(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 11 月 18 日(18.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/131745 A1

(51) 国際特許分類:
C07C 247/16 (2006.01) *C07H 7/06* (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01) *C07B 59/00* (2006.01)
C07D 249/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/058217

(22) 国際出願日: 2010 年 5 月 14 日(14.05.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-118505 2009 年 5 月 15 日(15.05.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 **(RIKEN)** [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP). 国立大学法人大阪大学 **(OSAKA UNIVERSITY)** [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡辺　恭良 **(WATANABE, Yasuyoshi)** [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町６－７－３　独立行政法人理化学研究所　神戸研究所内 Hyogo (JP). 鈴木　正昭 **(SUZUKI, Masaaki)** [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町６－７－３　独立行政法人理化学研究所　神戸研究所内 Hyogo (JP). 土居　久志 **(DOI, Hisashi)** [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町６－７－３　独立行政法人理化学研究所　神戸研究所内 Hyogo (JP). 窪山　剛之 **(KUBOYAMA, Takeshi)** [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町６－７－３　独立行政法人理化学研究所　神戸研究所内 Hyogo (JP). 小比賀　聡 **(OBIKA, Satoshi)** [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 今西　武 **(IMANISHI, Takeshi)** [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

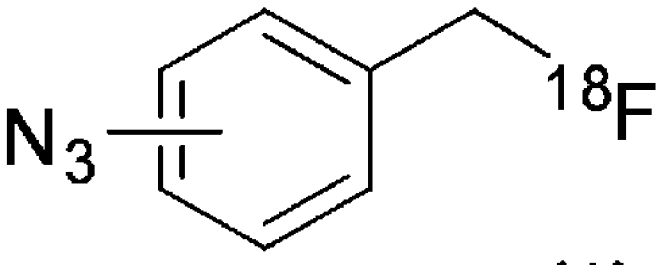
(74) 代理人: 青山陽 **(AOYAMA Yo)**; 〒4600012 愛知県名古屋市中区千代田５丁目１４番２７号 Aichi (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,

[続葉有]

(54) **Title**: ^{18}F-LABELED AZIDE COMPOUND, REAGENT FOR ^{18}F-LABELING AND METHOD FOR ^{18}F-LABELING OF ALKYNE COMPOUND USING SAME

(54) 発明の名称 : 18 Ｆ標識アジド化合物、18 Ｆ標識化用試薬及びそれを用いたアルキン化合物の 18 Ｆ標識方法



(1)

(57) **Abstract**: Disclosed are: an ^{18}F-labeled azide compound usable in a Huisgen reaction which enables ^{18}F-labeling even though there is only a small amount of an alkyne compound that is the subject substrate, is applicable to PET methods for peptides and oligonucleotides, and enables ^{18}F-labeling of an oligonucleotide at a site other than the 5'- or 3'-end thereof; a reagent for ^{18}F-labeling; and a method for ^{18}F-labeling of an alkyne compound using the same. The ^{18}F-labeled azide compound is characterized by being represented by structural formula (1).

(57) 要約: 【課題】Huisgen 反応に利用できる ^{18}Ｆ標識アジド化合物であって、相手基質となるアルキン化合物が少ない量でも ^{18}Ｆ標識化が可能であり、ペプチドやオリゴヌクレオチドへのＰＥＴ法の適用が可能であり、オリゴヌクレオチドの５'末端や３'末端以外の部位にも ^{18}Ｆ標識化が可能な ^{18}Ｆ標識アジド化合物、^{18}Ｆ標識化用試薬及びそれを用いたアルキン化合物の ^{18}Ｆ標識方法を提供することを目的とする【解決手段】 本発明の ^{18}Ｆ標識アジド化合物は、下記構造式（１）で示されることを特徴とする。

WO 2010/131745 A1

SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ：

18Ｆ標識アジド化合物、18Ｆ標識化用試薬及びそれを用いたアルキン化合物の18Ｆ標識方法

技術分野

[0001] 本発明は、^{18}Ｆ標識アジド化合物、^{18}Ｆ標識化用試薬及びそれを用いたアルキン化合物の^{18}Ｆ標識方法に関する。本発明は、陽電子放射断層画像撮影（以下「ＰＥＴ」という）に不可欠な放射性トレーサーの製造に、好適に用いることができる。

背景技術

[0002] ＰＥＴ法とは、^{18}Ｆや^{11}Ｃなどのポジトロンを放出する短寿命放射核で標識されたトレーサーを生体内に投与し、トレーサーから発生するγ線をＰＥＴカメラ（ガンマ線シンチレーターと光電子増倍管からなる検出器）によって計測して、その体内分布をコンピューターにより画像化する方法である。ＰＥＴ法は生体内での物質の移動を経時的、非侵襲的かつ定量的に追跡することができるため、生物学、医薬品開発、医療などの各分野において有用な測定技術として活用されている。

[0003] ＰＥＴ法で使用される短寿命放射核種としては^{18}Ｆや^{11}Ｃ等が用いられ、これらの放射核種で標識された化合物がトレーサーとして用いられる。^{11}Ｃは有機化合物中に存在している炭素原子を利用しているため適用範囲が極めて広く、理想的な放射核種ともいえるが、半減期が２０分と短く、合成からＰＥＴ法での測定までを極めて短時間で行なわなければならないという制約がある。これに対して^{18}Ｆの半減期は１１０分であり、^{11}Ｃよりは半減期が長くて扱いやすいため、^{18}Ｆ標識グルコース等、広く利用されている。しかしながら、^{18}Ｆといえども時間と共にポジトロンの放出量が少なくなるため、ＰＥＴ測定が困難となる。このため、迅速かつ簡便な^{18}Ｆによる標識方法が求められている。

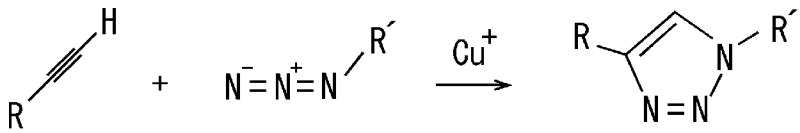
[0004] ^{18}Ｆ標識化合物の調製に際し、原料となる^{18}Ｆはサイクロトロンによる核種変換によって供給される。具体的には、^{18}Ｏを含んだ水にサイクロトロンで加速したイオンを衝突させ、^{18}Ｏから^{18}Ｆへ核種変換させることによって調製される。こうして得られた^{18}Ｆイオンを含む極めて希薄な水溶液と、ＰＥＴ法の対象となる化合物とを反応させれば、^{18}Ｆによる標識された化合物が得られることになる。

[0005] しかし、ＰＥＴ法の対象となる化合物に対して^{18}Ｆを直接結合させることは、通常極めて困難である。このため、^{18}Ｆで標識されているとともに、他の化合物と結合するための官能基を有する中間化合物（以下、本明細書においてこのような中間体を「^{18}Ｆ接合団」という）を予め調製しておき、これをＰＥＴ法の対象となる化合物と結合させるという、間接的な^{18}Ｆ標識化手法が用いられる。

[0006] ^{18}Ｆ接合団に要求される性質としては、（１）手早く簡単に合成ができること、（２）温和な条件で短時間に高効率で目的化合物と結合すること、（３）目的化合物の生体内での動態に与える影響が小さいこと、等が挙げられる。これらの要求に応えるため、Huisgen反応を利用する^{18}Ｆ接合団が注目されている。

[0007] Huisgen反応とは、有機アジド化合物とアルキン類とが［３＋２］型の付加環化反応を起こし、1,2,3-トリアゾール誘導体となる反応をいう（下記化学式参照）。

[0008] [化1]



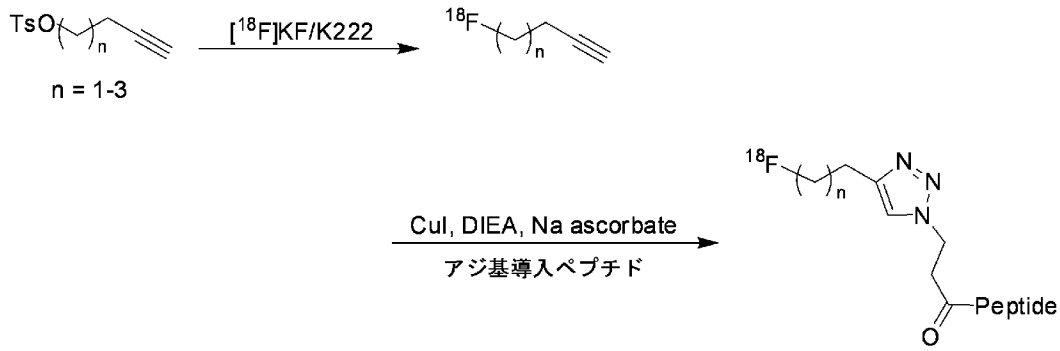
[0009] アルキン類が末端アルキンの場合、銅（Ｉ）イオンが触媒となり、選択的に1,4-二置換体が得られる。この反応は、他にアルコール、アミン、アミド、エステル、ハライドなど各種官能基があっても邪魔されず、目的のトリアゾールが高収率で得られる。反応溶媒もアルコール、一般的有機溶媒、水な

どの中で問題なく進行する。またアジド及びアルキンは各種有機化合物に導入が容易であり、反応後に余分な廃棄物を出さないという多くの利点を有している。このため、ノーベル化学賞を受賞したK.B.Sharplessらが提唱するクリック化学の代表例として挙げられている。

[0010] 近年、このHuisgen反応を利用し、アジド化合物又はアルキン化合物に^{18}Ｆを標識した化合物を^{18}Ｆ接合団として用いて、目的化合物に^{18}Ｆ接合団を導入することが行なわれている。以下、その具体例を挙げる。

[0011] 例えば、カリフォルニア大学デービス校のMarik及びSutcliffeは、末端にアセチレン基を有するトシラート体を[^{18}Ｆ]ＫＦ及びカリウム捕捉剤（Ｋｒｙｐｔｏｆｉｘ２２２）の存在下でフルオロ化し、蒸留によって精製して^{18}Ｆで標識されたフルオロアルキン類を^{18}Ｆ接合団として得ている（非特許文献１）。そして、さらにアジド化したペプチドと^{18}Ｆ接合団とのHuisgen反応をヨウ化銅（Ｉ）、アスコルビン酸ナトリウム、及びアミン塩基としてジイソプロピルエチルアミンを添加した触媒系で行い、室温１０分の条件でペプチドの^{18}Ｆ標識化を行なっている（下記反応式参照）。

[0012] [化2]



[0013] そして、さらに彼らのグループは上記式におけるｎ＝３の^{18}Ｆ接合団を用いて$\alpha_v\beta_6$特異的ペプチドの^{18}Ｆによる標識化を行い、マウスを用いてｉｎ ｖｉｖｏでのＰＥＴ撮像に成功している（非特許文献２）。

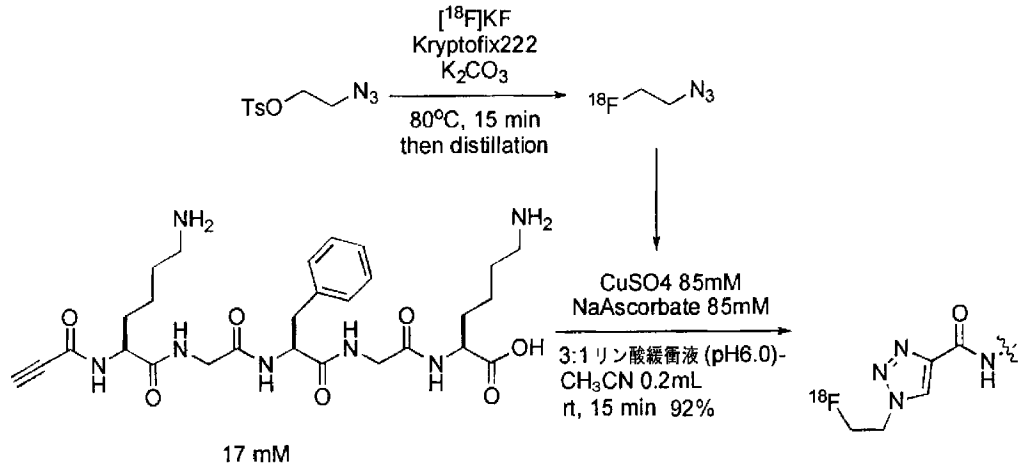
[0014] さらに、上記式におけるｎ＝１のものを用いた例は、韓国のSungkyunkwan大学校のグループからも報告されている（非特許文献３）。

[0015] また、シーメンス・メディカル・ソリューションズ・ＵＳＡ社のグループは

、上記式におけるｎ＝０に相当する化合物を用いる方法を報告している（特許文献１）。すなわち、プロパルギルトシラートを^{18}Ｆ化し反応容器内に^{18}Ｆ接合団([^{18}F]-3-fluoropropyne)を生成させ、これを精製することせずに反応液に大過剰のアジド基質を加え、酢酸銅（Ｉ）でカップリング反応を行っている。

[0016] また、^{18}Ｆ標識アジド化合物を用いた例として、非特許文献４では[^{18}Ｆ]フルオロエチレンアジドを^{18}Ｆとして用いて末端アセチレン基を有するオリゴペプチドとのHuisgen反応を行い、オリゴペプチドの^{18}Ｆ標識化に成功している（下記化学式参照）。

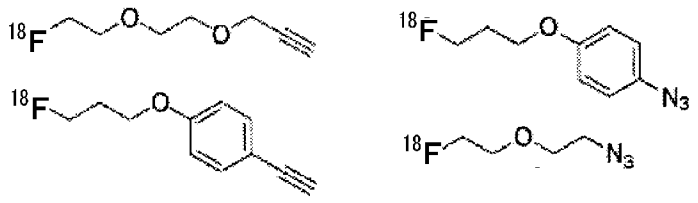
[0017] [化3]



[0018] また、韓国インハ大学校のグループは、複数の^{18}Ｆ標識アルキン化合物及び^{18}Ｆ標識アジド化合物（下記化学式参照）を^{18}Ｆ接合団として用いる方法を報告しており、多岐にわたる基質の^{18}Ｆ標識化を行なっている（非特許文献５）。しかしながら、彼らの方法もまた、特許文献１と同様、^{18}Ｆ接合団の精製をせずにそのままカップリング反応をする方法を取っているため、^{18}Ｆ接合団に対して大過剰の^{18}Ｆ標識化対象化合物を用いている。

[0019]

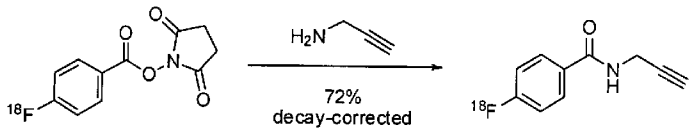
[化4]



[0020] さらに、スタンフォード大のグループは、蒸留法よりも自動化しやすい分取ＨＰＬＣで精製することで、純度の高い^{18}Ｆ標識アルキン化合物を得た（非特許文献６）。そして、硫酸銅－アスコルビン酸ナトリウムでアミン塩基無しの触媒系でHuisgen反応を行うことで、インテグリン$\alpha_v\beta_3$のリガンドの^{18}Ｆ標識化を行ない、マウスを使ったＰＥＴ撮像を行った。

[0021] また、ドイツのDresden-Rossendorf研究センターのグループは下記製法によって合成される4-[^{18}F]Fluoro-N-(prop-2-ynyl)benzamideをSPE法(Solid phase extraction法)で精製して^{18}Ｆ接合団として用い、Huisgen反応を用いてアジド化Neurotensin (8-13)ペプチドの^{18}Fによる標識化を行なっている（非特許文献７）。

[0022] [化5]

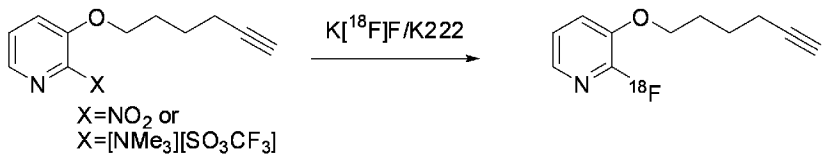


[0023] 彼らは、^{18}Ｆ標識化実験1回あたりに必要なペプチドの使用量を減らすべく、Huisgen反応の条件検討を行い、硫酸銅－アスコルビン酸ナトリウムの触媒系をホウ酸バッファーと共に用いる最適化条件に到達し、アジド化Neurotensin (8-13)ペプチドの使用量を１ｍｇ（約１μｍｏｌ）まで削減することに成功したが、実用化のためには、使用量の更なる削減が必要である。

[0024] また、カナダのTRIUMFのグループは、アリファティックなフッ素よりもアリールフッ素の方が代謝的に安定であろうという仮説を立て、1段階で合成できるアリールフッ素型の^{18}Ｆ接合団を開発し、2008年に報告した（非特許文献８）。

すなわち、下記式に示すピリジン誘導体の２位のニトロ基又はトリメチルアンモニオ基をフッ素置換し、ＨＰＬＣ精製することで純度の高い^{18}Ｆ接合団を得たのちに、ＴＢＴＡ，Ｃｕ（CH_3CN）$_4PF_6$及びジイソプロピルエチルアミンを用いる触媒系で^{18}Ｆ標識化対象化合物（アジド化ペプチド前駆体）とHuisgen反応を行った。しかしながら、^{18}Ｆ標識化対象化合物の使用量は１４００ｎｍｏｌと多く、実用化のためには、やはり、更なる削減が必要である。

[0025] [化6]



[0026] 一方、近年アンチセンス、アンチジーン、デコイ、RNA干渉などの現象に基づく遺伝子治療等の分野が進んでおり、天然型（ＤＮＡ，ＲＮＡ）や、天然型（ＤＮＡ，ＲＮＡ）よりもより優れた薬物動態や生理活性をもつ非天然型（例えば2’-O-MeRNA、ホスホロチオアートオリゴ、BNA類、LNA）の人工核酸を用いた遺伝子治療の試みがなされている。これら天然型あるいは非天然型のオリゴヌクレオチドを^{18}Ｆ標識化してＰＥＴプローブとし、ヒトや実験動物に投与してその生体内での動態をＰＥＴカメラで測定することは、オリゴヌクレオチドの研究を推進し、医薬品としての開発を加速すると思われる。また、オリゴヌクレオチドに特徴的な性質である「相補鎖との二重鎖形成」現象を、^{18}Ｆにより標識化されたオリゴヌクレオチドを用いて生きた生体内で観察すること(in vivo hybridization)ができれば、生体内でのmRNA発現量の簡便な測定が可能になり、疾病の診断及び医学／薬学研究に幅広く応用できると思われる。このような背景から、これまでにもオリゴヌクレオチドの^{18}Ｆ標識化法が研究され、報告されている（例えば非特許文献９～１４）。

先行技術文献

特許文献

[0027] 特許文献1：ＷＯ２００６／１１６６２９

非特許文献

[0028] 非特許文献1：Marik, J.; Sutcliffe, J. L. Tetrahedron Lett. 2006, 47, 6681-6684.

非特許文献2：Hausner, S. H.; Marik, J.; Gagnon, M. K. J.; Sutcliffe, J. L. J. Med. Chem. 2008, 51, 5901-5904.

非特許文献3：Kim, D. H.; Choe, Y. S.; Jung, K. -H.; Lee, K. -H.; Choi, J. Y.; Choi, Y.; Kim, B. -T. Arch. Pharm. Res. 2008, 31, 587-593.

非特許文献4：Glaser, M.; Arstad, E. Bioconjugate Chem. 2007, 18, 989-993.

非特許文献5：Sirion, U.; Kim, H. J.; Lee, J. H.; Seo, J. W.; Lee, B. S.; Lee, S. J.; Oh, S. J.; Chi, D. Y. Tetrahedron Lett. 2007, 48, 3953-3957.

非特許文献6：Li, Z. B.; Wu, Z.; Chen, K.; Chin, F. T.; Chen, X. Bioconjugate Chem. 2007, 18, 1987-1994.

非特許文献7：Ramenda, T.; Bergmann, R.; Wuest, F. Lett. Drug Des. Discovery 2007, 4, 279-285.

非特許文献8：Inkster, J. A. H.; Guerin, B.; Ruth. T. J.; Adam, M. J. J. LabelledCompd. Radiopharm. 2008, 51, 444-452.

非特許文献9：Dolle, F.; Hinnen, F.; Vaufrey, F.; Tavitian, B.; Crouzel, C. J. LabelledCompd. Radiopharm. 1997, 39, 319-330.

非特許文献10：Kuhnast, B.; Dolle, F.; Terrazzino, T.; Rousseau, B.; Loc'h, C.; Vaufrey, F.; Hinnen, F.; Doignon, I.; Pillon, F.; David, C.; Crouzel, C.; Tavitian, B. Bioconjugate Chem. 2000, 11, 627-636.

非特許文献11：Kuhnast, B.; de Bruin, B.; Hinnen, F.; Tavitian, B.; Dolle, F. Bioconjugate Chem. 2004, 15, 617-627.

非特許文献12：Hedberg, E.; Langstrom, B. Acta Chem. Scand. 1997, 51, 1236-1240.

非特許文献13：Hedberg, E.; Langstrom, B. Acta Chem. Scand. 1998, 52, 1034-1039.

非特許文献14：Christopher, W. L.; VanBrocklin, H. F.; Taylor, S. E. J. Label. Compd. Radiopharm. 2002, 45, 257-268.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0029] 上述のように、^{18}Ｆ接合団として、これまで様々な^{18}Ｆ標識アジド化合物及び^{18}Ｆ標識アルキン化合物が合成され、Huisgen反応を利用した^{18}Ｆ標識化が行なわれてきた。そして、さらには^{18}Ｆ標識化された化合物の動態がＰＥＴ法によって調べられてきた。しかしながら、それらの^{18}Ｆ標識アジド化合物では、何れも反応の相手となるアセチレン基修飾基質を多量に用いなければならず、^{18}Ｆ標識アルキン化合物では、何れも反応の相手となるアジ基修飾基質を多量に用いなければならなかった。これは、次のような理由によると考えられる。

[0030] 有機化学の分野において、Huisgen反応は、銅（Ｉ）触媒存在下、アジド化合物とアルキンとを混合するだけで容易かつ迅速に進行する便利な反応と思われているが、Huisgen反応を利用した^{18}Ｆ標識化においては、以下に示すように、事情が全く異なり、極めて困難となる。それは、サイクロトロンによって製造される^{18}Ｆは極少量であるため、極めて低濃度の^{18}Ｆ接合団を用いざるを得ないからである。反応速度論によれば、反応速度は反応速度定数と反応基質との関数となり、このため極めて低濃度の^{18}Ｆ接合団を用いてHuisgen反応を行なう場合、反応速度定数の大きな反応系を選んだり、標識化対象化合物の濃度を高めたりする必要がある。ところが、上記従来の反応系における反応速度定数は充分に大きくはなかったため、標識化対象化合物の濃度を高める、つまり多量の標識化対象化合物を用いるより他なかったのである。このため、例えばオリゴペプチドやオリゴヌクレオチドのように、天然物から多量に単離したり多種多量に合成するには多大な時間とコストがかかる物質を標識化対象化合物とする場合においては、限られた回数のＰＥＴ撮像は

可能であっても、何配列ものオリゴペプチドやオリゴヌクレオチドを用いた本格的なＰＥＴ研究に応用するのは困難となっていたのである。なお、オリゴヌクレオチドに対しては、これまでHuisgen反応を利用して^{18}Ｆ標識化を行なった例は存在しない。

[0031] Huisgen反応を利用しない方法によってオリゴヌクレオチドの^{18}Ｆ標識化を行なった報告としては、前述した非特許文献９～１４が挙げられる。しかし、これらの方法を用いてＰＥＴ法を行なおうとした場合、やはり、多量多種の入手には多大な時間とコストがかかるオリゴヌクレオチド前駆体を多量に用いることが必要であったため、実用化は困難となっていた。また、これらは、５’末端又は３’末端に^{18}Ｆ標識化する方法であり、それ以外の部位への^{18}Ｆ標識化はできなかった。このため、オリゴヌクレオチド前駆体の使用量が少なく、標識化部位の選択の幅が広い^{18}Ｆ標識化法が強く望まれていた。

[0032] 本発明は、上記従来の実情に鑑みてなされたものであり、Huisgen反応に利用できる^{18}Ｆ標識アジド化合物であって、相手基質となるアルキン化合物が少ない量でも^{18}Ｆ標識化が可能であり、ペプチドやオリゴヌクレオチドへのＰＥＴ法の適用が可能であり、オリゴヌクレオチドの５’末端や３’末端以外の部位にも^{18}Ｆ標識化が可能な^{18}Ｆ標識アジド化合物、^{18}Ｆ標識化用試薬及びそれを用いたアルキン化合物の^{18}Ｆ標識方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

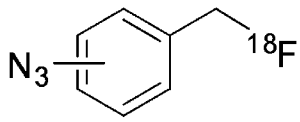
[0033] 本発明者らは、上記従来の問題点を解決すべく、まずＰＥＴ法に適用する上で好ましい^{18}Ｆ標識アジド化合物のデザインについて検討を行なった。^{18}Ｆ標識化に際しては、ＰＥＴ法の対象となる化合物の生体内での動態になるべく影響を与えないよう、分子量の小さな化合物であることが好ましい。このような化合物として究極的には^{18}ＦＣＨ$_2$Ｎ$_3$が考えられるが、沸点が低くてガス化しやすいため、放射能被曝の危険性から使用することができない。このため、ある程度沸点が高いことが好ましい。また、合成後に精製濃縮しやすくするためには、高速液体クロマトグラフ（以下「ＨＰＬＣ」という）装置におけるＵＶ検出器で検出可能な強いＵＶ吸収を持ち、かつ溶出したフラク

ションを濃縮時に揮発しない程度の沸点を持ちようにデザインされていることが望ましい。また、^{18}Ｆ標識アジド化合物の前駆体からは、１段階で迅速に合成できることが望ましい。さらには、化学的な安定性も考慮すべきである。

[0034] こうした要求を満たす化合物として、本発明者らは^{18}Ｆで標識化したフェニルアジド化合物を候補として挙げた。そして、フェニル基の水素をフッ素に変換することは困難であることを考慮し、フェニル基にフルオロアルキル基を導入することを考え、最も小さいフルオロメチル基を導入するデザインを考えた。そして、このデザインに沿った化合物を合成し、さらにはアセチレン基で修飾したオリゴヌクレオチドとのHuisgen反応を行ない、上記問題点を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0035] すなわち、本発明の^{18}Ｆ標識アジド化合物は、下記構造式（１）で示されることを特徴とする。

[化7]



(1)

[0036] 上記^{18}Ｆ標識アジド化合物はアジ基を有しているため、炭素－炭素三重結合を有する化合物とHuisgen反応を起こすことができる。このため、^{18}Ｆ標識化用試薬として用いることができる。

[0037] 本発明者らによれば、上記^{18}Ｆ標識アジド化合物は、アルキン化合物と銅化合物触媒存在下でHuisgen反応を行うことによって、迅速かつ容易に^{18}Ｆ標識トリアゾール誘導体とすることができる。この反応は、従来の^{18}Ｆ標識アジド化合物を用いたHuisgen反応と比べて、相手基質となるアルキン化合物の濃度が低くても反応が進行する。このため、多量に基質を用意することが難しい、ペプチドやオリゴヌクレオチドの^{18}Ｆ標識化にも用いることができる。

[0038] この場合において、反応溶媒として水及び水溶性の有機溶媒からなる混合

溶媒を用い、アスコルビン酸塩及びアミン系塩基の存在下で反応を行なうことが好ましい。水溶性の有機溶媒としては、例えば、ジフェニルスルホン、ジメチルスルホン、ジメチルスルホキシド、ベンゾフェノン、テトラヒドロチオフェン－１，１－ジオキシド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチル－２－ピロリジノン、Ｎ－メチル－ε－カプロラクタム、１，３－ジメチル－２－イミダゾリジノン、メタノール、エタノール、ｎ－プロパノール、ｉ－プロパノール、ｎ－ブタノール、ｉ－ブタノール、ｔ－ブタノールなどが挙げられる。この中でもジメチルスルホキシド（以下ＤＭＳＯという）は溶解力に優れ、安全性が高く、腐食性も少なく、融点や沸点が適当で扱いやすく、収率が良いことから、特に好適に用いることができる。また、アミン系塩基としては、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、２，６－ルチジン、（トリス((1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル)アミン等が挙げられる。これらの中でも、（トリス((1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル)アミン（以下「ＴＢＴＡ」という）が特に好ましい。

[0039] 本発明のアルキン化合物の^{18}Ｆ標識方法におけるアルキン化合物は、ヌクレオチド誘導体とすることができる。オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、アンチジーン、デコイ、RNA干渉などの現象に基づく生理活性から、医薬品へ応用可能な生体分子である。また近年は天然型（ＤＮＡ，ＲＮＡ）よりもより優れた薬物動態や生理活性をもつ非天然型の人工核酸（例えば2’-O-MeRNA、ホスホロチオアートオリゴ、BNA類、LNA）の研究も進んでいる。これら天然型あるいは非天然型のオリゴヌクレオチドを^{18}Ｆ標識化してＰＥＴプローブとし、ヒトや実験動物に投与してその生体内での動態をＰＥＴカメラで測定することは、オリゴヌクレオチドの研究を推進し、医薬品としての開発を加速することができる。

また、オリゴヌクレオチドへのアルキニル基の修飾は、５’末端や３’末端以外の部位へも可能であるため、５’末端や３’末端以外の部位への^{18}Ｆ標識が可能となる。

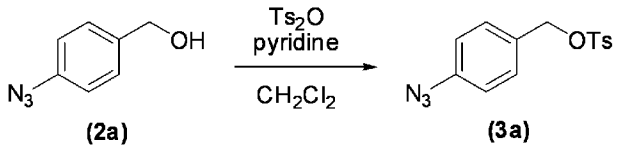
発明を実施するための形態

[0040] 本発明を具体化した実施例について以下に詳細を述べる。

4-メチルベンゼンスルホン酸4-アジドベンジル(3a)の合成

まず、本発明の^{18}Ｆ標識アジド化合物の前駆体となる4-メチルベンゼンスルホン酸4-アジドベンジル(3a)を下記反応式に示す方法により合成した。

[0041] [化8]



(2a) (3a)

[0042] すなわち、4-アジドベンジルアルコール(2a)(文献(Andersena,J.et al.;Synlett 2005, 14, 2209-2213)記載の方法により調製)(149mg、1.00mmol)を塩化メチレン(5.0mL)に溶解し、ピリジン(0.162mL、2.00mmol)及びp-トルエンスルホン酸無水物(343mg、1.05mmol)を0℃で加えた。３０分間撹拌した後、水を加えてクエンチした。水層を除去し、有機層を1mol/L塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣にジエチルエーテル(3mL)を加え、不溶物を綿栓でろ過した。ろ液にヘキサン(5mL)を加えて撹拌し、０℃で３０分静置して結晶を析出させた。上澄み液をピペットを用いて除去し、結晶をヘキサンで洗浄した後、減圧下乾燥して4-メチルベンゼンスルホン酸4-アジドベンジル(3a)(218mg、0.719mmol,71.9%)を無色の結晶として得た。このものの^{1}H-NMRスペクトル、^{13}C-NMR スペクトル及びマススペクトル(EI法)を以下に示す。

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3)

δ: 2.45 (3H, s), 5.02 (2H, s), 6.97 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.24 (3H, d, J = 8.3 Hz), 7.34 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.79 (2H, d, J = 8.3 Hz)

^{13}C-NMR (100 MHz, CDCl3)

δ: 21.7, 71.3, 119.2, 127.9, 129.9, 129.9, 130.3, 133.3, 141.0, 144.

9

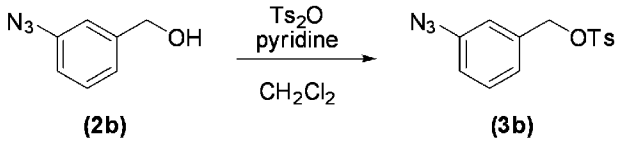
HRMS (EI)

calc 303.0677 obs 303.0650

[0043] 4-メチルベンゼンスルホン酸3-アジドベンジル（３b）の合成

また、上記と同様の方法により、上記化合物(3a)の異性体である4-メチルベンゼンスルホン酸3-アジドベンジル(3b)を収率51.8%で得た。

[0044] [化9]



(2b) (3b)

[0045] このもののIRスペクトル、^{1}H-NMRスペクトル、^{13}C-NMR スペクトル、マススペクトル（EI法）及び元素分析を以下に示す。

IR (film, KBr)

2114, 1593, 1489, 1452, 1360, 1292, 1177, 945, 835, 814, 781, 665 cm^{-1}

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

δ: 2.45 (3H, s), 5.03 (2H, s), 6.85 (1H, s), 6.97 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.03 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.30 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.33 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.79 (2H, d, J = 8.5 Hz)

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$)

δ: 21.6, 71.0, 118.8, 119.5, 124.7, 128.0, 129.9, 130.1, 133.1, 135.3, 140.5, 145.0. LRMS (EI)

calc 303 obs 303.

元素分析

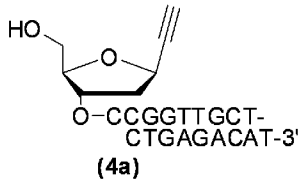
calc. H4.32%, C55.43%, N13.85%. obs. H4.32%, C55.59%, N13.89%

[0046] ＜アセチレン基修飾オリゴヌクレオチドの合成＞

アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４a）の合成

次に、Huisgen反応の基質となるアルキン化合物として、下記アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４a）（式中の配列は天然型ＤＮＡを示す）を文献（S. Obika, et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2009,19,3316-3319）に記載の方法により合成した。

[化10]

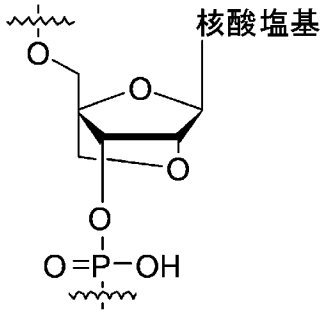


(4a)

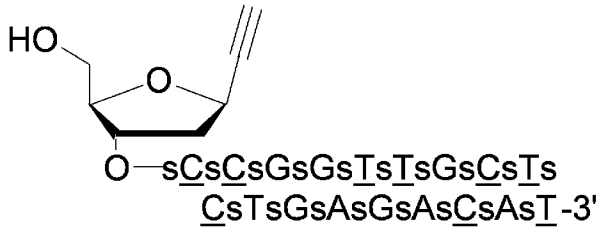
[0047] アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４b）の合成

さらに、人工核酸として２’，４’－ＢＮＡ（ＬＮＡとも呼ばれる、下式参照）及びホスホロチオエート結合を有するアセチレン基修飾オリゴヌクレオチド前駆体(4b)（式中下線部は２’，４’－ＢＮＡを示し、無下線部は天然型のＤＮＡを示す。また、式中「ｓ」は個々にホスホロチオエート結合を示す。）を、文献（S. Obika, et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2009,19,3316-3319）に記載の方法により合成した。

[化11]



[化12]

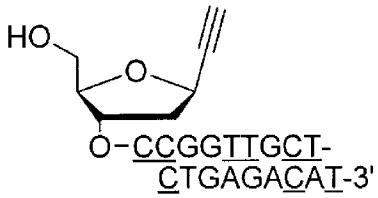


(4b)

[0048] アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４c）の合成

さらに、デオキシリボースの２´位と４´位が架橋化されたアセチレン基修飾オリゴヌクレオチド前駆体(4c)（式中下線部は２’，４’－ＢＮＡを示し、無下線部は天然型のＤＮＡを示す。）を、文献（S. Obika, et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, in press, doi:10.1016/j.bmcl.2009.04.063）に記載の方法により合成した。

[化13]



(4c)

[0049] ＜^{18}Ｆ標識アジド化合物の合成及びアセチレン基修飾オリゴヌクレオチドの^{18}Ｆ標識化＞

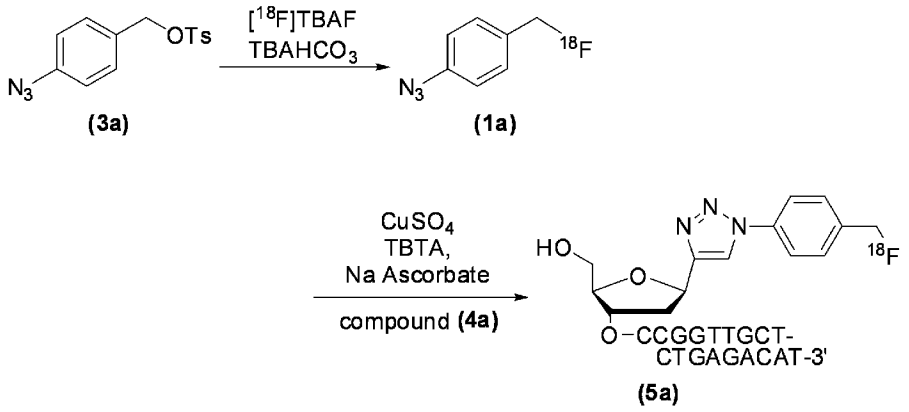
続いて、先に合成した4-メチルベンゼンスルホン酸-4-アジドベンジル(3a)及び4-メチルベンゼンスルホン酸-3-アジドベンジル(3ｂ)を用いて^{18}Ｆ標識アジド化合物を合成し、さらにアセチレン基修飾オリゴヌクレオチドとのHuisgen反応を用いたカップリング反応を行なった。

[0050] （実施例１）

実施例１では、4-メチルベンゼンスルホン酸-4-アジドベンジル(3a)のトシレート基を^{18}Ｆで置換することにより^{18}Ｆ標識アジド化合物(1a)を合成し、さらに上記アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４a）とのHuisgen反応を用

いたカップリング反応を行なった。詳細を以下に示す。

[0051] [化14]



[0052] ＜^{18}Ｆ標識アジド化合物(1a)の合成＞

[^{18}O]水（大陽日酸株式会社製，約2 mL）を12 MeVの電子ビーム（HM-12S，住友重機械工業株式会社製、50μA電流値、３０分）で照射して[^{18}F]フッ素イオンを生成した。得られた約50 GBqの[^{18}F]フッ素イオンの[^{18}O]水溶液をホットセル内に設置した標識用合成装置（GNMS-アルファ大日本精機株式会社製GNMS-α）に導入し、陰イオン交換樹脂カートリッジ(SAIKA-SPE SAX-30、AiSTI SCIENCE製)に通じた。吸着された[^{18}F]フッ素イオンを炭酸水素テトラN-ブチルアンモニウム（0.025 mol/L 80%アセトニトリル／水溶液、0.6 mL）で脱離させ、さらにアセトニトリル0.6 mLで洗浄した。そして、第１の反応容器へ導入した[^{18}F]フッ素イオンの溶液を減圧下、ヘリウム気流を流しながら110℃に加熱して乾固させ、さらにアセトニトリル（1mL）で共沸乾燥した。残渣に（4-メチルベンゼンスルホン酸4-アジドベンジル）（１a）（6.0 mg）のアセトニトリル（1 mL）溶液を加えて８５℃で５分間反応させた。この時の分析ラジオ化学収率は９９%であった。反応混合物をセミ分取HPLC（条件: ナカライテスク株式会社製COSMOSIL MS-II 10 x 250 mmカラム，40%アセトニトニル/水で６分60%で14分通液，4 mL/min流量，保持時間15-16 分に目的物は溶出する)で分離精製した。

[0053] ＜アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド(4a)の^{18}Ｆ標識アジド化合物(1a)によ

る^{18}Ｆ標識化＞

上記のようにして分離精製した^{18}Ｆ標識アジド化合物(1a)を含むフラクションを集め、あらかじめ0.18 mLのDMSOを入れておいた第２の反応容器に移送した。４０℃に加熱しつつヘリウム気流下で減圧してアセトニトリルを慎重に揮発させた。こうして得られた^{18}Ｆ標識アジド化合物（１a）のDMSO-水混合溶液（約0.5 mL）にバッファー（100 mmol/L リン酸ナトリウムバッファー, pH 7.0, 60μL）とアセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４a）（0.50 mmol/L水溶液、40μL）と硫酸銅（50 mmol/L水溶液、12μL）とTBTA（トリス((1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル)アミン、50 mmol/L DMSO溶液、6μL）とアスコルビン酸ナトリウム（50 mmol/L水溶液、12μL）を加えて４０℃で１５分間反応させた。この時の分析ラジオ化学収率は９２％であった。反応液を水（0.3 mL）で希釈し、セミ分取HPLC（条件: ナカライテスク株式会社製COSMOSIL AR-II 10 x 250 mmカラム, カラム温度50 ° C, 20分かけて10-20% CH3CN/ 0.1 mol/L TEAA bufferで直線的にグラジエント, 4 mL/min流量, 保持時間14-15分に目的物は溶出する。）で分離精製した。目的物[^{18}F]（５a）を含むフラクションを集め、減圧下アセトニトリルをエバポレートして^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５a）のTEAAバッファー溶液（5 mL）を得た。

[0054] ＜^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド(5a)の合成に要する時間と収率＞

以上、^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド(5a)の合成に要する時間及び収率等は以下の通りである。

合成時間:84分、単離した（５ａ）の放射能:2.53GBq、比放射能:2366GBq/μmol、化学的純度（UV260nm）:95%、放射化学的純度:87%、[^{18}F]フッ素イオンに基づく放射化学収率:5.2%(減衰補正なし)、8.6%(減衰補正あり)であった。

[0055] また、本合成法は必要に応じてTEAAを脱塩したり、濃縮したりすることも可能である。以下に脱塩の処理の詳細を示す。

[^{18}F]（５a）のTEAAバッファー溶液をSep-Pak Plus C18（ウォーターズ社製

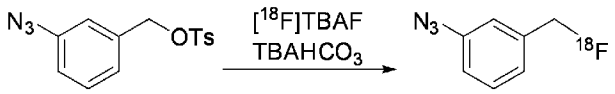
、40 mLの EtOH と40 mLの水でプレコンディショニング済)に通じ、水（５ｍL）で２回洗浄し、窒素ガスフローで１分間乾燥させ、エタノール（1 mL）で[18F]（５a）を溶出させた。エタノールは窒素ガスフローで揮発させ、[18F]（５a）の濃厚水溶液を得た。これを適切な量の生理食塩水で希釈して動物への投与液を作成した。プロセス時間がさらに30分かかったが、90%が回収された(減衰補正あり)。

[0056] （実施例２）

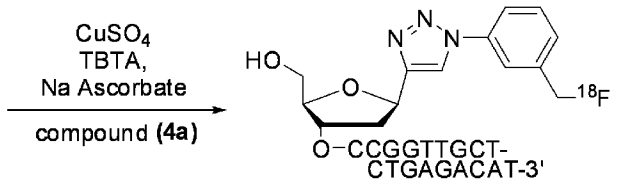
実施例１と同様の方法により、4-メチルベンゼンスルホン酸-3-アジドベンジル(3b)のトシレート基を18Ｆで置換することにより18Ｆ標識アジド化合物(1b)を合成し、さらに上記アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド(4a)とのHuisgen反応を用いたカップリング反応を行なった。

なお、実施例には示さないが、実施例１において出発物質となった4-アジドベンジルアルコール(2a)の代わりに2-アジドベンジルアルコールを用いて、実施例１と同様の操作を行なうことにより、オルト体の18Ｆ標識アジド化合物が得られることは、技術常識から明白である。

[0057] [化15]



(3b) (1b)



(5b)

[0058] ＜18Ｆ標識アジド化合物(1b)の合成＞

実施例１における18Ｆ標識アジド化合物(1a)の合成と同様の方法により、18Ｆ標識アジド化合物(1b)を合成した。

[0059] ＜アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド(4a)の18Ｆ標識アジド化合物(1b)によ

る標識化＞

次いで実施例１と同様の方法により、アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド(4a)の^{18}Ｆ標識アジド化合物(1b)による標識化を行なった。すなわち、上記で合成した^{18}Ｆ標識アジド化合物(1b)とアセチレン基修飾オリゴヌクレオチド(4a)とをHuisgen反応を用いてカップリング反応を行い、^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド(5b)のTEAAバッファー溶液（5mL）を得た。

[0060] ＜^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド(5b)の合成に要する時間と収率＞

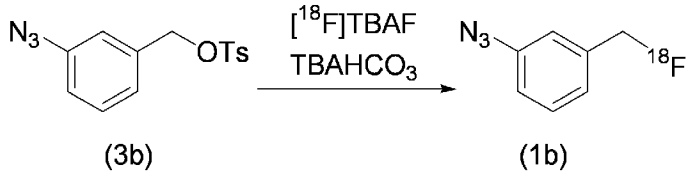
以上、^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド(5b)の合成の合成に要する時間及び収率等は以下の通りである。

合成時間:83分、単離した（５ｂ）の放射能:2.12GBq、比放射能:1809 GBq/μmol、化学的純度（UV260nm）:99%、放射化学的純度:93%、[^{18}F]フッ素イオンに基づく放射化学収率: 4.2%(減衰補正なし)、7.2%(減衰補正あり)であった。

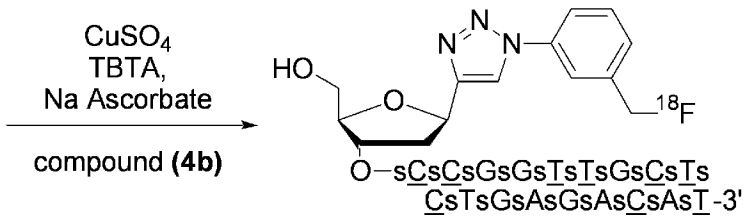
[0061] （実施例３）

実施例３では実施例２と同様の方法により、4-メチルベンゼンスルホン酸-3-アジドベンジル(3b)のトシレート基を^{18}Ｆで置換することにより^{18}Ｆ標識アジド化合物(1b)を合成し、さらに上記アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド(4b)とのHuisgen反応によるカップリングを行なった。

[0062] [化16]



(3b) (1b)



(5c)

[0063] ＜アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４b）の^{18}Ｆ標識化＞

前述の方法により合成した^{18}Ｆ標識アジド化合物(1b)と、アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４b）とを、実施例２と同様の方法によりカップリングさせて^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド(5c)を合成した。

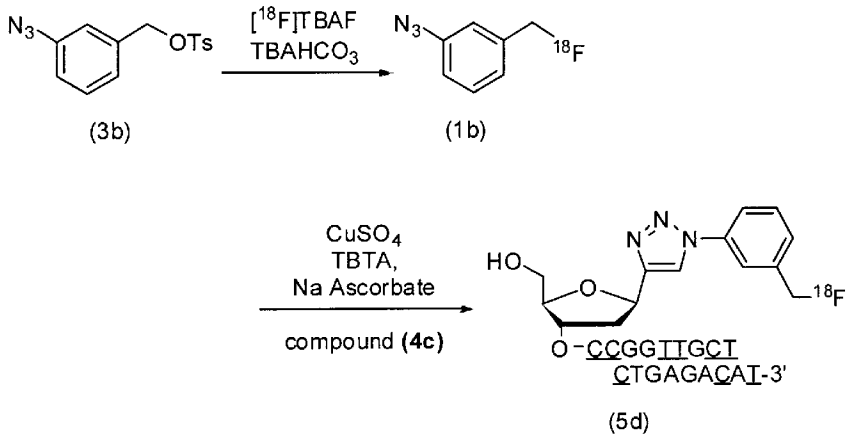
[0064] ＜^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５c）の合成に要する時間と収率＞

合成時間：95分、単離した（５c）の放射能:0.862GBq、比放射能:762 GBq/μmol、化学的純度（UV260nm）:96%、放射化学的純度:>99%、[^{18}F]フッ素イオンに基づく放射化学収率:1.7%(減衰補正なし)、3.1%(減衰補正あり)であった。

[0065] （実施例４）

実施例４では実施例２と同様の方法により、4-メチルベンゼンスルホン酸-3-アジドベンジル(3b)のトシレート基を^{18}Ｆで置換することにより^{18}Ｆ標識アジド化合物(1b)を合成し、さらに上記アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド(4c)とのHuisgen反応によるカップリングを行なった。

[0066] [化17]



[0067] ＜アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４c）の^{18}Ｆ標識化＞

前述の方法により合成した^{18}Ｆ標識アジド化合物(1b)と、アセチレン基修飾オリゴヌクレオチド（４b）とを、実施例２と同様の方法によりカップリングさせて^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド(5d)を合成した。

[0068] ＜^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５d）の合成に要する時間と収率＞

合成時間: 83分、単離した（５ｄ）の放射能:1.66 GBq、比放射能:3205 GBq/μmol、化学的純度（UV260nm）:98%、放射化学的純度:96%、[^{18}F]フッ素イオンに基づく放射化学収率:3.3%(減衰補正なし)、5.6%(減衰補正あり)であった。

[0069] [先行技術との比較]

上記実施例１～３の結果から、極めて希薄な本発明の^{18}Ｆ標識アジド化合物(1a)及び(1b)と、極めて希薄なアセチレン基修飾オリゴヌクレオチドとを、銅化合物触媒存在下でHuisgen反応を行なうことにより、収率よくアルキン化合物の^{18}Ｆ標識化ができることが分かった。表１に、従来の^{18}Ｆ標識化法と本発明の^{18}Ｆ標識化法における、^{18}Ｆ標識化対象化合物の必要量及び^{18}Ｆ標識化対象化合物の必要な濃度を示す。この表から明らかなように、上記実施例１～３で行なった^{18}Ｆ標識アジド化合物（1a)(1b)を用いた^{18}Ｆ標識化は、従来の^{18}Ｆ標識方法と比較して、^{18}Ｆ標識化対象化合物の必要量及び^{18}Ｆ標識化対象化合物の必要な濃度がともに極めて小さい場合でも可能となるという、顕著な効果を奏することが分かる。

[0070] [表1]

		^{18}Ｆ標識化対象化合物の必要量 (nmol)	^{18}Ｆ標識化対象化合物の濃度 (μmol/L)
オリゴヌクレオチド	非特許文献９に記載の方法	100-200	
	非特許文献１０に記載の方法	200-400	200-400
	非特許文献１１に記載の方法	141-275	353-688
	非特許文献１２に記載の方法	70	778
	非特許文献１３に記載の方法	52-140	520-1040
	非特許文献１４に記載の方法	76-600	688-5503
Huisgen反応	非特許文献１に記載の方法	300	136
	非特許文献２に記載の方法	400	533
	非特許文献３に記載の方法	48700	37462
	非特許文献４に記載の方法	3400	17000
	非特許文献５に記載の方法	15000	30000
	非特許文献６に記載の方法	678	565
	非特許文献７に記載の方法	1000	12500
	非特許文献８に記載の方法	1400	9333
	^{18}Ｆ標識アジド化合物(1a)(1b)	10-20	10-40

ここで、非特許文献１～８の方法は、Huisgen反応を利用する^{18}Ｆ標識方法であり、非特許文献９～１４に記載の方法は、オリゴヌクレオチドに対して^{18}Ｆ標識化を行なった従来の例である。

[0071] [反応条件の検討]

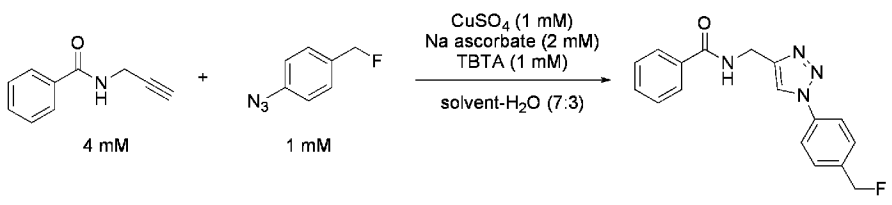
本発明の^{18}Ｆ標識アジド化合物を用いてHuisgen反応による^{18}Ｆ標識化を行なうためには、放射能の被曝を避けるため、合成は機械により遠隔的に行なうことが好ましい。このため、遮蔽されたドラフト内で標識用合成装置を用いることが必要となり、時間も限られ、多量に用いた前駆体、分解物及び各種試薬の中から、痕跡量の^{18}Ｆ標識アジド化合物を非常に高い純度で取得するという要求に答えなければならない。また、Huisgen反応の迅速化及び高収率化も必要となる。このため最適な反応条件の検討を行なった。

[0072] ＜Huisgen反応の適切な条件＞

Huisgen反応における効率化において、反応速度に着目し、これをなるべく大きくするための最適化を検討した。なぜならば、本発明において^{18}Ｆ標識アジド化合物は少量しか合成されないため、極めて希釈された二つの基質を、温和な条件で短時間で反応させる条件を見出す必要があるからである。

[0073] このため、N-(プロパ-2-イニル)ベンズアミドをモデルとなるアルキン化合物の基質として、非標識の^{19}Ｆアジド化合物を用いて反応条件の検討を行なった。まず、反応に最適な有機溶媒をスクリーニングするために、高い濃度の基質同士のHuisgen反応を行った。触媒としては硫酸銅を１ｍＭ／Ｌとし、還元剤としてアスコルビン酸ナトリウムを２ｍＭ／Ｌ、ＴＢＴＡを１ｍＭ／Ｌとし、水：有機溶媒＝３：７(容量比)で有機溶媒を種々変えて、Huisgen反応を行なった。

[0074] [化18]



その結果、下記表２に示すように、非プロトン性極性溶媒を添加した場合が収率がよく、特にＤＭＳＯの場合が最も収率がよかった。また、エントリー５とエントリー６との比較から明らかなように、ＴＢＴＡの添加によって収率を劇的に高められることが分かった。

[0075] [表2]

エントリー	溶媒 a)	収率(%)b)
1	dioxane	94
2	DMF	82
3	CH3CN	1
4	t-BuOH	95
5	DMSO	97
6	DMSOc)	8

a) 有機溶媒：H_2O=(7:3)

b) HPLC から求めた収率

c) TBTA を添加せず

[0076] また、上記の反応において、希薄溶液下における反応条件を検討した。すなわち、放射標識化実験で使われる濃度を模して、より希釈された基質(100μmol/LのN-(プロパ-2-イニル)ベンズアミドと50μmol/Lの非標識^{19}Ｆアジド化合物(1b))とを用い、反応条件を変化させた。その結果、表３に示すように、ＴＢＴＡの濃度は１００μＭ／Ｌ以上で収率が高いことが分かった。また、（TBTAの濃度）／（Cuの濃度）は１よりも１／２の方が収率が良かく、１未満であることが好ましいことが分かった。さらに、反応温度は室温よりも４０℃に加温したほうが、収率が良かった。

[0077]

[表3]

エントリー	Na Asc	TBTA	Cu	温度.	収率(%)[a]
1	1000	1000	1000	室温	71
2	1000	500	1000	室温	79
3	500	250	500	室温	81
4	200	100	200	室温	67
5	100	50	100	室温	41
6	1000	500	1000	40 °C	94
7	500	250	500	40 °C	87

a) HPLC から求めた収率　　反応時間 15 分

＜反応溶媒＞

DMSO/H_2O = 20/80, 10 mmol/L リン酸ナトリウムバッファ pH7

[0078] また、上記表３のエントリー2の条件において、リン酸ナトリウムバッファのｐHを変化させて収率を調べた。その結果、表４に示すように、ｐＨは６．５～７．５の範囲において優れた収率を示し、特にｐＨ７付近で最大になることが分かった。

[0079] [表4]

ｐＨ	収率(%)
6.5	67
7	79
7.5	68

[0080] さらに、上記表３のエントリー2の条件において、ＤＭＳＯの濃度を変化させて収率を調べた。その結果、表５に示すように、ＤＭＳＯの容量%は３０%以上とするのが好ましいことが分かった。

[0081] [表5]

DMSO(容量%)	収率(%)
10	82
20	79
30	92
40	90
50	92

[0082] [ＰＥＴ画像撮影]

上記実施例１で得た^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５a）をラットに投与してＰＥＴ画像を撮影した。すなわち、４５ＭＢｑの^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５a）の生理食塩水溶液を麻酔下のＳＤラット（８週齢、体重２５２ｇ）に尾静脈から投与し、シーメンス社製動物用ＰＥＴ装置ＭｉｃｒｏＰＥＴ　Ｆｏｃｕｓ－２２０で撮像した。プローブ投与後１２０分後から３０分間の全身像（Ｍａｘｉｍｕｍ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ　Ｐｒｏｊｅｃｔｉｏｎ画像）を図１に示す。この図から、投与された^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５a）は、血中で速やかに代謝され、尿排泄されることが分かった。なお、全身の骨組織に強い放射能の集積が認められるが、これは^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５a）の代謝によって生成したＦ$^{-}$イオンに基づくものと考えられる。

[0083] 同様の方法により、^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５ｂ）、（５ｃ）及び（５ｄ）をラットに投与してＰＥＴ撮像した。投与後１２０分後から３０分間の全身像（Ｍａｘｉｍｕｍ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ　Ｐｒｏｊｅｃｔｉｏｎ画像）を図２～図４に示す。これらの図から2’,4’-ＢＮＡ化体である（５ｄ）は血中の代謝が遅くなり、腎臓・膀胱への集積が観察され、骨組織での放射活性は低下していることが分かった。また2’,4’-ＢＮＡ化し骨格をホスホロチオアート結合とした（５ｃ）は血中の代謝がさらに遅くなり、肝臓・腎臓への集積が観察され、骨組織での放射活性はさらに低下していることが分かった。

[0084] 以上のように、本発明の^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチドを用いることにより、2’,4’-ＢＮＡ化オリゴヌクレオチドやホスホロチオアートオリゴヌクレオチドなどの人工核酸の効果について、直接的な観察が可能となる。このことは、例えばＲＮＡ干渉を用いた遺伝子治療の研究において、ヌクレアーゼ耐性や各組織への分布をｉｎ　ｖｉｖｏで、直接的に観察できるなど、オリゴヌクレオチド医薬の研究開発における強力な研究ツールとして利用できることを意味するものである。

[0085] この発明は上記発明の実施の態様及び実施例の説明に何ら限定されるもの

ではない。特許請求の範囲を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

図面の簡単な説明

[0086] [図1]^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５a）をＳＤラットに尾静脈から投与した場合における投与１２０分後から３０分間の積算した場合の全身像（ＭＩＰ画像）である。

[図2]^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５ｂ）をＳＤラットに尾静脈から投与した場合における投与１２０分後から３０分間の積算した場合の全身像（ＭＩＰ画像）である。

[図3]^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５ｃ）をＳＤラットに尾静脈から投与した場合における投与１２０分後から３０分間の積算した場合の全身像（ＭＩＰ画像）である。

[図4]^{18}Ｆ標識化オリゴヌクレオチド（５ｄ）をＳＤラットに尾静脈から投与した場合における投与１２０分後から３０分間の積算した場合の全身像（ＭＩＰ画像）である。

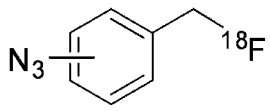
産業上の利用可能性

[0087] 本発明は、個別化医療への展開が期待されているＲＮＡ創薬等、核酸オリゴマーを用いた医療分野において有用な手段を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] 下記構造式（１）で示される^{18}Ｆ標識アジド化合物。

[化1]



(1)

[請求項2] 請求項１に記載の^{18}Ｆ標識アジド化合物からなる^{18}Ｆ標識化用試薬。

[請求項3] アルキン化合物と、請求項１に記載の^{18}Ｆ標識アジド化合物とを銅化合物触媒存在下でHuisgen反応を行ない^{18}Ｆ標識トリアゾール誘導体とするアルキン化合物の^{18}Ｆ標識方法。

[請求項4] 反応溶媒として水及び水溶性の有機溶媒からなる混合溶媒を用い、アスコルビン酸塩及びアミン系塩基の存在下で反応を行なうことを特徴とする請求項３記載のアルキン化合物の^{18}Ｆ標識方法。

[請求項5] アミン系塩基は（トリス((1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル)アミンであることを特徴とする請求項４記載のアルキン化合物の^{18}Ｆ標識方法。

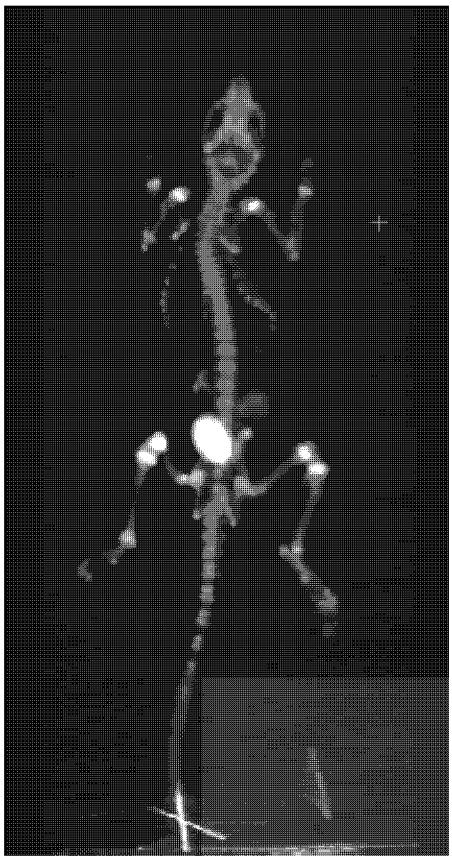
[請求項6] 前記アルキン化合物はヌクレオチド誘導体であることを特徴とする請求項３乃至５のいずれか１項記載のアルキン化合物の^{18}Ｆ標識方法。

WO 2010/131745 PCT/JP2010/058217

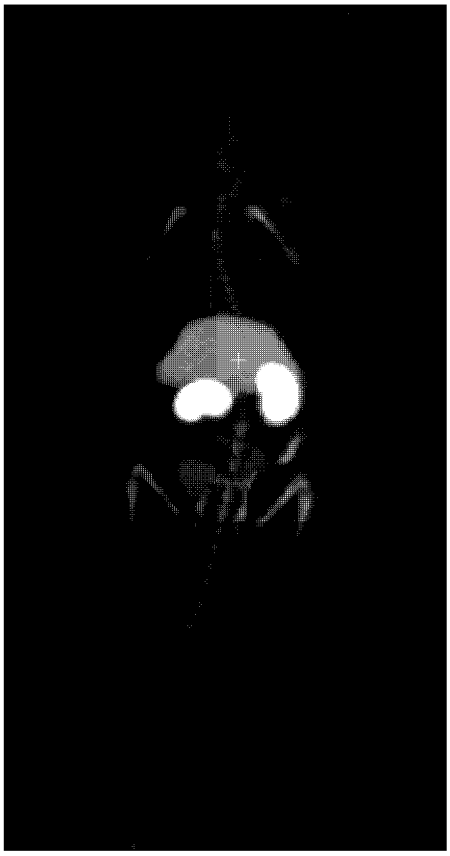
[図1]



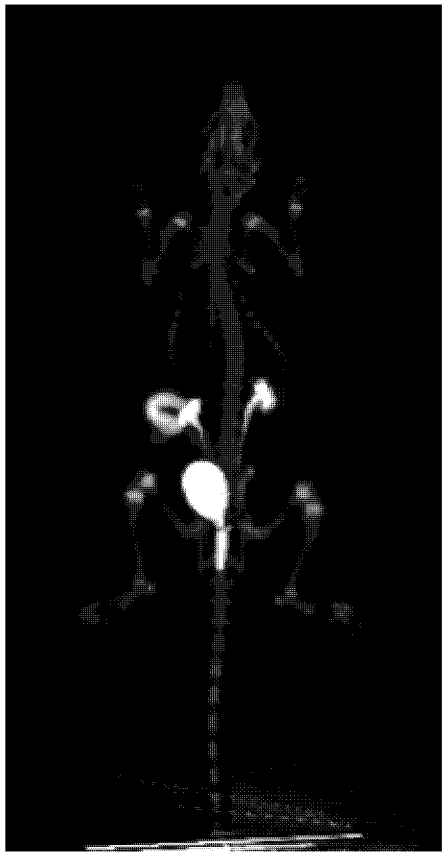
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/058217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07C247/16(2006.01)i, *A61K51/00*(2006.01)i, *C07D249/06*(2006.01)i, *C07H7/06*(2006.01)i, *C07B59/00*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07C247/16, A61K51/00, C07D249/06, C07H7/06, C07B59/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus(STN), REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THONON, D. et al., "New Strategy for the Preparation of Clickable Peptides and Labeling with 1-(Azidomethyl)-4-[^{18}F]-fluorobenzene for PET", Bioconjugate Chem., April 2009, Vol.20, No.4, p.817-823, ISSN: 1043-1802	1-6
A	JP 2008-515875 A (Koninklijke Philips Electronics N.V.), 15 May 2008 (15.05.2008), paragraphs [0061] to [0064]; fig. 5, 6 & US 2008/0075661 A1 & EP 1809339 A2 & WO 2006/038184 A2 & CN 101035565 A & IN 200701402 P4	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 21 June, 2010 (21.06.10)	Date of mailing of the international search report 29 June, 2010 (29.06.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５８２１７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07C247/16(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, C07D249/06(2006.01)i, C07H7/06(2006.01)i, C07B59/00(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07C247/16, A61K51/00, C07D249/06, C07H7/06, C07B59/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus(STN),REGISTRY(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	THONON, D. et al., "New Strategy for the Preparation of Clickable Peptides and Labeling with 1-(Azidomethyl)-4-[^{18}F]-fluorobenzene for PET", Bioconjugate Chem., April 2009, Vol.20, No.4, p.817-823, ISSN: 1043-1802	1-6
A	JP 2008-515875 A (コーニンクレッカ　フィリップス　エレクトロニクス　エヌ　ヴィ) 2008.05.15 [0061]-[0064],図5,6 & US 2008/0075661 A1　& EP 1809339 A2　& WO 2006/038184 A2 & CN 101035565 A　& IN 200701402 P4	1-6

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２１．０６．２０１０	国際調査報告の発送日 ２９．０６．２０１０
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｈ　９５４７ 爾見　武志 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４３