

(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
2012年12月20日(20.12.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/173222 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 51/00 (2006.01) C07F 5/00 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01) C07K 7/64 (2006.01)
C07C 251/16 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/065332
- (22) 国際出願日: 2012年6月15日(15.06.2012)
- (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 2011-135535 2011年6月17日(17.06.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人 千葉大学(NATIONAL UNIVERSITY
CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 荒野 泰
(ARANO, Yasushi) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市
中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉
大学大学院 薬学研究院内 Chiba (JP). 上原 知
也(UEHARA, Tomoya) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千

葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人
千葉大学大学院 薬学研究院内 Chiba (JP).

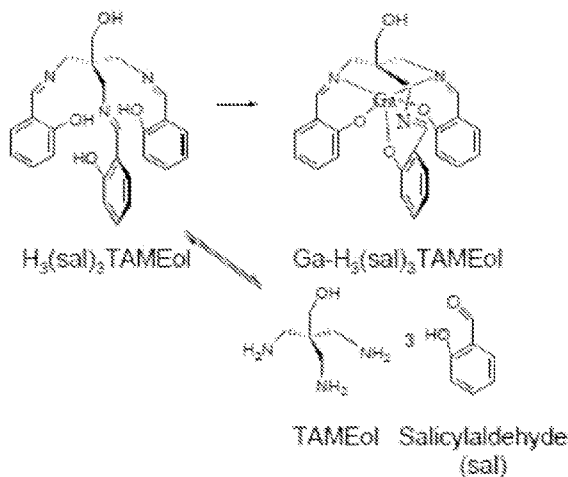
- (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒
5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目6番
13号 御幸ビル307号 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, 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,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) Title: GALLIUM-LABELED DRUG

(54) 発明の名称: ガリウム標識薬剤

[図1]



(57) Abstract: Provided are a radioactive gallium-labeled drug, which comprises gallium 67 or gallium 68 and a complex having a complex structure formed from trisalicylaldimino-methyl-ethanol bonded to a compound that bonds with the target molecules, and which has increased uptake to the target site and stability; the radioactive gallium-labeled drug for diagnostic or therapeutic use; a ligand for preparation of the radioactive gallium-labeled drug; a kit containing, as individually packaged units, the drug containing the ligand and the drug containing the gallium 67 or gallium 68; and a method for producing the radioactive gallium-labeled drug.

(57) 要約: 標的分子に結合する化合物と結合させたトリサリチルアルジミノメチルエタノール(trisalicylaldimino-methyl-ethanol)と、ガリウム67またはガリウム68とから形成される錯体構造を有する錯体を含み、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤; 診断用または治療用の前記放射性ガリウム標識薬剤; 前記放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子; 前記配位子を含む薬剤

とガリウム67またはガリウム68を含む薬剤とを、別々の包装単位として含んでなるキット; および、放射性ガリウム標識薬剤の製造方法を提供する。



WO 2012/173222 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
NE, SN, TD, TG). (規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： ガリウム標識薬剤

技術分野

[0001] 本発明は、標的分子に結合する化合物と結合させたトリサリチルアルジミノメチル エタノール [tri-salicylaldiminomethyl-ethanol、 $H_3(sal)_3TAMEol$] と、ガリウム67 (gallium-67、Ga-67) またはガリウム68 (gallium-68、Ga-68) とから形成される錯体構造を有する錯体を含み、標的部への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤、その製造方法、および前記放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子に関する。

背景技術

[0002] 放射性標識薬剤は、放射性同位元素の核種により標識された化合物を含む薬剤であり、疾患の診断や治療、例えば腫瘍の診断や治療などに広く利用されている。放射性標識薬剤を特定の組織や細胞に集積させることにより、感度の高い診断や有効な治療を行うことができ、また、正常の組織や細胞への副作用を低減することができる。例えば、腫瘍細胞が臓器や組織に転移し、散在しているような場合でも、正常の組織や細胞に影響を与えることなく、有効な診断や治療が行える。放射性標識薬剤を用いた診断や治療においては、有用な核種の選択や、該薬剤を特定の組織や細胞に集積させるための薬剤設計が行われてきた。

[0003] ガリウム (Ga) は原子番号31の元素であり、インジウムと同じ第13族元素に属する。ガリウムの多種類の核種の中でGa-67 (以下、 ^{67}Ga と略称することがある) とGa-68 (以下、 ^{68}Ga と略称することがある) の二つの放射性核種が核医学診断に適した性質を有している。 ^{67}Ga はサイクロトロンにより製造される半減期78時間の γ 線放出核種であり、 ^{67}Ga クエン酸塩 ($^{67}Ga-citrate$) が悪性腫瘍や炎症の診断を目的とした単一光子放射線コンピュータ断層撮影 (single photon

emission computed tomography、以下SPECTと略称する) 用薬剤として臨床で使用されている。一方、 ^{68}Ga は半減期68分の陽電子放出核種であり、ポジトロン断層撮影 (positron emission tomography、以下、PETと略称する) 診断に用いられる。また近年、半減期270日のゲルマニウム-68 (^{68}Ge) との過渡平衡を利用したジェネレータシステムの開発により、サイクロトロンを設置しなくても使えるPET核種として期待されている。

[0004] タンパク質やペプチドなどの生理活性分子は一般に、ガリウムに対する安定な結合部位を有していないことから、標的分子である生理活性分子をガリウムで標識するために、ガリウムへの配位部位と生理活性分子との結合部位とを分子内に併せ持つ二官能性キレート剤を用いた診断薬剤の開発が行われている。実際、内分泌腫瘍に発現するソマトスタチン受容体を標的としたDOTA-D-Phe1-Tyr3-オクトレオチド (DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotide、DOTA-TOC、非特許文献1および2) や乳がんのHer2受容体を標的としたDOTAアフィボディ (DOTA-affibody、非特許文献3) などが研究されている。

[0005] しかしながら、放射性標識薬剤の製造においては、放射性ガリウムなどの金属放射性核種の濃度が極めて低いため、目的とする放射性標識薬剤を高い放射化学的収率で短時間のうちに得るために、大過剰のキレート剤、具体的には0.01~1mM濃度のキレート剤を用いて標識が行われている。そのため、このような放射性標識薬剤をそのまま生体に投与すると、標識されていないキレート剤が標的部位に対して放射性標識薬剤と競合し、放射性標識薬剤の集積の低下を招き、その結果、標的分子の画像化が妨げられる。このような問題に対して、比放射能の向上を目指した検討が行われているが、配位子濃度が低い場合には標識率が低下することや、二官能性キレート剤を複数個導入して標識率を向上させた場合には標的分子との結合親和性が低下することが報告されている (非特許文献4)。

[0006] 一方、分子内に標的分子との結合部位 (標的分子認識素子と称することが

ある)を2分子有する化合物(二価の化合物と称する)は結合部位を1分子有する化合物(一価の化合物と称する)に比べ標的分子への高い結合力を有することが知られており、これは多価効果として医薬品の設計に広く利用されている(非特許文献5~7)。これらの知見から、標的分子認識素子を一つ有する一価配位子が金属原子と1:2あるいは1:3の錯体を作ることによって、標的分子への標識体の集積が向上することが期待できる。

[0007] 実際、本発明者らは、金属放射性核種としてテクネチウム-99m(以下、 ^{99m}Tc と略称することがある)を、そして標的分子認識素子を有する配位子としてArg-Gly-Asp結合ペニシラミン(以下、RGD結合ペニシラミンを称することがある)を用い、 ^{99m}Tc とRGD結合ペニシラミンとで形成された錯体が標的分子への高い集積性を有し、かつ生体内で安定であることを明らかにし、該錯体の放射性標識薬剤としての有用性を示している(特許文献1および2)。

[0008] これに対し、ガリウムと配位子とで形成される1:2あるいは1:3の錯体であって生体内や過剰の配位子を除去した状態で安定に存在するものは報告されていない。生体内では、ガリウム錯体と配位子とは異なる挙動を示すことから、過剰の配位子を除去した場合における安定性が重要となる。2座配位子であるデフェリプロンはガリウムと1:3の錯体を形成するが、形成した錯体溶液から過剰の配位子を除去すると錯体が崩壊することが報告されている(非特許文献8)。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1:特開2009-132691号公報。

特許文献2:国際公開第2010/125647号パンフレット。

非特許文献

[0010] 非特許文献1:ハニン(Hanin, F.-X.)ら、「Tumor uptake of ^{68}Ga -DOTA-Tyr3-octreotate: animal PET studies of tumor flow an

d acute somatostatin receptor modulation in the CA20948 rat model.」、ヌクレアー メディシン アンド バイオロジー (Nuclear Medicine and Biology)、2010年、第37巻、p. 157-165。

非特許文献2:カーン (Khan, M. U.) ら、「Clinical indications for Gallium-68 positron emission tomography imaging.」、ヨーロッパ ジャーナル オブ サージカル オンコロジー (European Journal of Surgical Oncology)、2009年、第35巻、p. 561-567。

非特許文献3:レン (Ren, G.) ら、「A 2-helix small protein labeled with 68Ga for PET imaging of HER2 expression.」、ジャーナル オブ ニュクレアー メディシン (Journal of Nuclear Medicine)、2009年、第50巻、p. 1492-1499。

非特許文献4:レンネン (Rennen, H. J. J. M.) ら、「Labeling proteins with Tc-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the conjugation reaction.」、ヌクレアー メディシン アンド バイオロジー (Nuclear Medicine and Biology)、2000年、第27巻、p. 599-604。

非特許文献5:マムメン (Mammen, M.) ら、「Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibit

ors.」、アンゲヴァンテ ケミー インターナショナル エディション (Angewandte Chemie-International Edition)、1998年、第37巻、p. 2755-2794。

非特許文献6: ムルダー (Mulder, A.) ら、「Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication.」、オーガニック アンド バイオモレキュラー ケミストリー (Organic and Biomolecular Chemistry)、2004年、第2巻、p. 3409-3424。

非特許文献7: キースリング (Kiessling, L. L.) ら、「Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction.」、アンゲヴァンテ ケミー インターナショナル エディション (Angewandte Chemie-International Edition)、2006年、第45巻、p. 2348-2368。

非特許文献8: モテカイティス (Motekaitis, R. J.) ら、「Stabilities of the iron(III) chelates of 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone and related ligands.」、インオーガニカ キミカ アクタ (Inorganica Chimica Acta)、1991年、第183巻、p. 71-80。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] ガリウムの放射性核種は、高度な画像診断や病態の解明などに大きく貢献すると期待されている分子イメージングに有用であるが、生体内で安定であり、かつ、標的部位に効率的に集積する放射性ガリウム標識薬剤は未だ開発されていない。

[0012] 本発明は、標的部位に効率的に集積し、かつ、生体内での高い安定性を有

する放射性ガリウム標識薬剤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

- [0013] 本発明者らは、ガリウムと2座配位子あるいは3座配位子による1:3または1:2の安定な錯体を得ることは困難であり、ガリウムとの安定な錯形成には6座の配位子が必要であると考え、ガリウムと錯形成するときは6座配位子であるが、錯形成後残存した配位子が速やかにn座配位子(n=1-5)に崩壊することでガリウム錯体のみが多価効果を示すという新たな薬剤設計を考案した。そして、シッフ塩基が水溶液中でアミン、アルデヒドと平衡状態にあることに注目し、配位子内にシッフ塩基が存在する場合、該シッフ塩基が、錯未形成時は加水分解を受けてアルデヒドとアミンに分解するが、ガリウムの配位により安定化されることで、標識体のみが6座となり多価効果を示すと考え(図1)、モデル配位子として配位子骨格にシッフ塩基を有するトリサリチルアルジミノメチル エタノール [tri-salicylal diminomethyl-ethanol、以下 $H_3(sal)_3TAMEol$ と略称することがある]を用いて本薬剤設計の基礎的評価を行った。まず、 $H_3(sal)_3TAMEol$ を配位子として用いてガリウムとの錯体 $Ga-(RGD-hx)_3TAMEol$ を作製した。次いで、標的分子認識素子として、悪性腫瘍などの新生血管に高密度に発現することが知られている $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合する環状ペプチド、シクロ-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys [配列表の配列番号1、以下c(RGDfK)と略称することがある]を $Ga-(sal)_3TAMEol$ のベンゼン環にヘキサ酸を介して結合した構造を有する錯体 $Ga-(RGD-hx)_3TAMEol$ を作製し、そのアポトランスフェリン (apo-transferrin) 中での安定性および $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する親和性を検討した。また、担癌モデルマウスを用いて $Ga-(RGD-hx)_3TAMEol$ の標的部位への特異的な集積性をインビボで検討した。
- [0014] その結果、本発明者らは、配位子骨格にシッフ塩基を有する化合物である $H_3(sal)_3TAMEol$ や標的分子認識素子を有する当該化合物である

$H_3(RGD-hx)_3TAMEoI$ とガリウムとの錯体がアポトランスフェリン中で安定であることを明らかにした。さらに、 $H_3(RGD-hx)_3TAMEoI$ とガリウムとの錯体が、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する高い親和性を示すこと、および、担癌モデルマウスを用いた検討において、移植した腫瘍に集積して明瞭な画像を与えたが、排泄組織を除く他の組織へは集積しなかったことを明らかにした。これらの知見から、本発明者らは標的分子結合素子を有する $H_3(sal)_3TAMEoI$ と放射性ガリウムとから形成される錯体が、生体内での高い安定性を有し、かつ、標的部位に効率的に集積する放射性ガリウム標識薬剤を与え得ることを見出し、本発明を完成した。

[0015] 即ち、本発明は以下に関する。

(1) 標的分子に結合する化合物と結合させたトリサリチルアルジミノメチル エタノール [*tri-salicylaldiminomethyl-ethanol*、 $H_3(sal)_3TAMEoI$] と、ガリウム67またはガリウム68とから形成される錯体構造を有する錯体を含み、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤。

(2) 標的分子に結合する化合物と結合させた $H_3(sal)_3TAMEoI$ が、配列表の配列番号1に示す環状ペプチドと結合させた $H_3(sal)_3TAMEoI$ である前記放射性ガリウム標識薬剤。

(3) 6-アミノヘキサノアート c(RGDFK) 結合サリチルアルデヒド (*sal-hx-RGDFK*) と、2, 2', 2''-トリ(アミノメチル) エタノール [2, 2', 2''-tri-(aminomethyl)-ethanol、 $TAMEoI$] と、ガリウム67またはガリウム68とをクエン酸溶液中で反応させることにより形成された錯体を含む、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤。

(4) 診断用放射性標識薬剤である前記いずれかの放射性ガリウム標識薬剤。

(5) 標的分子に結合する化合物と結合させた $H_3(sal)_3TAMEoI$ からなる、標的部位への集積性が増加した放射性ガリウム標識薬剤の調製用

配位子。

(6) 標的分子に結合する化合物とサリチルアルデヒドとを有する化合物およびTAMEoIをインビトロで反応させることにより形成される化学構造を有する化合物からなる、標的部位への集積性が増加した放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子。

(7) 標的分子に結合する化合物が、配列表の配列番号1に示す環状ペプチドである前記放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子。

(8) 前記いずれかの放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子を含む薬剤と、ガリウム67またはガリウム68を含む薬剤とを、別々の包装単位として含んでなるキット。

(9) sal-hx-RGDFKと、TAMEoIと、ガリウム67またはガリウム68とを、別々の包装単位として含んでなるキット。

(10) 標的分子に結合する化合物と結合させた $H_3(sal)_3TAMEoI$ を配位子として用い、ガリウム67またはガリウム68とインビトロで錯形成させることを含む放射性ガリウム標識薬剤の製造方法。

(11) 標的分子に結合する化合物と結合させた $H_3(sal)_3TAMEoI$ が、配列表の配列番号1に示す環状ペプチドと結合させた $H_3(sal)_3TAMEoI$ である前記放射性ガリウム標識薬剤の製造方法。

(12) sal-hx-RGDFKと、TAMEoIと、ガリウム67またはガリウム68とをクエン酸溶液中で反応させることを含む、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤の製造方法。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、標的部位に効率的に集積し、かつ、生体内での高い安定性を有する放射性ガリウム標識薬剤を提供できる。具体的には、本発明により、標的分子に結合する化合物と結合させた $H_3(sal)_3TAMEoI$ と、ガリウム67またはガリウム68とから形成される錯体構造を有する錯体を含み、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤を提供できる。本発明に係る放射性ガリウム標識薬剤に含まれる錯体は、

標的分子への結合部位を1箇所有する標的分子認識素子（1価の標的分子認識素子）を3箇所有する多価錯体であるため、従来使用されていた1価の錯体と比較して、標的部位に高い集積性を示す。

[0017] 従来の放射性ガリウム標識薬剤はその製造において大過剰の配位子を使用するために、そのまま使用すると錯体を形成していない配位子が標的部位に対して放射性標識薬剤と競合し、放射性標識薬剤の標的部位への集積の低下を招き、その結果、分子イメージングにおける標的分子の画像化が妨げられていた。

[0018] 本発明に係る放射性ガリウム標識薬剤は、錯体を形成していない配位子が速やかに配位座の数のより少ない配位子に崩壊し、ガリウム錯体のみが多価効果を示すために、その製造において大過剰の配位子を使用しても標的部位への集積性が高く、分子イメージング技術による診断や治療経過の観察を容易にする。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]配位子がガリウムと錯形成することによりシッフ塩基が安定化し、配位子の分解が防止されることを説明する図である。シッフ塩基を有するモデル配位子であるトリサリチルアルジミノメチル エタノール $[H_3(sal)_3TAMEol]$ は、ガリウムと錯形成しないときはTAMEolとサリチルアルデヒド (Salicylaldehyde、sal) に分解するが、ガリウムと錯形成した $Ga-H_3(sal)_3TAMEol$ は分解しない。

[図2] $^{67}Ga-(sal)_3TAMEol$ と非放射性ガリウム標識 $(sal)_3TAMEol$ のそれぞれの逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 保持時間が一致したことを示す図である。パネル (A) は、 $^{67}Ga-(sal)_3TAMEol$ のRP-HPLC分析における放射活性 (Radioactivity) を示す。パネル (B) は対照である非放射性ガリウム標識 $(sal)_3TAMEol$ のRP-HPLCにおけるガリウムイオン強度 (^{69}Ga ion count) を誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) により分析した結果を示す。横軸は保持時間 (分) [retent

ion time (min)] を示す。(実施例4)

[図3] $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ と非放射性ガリウム標識 $(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ のそれぞれのRP-HPLC保持時間が一致したことを示す図である。パネル(A)は、対照である非放射性ガリウム標識 $(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ をRP-HPLCで分析し紫外吸収(UV吸収)を測定したところ、保持時間28.5分に $\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ 、26分に sal-hx-RGDfK が観察されたことを示す。パネル(B)は、 $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ のRP-HPLC分析において、その放射活性(Radioactivity)が28.5分に観察されたことを示す。パネル(C)は、 ^{67}Ga 標識後にRP-HPLCで分析しUV吸収を測定したところ、主に、 sal-hx-RGDfK が26分に、 ^{67}Ga -クエン酸ガリウム($^{67}\text{Ga-citrate}$)に含まれるベンジルアルコールが15分に観察されたことを示す。横軸は保持時間(分) [retention time (min)] を示す。(実施例4)

[図4] $\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ はエタノール溶液中では安定であるが、リン酸緩衝液中で速やかにサリチルアルデヒドとTAMEolに崩壊することを示す図である。パネル(A)は、エタノール中で $\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ を1時間インキュベーション後にRP-HPLCにより分析しUV吸収を測定した結果を示す。パネル(B)は、リン酸緩衝液中で $\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ を1時間インキュベーション後にRP-HPLCにより分析しUV吸収を測定した結果を示す。保持時間13.5分は $\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ 、保持時間5分はサリチルアルデヒドのピークである。横軸は保持時間(分) [retention time (min)] を示す。(実施例5)

[図5]アポトランスフェリン溶液中において $^{67}\text{Ga}-(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ が安定に存在することを示す図である。横軸は期間(時間) [Time (h)] を、縦軸は完全なものの割合(% of intact)を示す。(実施例5)

[図6]アポトランスフェリン溶液中において $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ が安定に存在することを示す図である。横軸は期間(時間) [Time (h)] を、縦軸は完全なものの割合(% of intact)を示す。(実施例5)

[図7] $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ の標的部位への集積性と、副作用である他組織へのその集積の程度を、担癌モデルマウスを用いてインビボで検討した結果を示す図である。 $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ は、左足に移植した腫瘍(Tumor)を明瞭に画像化したが、腎臓(Kidney)および膀胱(Bladder)の排泄組織を除く他の組織への集積は観察されなかった。(実施例7)

発明を実施するための最良の形態

[0020] 本発明は、標的分子認識素子と結合させたトリサリチルアルジミノメチルエタノール [tri-salicylaldiminomethyl-ethanol、 $\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$] と、ガリウム67またはガリウム68とから形成される錯体構造を有する錯体を含み、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤、その製造方法、および前記放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子に関する。

[0021] 用語「放射性ガリウム標識薬剤」は、放射性標識薬剤の1種であり、ガリウムの放射性核種により標識された化合物を含み、標的部位、例えば特定の組織や細胞の標識化に使用される薬剤を意味する。かかる薬剤は、疾患の診断や治療効果の経過観察など、例えばSPECTやPETなどを用いた分子イメージング技術による診断や治療効果の経過観察に使用される。ガリウムの放射性核種として、 ^{67}Ga または ^{68}Ga を好ましく例示できる。

[0022] 用語「錯体」とは、金属および金属類似元素の原子またはイオンを中心に、配位子が配位した物質を意味し、配位化合物ともいう。配位とは、配位子が中心の金属と配位結合を形成して中心金属の周囲に配列することをいう。錯体は、配位子と金属との配位結合により形成される。配位子と金属による錯体の形成を、錯形成と称することがある。配位結合とは、1本の結合

にあずかる2個の原子価電子が、一方の原子のみから提供されている結合をいう。多配位とは、複数の配位子が中心の金属と配位結合を形成して中心金属の周囲に配列することをいう。n配位とは、n分子の配位子が中心の金属と配位結合を形成して中心金属の周囲に配列することをいう。金属が遷移金属である場合、nは一般的に2から9である。錯体において、中心金属の周囲に集まって配位結合をつくる配位子の数を配位数という。

[0023] 用語「配位子」とは、錯体中で中心金属に配位結合している他の原子（配位原子）を含む化合物を意味する。配位子には多数の種類があり、2つ以上の可能な配位原子を含む化合物を多座配位子、1つである場合を単座配位子、2つである場合を2座配位子、3つである場合を3座配位子のように称する。

[0024] 用語「標的分子認識素子」とは、標的分子に結合する化合物、好ましくは特異的に結合する化合物を意味する。標的分子に特異的に結合するとは、標的分子には結合するが、標的分子以外の分子には結合しないか、弱く結合することをいう。標的分子認識素子として、例えば、タンパク質、ペプチド、抗体、および抗体断片などを挙げることができる。標的分子認識素子と結合させた配位子と金属とで錯体を形成させることにより、該錯体を標的分子、すなわち標的部位に結合させることができる。したがって、標的分子認識素子を選択して用いることにより、所望の標的部位に錯体を集積させることができる。

[0025] 本発明において、錯体を形成する金属は、配位子と2配位以上の配位結合を形成する金属、例えばガリウムが使用される。金属として、好ましくは金属放射性核種が使用される。金属放射性核種として具体的には、 ^{67}Ga および ^{68}Ga を好ましく例示できる。金属放射性核種はこれら具体例に限定されず、放射標識薬剤を用いた診断や、がん疾患などの内部放射線治療などの目的に適切な放射線、放射線量、半減期を有する限りにおいていずれも使用することができる。診断および治療において正常の組織や細胞への影響を少なくするという観点から、短半減期金属放射性核種が好ましく使用される。

[0026] 本発明において、錯体を形成する配位子は、金属と配位結合により多配位の錯体を形成し得る化合物であって、錯体を形成しない場合は速やかに崩壊する化合物が使用される。具体的には、配位子骨格内にシッフ塩基を有する化合物が好ましく例示できる。シッフ塩基は水溶液中でアミン、アルデヒドと平衡状態にあるため、シッフ塩基を有する配位子が錯体を形成していない時には分解されるが、錯形成することにより安定化し、錯形成した標識体のみが多価効果を示すと考えることができる（図1）。したがって、本発明に係る錯体は、その製造において大過剰の配位子を使用しても、錯体を形成していない配位子が速やかに配位座の数のより少ない配位子に崩壊し、錯体のみが多価効果を示すために、標的部位への集積性が従来製造されていた錯体と比較して高い。

[0027] 配位子骨格にシッフ塩基を有する化合物として、トリサリチルアルジミノメチル エタノール [tri-salicylaldiminomethyl-ethanol、 $H_3(sal)_3TAMEol$] を好ましく例示できる。配位子は特に限定されず、金属と多配位の錯体を形成する化合物である限りにおいていずれも使用することができる。

[0028] 本発明において、標的分子認識素子として、タンパク質、ペプチド、抗体、および抗体断片を例示できる。具体的には、炎症や腫瘍細胞浸潤などに伴う組織構築において高い発現が認められるタンパク質や腫瘍細胞に特異的に発現するタンパク質に結合するリガンド、抗体および抗体のFab断片などを例示できる。より具体的には、がんの新生血管に高発現が認められるインテグリンに親和性を有する環状ペプチド、例えばシクロ-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys [配列表の配列番号1、c(RGDfK)] と略称する] を挙げるることができる。そのほか、造骨性のがん（骨転移）に多く存在するヒドロキシアパタイトへの親和性を有するビスフォスホン酸やオリゴアスパラギン酸、オリゴグルタミン酸、マクロファージの表面に存在する走査因子の受容体と親和性があるペプチドであるfMet-Leu-Phe (fMLP)、がん細胞に発現が認められる葉酸受容体と結合する

葉酸とその誘導体などを例示できる。標的分子認識素子は、例示された化合物に限定されず、標的分子に結合する化合物であればいずれを使用することもできる。

[0029] 標的分子認識素子と配位子とを結合させるとき、それらの間にスペーサーを介在させることができる。配位子が複数の標的分子認識素子を有する場合、該配位子と金属とで形成される錯体が多価効果を有効に示すためには、標的分子認識素子同士の間距離が重要となる。標的分子認識素子同士の間距離は、該標的分子認識素子の大きさにより異なる。例えば、 α 、 β 、 γ インテグリンを標的としたRGD結合薬剤の多価効果についての検討で、RGDペプチド間に25～30 bondの間距離が必要とされている。標的分子認識素子同士の間距離は例示した距離に限定されず、使用する標的分子認識素子により適当な距離を選択する。このような距離を保つためにスペーサーの利用が有効である。スペーサーとして好ましく使用できる化合物として、ヘキサン酸などの直鎖飽和カルボン酸、アミノ酸数個からなるペプチド、複数のエチレングリコールからなるエチレングリコール鎖などを例示できる。より好ましくはヘキサン酸を例示できる。標的分子認識素子と配位子を結合させる方法は特に限定されないが、例えば、カルボン酸とアミノ基によるアミド結合や、ハロゲン化アルキルによるN-アルキル化により結合させることができる。

[0030] 錯体の製造は、標的分子認識素子と結合させた $H_3(sal)_3TAMEol$ を配位子として用い、金属とインビトロで錯形成させることにより実施できる。

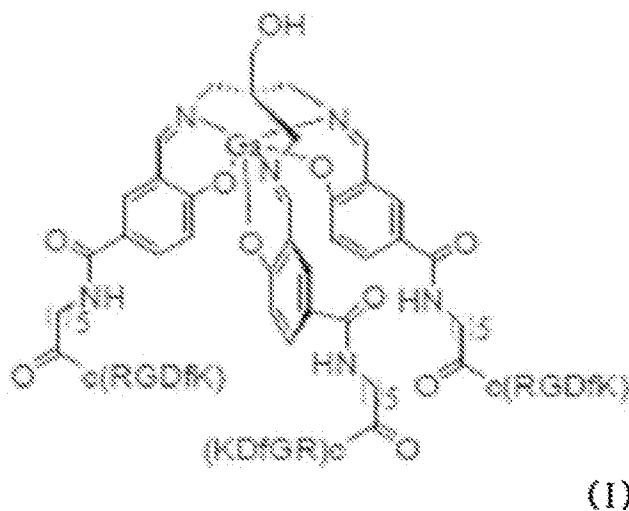
[0031] 錯体の製造は、あるいは、標的分子認識素子と、配位子と、金属とを混合して標的分子認識素子と配位子とを結合させると同時に錯体を形成させることができる。例えば、6-アミノヘキサノアート c (RGDfK) 結合サリチルアルデヒド ($sal-hx-RGDfK$) と、2, 2', 2''-トリ(アミノメチル)エタノール [2, 2', 2''-tri-(aminomethyl)-ethanol, TAMEol] と、 ^{67}Ga または ^{68}Ga

とをクエン酸溶液中で反応させることにより、 ^{67}Ga または ^{68}Ga の錯体を形成させることができる。錯形成反応は、放射性ガリウムとして $^{67}\text{GaCl}_3$ を使用して酢酸緩衝液中あるいはクエン酸溶液中で実施することもできる。好ましい反応条件は、 $^{67}\text{Ga-citrate}$ を使用する場合、配位子濃度が $0.1\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ 程度、クエン酸濃度が $1 \sim 10\text{ mM}$ 程度、 $\text{pH} 4 \sim 6$ 、温度が $80 \sim 100^\circ\text{C}$ 、反応時間が $15 \sim 60$ 分間である。放射性ガリウムとして $^{67}\text{GaCl}_3$ を使用する場合、好ましい反応条件は、配位子濃度が $0.01\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ 程度の 0.1 M 酢酸緩衝液あるいは $0.1\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ クエン酸溶液、 $\text{pH} 3 \sim 6$ 、温度が室温から 100°C 、反応時間が $5 \sim 30$ 分間である。

[0032] 本発明に係る放射性標識薬剤として、 $c(\text{RGDFK})$ (配列表の配列番号1) と結合させた $\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ と ^{67}Ga または ^{68}Ga とから形成される錯体構造を有する錯体を含む放射性標識薬剤を例示できる。

[0033] 本発明に係る放射性標識薬剤として、好ましくは、 $c(\text{RGDFK})$ (配列表の配列番号1) をヘキサミン酸を介して結合させた $\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ と ^{67}Ga または ^{68}Ga とから形成される錯体構造 [下式(1)] を有する錯体を含む放射性標識薬剤を好ましく例示できる。

[0034] [化1]



[0035] 上記式(1)で表される錯体において、 Ga は ^{67}Ga または ^{68}Ga であり

得る。

[0036] 本発明に係る放射性標識薬剤として、より好ましくは、 sal-hx-RGDfK と、 TAMEol と、 ^{67}Ga または ^{68}Ga とをクエン酸溶液中で反応させることにより形成された錯体を含む、放射性ガリウム標識薬剤を例示できる。

[0037] 本発明に係る放射性標識薬剤は、標的分子認識素子と結合させた配位子であって金属と多配位の錯体を形成する配位子と該金属の放射性核種とから形成される錯体を有効成分とするものである。このような錯体は、標的分子認識素子と結合させた配位子であって金属と多配位の錯体を形成する配位子を含むため、配位子と同数の標的分子認識素子を有する。すなわち、このような錯体は複数の標的分子結合部位を有する。このように、標的分子認識素子と結合させた配位子であって金属と多配位の錯体を形成する配位子を含み、その結果錯体中に配位子と同数の標的分子認識素子を有する錯体を多価錯体と称し、そして多価の錯体を有効成分として含む放射性標識薬剤を多価放射性標識薬剤と称する。例えば、標的分子認識素子と結合させた配位子であって金属と3配位の錯体を形成する配位子を含む錯体は、錯体中に3箇所の標的分子結合部位を有し、3価錯体と称する。また、標的分子認識素子と結合させた配位子であって金属と2配位の錯体を形成する配位子を含む錯体は、錯体中に2箇所の標的分子結合部位を有し、2価錯体と称する。標的分子認識素子と結合させた配位子であって金属と1配位の錯体を形成する配位子を含む錯体は、錯体中に1箇所の標的分子結合部位を有し、1価錯体と称する。

[0038] 標的分子への結合部位を2箇所有する化合物（2価の化合物）は標的分子への結合部位を1箇所有する化合物（1価の化合物）に比べて標的分子との高い親和性や集積を示すことが知られている（非特許文献3）。標的分子へ結合する化合物として抗体を例にとると、2価のIgG抗体は、1価のFab断片よりも少なくとも50～100倍、多価抗体のIgMはIgGの10⁴倍の抗原との結合力（avidity）を有する。

[0039] このことから、多価錯体は1価錯体と比較して、標的分子との高い親和性

や集積を示す。したがって、多価錯体を含む放射性標識薬剤は、標的部位に高い集積性を示す。

[0040] 本発明に係る放射性標識薬剤は、放射性標識薬剤を用いた画像診断や、内部放射線治療に使用することができる。本発明に係る放射性標識薬剤は、がん疾患の診断や治療に好ましく使用されるが、適用疾患は特に限定されず、画像診断や内部放射線治療が適用される疾患であればいずれの疾患にも使用できる。診断や治療の対象となる標的の特性にしたがって、放射性標識薬剤の有効成分である錯体に結合させる標的分子認識素子を選択することにより、該標的の診断や治療が可能であり、本放射性標識薬剤は診断および治療の分野で広く使用できる。

[0041] 本発明に係る放射性標識薬剤の投与経路として、静脈内投与あるいは動脈内投与を好ましく挙げることができる。投与経路はこれら経路に限定されず、本放射性標識薬剤の投与後、その作用が有効に発現し得る経路であればいずれも利用できる。

[0042] 本発明に係る放射性標識薬剤の放射活性強度は、本標識薬剤を投与したことにより目的を達成し得る強度であり、かつ、被験者の放射線被曝が可能な限り低い臨床投与量である限りにおいて任意である。放射活性強度は、放射性標識薬剤を使用する一般的な診断方法や治療方法で使用されている放射活性強度を参考にして決定できる。

[0043] 本発明に係る放射性標識薬剤は、上記錯体を有効成分として含むほか、必要に応じて、1種類または2種類以上の医薬的に許容される担体（医薬用担体）を含むことができる。医薬用担体として、pHを調整するための酸、塩基、緩衝液、安定化剤、等張化剤、保存剤を例示できる。

[0044] 本発明において、標的分子認識素子と結合させた $H_3(sal)_3TAMEol$ を含む薬剤と、 ^{67}Ga または ^{68}Ga を含む薬剤とを、別々の包装単位として含んでなるキットを提供できる。本発明に係るキットとして、 $sal-hx-RGDFK$ を含む薬剤と、 $TAMEol$ を含む薬剤と、 ^{67}Ga または ^{68}Ga を含む薬剤とを、別々の包装単位として含んでなるキットを好ましく例

示できる。 ^{67}Ga または ^{68}Ga を含む薬剤は、好ましくは ^{67}Ga 溶液または ^{68}Ga 溶液であり、より好ましくはクエン酸 ^{67}Ga や $^{67}\text{GaCl}_3$ を、さらに好ましくはクエン酸 ^{67}Ga を例示できる。キットに含まれる薬剤は、必要に応じて、上記のような1種類または2種類以上の医薬的に許容される担体（医薬用担体）を含むことができる。

[0045] 本発明に係る放射性標識薬剤の有効成分である錯体は多価錯体であり、1価錯体と比較して、標的分子との高い親和性や集積を示す。したがって、本発明に係る多価錯体を含む放射性標識薬剤は、従来使用されていた1価錯体を含む放射性標識薬剤と比較して、標的部位に高い集積性を示し、そのため放射性標識薬剤を用いた画像診断において高い感度を提供できる。また、本発明に係る多価錯体を含む放射性標識薬剤は、生体内において十分な安定性を示す。

[0046] このように、本発明に係る多価錯体を含む放射性標識薬剤の使用により、標的部位への放射性錯体の集積を増加させることができ、その結果、放射性標識薬剤を用いた画像診断において高い感度を提供できる。例えば、本発明に係る放射性標識薬剤の有効成分である錯体は、がんの新生血管に高発現が認められるインテグリンに親和性を有する環状ペプチドであるc(RGDfK)（配列表の配列番号1）を標的分子認識素子として複数有するため、1価錯体と比較して、標的部位であるがん新生血管への集積が増加する。また、この錯体は生体内において十分な安定性を示した。したがって、このような錯体を含む放射性標識薬剤は、がんの診断において高い感度を提供できる。

[0047] 本発明に係る放射性標識薬剤はまた、従来の放射性ガリウム標識薬剤と比較して有用性が高い。従来の放射性ガリウム標識薬剤はその製造において大過剰の配位子を使用するために、そのまま使用すると錯体を形成していない配位子が標的部位に対して放射性標識薬剤と競合し、放射性標識薬剤の集積の低下を招き、その結果、分子イメージングにおける標的分子の画像化が妨げられていた。一方、本発明に係る放射性標識薬剤は、錯体を形成していな

い配位子が速やかに配位座の数のより少ない配位子に崩壊し、錯体のみが多価効果を示すために、その製造において大過剰の配位子を使用しても標的部位への集積性が高く、分子イメージング技術による診断や治療経過の観察を容易にする。

[0048] 以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

[0049] 標的部位に効率的に集積し、かつ、生体内での高い安定性を有する放射性ガリウム標識薬剤の製造を目的とし、Gaと錯形成するときは6座配位子であるが、錯形成後残存した配位子が速やかにn座配位子（n=1-5）に崩壊するという薬剤設計考案した。そして、シッフ塩基が水溶液中でアミン、アルデヒドと平衡状態にあることに注目し、シッフ塩基を有する配位子が錯体を形成していない時には分解されるが、錯形成することにより安定化すると考え（図1）、モデル配位子として配位子骨格にシッフ塩基を有するH₃(sal)₃TAMEoIを用い、Gaとの錯体Ga-(sal)₃TAMEoIを製造し、本薬剤設計の基礎評価を行った。次いで、標的分子認識素子として、悪性腫瘍などの新生血管に高密度に発現することが知られているα_vβ₃インテグリンに特異的に結合する環状ペプチドであるc(RGDfK)（配列表の配列番号1）を、Ga-(sal)₃TAMEoIのベンゼン環にヘキサ酸を介して結合したGa-(RGD-hx)₃TAMEoIを作製し、そのアポトランスフェリン中での安定性およびα_vβ₃インテグリンに対する親和性を検討した。さらに、担癌モデルマウスを用いてGa-(RGD-hx)₃TAMEoIの標的部位への特異的な集積性をインビボで検討した。

[0050] (機器と試薬)

ガリウム-67 (⁶⁷Ga) は [⁶⁷Ga] Ga-citrate (富士フィルムRIファーマ株式会社、トウキョウ、ニッポン) を用いた。HPLCによる分析は、UV検出器L-7405、ポンプL-7100 (HITACHI製) を使用して行った。RT-HPLCカラムは5C₁₈-AR-300カ

ラム (4.6 × 150 mm、Nacalai Tesque 製、キョウト、ニッポン) を用い、流速 1 mL / 分でミリQ水 (milliQ水、A相) とメタノール (B相) を 50 : 50 から 0 : 100 まで 15 分で変化させる直線グラジエント法 (システム 1)、あるいは A相 : B相 を 90 : 10 から 40 : 60 まで 30 分で変化させる直線グラジエント法 (システム 2)、さらに、TSK gel TMS250 (4.6 × 75 mm TOSOH、トウキョウ、ニッポン) を用いて、流速 0.8 mL / 分で 0.1 M Tris-HNO₃-バッファ pH 7.0 (C相) とアセトニトリル (D相) を 95 : 5 で溶出した (システム 3)。溶出液はフラクションコレクター (Redi Fraction、GEヘルスケア バイオサイエンス製、トウキョウ) を用いて 30 秒毎に分取した。放射活性はオートウェルガンマカウンター (ARC-380M、アロカ、トウキョウ) を用いて計測した。また、LC-ICP-MS による分析は、HPLC 溶出液を ICP-MS HP4500 (アジレント、トウキョウ) にオンラインで接続し分析した。順相薄層クロマトグラフィー (TLC) には、シリカゲルプレート (メルクシリカゲル 60F₂₅₄、日本メルク、トウキョウ) を、逆相薄層クロマトグラフィー (RP-TLC) には逆相シリカゲルプレート (メルクシリカゲル 60-RP-18F₂₅₄s、日本メルク、トウキョウ) を用い、展開溶媒としてメタノール (システム 4) あるいは 0.1 M 酢酸アンモニウム : メタノール = 1 : 1 を用いた。¹H-NMR、ESI-MS および FAB-MS による分析はそれぞれ JEOL JNM-ALPHA 400 スペクトロメータ (JEOL社、トウキョウ) およびアジレント 6100A JEOL JMS-AX 505 マス スペクトロメータ (JEOL社、トウキョウ) を使用して行った。¹²⁵I-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Val (¹²⁵I-RGDyV) および ¹⁸⁵/¹⁸⁷Re-TMEC-[N-hx-c (RGDfK)]₂ は以前に報告した方法 (特許文献 1) に従って合成した。その他の試薬は特級試薬を購入し、そのまま使用した。

実施例 1

[0051] (配位子の合成)

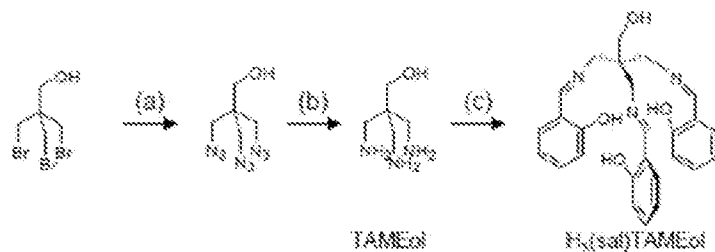
Gaと錯形成するときは6座配位子であるが、錯形成後残存した配位子が速やかにn座配位子(n=1-5)に崩壊するという薬剤設計を基に、配位子の骨格内にシッフ塩基を有する $H_3(sal)_3TAMEol$ を合成した。

[0052] 1. トリサリチルアルジミノメチル エタノール [Tri-salicylalaldiminomethyl-ethanol, $H_3(sal)_3TAMEol$] の合成

[0053] $H_3(sal)_3TAMEol$ の合成法を化学反応式1に示す。

[0054] (化学反応式1)

[化2]



(a) NaN_3 , DMF, (b) Pd/C, H_2 , (c) salicylaldehyde methanol

[0055] 1-1. ペンタエリトリール トリアジド (Penta-erithoritol-triazide) の合成

ペンタエリトリール トリブロミン (Penta-erithoritol-tri-bromin) 2g (6.17mmol) とアジ化ナトリウム 4.7g (72mmol) をジメチルホルムアミド (dimethylformamide, DMF) 35mL に溶解し、窒素雰囲気下 $80^\circ C$ で24時間攪拌した。溶媒を減圧除去した後、残渣をジクロロメタン (dichloromethane) 30mL に溶解し、ミリQ水 (milliQ水) 20mL で2回洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧除去した。残渣をヘキサン：酢酸エチル (3:1) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、ペンタエリトリール トリアジドを無色透明油状物として得た (収量1.10g; 収

率84%)。¹H-NMR (CD₃OD) : δ 3.34 (s, 6H, CH₂)、3.49 (s, 2H, CH₂)、FAB-MS (m/z) : 212 [(M+H)⁺] ; Found : 212.

[0056] 1-2. 2, 2', ' ' -トリ (アミノメチル) エタノール [2, 2', 2' ' -tri-(aminomethyl)-ethanol, TAMEoI] の合成

ペンタエリトリトール トリアジド 1.10g (5.2mmol) と10% パラジウム炭素 (Pd/C) 1.00gにメタノール 10mLを加え、水素雰囲気下4時間攪拌した。セライトろ過した後、溶液を減圧除去し、TAMEoIを無色透明オイルとして得た。この化合物は精製をすることなく次の反応に用いた (収量177mg ; 収率25.6%)。¹H-NMR (CD₃OD) δ 2.61 (s, 6H, CH₂)、3.46 (s, 2H, CH₂) FAB-MS (m/z) : 134 [(M+H)⁺] ; Found : 134.

[0057] 1-3. トリサリチルアルジミノメチル エタノール [H₃(sal)₃TAMEoI] の合成

TAMEoI 170mg (1.27mmol) とサリチルアルデヒド (salicylaldehyde) 489mg (4mmol) をメタノール 10mLに溶解した。一晩室温で静置し、溶媒を減圧濃縮し黄色結晶を得た。結晶を最少量のメタノールに溶解し、再結晶することでH₃(sal)₃TAMEoIを黄色結晶として得た (収量83mg ; 収率14.6%)。¹H-NMR 3.72 (s, 6H, CH₂)、3.75 (s, 2H, CH₂)、6.89 (t, 3H, CH)、6.97 (d, 3H, CH)、7.25 (d, 3H, CH)、7.34 (t, 3H, CH)、8.41 (s, 3H, CH=N)、FAB-MS (m/z) : 446 [(M+H)⁺] ; Found : 446.

実施例 2

[0058] (配位子の合成)

$H_3(sal)_3TAMEol$ を基本骨格とし、かつ、標的分子認識素子として $c(RGDFK)$ （配列表の配列番号1）を有する配位子 $H_3(RGD-hx)_3TAMEol$ の合成を試みた。 $H_3(sal)_3TAMEol$ の各サリチルアルデヒドに標的分子認識素子を結合することで、3価の標識体が得られる。標的分子への結合部位を複数有する多価薬剤の親和性には、それぞれの結合部位同士の距離が重要となる。実際、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを標的としたRGD結合薬剤の多価効果についての検討で、RGDペプチド間に25~30bondの距離が必要とされている。そこでRGDと配位子のスペーサーとしてヘキサン酸を選択して、 $H_3(RGD-hx)_3TAMEol$ の合成を試みた。

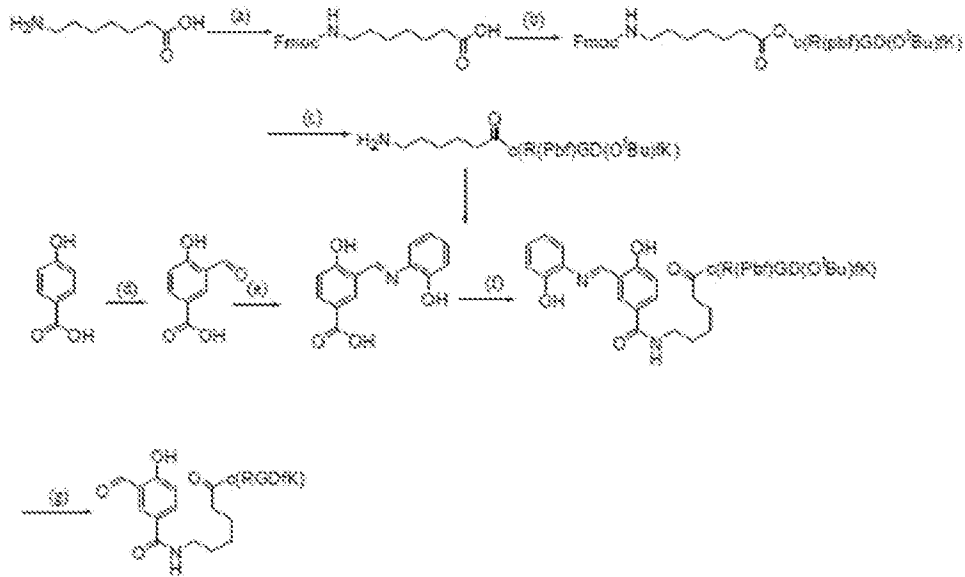
[0059] まず、 $sal-hx-RGDFK$ の合成を行った。アルデヒド基の保護基として当初アセタールを試みたが、導入時の酸触媒により、カルボン酸とのエステル生成が確認され、精製が困難であった。そこで、アミンとアルデヒドとの縮合によりシッフ塩基をつくり、これを保護基として用いた。スペーサーを結合させた $c(RGDFK)$ （配列表の配列番号1）との縮合後、ペプチドの脱保護およびシッフ塩基の加水分解を同時に行い、RT-HPLCにより精製することで $sal-hx-RGDFK$ を7工程で合成した。

[0060] 2. $hx-c(RGDFK)$ 結合サリチルアルデヒド($sal-hx-RGDFK$)の合成

[0061] $sal-hx-RGDFK$ の合成は、具体的には、パラヒドロキシ安息香酸($p-Hydroxybenzoic acid$)を出発物質として用いて、ダフ反応(Duff reaction)によりアルデヒド基を導入し、次いでアミンとの縮合によりシッフ塩基($shiff base$)を作りアルデヒドを保護することにより行った(化学反応式2)。

[0062] (化学反応式2)

[化3]



(a) Fmoc-Cl, 10% NaHCO₃, dioxane, (b) c(R(Pbf)GD(OtBu)fk), WSCI, HOBT, DMF, (c) 10% piperidine/DMF, (d) TFA, hexamethylenetetramine, (e) o-aminophenol, methanol, (f) WSCI, HOBT, (g) TFA/water 9:1

[0063] 2-1. 3-ホルミル-4-ヒドロキシ安息香酸 (3-Formyl-4-hydroxy-benzoic acid) の合成

パラヒドロキシ安息香酸 5.0g (36mmol) をトリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid、TFA) 13mL に懸濁させ、TFA 15mL に溶解したヘキサメチレンテトラミン (hexamethylenetetramine) 5.1g (36mmol) を窒素雰囲気下室温で滴下した。原料が消失するまで70℃で還流した後、室温下4N HCl 100mL を加えた。3時間攪拌後、黄色の析出物をろ取し、300mL のミリQ水で洗浄することにより目的物を得た (収量2.1g ; 収率35%)。¹H-NMR (CD₃OD) 7.01 (d, 1H, Aril), 8.15 (d, 1H, Aril), 8.38 (s, 1H, Aril), 10.11 (s, 1H, CHO)。

[0064] 2-2. 4-ヒドロキシ-3-[(2-ヒドロキシフェニルイミノ)メチル]安息香酸 {4-Hydroxy-3-[(2-hydroxy-ph

enyl imino) - methyl] - benzoic acid} の合成

3-ホルミル-4-ヒドロキシ安息香酸 500mg (3.0mmol) とオルトアミノフェノール (o-amino-phenol) 328mg (3.0mmol) をメタノール (30mL) に溶解した。70°Cで5分間還流後室温まで冷却し、析出した赤褐色結晶をろ取することで目的物を得た (収量240mg; 収率31%)。¹H-NMR (ジメチルスルホキシド (DMSO)) 6.90 (t, 1H, CH), 6.96 (dd, 2H, CH), 7.12 (t, 1H, CH), 7.43 (d, 1H, CH), 7.91 (d, 1H, CH) 8.24 (s, 1H, CH) 9.10 (s, 1H, CH=N). ESI-M (m/z) : 256 [(M-H)⁻]; Found: 256.

[0065] 2-3. Fmoc-6-アミノヘキサン酸 (Fmoc-6-Aminohexanoic acid) の合成

6-アミノヘキサン酸 (6-Aminohexanoic acid) 2.5g (19mmol) を水 38mLに溶解させ、10% NaHCO₃ 溶液 38mLを加え攪拌した。その後、ジオキサン 38mLに溶解した Fmoc-Cl 3.1g (21mmol) を先の溶液に0°Cでゆっくりと滴下した。室温で48時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をジクロロメタン 100mLに溶解し、2N HCl 30mLで洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム-メタノール (40:1) を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的化合物を白色結晶として得た (収量1.61g; 収率24%)。ESI-MS (m/z) : 354 [(M+H)⁺]; Found: 354.

[0066] 2-4. Fmoc-6-アミノヘキサノアート-c [Arg (Pbf) - Gly-Asp (OtBu) -D-Phe-Lys] の合成

Fmoc-6-アミノヘキサン酸 324mg (0.92mmol)、c

y c l o [A r g (P b f) - G l y - A s p (O t B u) - D - P h e - L y s] 838 mg (0.92 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (h y d r o x y b e n z o t r i a z o l e、(H O B t) 156 mg (1.02 mmol) を乾燥 DMF 43.7 mL に溶解した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド [1 - E t h y l - 3 - (3 - d i m e t h y l a m i n o p r o p y l) - c a r o b o d i i m i d e、W S C I] 194 mg (1.02 mmol) の乾燥 DMF (32.8 mL) 溶液を氷冷攪拌下ゆっくりと滴下し、室温で二晩攪拌した。溶媒を減圧留去後、残渣をジクロロメタン 100 mL に溶解し、5% クエン酸 (30 mL)、ブリン (30 mL)、5% NaHCO₃ (30 mL)、ブリン (30 mL)、そして5% クエン酸 (30 mL) を用いて洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣に少量のジエチルエーテル (Et₂O) を加え、析出した薄黄色の結晶を粗生成物として得た。クロロホルム-メタノール (10 : 1) を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的化合物を灰白色の結晶として得た (収量 705.4 mg ; 収率 61.5%)。ESI-MS (m / z) : 1247 [(M + H) ⁺] ; F o u n d : 1247.

[0067] 2-5. 6-アミノヘキサノアート-c [Arg (Pbf) -Gly-Asp (OtBu) -D-Phe-Lys] [hx-c (R (Pbf) GD (OtBu) fK] の合成

F m o c - 6 - アミノヘキサノアート-c [A r g (P b f) - G l y - A s p (O t B u) - D - P h e - L y s] 697.5 mg (0.56 mmol) を5% ピペリジン / DMF 溶液 46.5 mL に溶解し、室温で10分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をノルマルヘキサン (n - h e x a n e) (100 mL) および Et₂O (100 mL) で洗浄することにより目的とする灰白色結晶を得た (収量 578.2 mg ; 収率 100%)。ESI-MS (m / z) : 1025 [(M + H) ⁺] ; F o u n d : 1025.

[0068] 2-6. hx-c [R (Pbf) GD (OtBu) fK] 結合サリチルア

ルデヒド {s a l - h x - c [R (P b f) G D (O t B u) f K]} の合成

4-ヒドロキシ-3-[(2-ヒドロキシフェニルイミノ)メスチル]安息香酸 31 mg (146.4 μmol)、h x - c [R (P b f) G D (O t B u) f K] 100 mg (97.6 μmol)、HOBt 15 mg (10.7 μmol)を乾燥DMF 44 mLに溶解した。乾燥DMF 4.4 mLに溶解したWSCl/HCl 19 mg (10.7 μmol)を氷冷攪拌下ゆっくり滴下した。室温で2日攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル 5 mLおよび5% クエン酸 5 mLで洗浄後、橙黄色の結晶を粗成生物として得た。これ以上の精製を行わず、次の反応に用いた(粗収量: 96.5 mg; 粗収率: 77%)。ESI-MS (m/z): 1265 [(M+H)⁺]; Found: 1265.

[0069] 2-7. h x - c (R G D f K) 結合サリチルアルデヒド (s a l - h x - R G D f K) の合成

S a l - h x - c [R (P b f) G D (O t B u) f K] 70 mg (55.4 μmol)をTFA:水=9:1の溶液30 mLに溶解し、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、残渣を水とアセトニトリル 9:1溶液に溶解し、HPLC (システム1)で分取した(収量: 13.48 mg; 収率: 28.9%)。ESI-MS (m/z): 865 [(M+H)⁺]; Found: 865.

[0070] s a l - h x - R G D f Kを用いて、TAMEoIとの縮合を行い、H₃(RGD-hx)₃TAMEoIの合成を試みたが目的物の合成は困難であった。これはペプチドが有機溶媒に難溶性であり、水溶液中で結合反応を行っているため、形成された配位子が安定に存在できないためと考えられた。そこで配位子H₃(RGD-hx)₃TAMEoIを作製せず、c(RGDfK) (配列表の配列番号1)を標的分子認識素子として有する配位子とガリウムとの錯体の作製は、s a l - h x - R G D f Kと、TAMEoIと、ガリウムとを同時に混合して、配位子骨格の形成とガリウムとの錯形成を同時に行

わせることにより実施した（後述3-2. および4-2.）。

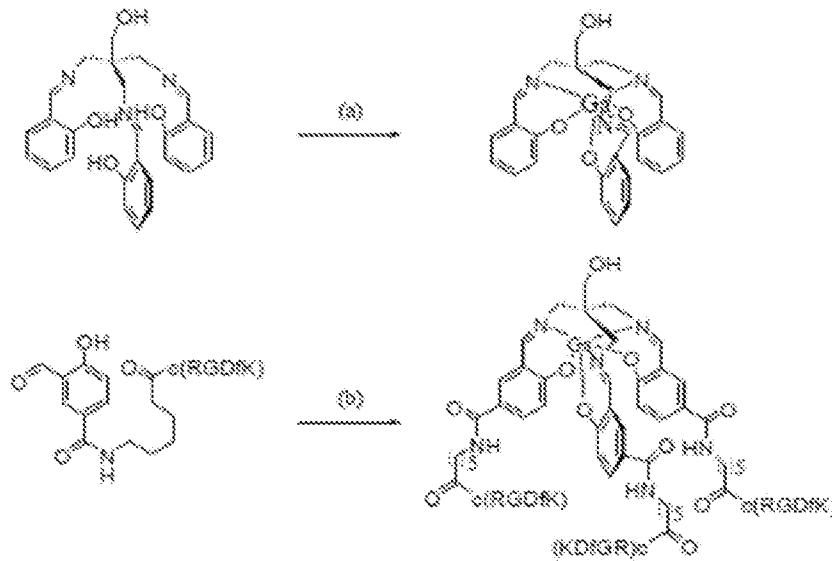
実施例 3

[0071]（非放射性ガリウム錯体の合成）

$\text{Ga}-(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ および $\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ の合成法を化学反応式3に示す。 $\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ はクエン酸ガリウム (Ga-citrate) との配位子交換反応により合成した。

[0072]（化学反応式3）

[化4]



(a) $\text{Ga}(\text{acetate})_3$, 80°C . (b) GaCl_3 , Na-citrate, TAMEol

[0073] 3-1. $\text{Ga}-(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ の合成

$\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ 12.8 mg ($28.9 \mu\text{mol}$) とガリウムアセチルアセトナート (acetylacetonate) 10.5 mg ($28.6 \mu\text{mol}$) をエタノール 8.5 mL に溶解し、 80°C で 12 時間還流した。析出した淡黄色結晶を濾取し、目的とするガリウム錯体を得た (収量 8 mg ; 収率 54%)。FAB-MS (m/z) : 511 [$(\text{M}+\text{H})^+$] ; Found : 510.

[0074] 3-2. Ga-(RGD-hx)₃TAMEolの合成

TAMEol 0.033 mg (250 nmol)、sal-hx-RGDfK 0.86 mg (1 μmol) をミリQ水 120 μL に溶解した。GaCl₃ 34 mg (196 μmol) を0.1 N クエン酸三ナトリウム溶液 4 mL に溶解し、0.2 N NaOH 溶液で pH 6~6.5 に調整した溶液 5 μL を先の溶液に加え、80°C で1時間加熱した。室温まで冷却した後、RT-HPLC (システム3) により精製し、目的とする錯体を得た (収量 0.1 mg; 収率 14.4%)。ESI-MS (m/z): 1370 [(M+2H)²⁺], 914 [(M+3H)³⁺]; Found: 1370 (m/2z), 914 (m/3z)。

[0075] Ga-(sal)₃TAMEol はクロロホルムや酢酸エチルをはじめとするほとんどの有機溶媒に難溶性で、加熱した DMSO にのみ多少溶解した。

実施例 4

[0076] [放射性ガリウム (⁶⁷Ga) 標識]

4-1. ⁶⁷Ga-(sal)₃TAMEolの作製

H₃(sal)₃TAMEol 0.5 mg を1.12 mL のエタノールに溶解した。本溶液 20 μL に⁶⁷Ga-citrate 溶液を 20 μL 加え、80°C で15分間加熱した。放射化学的収率は TLC (システム4) により求めた。

[0077] 4-2. ⁶⁷Ga-(RGD-hx)₃TAMEolの作製

2 mM sal-hx-RGDfK と0.57 mM TAMEol を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液 20 μL に⁶⁷Ga-citrate 溶液 40 μL を加え、80°C で1時間加熱した。放射化学的純度は TLC (システム5) および RP-HPLC (システム3) により求めた。

[0078] [⁶⁷Ga-(sal)₃TAMEolの形成の確認]

⁶⁷Ga-(sal)₃TAMEol は、上記のように⁶⁷Ga-citrate と H₃(sal)₃TAMEol との配位子交換反応により、最終濃度 5 × 10⁻⁴ M において放射化学的収率 95% 以上で得られた。

[0079] $^{67}\text{Ga}-(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ の形成の確認を、RT-HPLCにおける $^{67}\text{Ga}-(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ の保持時間を $\text{Ga}-(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ の保持時間と比較することにより行った。 $\text{H}_3(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ の非放射性ガリウム錯体は難溶性であり、RT-HPLC装置に付随したUV検出装置で検出できる量の溶解度を有していなかったため、非放射性ガリウム錯体の保持時間はICP-MSにより求めた。TSK gel TMS 250カラムを用いたRP-HPLC分析において、非放射性 $\text{Ga}-(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ の保持時間と $^{67}\text{Ga}-(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ 錯体の保持時間(5.5分)が一致した(図2)。また、TLC(システム4)を用いた分析においても同様のRf値(順相:0.55、逆相:0.79)に放射活性とUV吸収を観察した。このように、 $^{67}\text{Ga}-(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ の保持時間が $\text{Ga}-(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ の保持時間と類似したことから、 $^{67}\text{Ga}-(\text{s a l})_3\text{T A M E o l}$ の形成を確認した。

[0080] [$^{67}\text{Ga}-(\text{R G D}-\text{h x})_3\text{T A M E o l}$ の形成の確認]

$^{67}\text{Ga}-(\text{R G D}-\text{h x})_3\text{T A M E o l}$ は、上記のように $\text{s a l}-\text{h x}-\text{R G D f K}$ と T A M E o l を混合した溶液に $^{67}\text{Ga}-\text{c i t r a t e}$ を加えて加熱することにより合成した。本合成方法では、ガリウムの配位した錯体は三価錯体として安定に存在するが、ガリウムが配位しないものは一価配位子のまま存在すると考えられる。そこで、RT-HPLCでの分析および質量分析により構造を確認した非放射性ガリウム錯体 $\text{Ga}-(\text{R G D}-\text{h x})_3\text{T A M E o l}$ のRT-HPLCにおける保持時間と放射性ガリウム錯体の保持時間とを比較することにより、 $^{67}\text{Ga}-(\text{R G D}-\text{h x})_3\text{T A M E o l}$ の形成の確認を行った。

[0081] RP-HPLC(システム2)分析において、 $^{67}\text{Ga}-(\text{R G D}-\text{h x})_3\text{T A M E o l}$ の保持時間は $\text{Ga}-(\text{R G D}-\text{h x})_3\text{T A M E o l}$ のものと一致した(28.5分)(図3のパネルAおよびB)。UVによる分析では、主なUV吸収は $\text{s a l}-\text{h x}-\text{R G D f K}$ および $^{67}\text{Ga}-\text{c i t r a t e}$ に含まれるベンジルアルコールであり(それぞれ26分および15分)、 H_3-

(RGD-hx)₃TAMEoIやH₂-(RGD-hx)₂TAMEoIなどのガリウムを含まない多価配位子のUV吸収は観察されなかった(図3のパネルC)。このことから、本合成方法の産物には⁶⁷Ga錯体のみが三価体として存在していると考えることができる。

[0082] ⁶⁷Ga-(RGD-hx)₃TAMEoIは、最終濃度6.67×10⁻⁴Mにおいて放射化学的収率95%以上で得られた。

実施例 5

[0083] H₃(sal)₃TAMEoI、⁶⁷Ga-(sal)₃TAMEoI、および⁶⁷Ga-(RGD-hx)₃TAMEoIの安定性の評価を行った。

[0084] [H₃(sal)₃TAMEoIの水溶液中での安定性の評価]

配位子であるH₃(sal)₃TAMEoIの安定性の評価を行った。H₃(sal)₃TAMEoIを1mM/エタノール溶液として37°Cで1時間インキュベーションした。また、H₃(sal)₃TAMEoIの1mM/エタノール溶液を10mMリン酸緩衝液(pH7.4)で3倍に希釈し、37°Cで1時間インキュベーションした。両溶液をRP-HPCL(システム3)により分析し、分解で生じるサリチルアルデヒドの量を比較した。

[0085] H₃(sal)₃TAMEoIは、エタノール溶液中では安定であったが、リン酸緩衝液中では保持時間5分のサリチルアルデヒドのピークが主に観察された(図4)。このことから、リン酸緩衝液で希釈することによりH₃(sal)₃TAMEoIは、速やかにサリチルアルデヒドとTAMEoIに崩壊することが明らかになった。

[0086] また、⁶⁷Ga標識した後のRT-HPLC分析においても、H₃(sal)₃TAMEoIの残存量は僅かであった。

[0087] これらの結果は、錯形成後残存した配位子が速やかに2座配位子に分解することを示す。

[0088] (ガリウム錯体のアポトランスフェリン中での安定性の評価)

⁶⁷Ga-(sal)₃TAMEoIの安定性を評価するために、アポトランスフェリンに対する安定性を評価した。Gaは鉄イオンと似た性質をもち、

炭酸イオン存在下では血漿タンパク質であるトランスフェリンと結合する。そのため、不安定なGa錯体は血漿中で分解し、トランスフェリンと結合後、肝臓などへ運ばれる。RT-HPLCで精製した $^{67}\text{Ga}-(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ の炭酸イオン存在下におけるアポトランスフェリンに対する安定性を検討した。

[0089] 具体的には、次のように評価を実施した。まず、RP-HPLC（システム2）により過剰の sal-hx-RGDFK を除去し、精製した $^{67}\text{Ga}-(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ を0.1M 炭酸バッファ（carbonate buffer、pH7.4）に溶解した。本溶液100 μL にアポトランスフェリン 1.04mgを150 μL の0.1 M 炭酸バッファ（pH7.4）に溶解した溶液を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で1、3、6時間インキュベーションし、TLC（システム4、5）およびRP-HPLC（システム3）で未反応の割合を求めた。

[0090] $^{67}\text{Ga}-(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ はアポトランスフェリン溶液中において6時間後まで安定に存在した（図5）。

[0091] これらの結果は、 $\text{H}_3(\text{sal})_3\text{TAMEol}$ が、Gaと錯形成した場合は安定であり、錯形成後残存した場合は速やかに2座配位子に崩壊するという所期の目的を満たした配位子であることを示す。

[0092] 本配位子の各サリチルアルデヒドに標的分子認識素子c（RGDFK）を有し、Gaと錯形成した錯体、 $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ を製作し、同様に安定性の検討を行った。

[0093] $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ も6時間後まで安定に存在した（図6）。従って、パラ位に標的分子認識素子の導入を行っても錯体の安定性に影響はないと考えられた。

[0094] 以上の結果より、TAMEolは標的分子認識素子としてペプチドを導入しても高い安定性を有し、錯形成により生じた $\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{TAMEol}$ のみが三価として安定に存在し、錯形成を行わなかったものは、加水分解により、一価体となるという所期の目的に適した化合物であると考え

られる。

実施例 6

[0095] $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD}-\text{hx})_3\text{TAMEol}$ の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する親和性を検討した。

[0096] [固相 $\alpha_v\beta_3$ 結合アッセイ (Solid-phase $\alpha_v\beta_3$ binding assay)]

標的分子認識素子を3個有する3価の放射性ガリウム錯体 $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD}-\text{hx})_3\text{TAMEol}$ の標的分子 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンへの結合親和性を、 $^{125}\text{I}-\text{RGDyV}$ との競合的結合アッセイにより検討した。対照化合物として、環状ペプタペプチドであり1価化合物である $\text{c}(\text{RGDyV})$ (配列番号2) および2価化合物である $^{185/187}\text{Re}-\text{TMEC}-[\text{N}-\text{hx}-\text{c}(\text{RGDfK})]_2$ (特許文献2) を使用した。

[0097] 具体的には、次のように評価を実施した。イムノロックウェルモジュール (マキシソープ、Nalge-Nunc International K. K.、トウキョウ) プレートに、ヒト精製 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン (Chemicon International, Temecula, CA, USA) のコーティング バッファー (25mM Tris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、1mM CaCl_2 、0.5mM MgCl_2 、1mM MnCl_2) 溶液 (600ng/mL) 100 μL を加え、4 $^\circ\text{C}$ で一晩コーティングした。ウェルをバインディング バッファー (0.1% BSA/コーティング バッファー) 200 μL で2回洗浄した。各ウェルを2時間ブロッキング バッファー (1% BSA/コーティング バッファー) 200 μL でブロッキングした後、各ウェルをバインディング バッファー 200 μL で2回洗浄した。バインディング バッファーに溶解した $^{125}\text{I}-\text{RGDyV}$ 溶液 (95 μL 、0.3 μCi) および各濃度 (2nM、20nM、0.2 μM 、2 μM 、20 μM 、200 μM 、2000 μM) の非放射性リガンド $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD}-\text{hx})_3\text{TAMEol}$ 、 $^{185/187}\text{Re}-\text{TMEC}-[\text{N}-\text{hx}-\text{c}(\text{RGDfK})]_2$ および $\text{c}(\text{RGDyV})$ 溶液

5 μ Lを加えて最終濃度を 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} Mとし、 37°C で1時間振とうした。ウェルをバインディングバッファ $200\mu\text{L}$ で3回洗浄し、各ウェルの放射活性を測定した。

[0098] $^{125}\text{I}-\text{RGDyV}$ との競合的結合アッセイにおいて $\alpha_v\beta_3$ インテグリンへの結合性を評価したところ、 $\text{c}(\text{RGDyV})$ 、 $^{185/187}\text{Re}-\text{TMEC}-[\text{N}-\text{hx}-\text{c}(\text{RGDfK})]_2$ 、および $\text{Ga}-(\text{RGD}-\text{hx})_3\text{TAMEoI}$ の IC_{50} 値はそれぞれ $114 \pm 13\text{ nM}$ 、 $44.7 \pm 13\text{ nM}$ 、および $5.26 \pm 0.35\text{ nM}$ であった。 $\text{Ga}-(\text{RGD}-\text{hx})_3\text{TAMEoI}$ が最も低い IC_{50} 値を示した。

[0099] このように、3価化合物である $\text{Ga}-(\text{RGD}-\text{hx})_3\text{TAMEoI}$ は、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンへの結合能が、1価の化合物である $\text{c}(\text{RGDyV})$ （配列番号2）や2価化合物である $^{185/187}\text{Re}-\text{TMEC}-[\text{N}-\text{hx}-\text{c}(\text{RGDfK})]_2$ （特許文献2）よりも高いことが判明した。

[0100] これらの結果は、 $\text{saI}-\text{hx}-\text{RGDfK}$ と TAMEoI とからなる配位子は、 Ga と錯形成することで、親和性の高い3価の錯体となる一方、未反応の配位子は親和性の低い一価のままであることを示す。

[0101] $\text{c}(\text{RGDfK})$ を標的分子認識素子として用いた以上の検討から、 $\text{H}_3(\text{saI})_3\text{TAMEoI}$ はガリウムと錯形成を行ったもののみが三価体として安定に存在し、錯形成を行わなかったものは加水分解により一価となり、多価効果により親和性に差が生じることが明らかになった。このように、 $\text{H}_3(\text{saI})_3\text{TAMEoI}$ 、および標的分子認識素子を有する $\text{H}_3(\text{saI})_3\text{TAMEoI}$ は、標的部位への集積を向上する新たな放射性ガリウムの標識薬剤の設計に有用である。

実施例 7

[0102] 腫瘍の画像診断における $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD}-\text{hx})_3-\text{TAMEoI}$ の効果と、副作用である他組織への集積の程度を、担癌モデルマウスを用いて検討した。

[0103] 具体的には、ヒトグリオーマ細胞、U87MGを移植した担癌マウスに $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{-TAMEol}$ (6.4 MBq、0.4 mM、100 μL) を投与し、投与1時間後に小動物用SPECT/CT装置にて撮像した。撮像は、5穴マルチピンホールコリメータを装着したFX-3200小動物用SPECT/CT装置 (Gamma Medica社製) を用い、60 s / projection、ROR 45 mmの条件により撮像した。撮像中、マウスは1.3% イソフルラン (isoflurane) により麻酔を行った。

[0104] 図7に示すように、 $^{67}\text{Ga}-(\text{RGD-hx})_3\text{-TAMEol}$ は、左足に移植した腫瘍を明瞭に画像化した。一方、他の組織へのその集積は、腎臓および膀胱の排泄組織以外では観察されなかった。

[0105] 本結果から、標的分子認識素子を有する $\text{H}_3(\text{sAl})_3\text{TAMEol}$ と放射性ガリウムとから形成される錯体構造を有する錯体は、標的部位に特異的に集積し、画像診断で標的部位を明瞭に画像化できること、および排泄組織以外の他の組織に集積するという副作用を示さないことが、インビボにおいて明らかになった。

産業上の利用可能性

[0106] 以上説明したとおり、本発明は、標的分子認識素子と結合させた $\text{H}_3(\text{sAl})_3\text{TAMEol}$ と、ガリウム67またはガリウム68とから形成される錯体を含み、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤を提供できる。

[0107] 本発明に係る放射性ガリウム標識薬剤は、錯体を形成していない配位子が速やかに配位座の数のより少ない配位子に崩壊し、ガリウム錯体のみが多価効果を示すために、標的部位への集積性が高く、また、安定性も高いため、疾患の診断や治療効果の経過観察など、例えばSPECTやPETなどを用いた分子イメージング技術による診断や治療効果の経過観察などに有用である。

配列表フリーテキスト

[0108] 配列番号 1 : 第 10 フィブロネクチンタイプ III 反復領域に由来する環状ペプチド。

配列番号 2 : 環状ペプチド。

請求の範囲

- [請求項1] 標的分子に結合する化合物と結合させたトリサリチルアルジミノメチル エタノール [tri-salicylaldiminomethyl-ethanol、 $H_3(sal)_3TAMEol$] と、ガリウム67またはガリウム68とから形成される錯体構造を有する錯体を含み、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤。
- [請求項2] 標的分子に結合する化合物と結合させた $H_3(sal)_3TAMEol$ が、配列表の配列番号1に示す環状ペプチドと結合させた $H_3(sal)_3TAMEol$ である請求項1に記載の放射性ガリウム標識薬剤。
- [請求項3] 6-アミノヘキサノアト c (RGDFK) 結合サリチルアルデヒドと、2, 2', 2''-トリ (アミノメチル) エタノール [2, 2', 2''-tri-(aminomethyl)-ethanol、TAMEol] と、ガリウム67またはガリウム68とをクエン酸溶液中で反応させることにより形成された錯体を含む、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤。
- [請求項4] 診断用放射性標識薬剤である請求項1から3のいずれか1項に記載の放射性ガリウム標識薬剤。
- [請求項5] 標的分子に結合する化合物と結合させたトリサリチルアルジミノメチル エタノール [tri-salicylaldiminomethyl-ethanol、 $H_3(sal)_3TAMEol$] からなる、標的部位への集積性が増加した診断用放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子。
- [請求項6] 標的分子に結合する化合物とサリチルアルデヒドとを有する化合物および2, 2', 2''-トリ (アミノメチル) エタノール [2, 2', 2''-tri-(aminomethyl)-ethanol、TAMEol] をインビトロで反応させることにより形成される化学

構造を有する化合物からなる、標的部位への集積性が増加した放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子。

[請求項7] 標的分子に結合する化合物が配列表の配列番号1に示す環状ペプチドである請求項5または6に記載の放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子。

[請求項8] 請求項5から7のいずれか1項に記載の放射性ガリウム標識薬剤の調製用配位子を含む薬剤と、ガリウム67またはガリウム68を含む薬剤とを、別々の包装単位として含んでなるキット。

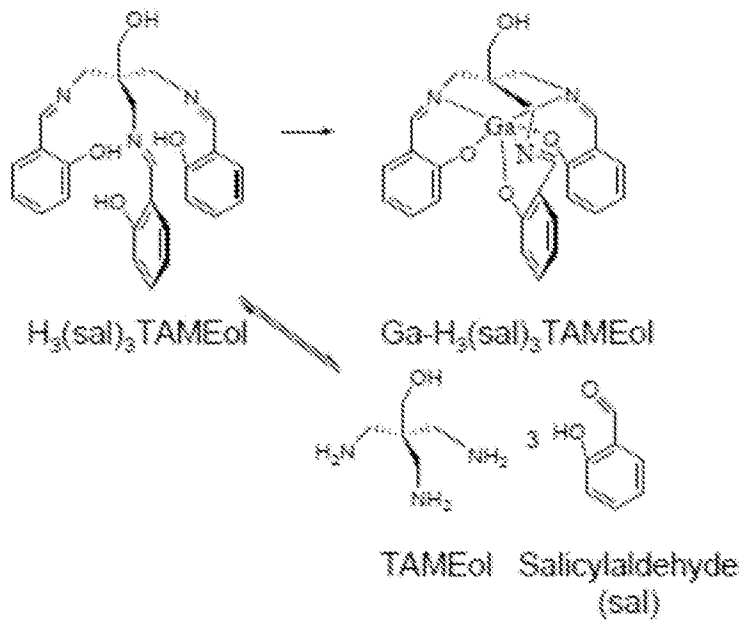
[請求項9] 6-アミノヘキサノアート c (RGDFK) 結合サリチルアルデヒドと、2, 2', 2''-トリ(アミノメチル)エタノール [2, 2', 2''-tri-(aminomethyl)-ethanol、TAMEol] と、ガリウム67またはガリウム68とを、別々の包装単位として含んでなるキット。

[請求項10] 標的分子に結合する化合物と結合させたトリサリチルアルジミノメチルエタノール [tri-salicylaldiminomethyl-ethanol、H₃(sal)₃TAMEol] を配位子として用い、ガリウム67またはガリウム68とインビトロで錯形成させることを含む放射性ガリウム標識薬剤の製造方法。

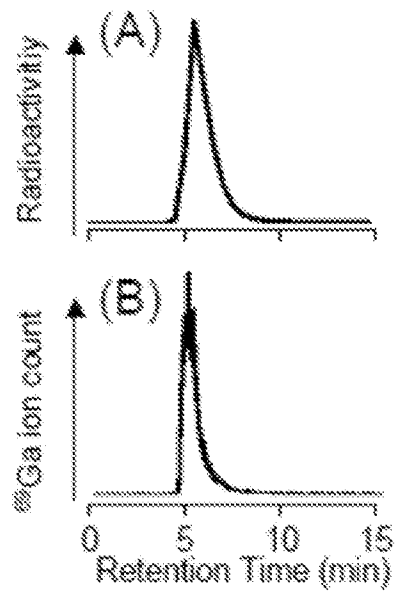
[請求項11] 標的分子に結合する化合物と結合させたH₃(sal)₃TAMEolが、配列表の配列番号1に示す環状ペプチドと結合させたH₃(sal)₃TAMEolである請求項10に記載の放射性ガリウム標識薬剤の製造方法。

[請求項12] 6-アミノヘキサノアート c (RGDFK) 結合サリチルアルデヒドと、2, 2', 2''-トリ(アミノメチル)エタノール [2, 2', 2''-tri-(aminomethyl)-ethanol、TAMEol] と、ガリウム67またはガリウム68とをクエン酸溶液中で反応させることを含む、標的部位への集積性および安定性が増加した放射性ガリウム標識薬剤の製造方法。

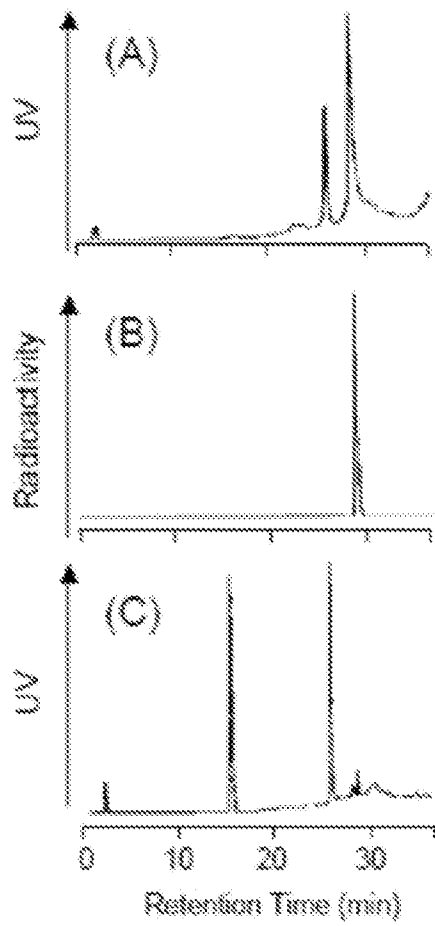
[図1]



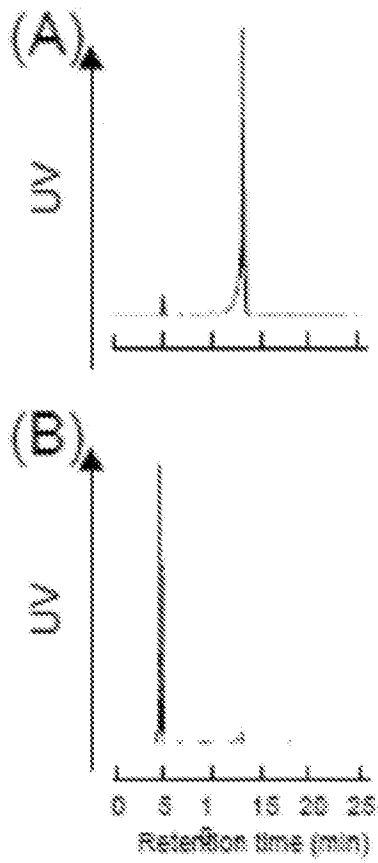
[図2]



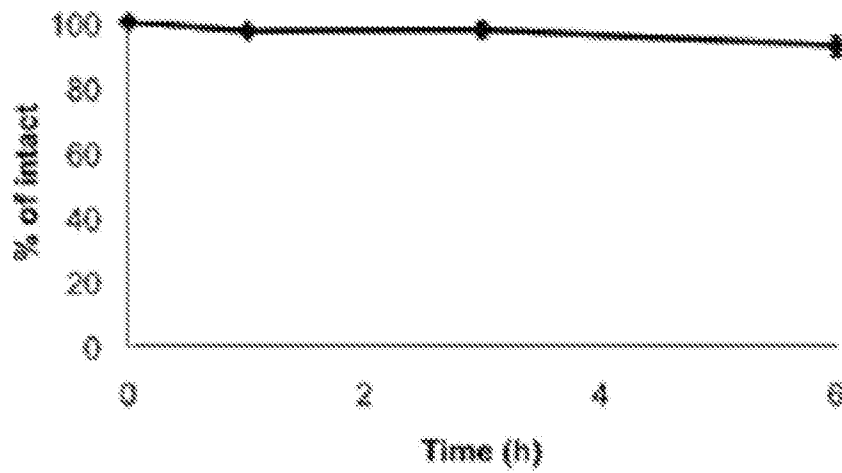
[圖3]



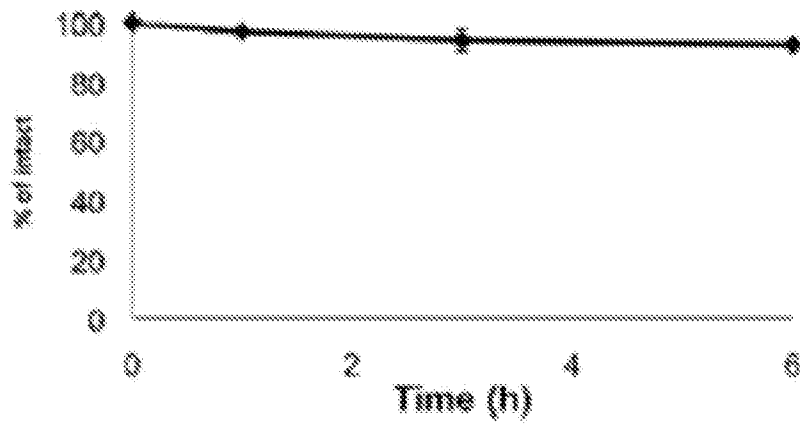
[図4]



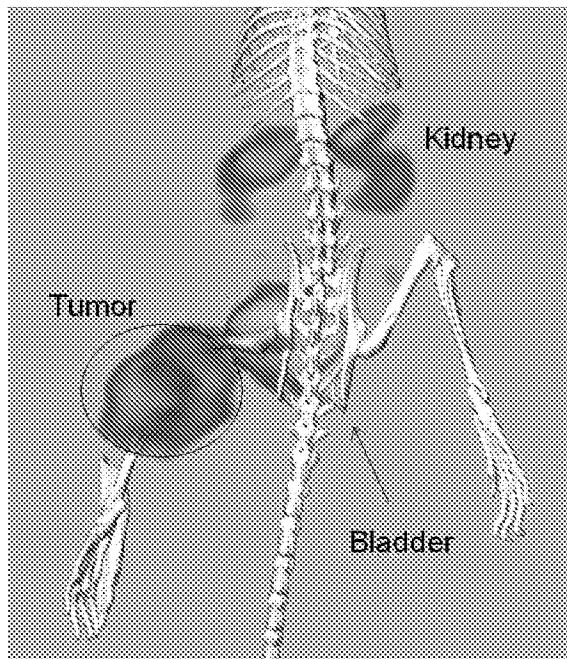
[図5]



[圖6]



[圖7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/065332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K51/00(2006.01)i, C07B59/00(2006.01)n, C07C251/16(2006.01)n, C07F5/00(2006.01)n, C07K7/64(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)

A61K51/00, C07B59/00, C07C251/16, C07F5/00, C07K7/64

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	GOTTSCHALDT, M. et al, InIII and GaIII Complexes of Sugar-Substituted Tripodal Trisalicylidene Imines: The First ⁶⁸ Ga-Labeled Sugar Derivative, European Journal of Inorganic Chemistry, 2009, No.28, p.4298-4307, entire text, particularly, Abstract	1, 4-6, 8, 10 1-12
X Y	JP 4-500072 A (MALLINCKRODT INC.), 09 January 1992 (09.01.1992), entire text; particularly, claims; examples & WO 90/00854 A & EP 426759 A & US 5071965 A & EP 426759 B1	1, 4-6, 8, 10 1-12
Y	WO 2010/125647 A1 (UNIV CHIBA NAT CORP., JP), 04 November 2010 (04.11.2010), entire text; particularly, examples (Family: none)	1-12

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
13 August, 2012 (13.08.12)

Date of mailing of the international search report
21 August, 2012 (21.08.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/065332

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-132691 A (UNIV CHIBA, JP), 18 June 2009 (18.06.2009), entire text; particularly, examples (Family: none)	1-12
P,A	Tomoya UEHARA et al., "Takai Hyoteki Shikosei o Yusuru Taka Hoshasei Gallium Sakutai: RGD Peptide o Mochiita Kento", Japanese Journal of Nuclear Medicine, 30 September 2011 (30.09. 2011), vol.48, no.3, page 305, entire text	1-12
A	Takemi ROKUGAWA et al., "Basic studies on multivalent ⁶⁸ Ga-labeled probes: A preliminary study with RGD peptides", Abstracts of Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, 05 March 2011 (05.03.2011), vol.131, no.4, page 97, entire text	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K51/00(2006.01)i, C07B59/00(2006.01)n, C07C251/16(2006.01)n, C07F5/00(2006.01)n, C07K7/64(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. A61K51/00, C07B59/00, C07C251/16, C07F5/00, C07K7/64

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

日本国实用新案公報	1922-1996年
日本国公開实用新案公報	1971-2012年
日本国实用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録实用新案公報	1994-2012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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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
X Y	GOTTSCHALDT, M. et al, InIII and GaIII Complexes of Sugar-Substituted Tripodal Trisalicylidene Imines: The First 68Ga-Labeled Sugar Derivative, European Journal of Inorganic Chemistry, 2009, No. 28, p. 4298-4307, 全文, 特に Abstract	1, 4-6, 8, 10 1-12
X Y	JP 4-500072 A (MALLINCKRODT INC) 1992.01.09, 全文, 特に請求項, 実施例 & WO 90/00854 A & EP 426759 A & US 5071965 A & EP 426759 B1	1, 4-6, 8, 10 1-12

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

13.08.2012

国際調査報告の発送日

21.08.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 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)

小堀 麻子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

2938

C (続き) . 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
Y	WO 2010/125647 A1 (UNIV CHIBA NAT CORP, JP) 2010. 11. 04, 全文, 特に実施例 (ファミリーなし)	1-12
Y	JP 2009-132691 A (UNIV CHIBA, JP) 2009. 06. 18, 全文, 特に実施例 (ファミリーなし)	1-12
P A	上原知也他, 高い標的指向性を有する多価放射性ガリウム錯体:RGD ペプチドを用いた検討, 核医学, 2011. 09. 30, Vol. 48, No. 3, p. 305, 全文	1-12
A	六川武美他, 多価 ⁶⁸ Ga 標識プローブの開発に関する基礎的検討:RGD ペプチドを用いた評価, 日本薬学会年会要旨集, 2011. 03. 05, Vol. 131, No. 4, p. 97, 全文	1-12