むベクターと容易に反応し得る基、および架橋剤を使用することにより、反応性基を含むベクターに、あるいは上記のように修飾されたベクターに結合され得る基、である。20

**【 0 0 6 4 】**

好ましい有用な結合剤は、ピース・ケミカル・カンパニー・イミューノテクノロジー・カタログ - プロテイン・モディフィケーション・セクション（Pierce Chemical Company Immunochemistry Catalog - Protein Modification Section），1995および1996に挙げられているような、様々なヘテロ二官能架橋剤から誘導される。30

**【 0 0 6 5 】**

上記に加えて結合剤はまた、全部または一部において、ヌクレオチド及びヌクレオチド残基の相補的構造を含有し又は誘導され得、天然に存在するもの及び修飾されたもの双方であり、好ましくは異物に結合したオリゴヌクレオチド構造である。

**【 0 0 6 6 】**

本発明において使用される結合剤は、通常、ベクターとリポーター、又はリポーターとリポーターとの、ある程度の特異性を有する結合をもたらし得、また治療学的に活性な 1 又は 2 以上の活性剤を結合するためにもまた使用され得る。40

**【 0 0 6 7 】**

本願の内容において用いられ得るリンカーの更なる例は、W098/47541 の第 32 頁～第 54 頁に記載されており、参照によりこれらの開示のすべてを取り込む。その結果、上記該当頁に開示された各々かつすべてのリンカーあるいはその部分は、本明細書に開示された発明の一部であるとみなされる。

**【 0 0 6 8 】**

本発明の造影剤におけるリポーター部は、インヴィヴォにおける診断的像形成処置において直接的に、または間接的に検出することが可能なすべての部分であり得る。好ましくは、造影剤は、一つのリポーターを含む。好適な部分は、検出可能な放射線を発する、または該放射線の発生を引き起こし得る部分（例えば、放射性減衰、蛍光性励起、スピニ共鳴50

励起等による）、局部的な電磁界に作用する部分（例えば、常磁性体、超超磁性体、フェリ磁性体又は強磁性体）、放射線エネルギー（例えば、発色団又は発蛍光団）を吸収し又は発散する部分、粒子（気泡を含有する液体を含む）、重元素並びにその化合物、検出可能な物質を発生する部分である。

#### 【0069】

診断的像形成様式により検出可能な極めて広範囲の物質が当該分野において知られており、リポーターは用いられる造形性様式に従い選択されうる。従って、例えば、超音波像形成においては、音波発生物質又は音波発生物質を発生することが可能な物質が通常は選択され得る。ベクターは、ガスが充填された微少な泡に取り込まれるために、リンカーを介して好適な脂質リポーター／キャリアーに連結され得る。このような微少な泡は、超音波造形性をターゲットとするために用いられ得る。X線像形成において、リポーターは概して重原子（例えば、原子量38以上）であるか、または重原子を含み得、MR像形成において、リポーターはゼロでない核スピン同位体（例えば<sup>19</sup>F）か、あるいは不対電子を有する物質であり得、故に常磁性、超超磁性、フェリ磁性又は強磁性特性を有し得、光像形成において、リポーターは光散乱体（例えば、彩色された、又は彩色されていない粒子）、光吸収体、又は光発生体であり得、磁気測定像形成において、リポーターは検出可能な磁気特性を有し得、電気的インピーダンス像形成において、リポーターは電気的インピーダンスに影響し得、シンチグラフィー、SPECT、PET等において、リポーターは放射性核種であり得る。

#### 【0070】

好適なリポーターの例は、診断的像形成論文から広く知られており、例えば磁性を帯びた鉄酸化物粒子、気泡を含有するX線造影剤、キレート化された常磁性金属（例えばGd、Dy、Mn、Fe等）等である。

#### 【0071】

一般的に述べられているように、リポーターは（1）キレート化可能な金属又は多原子からなる金属含有イオン（すなわち、TcO等）であって、前記金属は高原子番号金属（例えば、原子番号が37より大きい）である；常磁性体（例えば、遷移金属又はランタニド）；又は放射性同位体である、（2）電子対を共有して結合した非金属種であって、不対電子サイトである（例えば、遊離基中の酸素又は炭素）；高原子番号の非金属；又は放射性同位体、（3）高原子番号の原子を含有する、又は協同磁性作用を示す（例えば超常磁性体、フェリ磁性体、又は強磁性体）、又は放射性核種を含有する、多原子クラスター又は結晶、（4）発色団（該発色団に蛍光性又は燐光性である種が含まれる）、例えば無機又は有機構造、特に複合金属イオン又は広範囲に非局在化された電子系を有する有機基、又は（5）例えば広範囲に非局在化された電子系により、特性を変化させる電気的インピーダンスを有する構造又は基、である。

#### 【0072】

特に好ましいリピーター基の例を以下においてより詳細に記載する。

#### 【0073】

キレート化された金属リピーターは、好ましくは、金属放射性核種、常磁性金属イオン、蛍光性金属イオン、重金属イオン及びクラスターの群から選択される。

#### 【0074】

好ましい金属放射性核種には、<sup>90</sup>Y、<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>47</sup>Sc、<sup>67</sup>Ga、<sup>51</sup>Cr、<sup>177</sup>mSn、<sup>67</sup>Cu、<sup>167</sup>Tm、<sup>97</sup>Ru、<sup>188</sup>Re、<sup>177</sup>Lu、<sup>199</sup>Au、<sup>203</sup>Pb及び<sup>141</sup>Ceが含まれる。

#### 【0075】

好ましい常磁性金属イオンには、遷移金属及びランタニド金属のイオンが含まれ（例えば原子番号6～9、21～29、42、43、44、又は57～71）、特にはCr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb及びLuであり、より好ましくはMn、Cr、Fe、Gd及びDyであり、特に好ましくはGdである。

10

20

30

40

50

## 【0076】

金属イオンは、望ましくはリンカー基上又は粒子内もしくは粒子上（例えば気泡もしくは、気孔又は気孔を有しない無機もしくは有機固体）のキレート基によりキレート化され、該キレート基として、特には直線状、大環状、テルピリジン（terpyridine）及びN<sub>2</sub>S<sub>2</sub>キレートであり、例えばDTPA、DTPA-BMA、EDTA、DO3A及びTMTがある。好適なキレート基の更なる例が、US-A-4647447, WO89/00557, US-A-5367080, US-A-5364613等に記載されている。

## 【0077】

リンカー基又は粒子はそのようなキレート基を1又は2以上含み得、所望により1以上の金属種により金属付加される（例えば異なる像形成様式において検出可能なりポーターを提供するために）。 10

## 【0078】

キレート試薬を金属付加する方法は当業者が通常行う程度の技術である。3つの一般的な方法のいずれかにより金属をキレート部に含ませることができる：直接的な取り込み、テンプレート合成および／または金属交換反応であり、直接的な取り込みが好ましい。

## 【0079】

従って、金属イオンは、例えば、単にさらすのみにより、あるいはキレート試薬を含む部分の水溶液を、好ましくはpHが約4～約11の範囲である水溶液中に含有される金属塩と混合することにより、容易にキレート試薬と複合化され得ることが好ましい。前記塩はいずれの塩でもよいが、例えばハロゲン塩のような金属の水可溶性塩であり、より好ましくは、金属イオンがキレート試薬と結合するのを妨げない塩から選択される。キレート試薬含有部分は、好ましくはpHが約5～約9の間である水溶液中にあり、より好ましくはpHが約6～約8である。最適なpHを得るために、キレート試薬含有部分はクエン酸塩、アセテート、リン酸塩及びホウ酸塩等のバッファー塩と共に混合され得る。好ましくは、バッファー塩は、その後に起こる金属イオンとキレート試薬との結合を妨げないよう選択される。 20

## 【0080】

診断的像形成において、ベクター-リンカー-リポーター(V)<sub>k</sub>LR構造は、好ましくは、キレート試薬に対して金属放射性核種イオンを、診断的像形成の適用において有効な比率で含有する。好ましい態様において、キレート試薬1モル当たりの金属イオンのモル比は約1:1000～約1:1である。 30

## 【0081】

放射線療法への適用において、(V)<sub>k</sub>LRは、好ましくは、キレート試薬に対して金属放射性核種イオンを、治療上の適用において有効な比率で含有する。好ましい態様において、キレート試薬1モル当たりの金属イオンのモル比は約1:100～約1:1である。例えば、放射性核種はSc、Fe、Pb、Ga、Y、Bi、Mn、Cu、Cr、Zn、Ge、Mo、Ru、Sn、Sr、Sm、Lu、Sb、W、Re、Po、Ta及びTlの放射性同位体から選択され得る。

## 【0082】

好ましい放射性核種には、<sup>44</sup>Sc、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>212</sup>Pb、<sup>68</sup>Ga、<sup>90</sup>Y、<sup>153</sup>Sr、<sup>212</sup>Bi、<sup>186</sup>Re及び<sup>188</sup>Reが含まれる。これらのなかで、<sup>90</sup>Yが特に好ましい。これらの放射性同位体は原子でもよいが、好ましくはイオンである。 40

## 【0083】

以下の同位体、又は対になっている同位体は、放射性同位体を識別するための方法論あるいはキレート化剤を変更することなく、像形成と治療の双方において使用することができる：<sup>47</sup>Sc<sub>21</sub>；<sup>141</sup>Ce<sub>58</sub>；<sup>188</sup>Re<sub>75</sub>；<sup>177</sup>Lu<sub>71</sub>；<sup>199</sup>Au<sub>79</sub>；<sup>47</sup>Sc<sub>21</sub>；<sup>131</sup>I<sub>53</sub>；<sup>67</sup>Cu<sub>29</sub>；<sup>131</sup>I<sub>53</sub>及び<sup>123</sup>I<sub>53</sub>；<sup>188</sup>Re<sub>75</sub>及び<sup>99m</sup>Tc<sub>43</sub>；<sup>90</sup>Y<sub>39</sub>及び<sup>87</sup>Y<sub>39</sub>；<sup>47</sup>Sc<sub>21</sub>及び<sup>44</sup>Sc<sub>21</sub>；<sup>90</sup>Y<sub>39</sub>及び<sup>123</sup>I<sub>53</sub>；<sup>146</sup>Sm<sub>62</sub>及び<sup>153</sup>Sm<sub>62</sub>；および<sup>90</sup>Y<sub>39</sub> 50

<sub>9</sub> 及び<sup>1 1 1</sup> I n<sub>4 9</sub>。

【0084】

キレート部はキレートの根幹となる官能基を介して、あるいはキレートの1又はそれ以上の金属が配位結合している基の利用により、又は酸キレートとアミン、もしくはヒドロキシルを有するリンカー根幹との間のエーテル結合の形成により、連結され得、例えばPCT/EP 96/ 00565の、ポリリジン - ポリDTPA、ポリリジン - ポリDOTA及びいわゆる拡大ポリキレート(magnifier polychelant)である。かかる部分は1又は2以上のベクター基と直接的に(例えば、ポリキレートリンカーにおけるアミン、酸又はヒドロキシル基を利用する)、またはおいてモノキレートリンカーについて上記したような二官能リンカーアイソトープを介して共役され得る。

10

【0085】

粒状(あるいは分子アグリゲート、例えば小胞)のリンカーによりキレート化された種において、キレートは例えば連結していないモノ、又は粒子内に包含されるポリキレート(Gd-DTPA - BMA又はGd-HP - DOTA等)であり得、または電子対を共有した結合により、もしくは小胞の膜を有するモノ/ポリキレート上のアンカー基(例えば、脂肪親和性基)の相互作用のいずれかにより、粒子と共に役したモノ又はポリキレートであり得る。(PCT/GB 95/02378の実施例を参照のこと。)

好ましい非金属原子のリポーターには、<sup>1 2 3</sup>I、<sup>1 3 1</sup>I及び<sup>1 8</sup>F等の放射性同位体のほか、ゼロでない核スピン原子(例えば<sup>1 9</sup>F)、並びに重原子(例えばI)が含まれる。

20

【0086】

かかるリポーター(好ましくは、複数のリポーターであり、例えば2~200)は、リンカーアイソトープの根幹と、従来の化学合成技術を用いて直接的に、もしくは支持基(例えばトリヨードフェニル基)を介し、電子対を共有して結合され得る。

【0087】

本発明の一態様において、ヨウ素又はフッ素の放射性同位体の使用が具体的に検討された。例えば、仮にベクター又はリンカーが、反応を形成する電子対共有結合においてヨウ素又はフッ素により化学的に置換され得る置換基(例えば、ヒドロキシフェニル又はp-ニトロベンゾイルを含む置換基)を含有する場合に、かかる置換基はヨウ素又はフッ素各々の放射性同位体を用いて当業者に周知の方法によりラベル付けされ得る。これらの種は、治療においても、また診断的像形成における適用においても使用され得る。同時に、同じベクター-リンカーアイソトープ試薬に連結された金属もまた、治療においても、また診断的像形成における適用においても使用され得る。

30

【0088】

上述した金属キレートに関し、かかる金属原子リポーターはリンカーアイソトープに連結され得、あるいは粒状リンカーアイソトープ内又は粒状リンカーアイソトープ上(例えば、小胞内)におかれ得る(WO 95/ 26205及びGB 9624918.0参照)。

【0089】

金属リポーターに連結した上記タイプのリンカーアイソトープは、非金属原子リポーターのために、非金属原子リポーター又はキレート基の一部又は全部に代わるリポーターを有する基と共に使用され得る。

40

【0090】

本発明において好ましい(V)<sub>k</sub>L R試薬はリポーターに直接的に又は間接的に、例えば、電子対を共有して結合されたヨード放射性同位体を用いて、直接的に又は有機リンカーアイソトープを介して連結された、もしくは粒状リポーター又はリンカーアイソトープに連結された金属キレートと共に、連結した受容体ターゲットベクターを有し得る。例えば、超常磁性結晶(例えば、PCT/ GB97/ 00067に開示されているように、任意にコートされている。)、又は小胞。ミセル又はリボソームを含有するヨード化物造影剤。

【0091】

本発明の好ましい態様は、一般式(I)の放射性同位体を用いてラベル付けされた試薬に

50

係わり、特には腫瘍の像形成における使用に関するものである。

【0092】

本発明の診断的試薬は特別な像形成技術を用いて記載されたコントラストを生ずるのに充分な量をもって像を形成するために患者に投与され得る。リポーターが金属の場合においては、通常、患者の体重1キログラム当たりキレート化された像形成金属イオン $0.001 \sim 5.0\text{ mmol}$ が一回分の投与量として適切なコントラスト増強を達成するために効果的である。リポーターが放射性核種の場合においては、通常、 $0.01 \sim 100\text{ mCi}$ の投与量が、体重 $70\text{ kg}$ に対して充分であり得る。

【0093】

治療に使用するための本発明の化合物の投与量は、治療状況に依存するが、一般的には、 $1\text{ pmol/kg} \sim 1\text{ mmol/kg}$ 体重のオーダーであり得る。

10

【0094】

従って、本発明による化合物は、投与のために、生理的に許容されるキャリアー又は賦形剤を用い、当該分野における技術レベルの方法において充分に調製されうる。例えば、本発明の化合物は、任意に薬学的に許容される賦形剤と共に、水溶性媒体に懸濁され、あるいは溶解され得、次いで得られた溶液又は懸濁液は攪拌される。

20

【0095】

式Iの化合物は、疾患の治療において治療学的に効果的であり、同様にインヴィヴォにおいて像を形成する際に検出可能であり得る。従って、例えば、リポーター部上のベクターは、治療上の効果（例えば放射性核種リポーターの放射線療法効果の効き目による）、発色団（又は発蛍光団）リポーターの光力学的治療における効果、あるいはベクター部の化学療法効果を有し得る。

20

【0096】

治療学的組成物の製造における、並びに、ヒト又はヒト以外の動物の身体における治療又は予防的治療、好ましくは癌の治療方法における式Iの化合物の使用は、本発明の更なる側面を表すものと考えられる。

【0097】

本発明の内容において使用され得るリポーターの更なる例としては、WO 98/ 47541の63～66頁、70～86頁に開示があり、この開示のすべては本明細書において参照により取り込まれる。その結果、上記該当頁に開示された各々かつすべてのリンクあるいはその部分は、本明細書に開示された発明の一部であるとみなされる。

30

【0098】

更なる側面から見ると、本発明は、前記造影剤の生体対象への投与と、少なくとも前記対象の一部における像の発生を含む診断方法において使用するための造影剤の製造における式Iの化合物の使用を提供する。

【0099】

更に別の側面から見ると、本発明は、生きたヒトまたは非ヒト動物（好ましくは哺乳類または鳥類）対象の画像を生成する方法であって、造影剤を前記対象に投与する（例えば血管系の中に）ことと、例えば、X線、MR、超音波、シンチグラフィー、PET、SPECT、電気的インピーダンス、光、または磁気撮像施設により、前記造影剤が分布された前記対象の少なくとも一部の画像を生成させることとを含み、前記造影剤として式Iの薬剤が使用される方法を提供する。

40

【0100】

更に別の側面から見ると、本発明は、式Iで定義した化合物を含む造影剤組成物を策に投与されたヒトまたは非ヒト動物対象の、向上した画像を生成する方法であって、前記対象の少なくとも一部の画像を生成することを含む方法を提供する。

【0101】

更なる側面から見たとき、本発明は、癌、好ましくは血管新生に関連する症状と戦う薬物を用いたヒトまたは非ヒト対象の治療効果をモニターする方法であって、前記対象に、式Iで定義された薬剤を投与すること、細胞受容体、好ましくは内皮細胞受容体、特に v

50

3受容体による前記薬剤の取り込みを検出することとを含み、前記投与および検出は、任意に且つ好ましくは、前記薬物での治療の前、最中および後に繰り返し行われる方法を提供する。

#### 【 0 1 0 2 】

更なる側面から見たとき、本発明は、式 I の薬剤を調製するための方法であって、ベクター V を、診断撮像法において検出可能な化合物またはキレート剤に接合することと、もし必要であれば、得られた接合体中に存在するキレート基を、診断撮像法において検出可能な金属イオンで金属化することとを含む方法を提供する。

#### 【 0 1 0 3 】

本発明の化合物は、全て既知の化学合成法を使用して合成することができるが、特に有用なのは、自動ペプチド合成機を用いた Merrifield の固相法 ( J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964) ) である。複数の架橋を含むベクターは、ベクターの最終折り畳み形態に関して曖昧さが存在しないように、示差的システイン保護基を使用して合成される。このペプチド類およびペプチドキレート類は、高性能液体クロマトグラフィー ( HPLC ) を使用して精製してもよく、またインピトロでのスクリーニングで試験する前に、質量スペクトル分析および分析的HPLCによって特徴付けしてもよい。

#### 【 0 1 0 4 】

#### 【 実施例 】

以下に示す実施例（これらは本発明を限定するものではない）により本発明を更に詳細に説明する。

#### 【 0 1 0 5 】

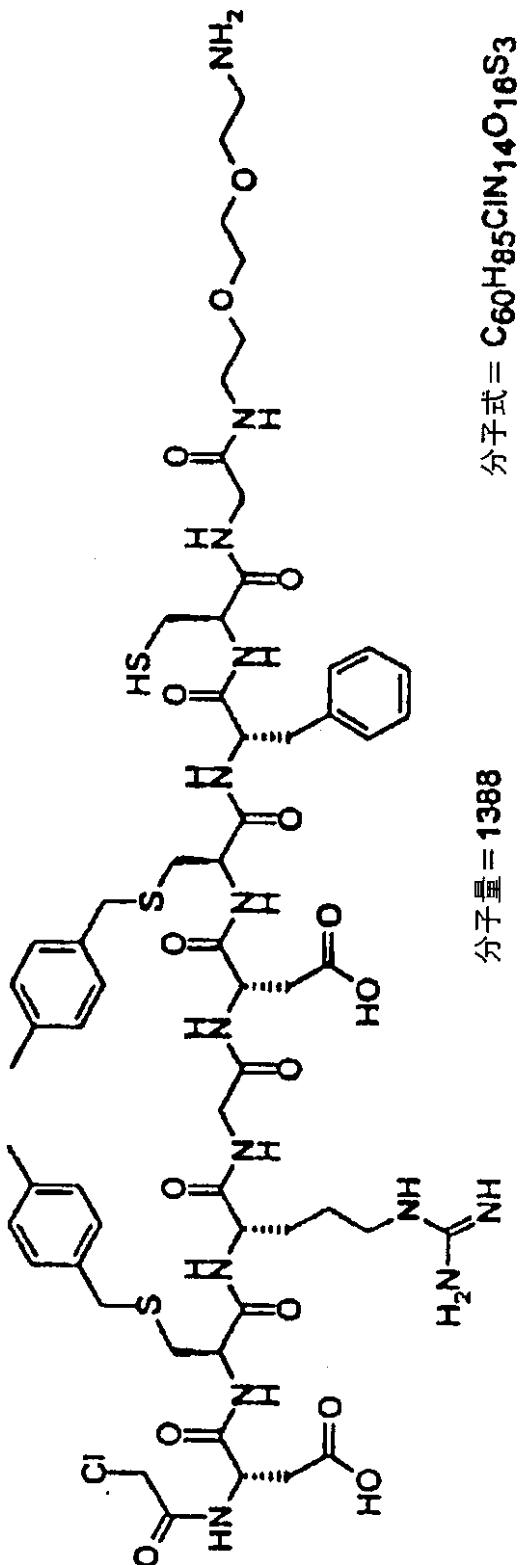
例 1：化合物 V1a の合成

1 a ) ClCH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys (MBzI) - Arg - Gly - Asp - Cys (MBzI) - Phe - Cys - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> の合成

#### 【 化 1 7 】

10

20



ペプチドを、O - ビス - (アミノエチル) エチレングリコールトリチル樹脂を出発物質として 0 . 25 mmol スケールにつき、1 mmol のアミノ酸とクロル酢酸カートリッジを用い、A B I 433 A 自動ペプチドシンセサイザーで合成した。アミノ酸とクロル酢酸をカップリング前に HBTU を用いて予め活性化した。TIS (5 %)、H<sub>2</sub>O (5 %)、及びフェノール (2 . 5 %) を含む TFA 中で、2 時間 20 分かけて樹脂からペプチド及び側鎖保護基 (MBzL を除く) を同時に除去した。

【 0106 】

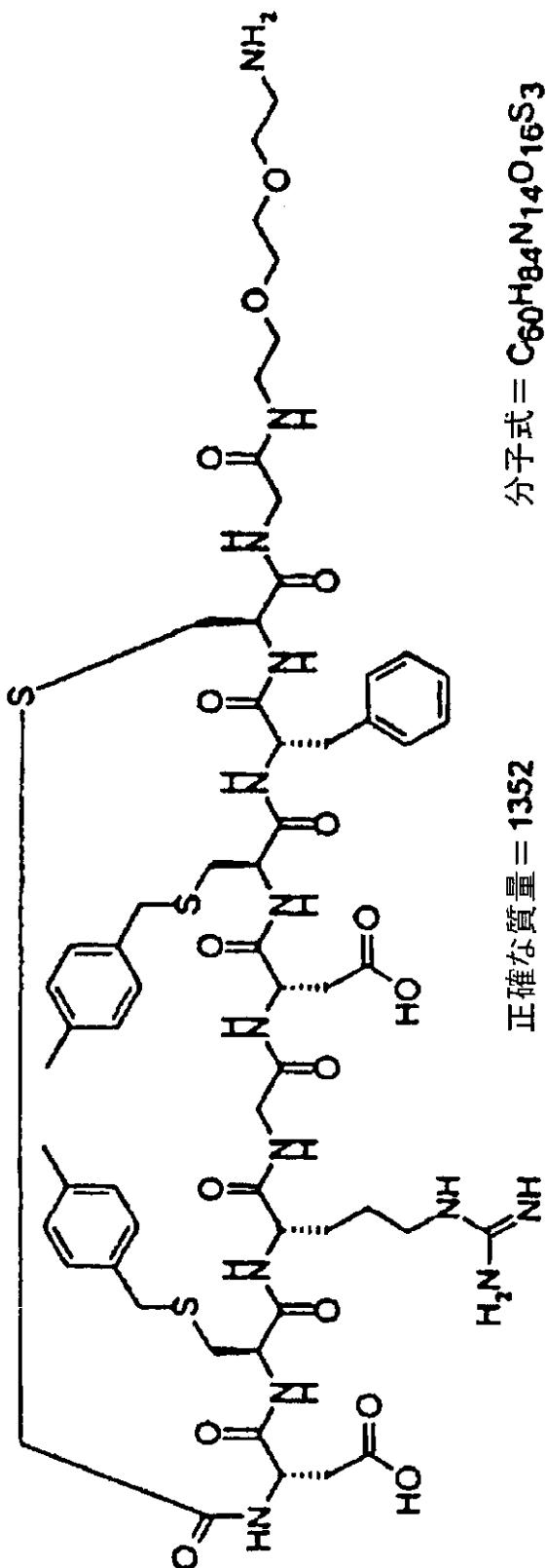
作業後、250 mg の粗ペプチドを得た (HPLC 分析 : 勾配、20 分間 5 ~ 50 % B、A

= H<sub>2</sub>O / 0 . 1% TFA 及び B = C H<sub>3</sub>C N / 0 . 1% TFA ; カラム、VYDAC C18218 TP54 ; 検出、UV 214nm ; 生成物保持時間、20 . 55分)。更に生成物の特性を、MALDI 質量分析法を用いて調べた。計算値 : M+H、1389、実測値 : 1392。

【0107】

1 b ) シクロ[ - CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys (MBzl) - Arg - Gly - Asp - Cys (MBzl) - Phe - Cys ] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> の合成

【化18】



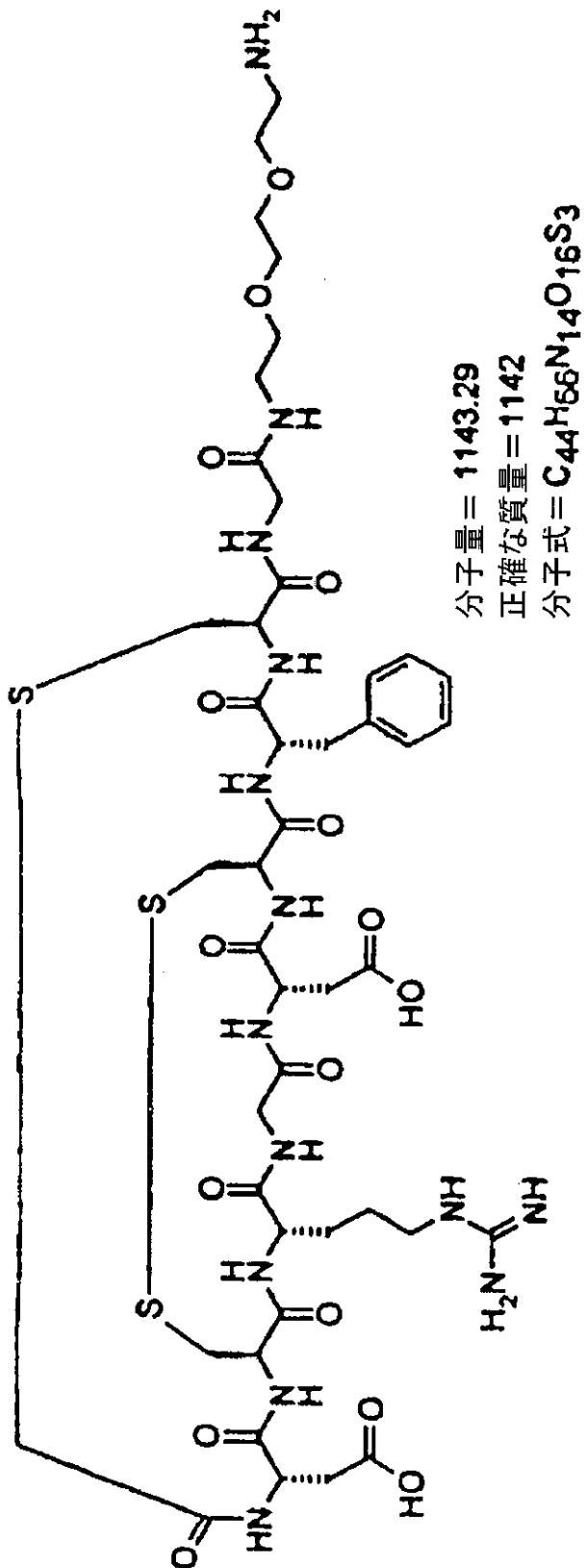
250 mgのCICH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys (MBzl) - Arg - Gly - Asp - Cys (MBzl) - Phe - Cys - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>を水 / アセトニトリル中に溶解した。アンモニア溶液を用いて混合溶液をpH 8に調整し、20時間攪拌した。凍結乾燥後、240 mgの粗ペプチドを得た (HPLC分析：勾配、20分間 5 ~ 50% B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA 及び B

= C H<sub>3</sub> C N / 0 . 1 % T F A ; カラム、VYDAC C18218TP54 ; 検出、UV 214nm ; 生成物保持時間、19.45分)。更に生成物の特性を、MALDI質量分析法を用いて調べた。計算値 : M+H、1353、実測値 : 1358。

【0108】

1 c ) [Cys<sup>2-6</sup>]シクロ[-CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>の合成

【化19】



10

20

30

40

100 mgのシクロ [- CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys (MBzI) - Arg - Gly - Asp - Cys (MBzI) - Phe - Cys ] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> を THA (10 ml) 中に溶解し、次いでこれをアニソール (200 μl)、DMSO (5 ml) 及び TFA (90 ml) の予め加熱された溶液に加えた。混合物を 60 度 60 分間攪拌し、次いで TFA を真空中で除去し、ジエチルエー

50

テルを添加してペプチドを沈澱させた。

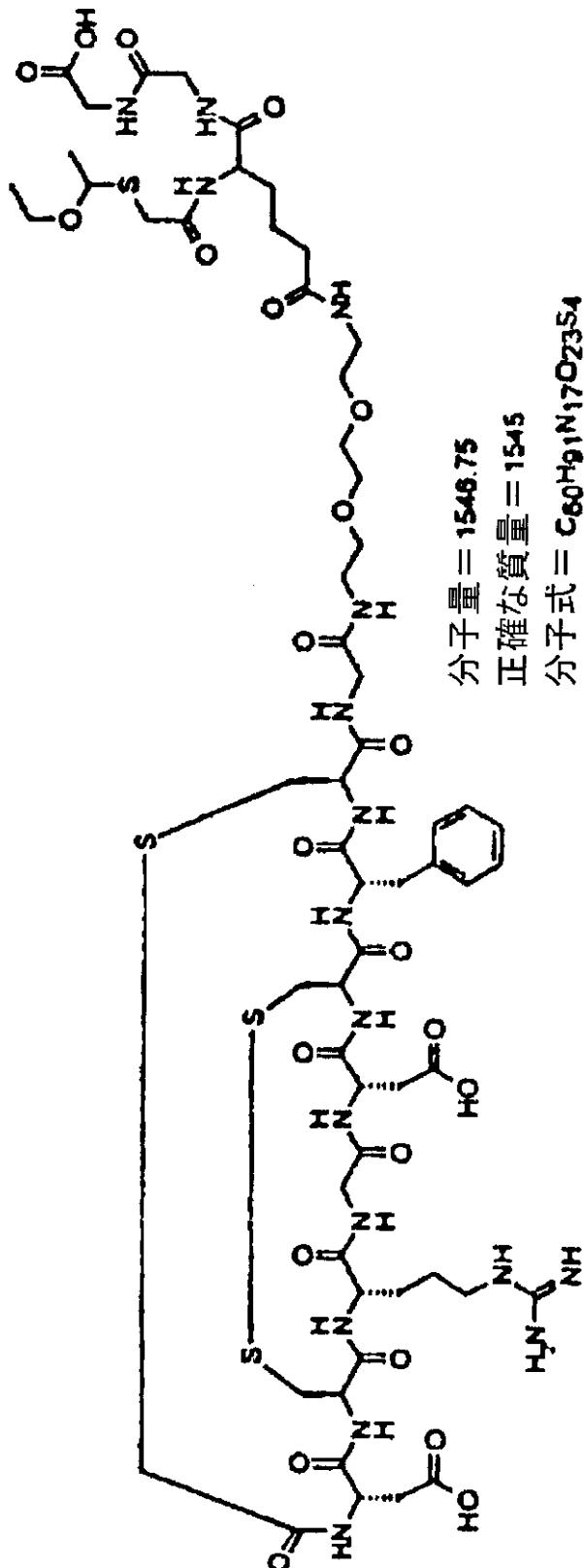
【0109】

HPLC (VYDAC C18 218TP1022 カラム) による予備的な精製を行った (流速 9 mL / minにおいて 40 分間、0 ~ 30% B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA 及び B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA)。凍結乾燥後、26 mg の純物質を得た (HPLC 分析: 勾配、0 ~ 35% B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA 及び B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA; カラム、VYDAC C18218TP54; 検出、UV 214nm; 生成物保持時間、14.33 分)。更に生成物の特性を、MALDI 質量分析法を用いて調べた。計算値: M+H、1143、実測値: 1148。

【0110】

1 d ) [Cys<sup>2-6</sup>] シクロ[CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> と N<sub>3</sub>S - アジパートキレートとの共役 - 化合物 V 1a:

【化20】



10

20

30

40

アセトニトリル（5ml）に溶解している6.5mgのN<sub>3</sub>S - アジパートキレート化活性エスチルを、D PBS（5ml、pH 7.4）に溶解する5.1mgの[Cys<sup>2-6</sup>]シクロ[CH<sub>2</sub>C(=O)ONH - Asp - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>に加えた。混合物を3日間攪拌した。

50

## 【0111】

HPLC (VYDAC C18 218TP1022 カラム)による予備的な精製を行った(流速 9 mL / minにおいて 40 分間、5 ~ 30 % B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1 % TFA 及び B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1 % TFA)。凍結乾燥後、4.3 mg の純物質を得た(HPLC 分析: 10 分、勾配、5 ~ 50 % B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1 % TFA 及び B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1 % TFA; カラム、Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 × 4.6 mm; 検出、UV 214nm; 生成物保持時間、6.55 分)。更に生成物の特性を、MALDI 質量分析法を用いて調べた。計算値: M+H、1150、実測値: 1546。

## 【0112】

1 e) 化合物 V 1a のテクネチウムラベル付け

10

窒素が充填された容器(vial)中に、水(50 μg)に溶解した化合物V1a(50 μg)、150 μL のグルコン酸ナトリウム溶液(6mL H<sub>2</sub>O に 25 mg)、100 μL の酢酸アンモニウム(pH 4.0、50 mM)、1mL の TcO<sub>4</sub> 溶液(500 MBq)及び 50 μL の SnCl<sub>2</sub> 溶液(100 mL H<sub>2</sub>O に 20 mg)を加えた。ITLC 及び HPLC による分析前に混合物を 75 °C において 20 分間加熱した。

## 【0113】

例 2: [Cys<sup>2-6</sup>]シクロ[CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> と Pn216 キレートとの共役(化合物 V a)

2 a) Pn216 キレートの合成

20

クロロ - ニトロソ中間体(3 - クロロ - 3 - メチル - 2 - ニトロソブタン)

2 - メチル - 2 - ブテン(18.5 mL)と硝酸イソアミル(19.5 mL)との混合物を攪拌し、-10 °C に冷却し、温度を 0 °C 以下に注意深く維持しながら塩酸(17.5 mL)を加えて濃縮した。反応物を当該温度で 30 分間攪拌した。生成した沈殿物を濾過して収集し、5 mL のエタノール(-20 °C)で 4 回洗浄し、真空中で乾燥することにより、白色固体のクロロ - 3 - メチル - 2 - ニトロソブタンを得た。

## 【0114】

2 b) Pn216 - (3,3,11,11 - テトラメチル - 7 - アミノエチル - 4,7,10, トリアザトリデカン - 2, 12 - ジオンジオキシム)

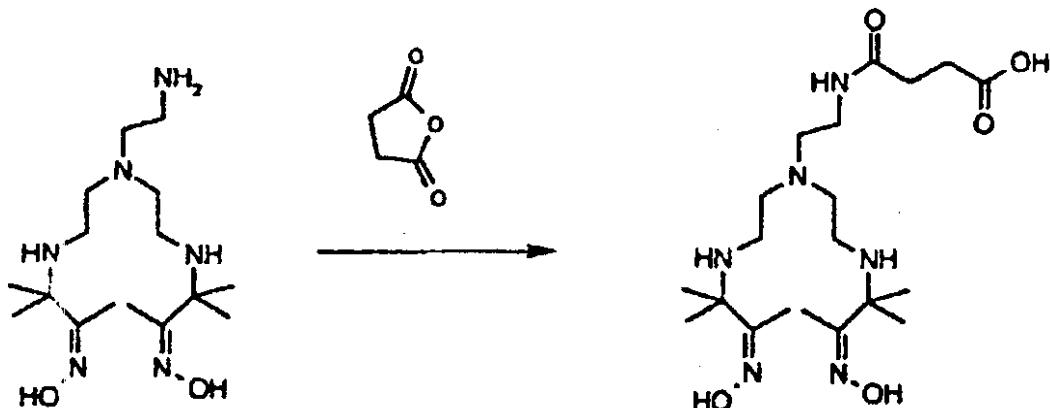
tris-(2 - アミノエチル)アミンのアセトニトリル溶液(20 mL)に、重炭酸ナトリウム(2.2 g、26 mmol)を加えた。3 - クロロ - 3 - メチル - 2 - ニトロソブタン(1.8 g、13 mmol)の乾燥アセトニトリル溶液を 0 °C においてゆっくり加えた。反応混合物を室温において 4 時間攪拌したままにし、次いで濾過した。濾液をアセトニトリルで洗浄し、該濾液を蒸発した。粗生成物をアセトニトリルに溶解し、HPLC により精製し、Pn216を得た。収率 0.88 g、19%。

30

## 【0115】

2 c) Pn216 - 琥珀酸中間体の合成

## 【化 21】



40

50

琥珀酸無水物 (100)

Pn216 (358)

テトラフルオロチオフェノール (182)

DCCl (206)

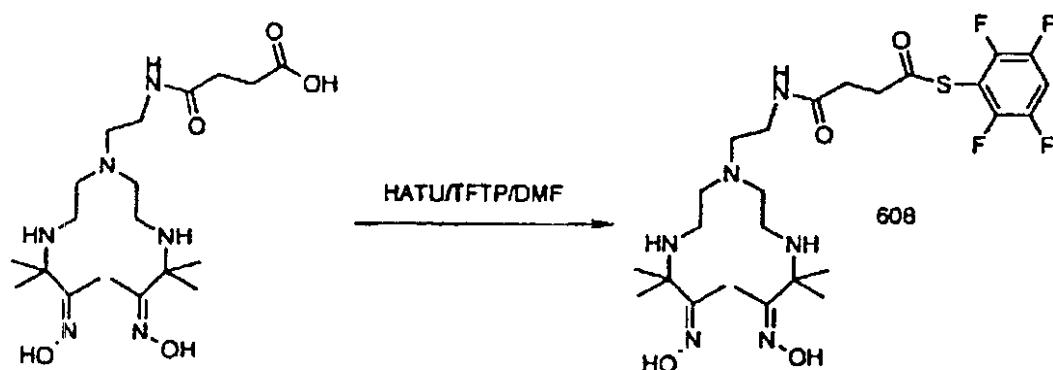
Pn216 (0.5 g、1.4 mmol) を DMF (5 mL) に溶解し、攪拌しながら DMF (10 mL) 中の琥珀酸無水物 (0.015 g、1.5 mmol) を分けて加えた。反応物をそのまま16時間攪拌し続け、所望の生成物への完全な変換を得た。続くHPLCクロマトグラフィーにおいて高収率で純酸を得た。

【0116】

2 d) Pn216 - 琥珀酸のテトラフルオロチオフェノールエステル誘導体の合成

10

【化22】



HATU (8.3 mg、0.022 mmol) および NMM (0.007 mL、0.066 mmol) を DMF (1.0 mL) 中の Pn216 酸 (10 mg、0.022 mmol) に添加した。混合物を5分間攪拌し、次いで TFTP (0.022 mmol、4 mg) を添加した。該溶液を30分間攪拌し、次いで反応混合物を 20% アセトニトリル / H<sub>2</sub>O (3 mL) で希釈し、生成物を逆相クロマトグラフィーにより精製し、続く凍結乾燥により所望の生成物 6 mgを得た。

【0117】

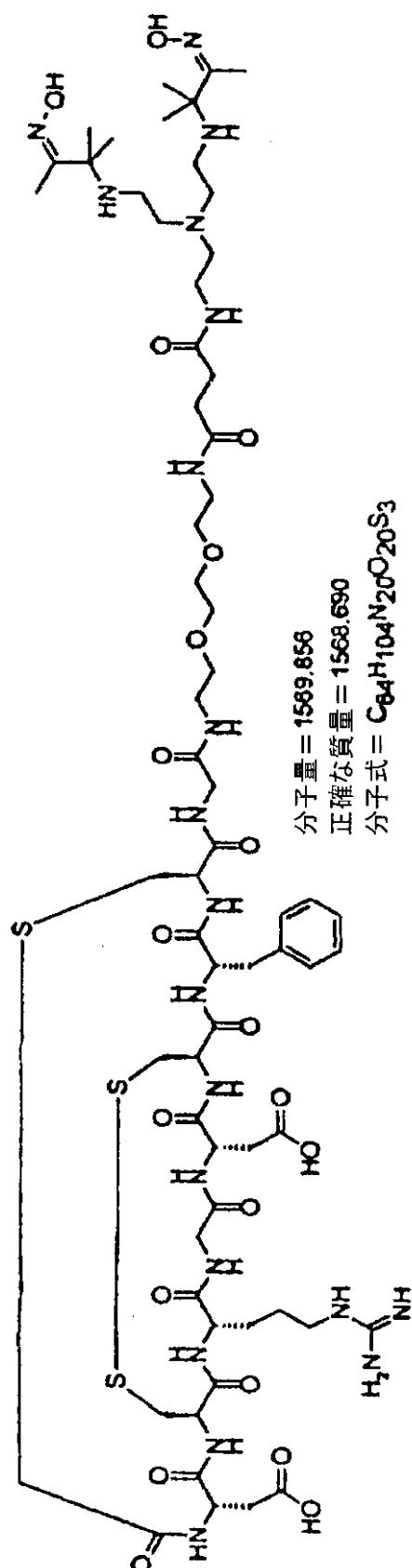
2 e) ペプチドの合成については、例1の a ) ~ c ) を参照することができる。

30

【0118】

2 f) ペプチドと Pn216 キレートとの共役

【化23】



10

20

30

40

5 mgのPn216キレート活性エステル、2 μlのN - メチルモルホリンおよび6 mgの[Cys<sup>2-6</sup>]シクロ[CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>をN, N - ジメチルホルムアミド(0.5 ml)に溶解した。混合物を24時間攪拌した。

50

## 【0119】

反応混合物のHPLC (Phenomenex Luna 5μ C18 (2) 250 x21.20 mm カラム)による予備的な精製を行った(流速1.0 mL/minで10分間、5~50%B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1%TFAおよびB = CH<sub>3</sub>CN / 0.1%TFA)。凍結乾燥後、3.5 mgの純物質を得た(HPLC分析:勾配、10分間、5~50%B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1%TFAおよびB = CH<sub>3</sub>CN / 0.1%TFA;カラム、Phenomenex Luna 3μ C18 (2) 50 x 4.6 mm;検出、UV 214 nm;生成物保持時間、4.47分)。更に生成物の特性を、質量分析法を用いて調べた。計算値: M+H、1569.7、実測値: 1569.7。

## 【0120】

2 g) 化合物は上記1 e)において述べた方法と類似の方法においてテクニチウム(<sup>99</sup>Tc)でラベル付けされ得る。

## 【0121】

例3:Pn216キレートで脂肪酸修飾されたペクター

3 a) Dde - Lys - Cys (tBu) - Arg (Pmc) - Gly - Asp (OtBu) - Cys (tBu) - Phe - Cys (Trt) - Gly - (O - ビス - (アミノエチル)エチレングリコールトリチル)樹脂のアセンブリー(i)

保護ペプチドを、O - ビス - (アミノエチル)エチレングリコールトリチル樹脂を出発物質として0.3 mmolスケールにつき、1 mmolのアミノ酸カートリッジを用い、ABI 433 A自動ペプチドシンセサイザーでアセンブルした。アミノ酸をカップリング前にHB TUを用いて予め活性化した。

## 【0122】

3 b) ClCH<sub>2</sub>CO - Lys(ヘキサノイル) - Cys (tBu) - Arg - Gly - Asp - Cys (tBu) - Phe - Cys - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (i i) の合成

0.1 mmolの樹脂(i)をヘキサン酸無水物のDMF溶液で17時間処理した。樹脂からのDde保護基の除去を、ヒドラジン-水和物の2% DMF溶液を用い、3分間で4回行った。次いで前記樹脂をクロル酢酸無水物のDMF溶液を用いて60分間処理した。

## 【0123】

TIS(5%)、H<sub>2</sub>O(5%)、及びフェノール(2.5%)を含むTFA中で、2時間かけて樹脂からペプチド及び側鎖保護基(MBzLを除く)を同時に除去した。

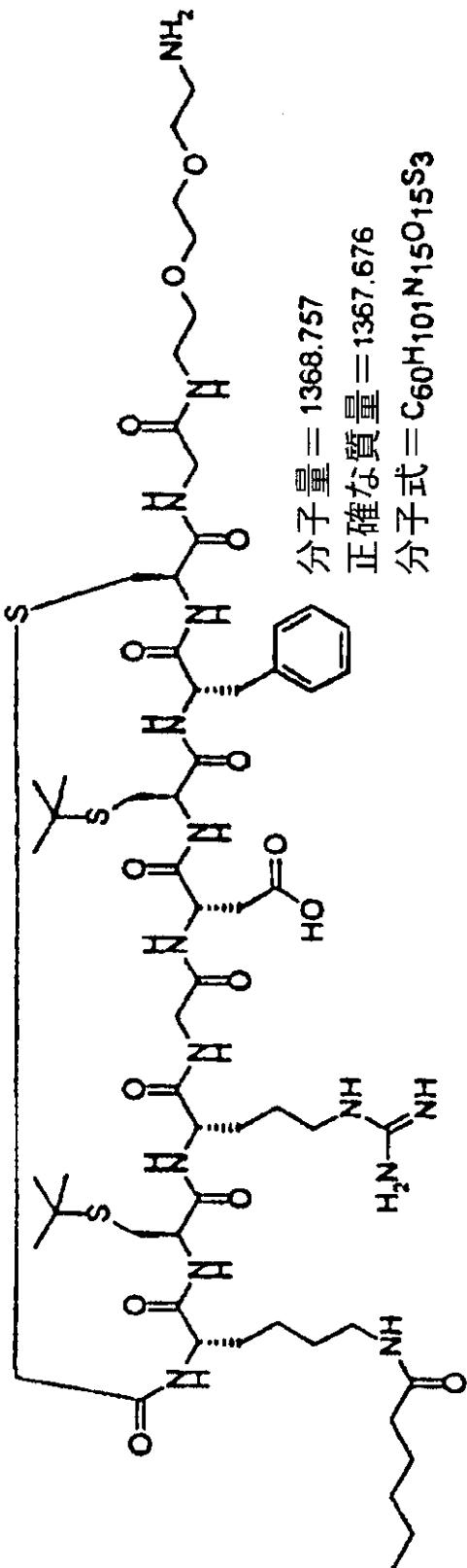
## 【0124】

作業後、100 mgの粗ペプチドを得た(HPLC分析:勾配、10分間5~50%B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1%TFAおよびB = CH<sub>3</sub>CN / 0.1%TFA;カラム、Phenomenex Luna 3μ C18 (2) 50 x 4.6 mm;流速、2 mL/min;検出、UV 214 nm;生成物保持時間、7.81分)。更に生成物の特性を、質量分析法を用いて調べた。計算値: M+H、1404.7、実測値: 1404.6。

## 【0125】

3 c) シクロ[CH<sub>2</sub>CO - Lys(ヘキサノイル) - Cys (tBu) - Arg - Gly - Asp - Cys (tBu) - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (i i i) の合成

## 【化24】



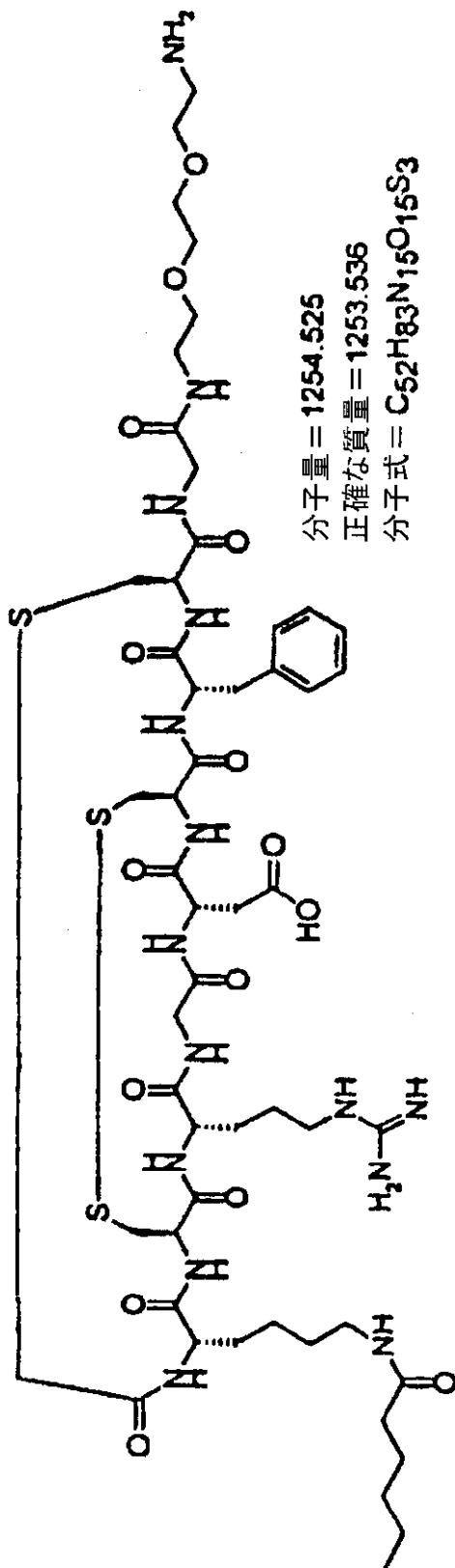
100 mgの化合物(i i)を水 / アセトニトリル中に溶解した。混合物をアンモニア溶液を用いてpH 8に調整し、20時間攪拌した。作業後、104 mgの粗ペプチドを得た(HPLC分析：勾配、10分間 5 ~ 50% B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA及びB = C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA；カラム、Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm；流速、

2 ml / 分 ; 検出、UV 214 nm ; 生成物保持時間、7.67分)。更に生成物の特性を、質量分析法を用いて調べた。計算値 : M+H、1368.7、実測値 : 1368.7。

【0126】

3 d ) [Cys<sup>2-6</sup>]シクロ[CH<sub>2</sub>CO - Lys(ヘキサノイル) - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>(iv) の合成

【化25】



10

20

30

40

50 mgの化合物(iii)を、アニソール(100 μm)、DMSO(1ml)およびTFA(50 ml)溶液を用いて室温において30分間処理し、次いでTFAを真空中において除去し、ジエチルエーテルを添加してペプチドを沈殿させた。

【0127】

50

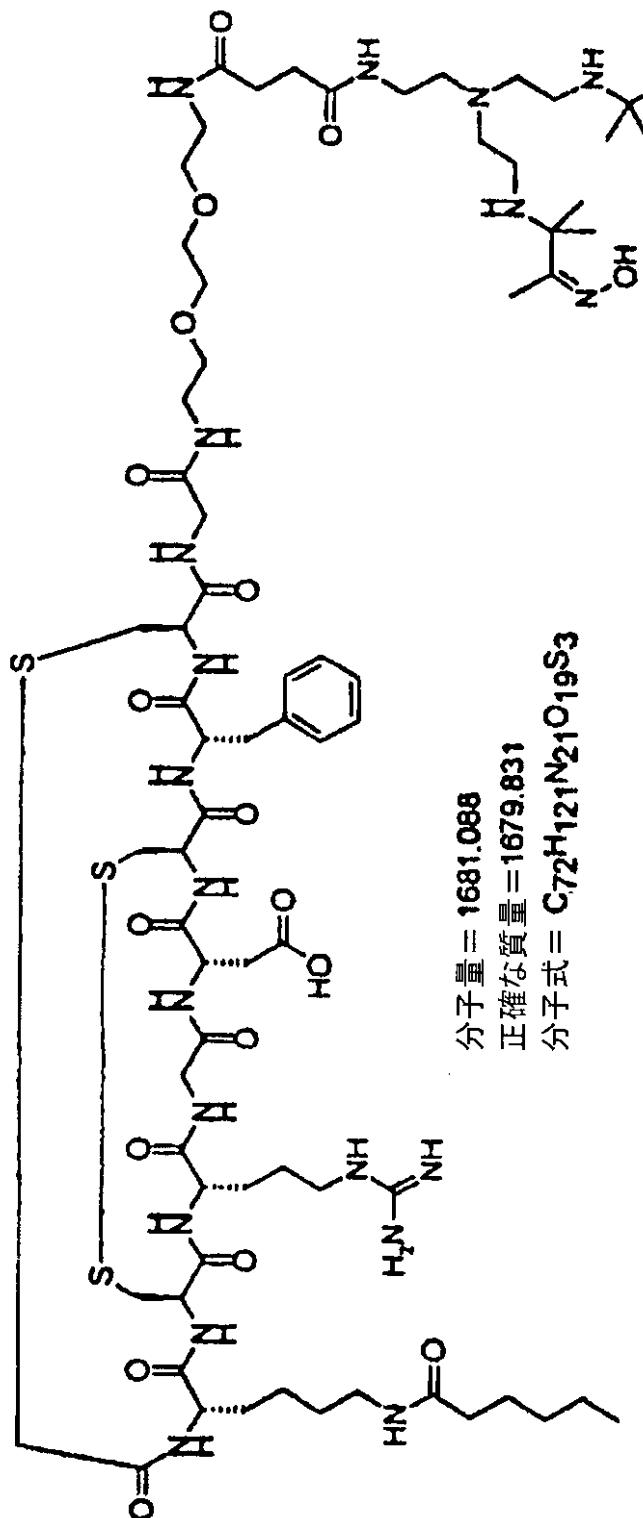
粗物質の H P L C ( Phenomenex Luna 5u C18 (2) 250 x21.20 mm カラム ) による予備的な精製を行った ( 流速 1.0 mL / min で 10 分間、 5 ~ 50 % B 、 A = H<sub>2</sub>O / 0.1 % TFA および B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1 % TFA ) 。凍結乾燥後、 9 mg の純物質を得た ( H P L C 分析 : 10 分間、 勾配、 5 ~ 50 % B 、 A = H<sub>2</sub>O / 0.1 % TFA および B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1 % TFA ; カラム、 Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm ; 流速 2 mL / 分 ; 検出、 UV 214 nm ; 生成物保持時間、 5.38 分 ) 。更に生成物の特性を、 質量分析法を用いて調べた。計算値 : M+H、 1254.5 、 実測値 : 1254.6 。

## 【 0128 】

3 e ) [Cys<sup>2-6</sup>]シクロ[CH<sub>2</sub>CO - Lys (ヘキサノイル) - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH - Pn216 ( v ) の合成

10

## 【 化 26 】



9 mgの化合物(i v)、11 mgのPn216キレート活性エステルおよび8 μlのN-メチルモルホリンをDMF(1 ml)中に溶解した。混合物を3.5時間攪拌した。

【 0 1 2 9 】

反応混合物の HPLC (Phenomenex Luna 5u C18 (2) 250 x21.20 mm カラム) による予備的な精製を行った (流速 1.0 mL / 分で 40 分間、5 ~ 50 %B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1 % TFA および B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1 % TFA)。凍結乾燥後、5.2 mg の純物質を得た (HPLC 分析: 10 分間、勾配、5 ~ 50 %B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1 % TFA および B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1 % TFA; カラム、Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速 2 mL / 分; 検出、UV 214 nm; 生成物保持時間、5.83 分)。更に生成物の特性を、質量

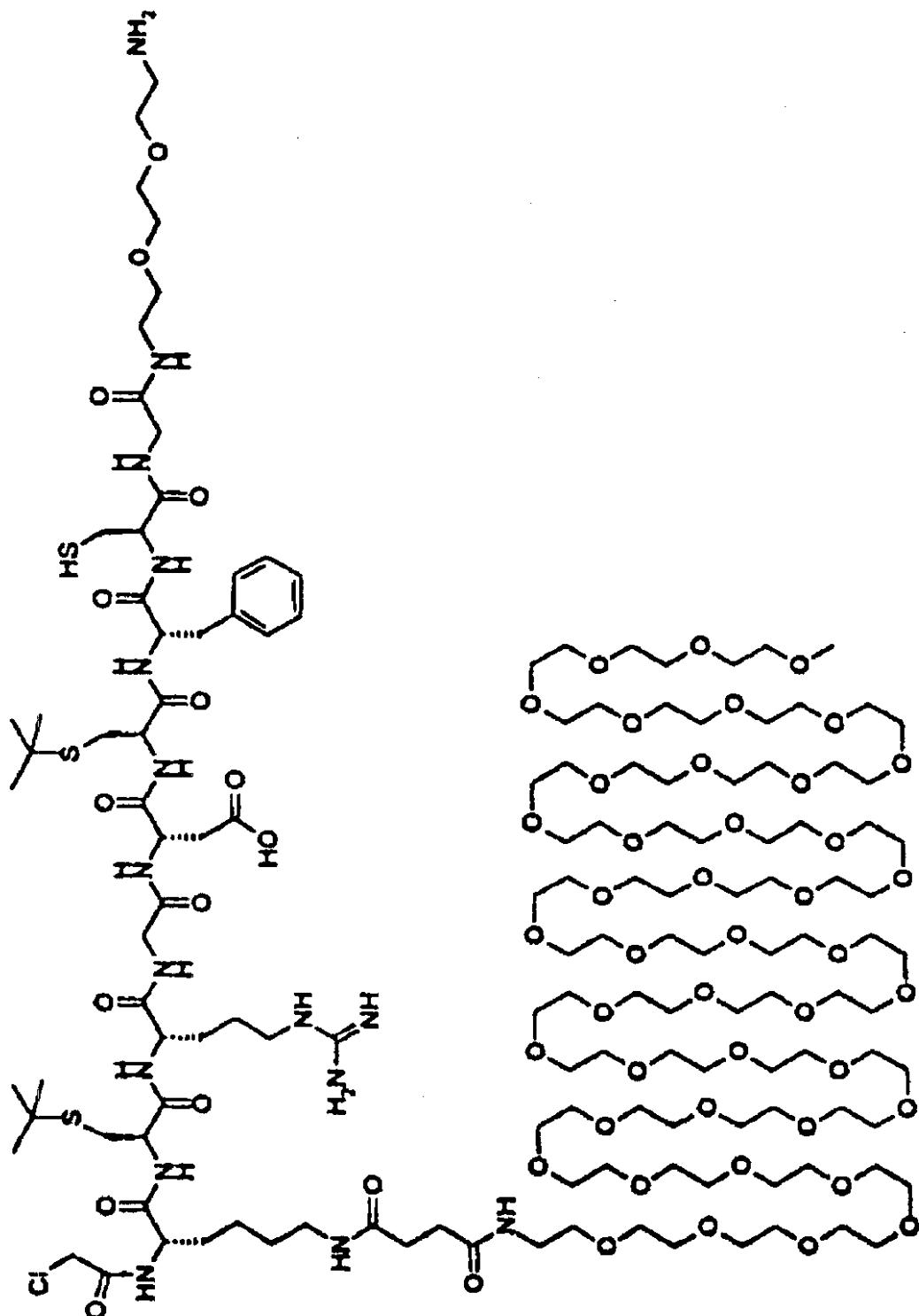
分析法を用いて調べた。計算値 : M+H、1680.8、実測値 : 1680.7。

【0130】

例4 : Pn216キレートを用いたPEG修飾ベクター

4 a)  $\text{ClCH}_2\text{CO} - \text{Lys}(\text{PEG2000}) - \text{Cys(tBu)} - \text{Arg} - \text{Gly} - \text{Asp} - \text{Cys(tBu)} - \text{Phe} - \text{Cys} - \text{Gly} - \text{NH} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  (v i) の合成

【化27】



0. 1 mmolの樹脂(i)を、 $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (HATUを用いて予め活性化されている)を用いて16時間処理した。樹脂からのDde保護基の除去を、ヒドラジン-水和物の2%DMF溶液を用い、3分間で4回行った。次いで前記樹脂をクロル酢酸無水物のDMF溶液を用いて60分間処理した。

**【 0 1 3 1 】**

T I S ( 5 % ) 、 H<sub>2</sub>O ( 5 % ) 、 及びフェノール ( 2 . 5 % ) を含む T F A 中で、 2 時間かけて樹脂からペプチド及び側鎖保護基 ( tBuを除く ) を同時に除去した。

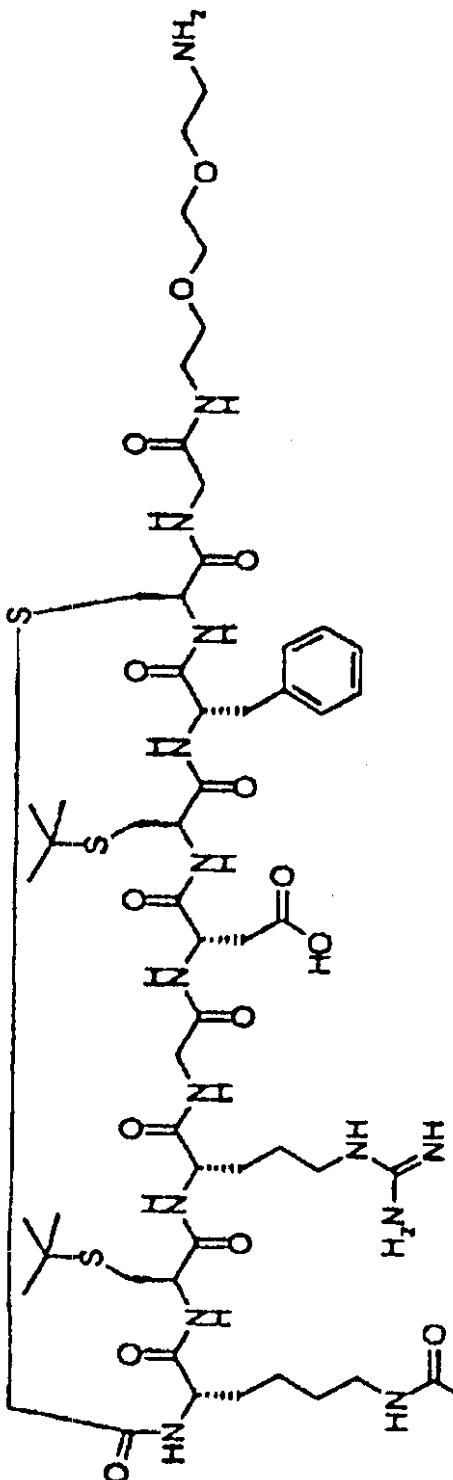
**【 0 1 3 2 】**

作業後、 1 0 0 mg の粗ペプチドを得た ( H P L C 分析 : 勾配、 1 0 分間 5 ~ 5 0 % B 、 A = H<sub>2</sub>O / 0 . 1 % T F A 及び B = C H<sub>3</sub>C N / 0 . 1 % T F A ; カラム、 Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm ; 流速、 2 ml / 分 ; 検出、 UV 214 nm ; 生成物保持時間、 5 ~ 9 分から多重ピーク ) 。更に生成物の特性を、 MALDI 質量分析法を用いて調べた。計算値 : M+H、 3313 、 実測値 : 2785 。

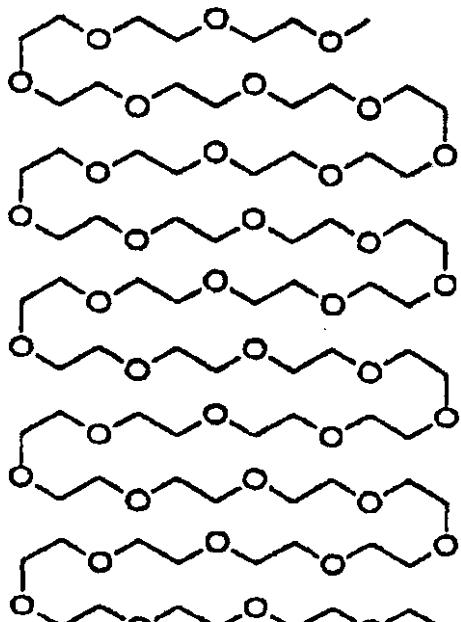
**【 0 1 3 3 】**

4 b ) シクロ [CH<sub>2</sub>CO - Lys (PEG2000) - Cys (tBu) - Arg - Gly - Asp - Cys (tBu) - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> ( v i i ) の合成

**【 化 2 8 】**



分子量 = 3278.032  
正確な質量 = 3275.778  
分子式 = C<sub>145</sub>H<sub>270</sub>N<sub>16</sub>O<sub>59</sub>S<sub>3</sub>



110 mg の化合物 (v i ) を水 / アセトニトリルに溶解した。混合物をアンモニア溶液を用いて pH 8 に調整し、20 時間攪拌した。作業後、90 mg の粗ペプチドを得た (HPLC 分析 : 勾配、10 分間 5 ~ 50 % B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA 及び B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA ; カラム、Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm ; 流速、2 mL / 分 ; 検出、UV 214 nm ; 生成物保持時間、5 ~ 9 分から多重ピーク)。更に生成物の特性を、MALDI 質量分析法を用いて調べた。計算値 : M+H、3277、実測値 : 2627。

【0134】

4 c) [Cys<sup>2-6</sup>] シクロ [CH<sub>2</sub>CO - Lys (PEG2000) - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (v i i i) の合成

60 mg の化合物 (v i i) を、室温においてアニソール (200 μl)、DMSO (2 ml)

10

20

30

40

50

) および TFA (100ml) の溶液を用いて30分間処理し、次いで真空中においてTFAを除去し、ジエチルエーテルの添加によりペプチドを沈澱させた。

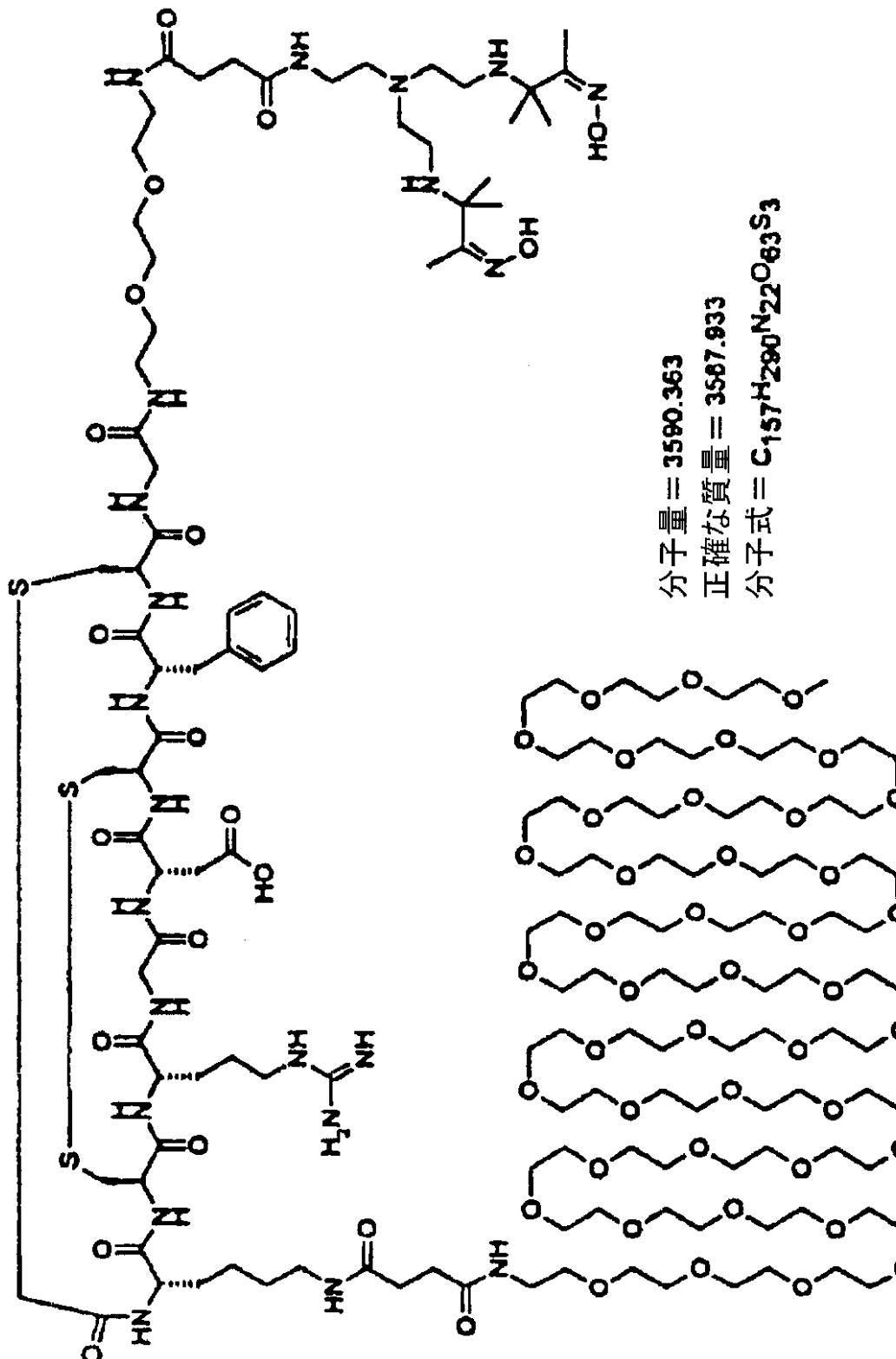
【0135】

粗物質のHPLC (Phenomenex Luna 5 $\mu$  C18 (2) 250 x 21.20 mm カラム) による予備的な精製を行った (流速 1.0 mL / 分において 40 分、5 ~ 50 % B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1 % TFA 及び B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1 % TFA)。凍結乾燥後、30 mg の純物質を得た (HPLC 分析: 勾配、10 分間 5 ~ 50 % B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1 % TFA 及び B = CH<sub>3</sub>CN / 0.1 % TFA; カラム、Phenomenex Luna 3 $\mu$  C18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速、2 mL / 分; 検出、UV 214 nm; 生成物保持時間、5 分においてプロードピーク)。

【0136】

4 d) [Cys<sup>2~6</sup>] シクロ [CH<sub>2</sub>CO - Lys (PEG2000) - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> と Pn216 キレートとの共役 (ix)

【化29】



2.0 mgの化合物(viii)、1.1 mgのPn216キレート活性エステルおよび8 μlのNMMをDMF(1ml)に溶解した。混合物を24時間攪拌した。

【0137】

反応混合物のHPLC(Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 × 21.20 mm カラム)による予備的な精製を行った(流速10mL/分において40分、5~50% B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA及びB = CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA)。凍結乾燥後、10.7 mgの純物質を得た(HPLC分析:勾配、10分間5~50% B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA及びB = CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA;カラム、Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 × 4.6

mm；流速、2 ml / 分；検出、UV 214 nm；生成物保持時間、5 ~ 8 分からプロードピーク）。更に生成物の特性を、質量分析法を用いて調べた。計算値：M+H、3589、実測値：3270。

### 【0138】

例5：Pn44を用いたベクター

5 a) 1, 1, 1, - トリ(フェニルスルホニルオキシメチル)エタンの調製

1, 1, 1, - tris トリヒドロキシメチル(120 g, 1.0 mol)を、ジクロロメタン(1000 mL)およびピリジン(237 g, 1 mol)に溶解し、氷 / メタノール浴で-5において、温度が10を上回らないような速度で、フェニルスルフォニルクロリド(528 g, 3 mol)を少しづつ滴下して処理した。次いで反応物を室温まで暖めて一晩おいた。

次いで反応物を5 N 塩酸を用いて振り動かし、有機相を分離し、ジクロロメタンを用いて水相を再抽出し、有機抽出物を合わせた。ジクロロエタン溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、真空中でこれを濃縮し、ゴム質の1, 1, 1, - トリ(フェニルスルホニルオキシメチル)エタン(540 g, 1 mol)を得た。

### 【0139】

5 b) 1, 1, 1, - トリ(アジドメチル)エタンの調製

ジメチルホルムアミド(300 mL)中の1, 1, 1, - トリ(フェニルスルホニルオキシメチル)エタン(25 g, 700 mmol)を、500 mL RBフラスコ中でアジ化ナトリウム(41 g, 630 mmol, 9 eq)を用いて処理し、混合物を攪拌しながら7時間120において加熱した。次いで反応物を室温まで冷却し、50%飽和ブライン溶液(250 mL)およびジエチルエーテル(250 mL)を加えた。有機層を50%飽和ブライン溶液(250 mL)を用い洗浄して分離し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥しこれを濃縮し、粘性のある黄色液体の1, 1, 1, - トリ(アジドメチル)エタンを得た(5.51 g, 28.2 mmol、収率40%)。

### 【0140】

NMR H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>)、1.0 (3H, s, CH<sub>3</sub>)、3.3 (6H, s, CH<sub>3</sub>)。

### 【0141】

5 c) 1, 1, 1, - トリ(アミノメチル)エタンの調製

エタノール(140 mL)中の1, 1, 1, - トリ(アジドメチル)エタン(5.51 g, 28.2 mmol)を、遊離した窒素を除去するために水素の流動下、大気圧下において炭(2 g)に担持された10%パラジウムを用いて処理し、15時間これを水素化した。反応物をセライトパッドを用いて濾過して触媒を除去し、真空下においてこれを濃縮し、黄色液体の1, 1, 1, - トリ(アジドメチル)エタン(2.53 g, 21.6 mmol、収率76%)を得た。

### 【0142】

NMR H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>)、0.8 (3H, s, CH<sub>3</sub>)、1.18 (6H, s, 3xNH<sub>2</sub>)、2.6 (6H, s, 3xNH<sub>2</sub>)。

### 【0143】

NMR C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>)、20.1 CH<sub>3</sub>、31.7 C、48.8 CH<sub>2</sub>。

### 【0144】

5 d) Pn44の調製

乾燥メタノール(10 mL)中の1, 1, 1, - トリ(アミノメチル)エタン(10 g、8.5.3 mmol)溶液を、0 の窒素下において、乾燥メタノール(50 mL)中の3-クロロ-3-メチル-2-ニトロソブタン(23.14 g、170.6 mmol、2 eq)懸濁液に徐々に加えた。混合物を0において40分間攪拌し、室温まで暖め、次いで60で3時間加熱した。次いで反応混合物を室温まで冷却し、5日間攪拌した。最終的に混合物を3時間還流温度において加熱し、その後、真空下において溶媒を除去した。残渣を2 M HCl(150 mL)に溶解し、エーテルで抽出した(3 × 100 mL)。次いで水層を6 M NaOHを用いてpH 1.0に塩基性化し、これをジクロロメタンを用いて抽出した(3 × 100 mL)。合わされた有機層を室温に放置することにより、白色固体が沈澱した。この固体を濾過により取り除き、NMRにより3付加化合物(tri-adduct)であることがわかった。

10

20

20

30

40

50

濾液を 1 / 3 までに濃縮し、冷却装置内に放置した。別の白色固体がこの溶液から沈澱した。これを濾過して分離し、<sup>1</sup>H - NMRによりPn44であることがわかった。濾液を再度濃縮し、更にPn44の一部を溶液から結晶化させた。（全収率：6.981 g、26%）  
 NMR H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>)，0.9 (3H, s, CH<sub>3</sub>)，1.25 (6H, d, 4xCH<sub>3</sub>)，1.8 (6H, s, 2xCH<sub>3</sub>)，2.4 (2H, d, 2xCH)，2.54 (2H, d, 2xCH)，2.95 (2H, s, CH<sub>2</sub>)，4.95 (6H, s, OH)。  
 MS C<sub>15</sub>H<sub>33</sub>N5O2 M+H=316 実測値 316。

## 【0145】

5 e ) PN44 - コハク酸中間体の合成

例 2 c に記載した通りである。

## 【0146】

5 f ) PN44のテトラフルオロチオフェノールエステル誘導体 - コハク酸の合成

例 2 d に記載した通りである。

## 【0147】

5 g ) [Cys<sup>2-6</sup>] シクロ [-CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly  
 - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> の合成

例 1 a - 1 c を参照することができる。

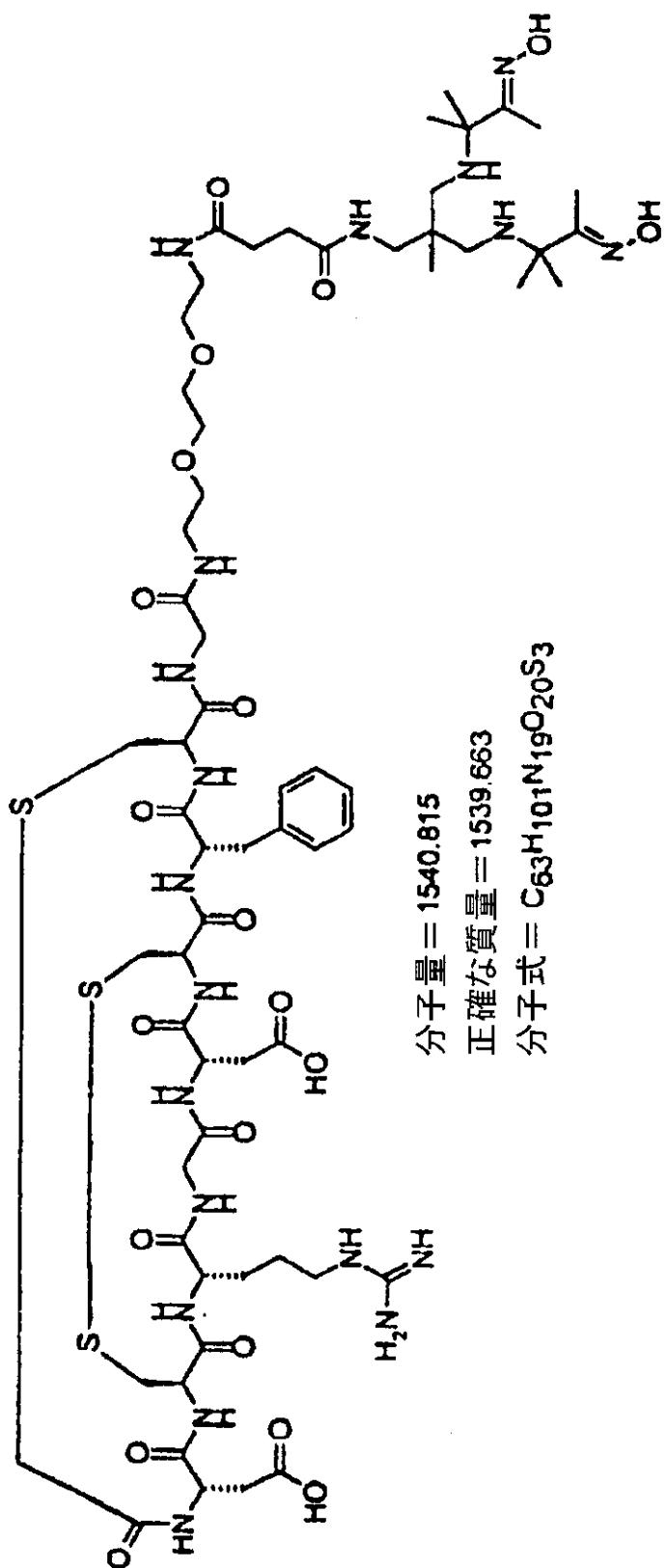
## 【0148】

5 h ) [Cys<sup>2-6</sup>] シクロ [-CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly  
 - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> - Pn44 の合成

## 【化30】

10

20



7 mgのPn44キレート活性エステル、5 μlのNMPおよび10 mgの[Cys<sup>2-6</sup>]シクロ[-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys - Arg - Gly - Asp - Cys - Phe - Cys] - Gly - NH - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>をNMP(1 ml)に溶解した。混合物を3時間攪拌した。

【0149】

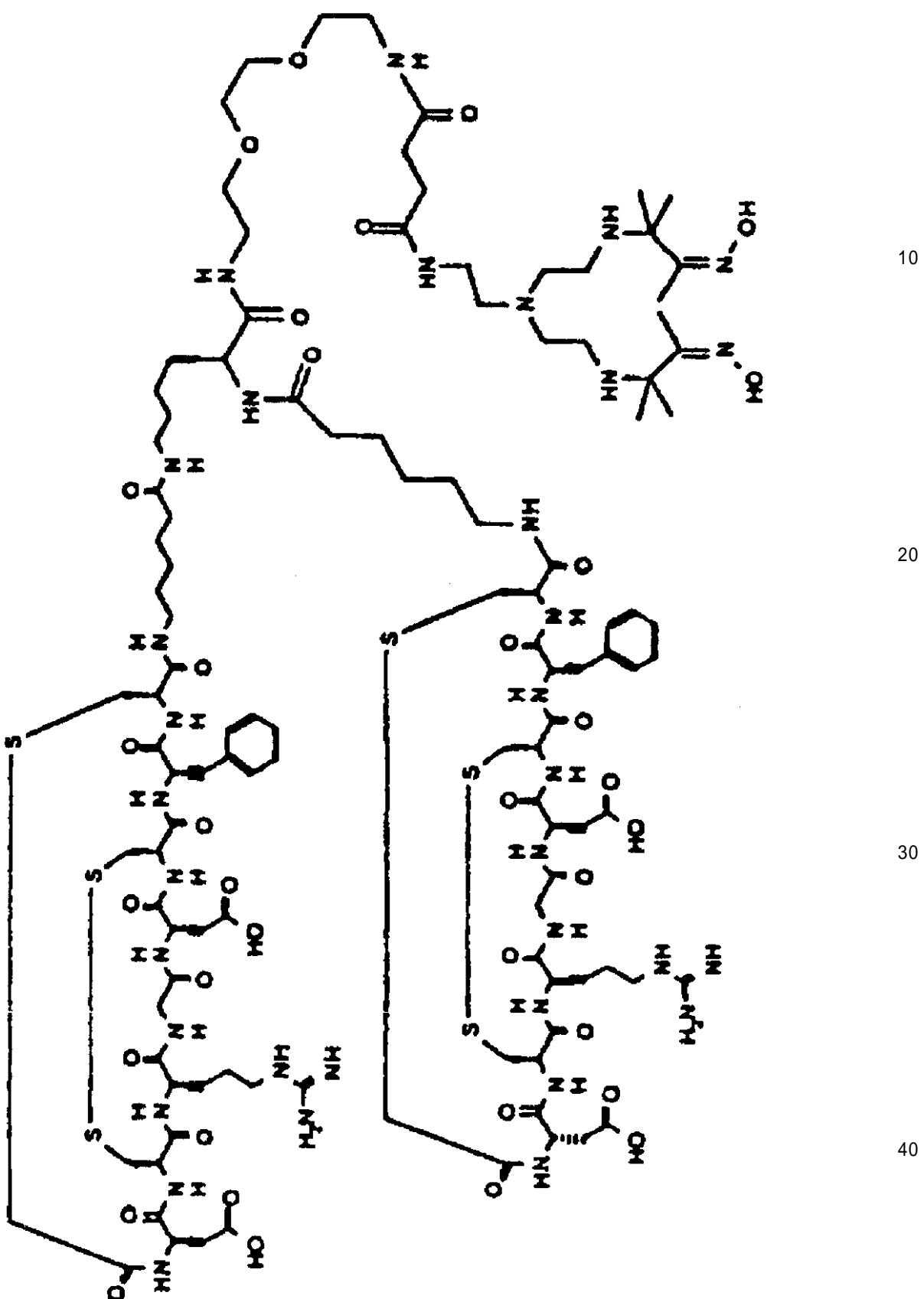
反応混合物のHPLC(Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 × 21.20 mm カラム)による予備的な精製を行った(流速10 mL / 分において40分、5 ~ 50% B、A = H<sub>2</sub>O / 50

0 . 1 % T F A 及び B = C H<sub>3</sub> C N / 0 . 1 % T F A )。凍結乾燥後、9 . 8 mgの純物質を得た (H P L C 分析 : 勾配、10分間 5 ~ 50% B、A = H<sub>2</sub>O / 0 . 1 % T F A 及び B = C H<sub>3</sub> C N / 0 . 1 % T F A ; カラム、Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 m m ; 流速、2 ml / 分 ; 検出、UV 214 nm ; 生成物保持時間、4 . 38分 )。更に生成物の特性を、質量分析法を用いて調べた。計算値 : M+H、1540.7、実測値 : 1540.6。

## 【0150】

例 6 : ビス - [Cys<sup>2-6</sup>]、シクロ[ - CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys<sup>2</sup> - Arg - Gly - Asp - Cys<sup>6</sup> - Phe - Cy s] - Ahx - Lys - (シクロ[ - CH<sub>2</sub>CONH - Asp - Cys<sup>2</sup> - Arg - Gly - Asp - Cys<sup>6</sup> - Phe - Cys] - Ahx) - NH (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH - Pn216 の合成

## 【化31】

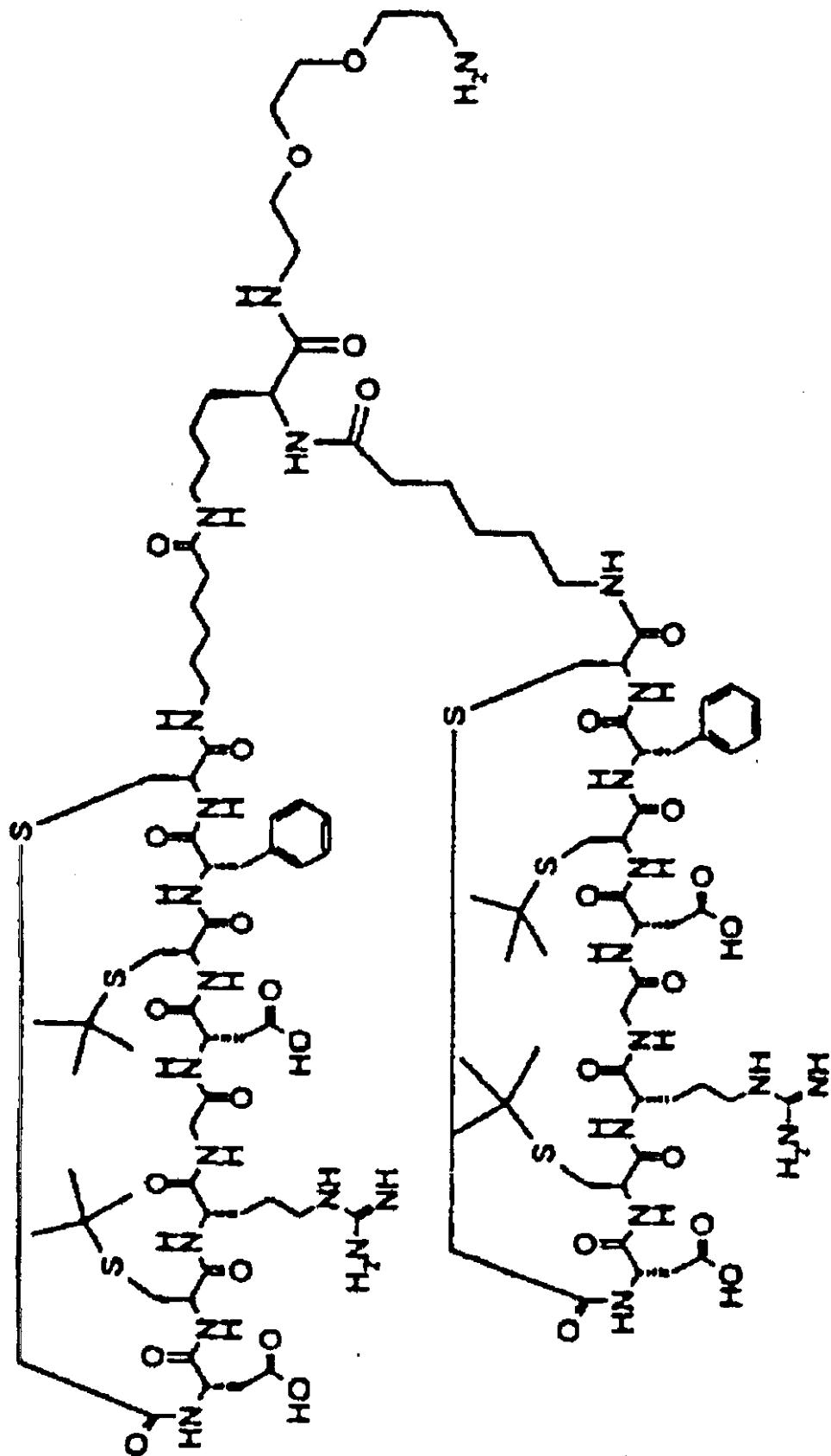


二量体ペプチドを、O - ピス - (アミノエチル) エチレングリコールトリチル樹脂を出発物質として 0 . 1 mmol スケールにつき、1 mmol のアミノ酸カートリッジを用い、A B I 4 3 3 A 自動ペプチドシンセサイザーでアセンブルした。アミノ酸をカップリング前に H B T U を用いて、Fmoc - Lys (Fmoc) - OH, Fmoc - Ahx - OH (Ahx = アミノヘキサン酸), Fm

oc - Cys (Trt) - OH, Fmoc - Phe - OH, Fmoc - Cys (tBu) - OH, Fmoc - Asp (O - tBu) - OH, Fmoc - Gly - OH, Fmoc - Arg (Pmc) - OH, Fmoc - Cys (tBu) - OH, Fmoc - Asp (O - tBu) - OH, クロロ酢酸無水物の順で、予め活性化した。次いで半保護ペプチドを T I S ( 5 % ) 、フェノール ( 5 % ) および H<sub>2</sub>O ( 5 % ) を含む T F A 中で、固体支持体からとった。次いで、Vydac C18 カラムにおける H P L C 精製後、粗クロロ - ペプチドを 20 % アセトニトリル / 水 ( pH 8 ) で環化し、単環式 t - ブチル保護中間体（以下に示す）を生じた。

【 0 1 5 1 】

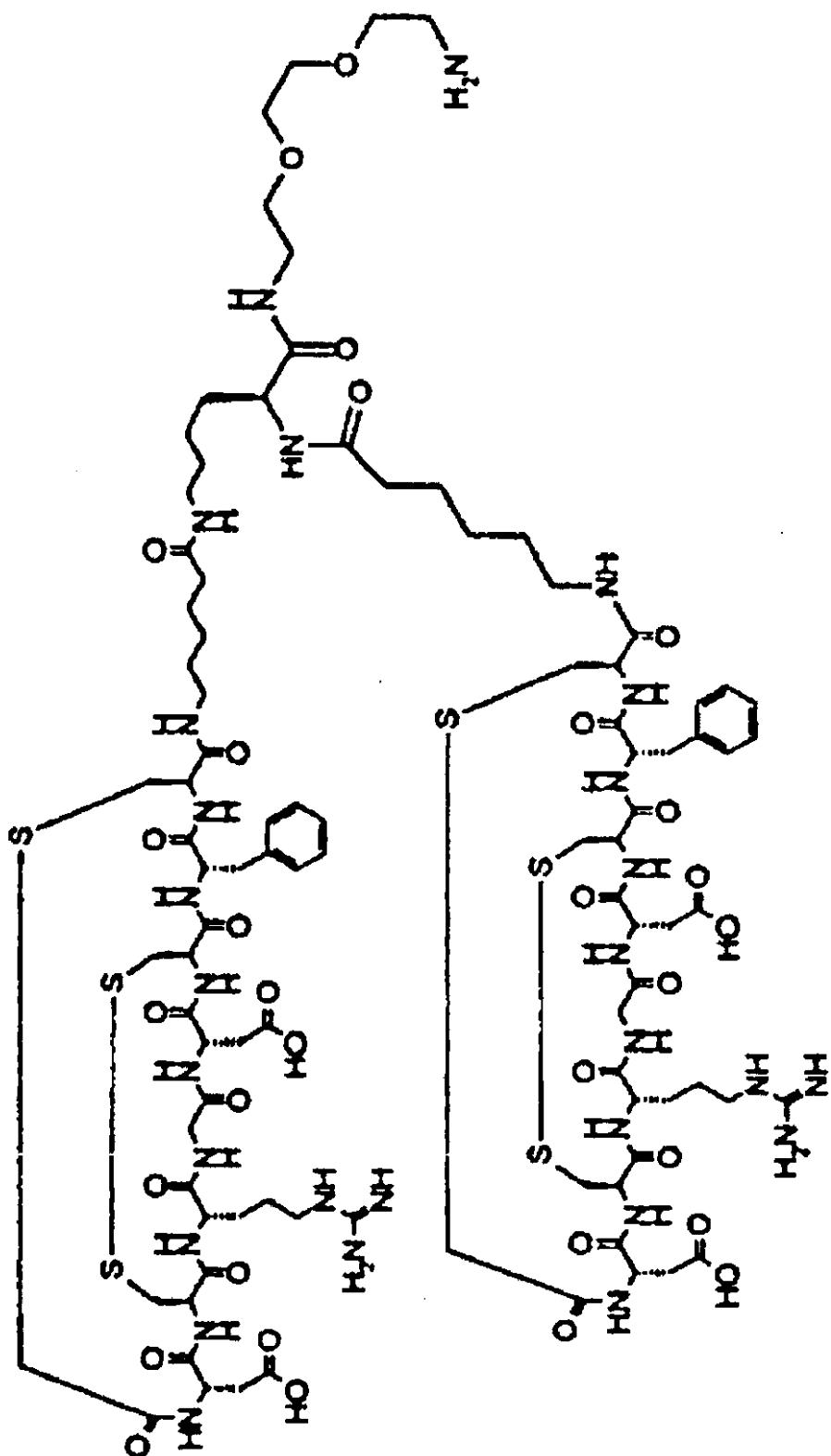
【 化 3 2 】



純中間体に、0.1mLのアニソールを含む10%DMSO/TFA溶液を加えた。ペプチド混合物を1時間攪拌し、過剰TFA蒸発させた後に、ジエチルエーテルを添加して生成物（以下に示す）を沈澱させた。

【0152】

【化 3 3】



次いでこの生成物 (5 mg) を、2% NMMを含有する1mLのDMFに溶解し、例1から5mgのPn216活性エステル5mgを加えた。共役反応はHPLCにより追隨され、16時間後完全になったことがわかった。次いでペプチド溶液を、水を用いてトータルで8mLになるまで希釈し、Phenomenex Luna 5u C18 (2) 250 x 10 mm カラムに充填した(流速、5mL/分において30分、5~50% B、A =  $\text{H}_2\text{O} / 0.1\% \text{TFA}$  及びB =  $\text{CH}_3\text{CN} / 0.1\% \text{TFA}$ )。凍結乾燥後、所望の目的生成物2mgを得た(HPLC分析：勾配、

10分間、5～50% B、A = H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA 及び B = C<sub>18</sub> / 0.1% TFA；カラム、Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 × 4.6 mm；流速、2 ml / 分；検出、UV 214 nm；生成物保持時間、9.8分）。更に生成物の特性を、ES-MS を用いて調べた。計算値：M+H、1805、実測値：1805。

---

フロントページの続き

(72)発明者 インドレボル、バルド

ノルウェー国、エヌ - 0 4 0 1 オスロ、ニイダレン、ピー・オー・ボックス 4 2 2 0、ニイコ  
ベイエン 1 - 2、アマシャム・ヘルス・エーエス内

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 國際公開第 9 8 / 0 4 7 5 4 1 ( WO , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

A61K 38/00-38/58

A61K 39/00-39/44

A61K 49/00-49/04

CAplus/REGISTRY(STN)