

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-507376

(P2005-507376A)

(43) 公表日 平成17年3月17日(2005.3.17)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/00	C O 7 K 7/00 Z N A	4 C O 7 6
A61K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C O 8 4
A61K 49/00	A 6 1 K 49/00 C	4 C O 8 5
A61K 49/04	A 6 1 K 49/04 A	4 H O 4 5
A61K 51/00	A 6 1 P 1/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 103 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-512261 (P2003-512261)	(71) 出願人	396019387
(86) (22) 出願日	平成14年7月8日 (2002.7.8)		アメルシャム ヘルス アクスイエ セル
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月9日 (2004.1.9)		スカプ
(86) 国際出願番号	PCT/N02002/000250		ノルウェー国, エン-0401 オスロ、
(87) 国際公開番号	W02003/006491		ニイダレン、ポストボックス 4220 ニ
(87) 国際公開日	平成15年1月23日 (2003.1.23)		イコペイエン 2
(31) 優先権主張番号	0116815.2	(74) 代理人	100058479
(32) 優先日	平成13年7月10日 (2001.7.10)		弁理士 鈴江 武彦
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100091351
(31) 優先権主張番号	20014954		弁理士 河野 哲
(32) 優先日	平成13年10月11日 (2001.10.11)	(74) 代理人	100088683
(33) 優先権主張国	ノルウェー (NO)		弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ペプチドベースの化合物

(57) 【要約】

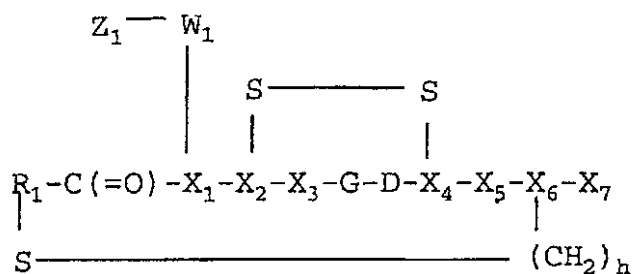
本発明はインテグリンレセプターと結合するターゲッティングベクターを含んでなる診断イメージング剤または治療薬として使用するための新規なペプチドベースの化合物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I)

【化 1】



10

(I)

の化合物またはその医薬上許容される塩

{式中、

Gはグリシンを表し、

Dはアスパラギン酸を表し、

R₁は-(CH₂)_n-または-(CH₂)_n-C₆H₄-を表し、ここで、

20

nは正の整数1~10を表し、

hは正の整数1または2を表し、

X₁は酸またはアミンなどの官能性側鎖を有するアミノ酸残基を表し、X₂およびX₄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、X₃はアルギニン、N-メチルアルギニンまたはアルギニンミメティックを表し、X₅は疎水性アミノ酸またはその誘導体を表し、かつ、X₆はチオール含有アミノ酸残基を表し、かつ、X₇は存在しないか、またはバイオモディファイア部分を表し、Z₁は抗腫瘍剤、キレート剤またはレポーター部分を表し、かつ、W₁は存在しないか、またはスペーサー部分を表す}。

30

【請求項 2】

アミノ酸残基のいずれかが独立にDまたはL配置である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

R₁が-(CH₂)-を表す、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

X₁がアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ホモリジンもしくはジアミノアルキル酸 (diaminoalkylic acid)、またはその誘導体を表す、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 5】

X₂、X₄およびX₆が独立にシステインまたはホモシステイン残基を表す、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

40

【請求項 6】

X₃がアルギニン残基を表す、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 7】

X₅がチロシン、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を表す、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 8】

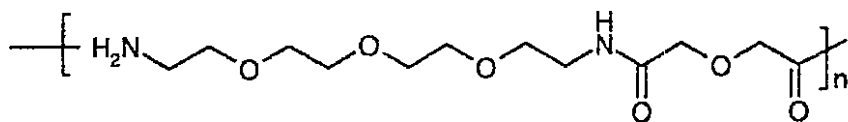
X₇が存在しないか、または1~10単位の単分散PEG構成ブロックを含んでなる、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 9】

50

X₇が存在しないか、または1~10単位の式II

【化2】



(II)

10

を含んでなる、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項10】

X₇が1~10のアミノ酸残基を表す、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項11】

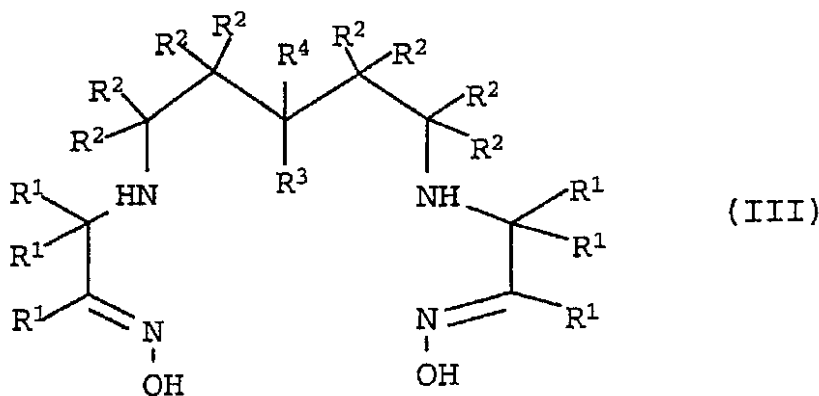
X₇がグリシン、リジン、アスパラギン酸またはセリン残基、グリシンを表す、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項12】

Z₁が式III

【化3】

20



(III)

30

{式中、

R¹、R²、R³およびR⁴は各々独立にR基であり；

R基は各々独立にHまたはC₁₋₁₀アルキル、C₃₋₁₀アルキルアリール、C₂₋₁₀アルコキシアルキル、C₁₋₁₀ヒドロキシアルキル、C₁₋₁₀アルキルアミン、C₁₋₁₀フルオロアルキルであるか、または2以上のR基が、それらに結合している原子とともに炭素環、複素環、飽和若しくは不飽和環を形成する}

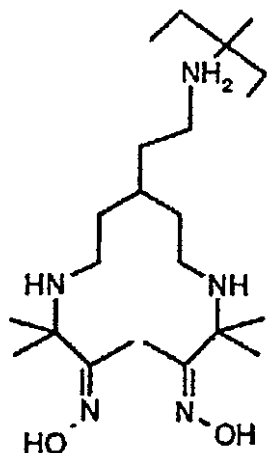
のキレート剤である、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

40

【請求項13】

Z₁が

【化 4】



e

10

である、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 1 4】

Z₁がレポーター部分を含んでなる、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

20

【請求項 1 5】

レポーター部分が金属放射性核種、常磁性金属イオン、蛍光金属イオン、重金属イオンまたはクラスターイオンを含んでなる、請求項 1 4 に記載の化合物。

【請求項 1 6】

レポーター部分が⁹⁰Y、^{99m}Tc、¹¹¹In、⁴⁷Sc、⁶⁷Ga、⁵¹Cr、^{177m}Sn、⁶⁷Cu、¹⁶⁷Tm、⁹⁷Ru、¹⁸⁸Re、¹⁷⁷Lu、¹⁹⁹Au、²⁰³Pb、¹⁴¹Ceまたは¹⁸Fを含んでなる、請求項 1 4 および 1 5 に記載の化合物。

【請求項 1 7】

レポーター部分が^{99m}Tcである、請求項 1 ～ 1 6 に記載の化合物。

30

【請求項 1 8】

Z₁が抗腫瘍剤である、請求項 1 ～ 1 1 に記載の化合物。

【請求項 1 9】

Z₁がシクロホスファミド、クロロアムブシル、ブスルファン、メトトレキサート、シタラビン、フルオロウラシル、ビンブラスチン、パクリタキセル、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、テニポシド、シスプラチン、アムサクリンまたはドセタキセルを表す、請求項 1 8 に記載の化合物。

【請求項 2 0】

W₁がグルタル酸またはコハク酸である、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

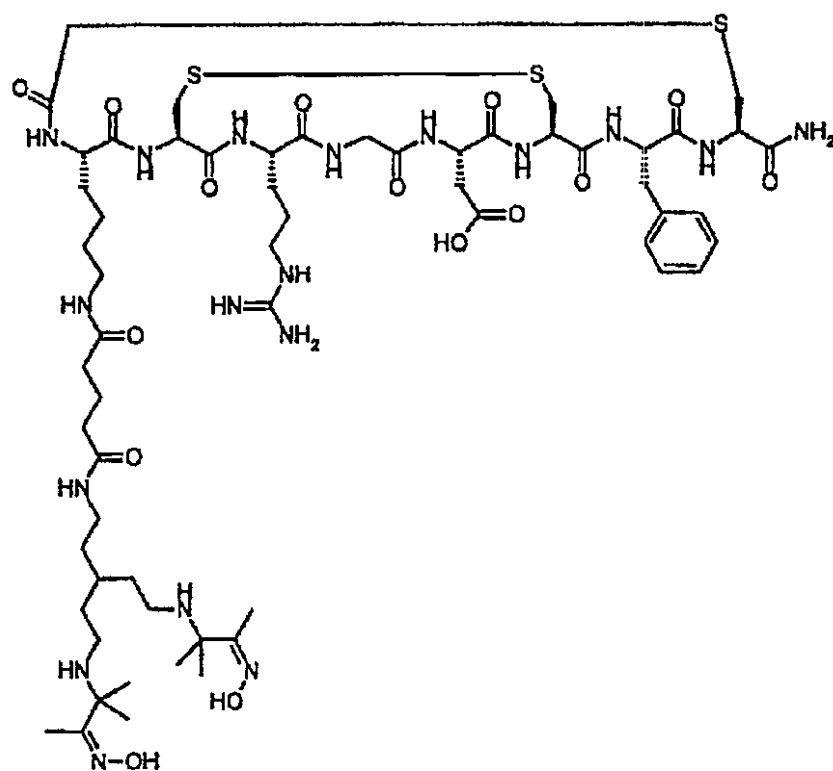
【請求項 2 1】

下式

40

【化 5】

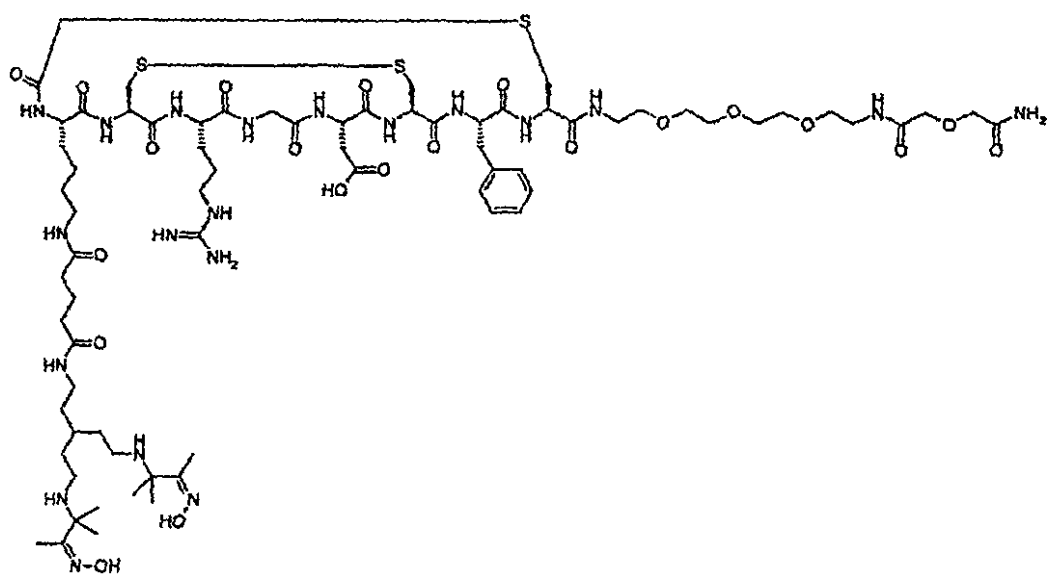
化合物I



10

20

化合物 II

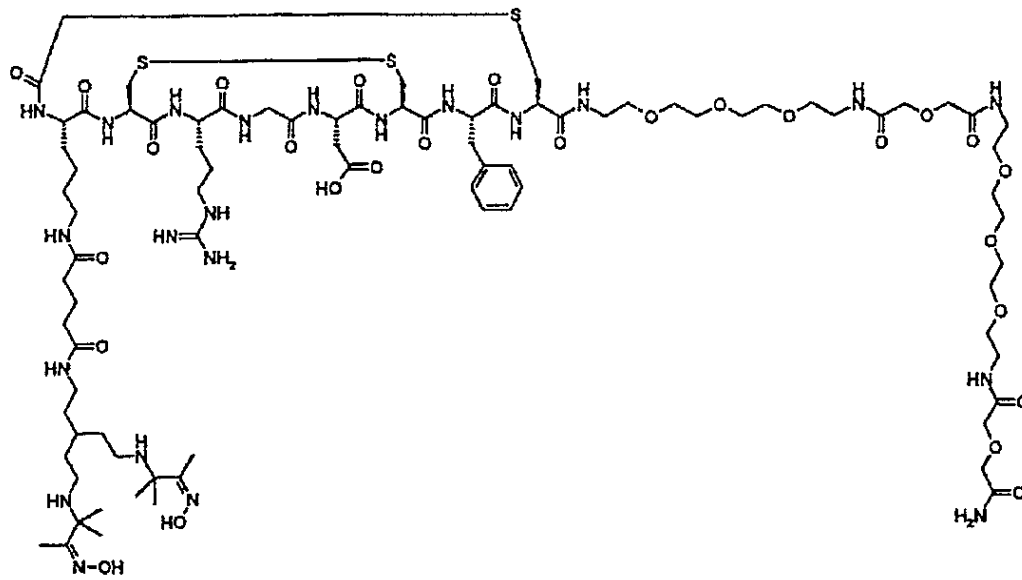


30

40

【化 6】

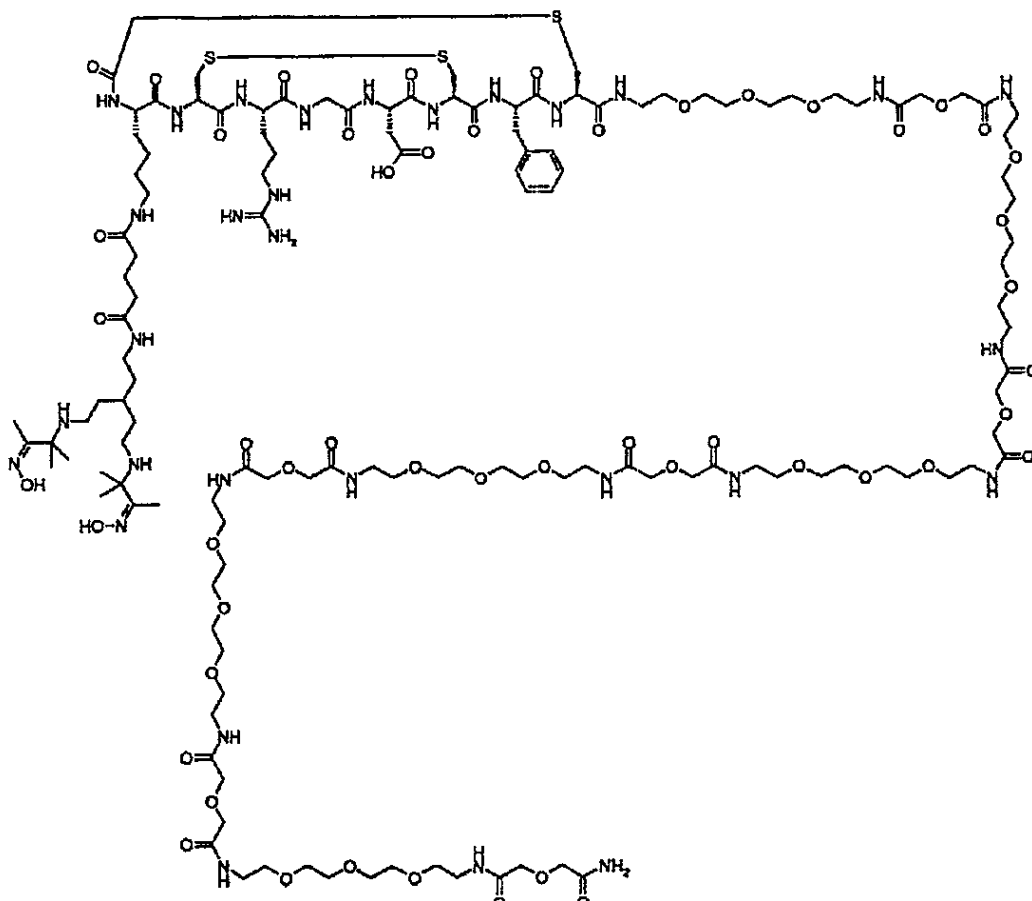
化合物Ⅲ



10

20

化合物Ⅳ



30

40

50

により定義される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 2 2】

有効量の一般式(I)の化合物またはその塩を1以上の医薬上許容されるアジュバント、賦形剤または希釈剤とともに含んでなり、in vivoイメージングにおいて画像コントラストの強調に使用するための、または疾病の治療のための医薬組成物。

【請求項 2 3】

人体または動物体へ該造影剤を投与し、その身体の少なくとも一部を画像化することを含む診断法で使用するための造影剤の製造における、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

【請求項 2 4】

人体または動物体へ造影剤を投与し、該造影剤が分布したその身体の少なくとも一部を画像化することを含み、該造影剤が請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の化合物を含んでなることを特徴とする、人体または動物体を画像化する方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 に記載の化合物を含んでなる造影剤組成物をあらかじめ投与した人体または動物体の強調画像を得る方法であって、少なくともその身体の一部を画像化することを含んでなる方法。

【請求項 2 6】

癌に伴う症状に対処する薬物による人体または動物体の治療効果を監視する方法であって、請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の化合物または組成物をその身体へ投与し、該化合物または組成物の細胞レセプターによる取り込みを検出することを含み、この投与と検出を任意ではあるが好ましくは、例えば該化合物または組成物による治療前、治療中および治療後に繰り返し行う、方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の有効量の化合物または組成物の投与を含んでなる人体または動物体における癌または関連疾患を治療する方法。

【請求項 2 8】

ヒトまたは動物における癌または関連疾患の治療的または予防的処置のための薬剤を製造するための請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規なペプチドベースの化合物(peptide-based compound)および、治療上有効な処置ならびに画像診断技術におけるそれらの使用に関する。より詳しくは、本発明はかかるペプチドベースの化合物の血管新生に関連するレセプター、特に例えば $\alpha v \beta 3$ インテグリンレセプターのようなインテグリンレセプターと結合するターゲッティングベクターとしての使用に関する。従ってこのような造影剤は例えば悪性疾患、心臓疾患、子宮内膜症、炎症関連疾患、慢性関節リウマチおよびカポジ肉腫等の診断のために使用される。さらにかかる薬剤はこれら疾病の治療処置において使用される。

【背景技術】

【0002】

新しい血管は脈管形成(vasculogenesis)または血管新生(angiogenesis)という2つの異なるメカニズムにより形成され得る。血管新生とは既存の血管からの分岐により新しい血管が形成されることである。組織の細胞への栄養および酸素の供給不足(低酸素症)がこのプロセスの主要な刺激となろう。細胞は血管新生因子の分泌により応答する。血管新生因子は多数存在するが、例えば一つの例としてしばしば言及されるのが血管内皮増殖因子(VEGF)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ならびにこれらの潜在的に有害な酵素の作用を制限する阻害物質の分泌を開始させる。血管新生因子のもう一つの重要な作用は内皮細胞を移動させ、分裂させることである。内腔の反対側で血管の周囲に連続的なシートを形成している基底膜に付着している内皮細胞は有糸分裂

10

20

30

40

50

を行わない。結合性の低下と血管新生因子レセプターからのシグナルの複合効果が内皮細胞を移動させ、増殖させ、それら自身を再配置させて最終的には新しい血管の周囲に基底膜を作らせる。

【0003】

血管新生は創傷治癒および炎症性疾患を含む組織の増殖および再構築において顕著である。腫瘍がミリメートルサイズに達した時、それらの増殖速度を維持するためには血管新生を開始しなければならなくなる。血管新生は内皮細胞およびそれらの環境の特徴的な変化を伴う。これらの細胞の表面は移動に備えて再構築され、基底膜が分解されたところではタンパク質分解の作用および制御に関与する種々のタンパク質に加えて微小血管構造が露出される。腫瘍の場合にはその結果生じる血管網は通常無秩序で、鋭角にねじれたり動静脈シャントが形成されていたりする。血管新生阻害はまた、抗腫瘍療法のために有望な方法であると考えられている。血管新生を伴う悪性転換はまた診断に関しても非常に有望であり、明らかな例としては悪性疾患があるが、その概念はまた炎症および初期のアテローム性動脈硬化症病変部のマクロファージが血管新生因子の供給源である可能性があるアテローム性動脈硬化症を含む種々の炎症関連疾患においてもかなり有望である。これらの因子はまた、短期間の内に狭窄が開放された場合に起こる心筋の梗塞部分の再血管化にも関与している。

【0004】

新血管形成または血管新生、すなわち新しい血管の発達もしくは増殖を伴う好ましくない状態のさらなる例を以下に示す。これに関してはW0 98/47541も参照のこと。

【0005】

血管新生を伴う疾病および徴候は、例えば乳癌、皮膚癌、結腸直腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌または卵巣癌など、さまざまな形態の癌および転移症である。

【0006】

その他の疾病および徴候としては炎症（例えば慢性の）、アテローム性動脈硬化症、慢性関節リウマチおよび歯肉炎がある。

【0007】

血管新生を伴うさらなる疾病および徴候としては、動静脈の奇形 (malformation)、星状細胞腫、絨毛癌、膠芽細胞腫、神経膠腫、血管腫（小児期、毛細血管）、肝臓癌、子宮内膜増殖症、虚血性心筋、子宮内膜症、カポジ肉腫、黄斑変性症、メラノーマ、神経芽細胞腫、閉塞性末梢動脈障害、変形性関節症、乾癬、網膜症（糖尿病性、増殖性）、強皮症、精上皮腫および潰瘍性大腸炎がある。

【0008】

血管新生には内皮細胞および周囲組織特有のレセプターが関与している。これらのマーカにはVEGFのような増殖因子レセプターおよびインテグリンファミリーのレセプターが含まれる。免疫組織化学的研究では種々のインテグリン、おそらく最も重要なものとして α vクラスのインテグリンが血管の頂端面に発現し[Conforti, G., et al. (1992) Blood 80: 37-446]、循環しているリガンドの標的として使用可能となる[Pasqualini, R., et al. (1997) Nature Biotechnology 15: 542- 546]ことが示された。 α 5 β 1もまた、フィブロネクチンマトリックスの組み立ての促進およびフィブロネクチンへの細胞の接着を促進する上で重要なインテグリンである。これはまた細胞の移動 [Bauer, J. S., (1992) J. Cell Biol. 116: 477-487]、ならびに腫瘍浸潤および転移 [Gehlsen, K. R., (1988) J. Cell Biol. 106: 925-930] においても重要な役割を果たす。

【0009】

インテグリン α v β 3は血管新生と関連することが知られているレセプターのうちのひとつである。 α v β 3インテグリンレセプター／リガンド相互作用のアンタゴニストがアポトーシスを引き起こし、血管増殖を阻害することから、刺激された内皮細胞は血管新生過程の臨界期において生存するためにこのレセプターに依存していると思われる。

【0010】

インテグリンは α および β サブユニットが細胞膜脂質二重層を貫通するヘテロ二量体分子

である。 α サブユニットはその細胞外鎖に4つの Ca^{2+} 結合ドメインを有し、 β サブユニットは多数の細胞外システインリッチドメインを有する。

【0011】

細胞接着に関与する多くのリガンド（例えば、フィブロネクチン）はトリペプチド配列アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)を包含する。このRGD配列はこの配列を提示するリガンドと細胞表面上のレセプター間の一次認識部位としての役割を果たすと思われる。一般にリガンドとレセプター間の二次的な相互作用は相互作用の特異性を高めると考えられている。これらの二次的な相互作用はリガンド部分と、RGD配列の直前のレセプターまたはRGD配列から離れた部分との間で起こりうる。

【0012】

RGDペプチドはある範囲のインテグリンレセプターと結合し、临床上重要な適用となる多数の細胞内事象を調節する潜在能力を有することが知られている(Ruoslahti, J. Clin. Invest., 87:1-5(1991))。おそらく最も幅広く研究されたRGDペプチドおよびそれらのミメティックス(mimetics)の作用は、血小板のインテグリン GpIIbIIIa を標的とする抗血栓薬としてのそれらの使用に関するものであろう。

【0013】

$\alpha\text{v}\beta 3$ または $\alpha\text{v}\beta 5$ アンタゴニストいずれかの投与による組織内血管新生の阻害は、例えばW0 97/06791およびW0 95/25543に記載されており、抗体またはRGD含有ペプチドのどちらかを使用している。EP 578083では一連の単環式RGD含有ペプチドを記載し、W0 90/14103ではRGD抗体の特許請求している。Haubner et al. はJ. Nucl. Med. (1999);40: 1061-1071で単環式RGD含有ペプチドベースの腫瘍標的化のための新しいクラスのトレーサーについて記載している。しかし、全身オートラジオグラフィイメージングを用いる生体分布試験では、 ^{125}I 標識ペプチドの血液クリアランス速度は非常に速く、主として肝胆汁排泄経路を有しているためバックグラウンド値が高いことが示された。

【0014】

複数の架橋を含む環状RGDペプチドはW0 98/54347およびW0 95/14714にも記載されている。in vivoバイオパニングにより得られたペプチド(W0 97/10507)はさまざまなターゲティング法に用いられてきた。CDCRGDCFC(RGD-4C)配列はドキシルビシンのような薬物(W0 98/10795)、核酸およびアデノウイルス(W0 99/40214、W0 99/39734、W0 98/54347、W0 98/54346、米国特許第5846782号参照)を細胞へターゲティングするために使用されてきた。しかし複数のシステイン残基を含有するペプチドには複数のジスルフィド異性体が生じ得るという欠点がある。RGD-4Cのような4つのシステイン残基を有するペプチドでは、3つの異なるジスルフィド折り畳み型を形成する可能性がある。RGDファルマコフォアが3つの異なる配置をとるため、これらの異性体はインテグリンレセプターに対してさまざまな親和性を有することになる。

【0015】

RGD含有ペプチドベースの化合物のさらなる例はPCT/N001/00146およびPCT/N001/00390に見出され、その内容は参照により本明細書の一部とする。

【0016】

従って、in vivoにおける血管新生に関連するインテグリンレセプターの効率的なターゲティングおよびイメージングには化学的に強固で安定な選択的、高親和性のRGDベースのベクターが必要となる。さらに、造影剤を設計する場合にバックグラウンド値の問題を軽減するためには排泄経路が重要な因子となる。本発明に記載されている二環式構造はこれらの厳しい条件を満たす。

【発明の開示】

【0017】

ひとつの態様において、本発明はクレームで定義された式Iの新規なペプチドベースの化合物を提供する。これらの化合物は例えばインテグリン $\alpha\text{v}\beta 3$ に対する親和性のようにインテグリンレセプターに対して親和性を有する。

【0018】

10

20

30

40

50

式Iの化合物は少なくとも2つの架橋を含んでなり、式中のひとつの架橋はジスルフィド結合を形成し、もうひとつはの架橋はチオエーテル（スルフィド）結合を含み、これらの架橋はペプチド部分を「入れ子式」の形で保持している。

【0019】

このように本発明の化合物は分子部分あたり最高ひとつのジスルフィド結合を有する。本発明により定義される化合物はin vivoおよび標識の際、例えばテクネチウムで標識する際に用いられる条件下においても驚くほど安定である。

【0020】

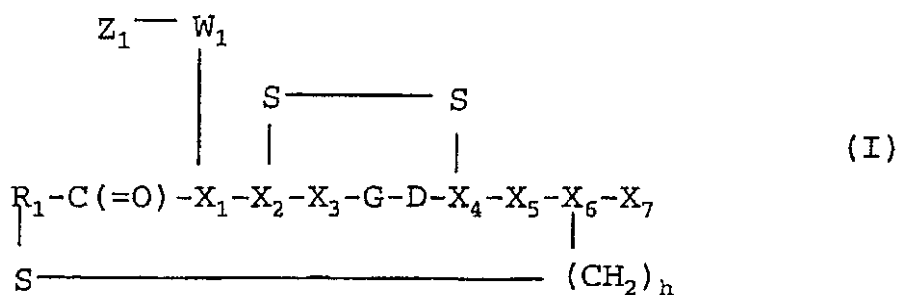
これらの新規化合物は治療上有効な処置ならびにイメージングのために用いる。

【0021】

本発明に記載される新規なペプチドベースの化合物は式I：

10

【化7】



20

【0022】

[式中、

Gはグリシンを表し、かつ、

Dはアスパラギン酸を表し、かつ、

R₁は-(CH₂)_n-または-(CH₂)_n-C₆H₄-を表し、好ましくはR₁は-(CH₂)_n-を表し、かつ、

nは正の整数1~10を表し、

hは正の整数1または2を表し、かつ、

X₁は酸またはアミンなどの官能性側鎖を有するアミノ酸残基、優先的にはアスパラギン酸またはグルタミン酸、リジン、ホモリジン、ジアミノアリサイクリック酸(diaminoalicyclic acid) またはジアミノプロピオン酸を表し、

30

X₂およびX₄は独立に、ジスルフィド結合を形成し得るアミノ酸残基、好ましくはシステインまたはホモシステイン残基を表し、かつ、

X₃はアルギニン、N-メチルアルギニンまたはアルギニンミメティック、好ましくはアルギニンを表し、かつ、

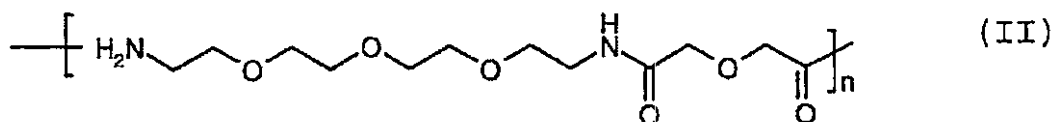
X₅は疎水性アミノ酸またはその誘導体、好ましくはチロシン、フェニルアラニン、3-ヨードチロシンまたはナフチルアラニン残基、より好ましくはフェニルアラニンまたは3-ヨードチロシン残基を表し、かつ、

X₆はチオール含有アミノ酸残基、好ましくはシステインまたはホモシステイン残基を表し、かつ、

40

X₇は存在しないか、または好ましくは1~10単位の構成ブロックを含んでなる単分散PEG構成ブロックベースの相同のバイオモディファイア部分を表し、該バイオモディファイアは該薬剤の薬物動態および血液クリアランス速度を改変する機能を有する。さらにX₇はまた1から10のアミノ酸残基、好ましくはグリシン、リジン、アスパラギン酸またはセリンを表してよい。本発明の好ましい実施形態ではX₇は単分散PEG様構造の重合からなるバイオモディファイア単位、式II：

【化8】



【0023】

{式中、

nは正の整数1~10を表し、

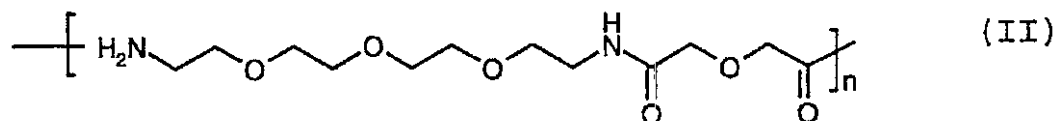
C末端単位はアミド部分である}

の17-アミノ-5-オキソ-6-アザ-3,9,12,15-テトラオキサヘプタデカン酸を表す。

【0024】

W₁は存在しないか、またはスペーサー部分を表し、好ましくはグルタル酸および／または
コハク酸および／またはポリエチレングリコールベースの単位および／または式II：

【化9】



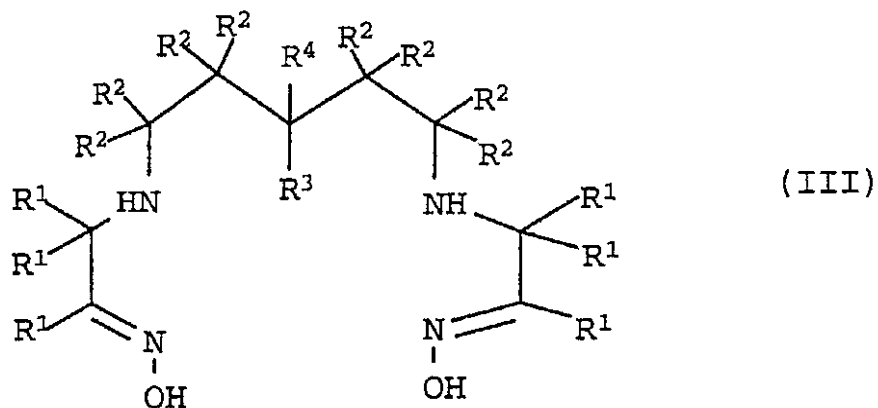
【0025】

の単位である。

【0026】

Z₁は抗腫瘍剤、キレート剤またはレポーター部分であり、式III

【化10】



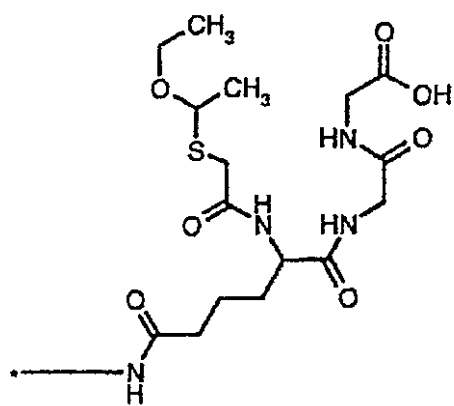
【0027】

{式中、

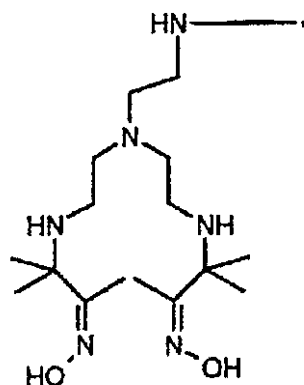
R¹、R²、R³およびR⁴は各々独立にR基であり；

R基は各々独立にHまたはC₁₋₁₀アルキル、C₃₋₁₀アルキルアリール、C₂₋₁₀アルコキシアル
キル、C₁₋₁₀ヒドロキシアルキル、C₁₋₁₀アルキルアミン、C₁₋₁₀フルオロアルキルである
か、又は2以上のR基が、それらが結合している原子とともに炭素環、複素環、飽和若しく
は不飽和環を形成する}のキレート剤により表されるか、あるいは式a、b、cおよびd

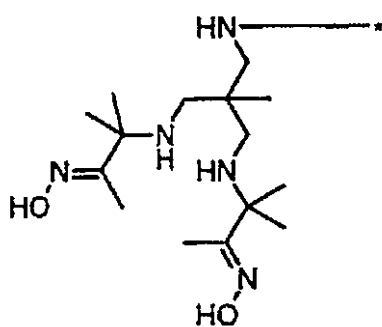
【化11】



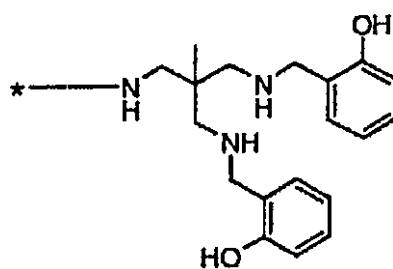
a



b



c



d

10

20

30

40

50

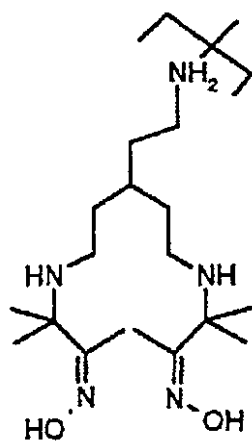
【0028】

で表されるキレート剤を表し得る。

【0029】

好ましいキレート剤は式e

【化12】



e

【0030】

により表される}」。

【0031】

式IIIのキレート剤を含んでなるコンジュゲートは室温で水性条件下、中性pH付近で高い放射化学的純度(RCP)となるよう放射性標識できる。室温でペプチド成分のジスルフィド架橋が開裂する危険性は、高温における危険性よりも低い。室温におけるコンジュゲートの放射性標識のさらなる利点は病院薬剤部での手順が簡易化されることである。

【0032】

スペーサー部分 W_1 の役割は比較的大きいキレート剤をペプチド成分の活性部位から離すことである。スペーサー部分 W_1 は大きい抗腫瘍剤をペプチドの活性部位から遠ざけるためにも適用できる。

10

【0033】

バイオモディファイアー X_7 は化合物の薬物動態および血液クリアランス速度を変えることがわかっている。このバイオモディファイアーは組織中すなわち筋肉、肝臓等における化合物の取り込みを低下させ、バックグラウンド干渉をより低く抑えることでより良好な診断画像が得られる。バイオモディファイアーのさらなる利点により分泌は主として腎臓を介して行われる。

【0034】

しかし、式Iで定義された化合物はまた、表Iに定義されたようなキレート剤 Z_1 も含みうる。

【0035】

本発明のいくつかの態様において Z_1 はレポーター部分を含み、このレポーター部分は放射性核種を含む。キレート剤のさらなる定義を以下の表Iに示す。

20

【表1】

表 I :

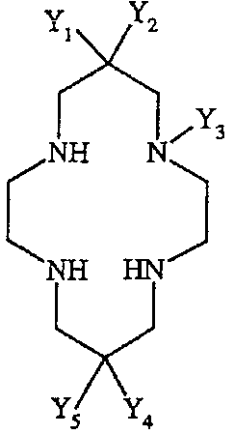
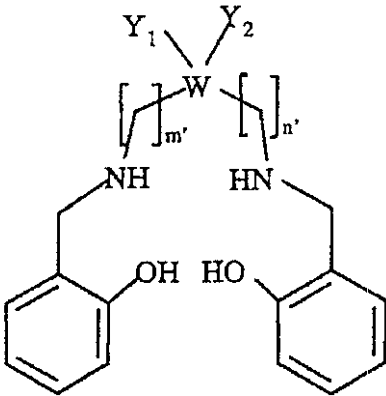
リガンドの種類	構造	定義
アミノキシム		Y1-8 は H、アルキル、アリールまたはその組合せであつてよく、 かつ、Y4 または Y5 はそれがペプチドベクターと結合できるよう適した官能基、例えば好ましくはアルキルアミン、アルキルスルフィド、アルコキシ、アルキルカルボキシレート、アリールアミン、アリールスルフィドまたは α-ハロアセチルを含む。 $m' = n' = 1$ のとき $X = C$ $m' = n' = 2$ のとき $X = N$
MAG3 型		P=保護基(好ましくはベンゾイル、アセチル、EOE); Y1、Y2 はそれがペプチドベクターに結合できるよう適した官能基; 好ましくは H (MAG3)、または L 型もしくは D 型いずれかのアミノ酸の側鎖を含む。
G4 型リガンド		Y1、Y2、Y3 はそれがペプチドベクターに結合できるよう適した官能基; 好ましくは H、または L 型もしくは D 型いずれかのアミノ酸の側鎖を含む。
テトラミンリガンド		Y1-Y6 は H、アルキル、アリールまたはその組合せであつてよく、ここで、Y1-6 基はそのキレートがベクターに結合できるような 1 以上の官能部分、例えば好ましくはアルキルアミン、アルキルスルフィド、アルコキシ、アルキルカルボキシレート、アリールアミン、アリールスルフィドまたは α-ハロアセチルを含む。

10

20

30

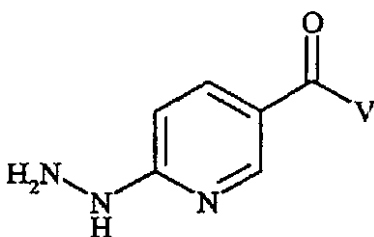
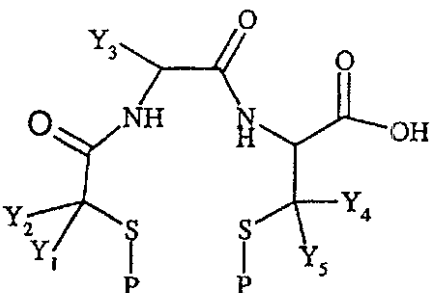
40

リガンドの種類	構造	定義
シラム型リガンド		Y1-5はH、アルキル、アリールまたはその組合せであってよく、かつここで、Y1-5基はそのキレートがベクターに結合できるような1以上の官能部分、例えば好ましくはアルキルアミン、アルキルスルフィド、アルコキシ、アルキルカルボキシレート、アリールアミン、アリールスルフィドまたはα-ハロアセチルを含む。
ジアミン ジフェノール		Y1、Y2はH、アルキル、アリールであり、かつここで、Y1またはY2基はそのキレートがベクターに結合できるような官能部分、例えば好ましくはアルキルアミン、アルキルスルフィド、アルコキシ、アルキルカルボキシレート、アリールアミン、アリールスルフィドまたはα-ハロアセチルを含む。 W=C、N M' =n' =1 または 2

10

20

30

リガンドの種類	構造	定義
HYNIC		V=ベクターに対するリンカーまたはベクター自体
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、アリール;またはY3はLまたはDアミノ酸側鎖またはグリシンであり、アミド結合を介してベクターに結合させるためにカルボキシレートを用いてもよい。あるいは、R1-5基はそのキレートがベクターに結合できるようなさらなる官能基、例えば好ましくはアルキルアミン、アルキルスルフィド、アルコキシ、アルキルカルボキシレート、アリールアミン、アリールスルフィドまたはα-ハロアセチルを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0038】

式Iの本発明のいくつかの態様において Z_1 部分は ^{18}F 同位体またはCuの同位体の結合を含み、薬剤に補欠分子族として取り込まれるか、置換または付加反応により取り込まれる。従って、その結果得られた化合物は陽電子放出断層撮影(PET)イメージングに使用できる。

【0039】

式Iの本発明のひとつの態様において Z_1 は抗腫瘍薬により表される。この態様において本化合物は癌に伴う血管新生部位を標的とし、抗腫瘍薬を病変領域へ導く。

【0040】

抗腫瘍薬はシクロホスファミド、クロロアムブシル、ブスルファン、メトトレキサート、シタラビン、フルオロウラシル、ビンブラスチン、パクリタキセル、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、テニポシド、シスプラチン、アムサクリン、ドセタキセルが挙げられるが、広範囲の他の抗腫瘍薬も使用してよい。

【0041】

本明細書に記載のコンジュゲートのペプチド成分は好ましくは遊離アミノ酸末端またはカルボキシ末端を持たない。このことによりこれらの化合物の酵素分解に対する耐性が著しく増大し、その結果として多くの既知の遊離ペプチドと比較して高いin vivo安定性を有する。

【0042】

本明細書において「アミノ酸」とは、その最も広い意味においてタンパク質新生のL-アミノ酸、D-アミノ酸、化学的に修飾されたアミノ酸、N-メチル、C α -メチルおよびアミノ酸側

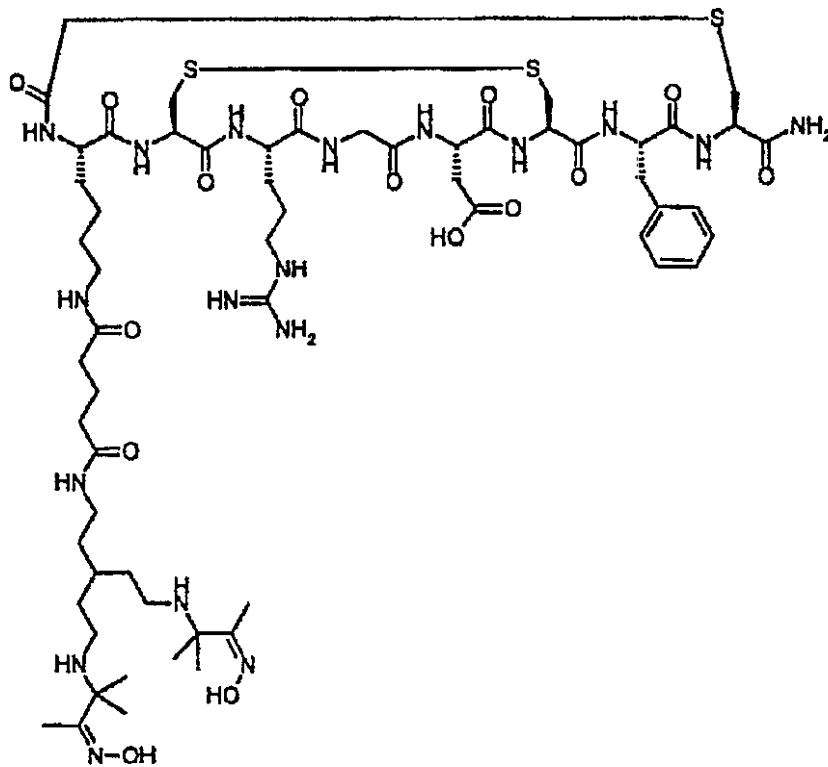
鎖ミメティックス、ならびにナフチルアラニンのような非天然アミノ酸を指す。いずれの天然アミノ酸またはかかる天然アミノ酸のミメティックスも好ましい。

【0043】

式Iの化合物のいくつかの好ましい実施形態を以下の化合物I～IVにより例示する。

【化13】

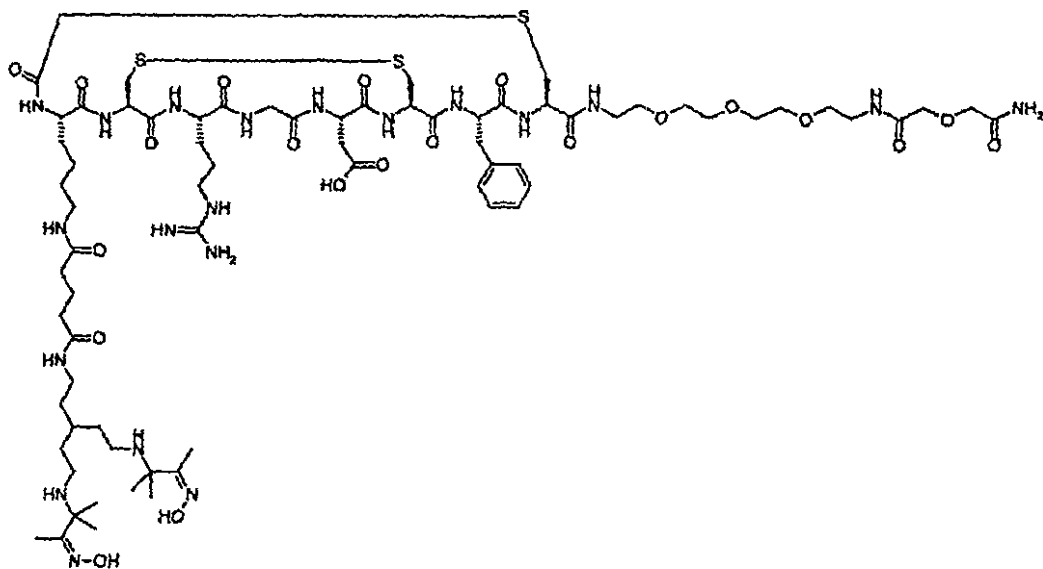
化合物I



10

20

化合物II

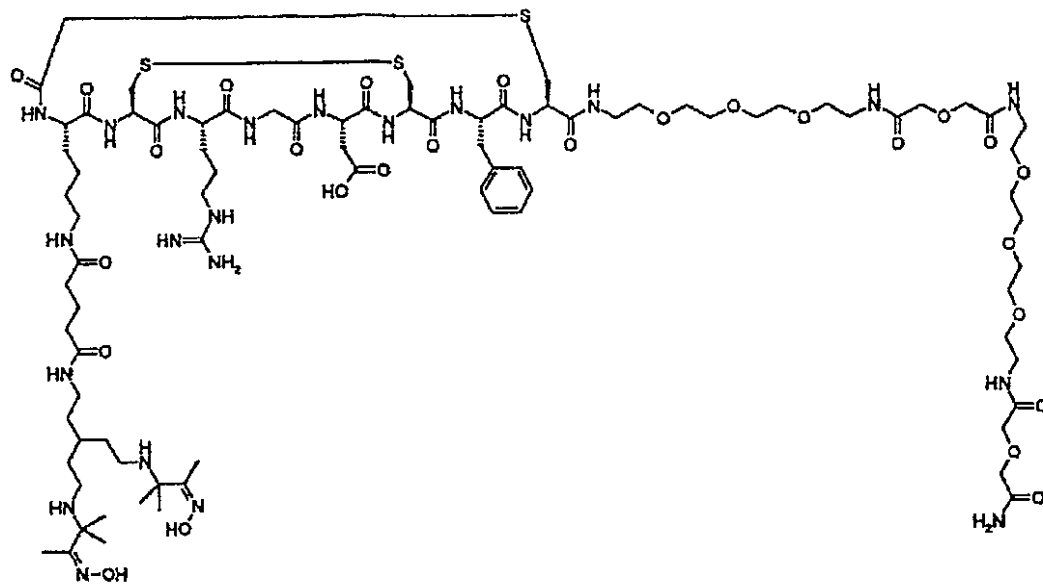


30

40

【化14】

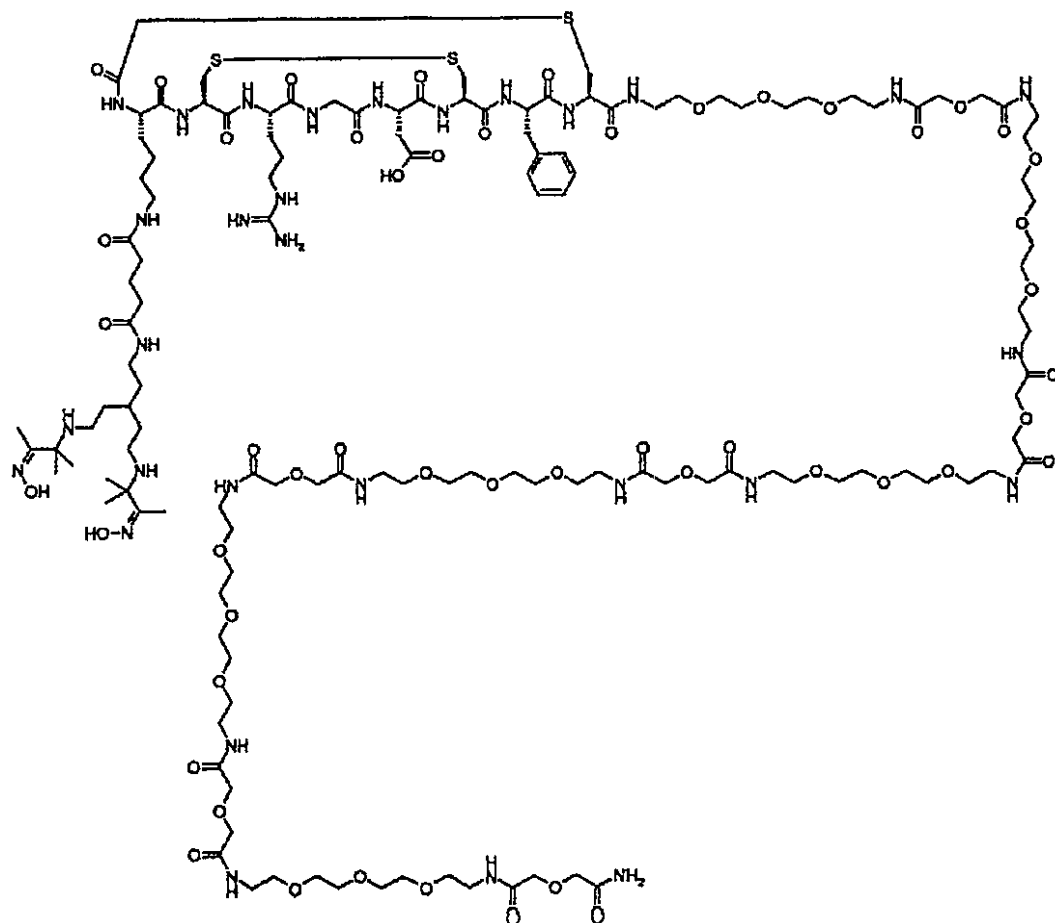
化合物Ⅲ



10

20

化合物Ⅳ



30

40

【0044】

たいていの場合、ペプチド中のアミノ酸はすべてL型であることが好ましい。しかし本発明のいくつかの実施形態においてはペプチド中の1、2、3またはそれ以上のアミノ酸はD 50

型であることが好ましい。このようなD型アミノ酸を含有することは化合物の血清安定性に著しい影響を及ぼしうる。

【0045】

本発明によれば、式Iで定義されたいずれのアミノ酸残基も天然アミノ酸であってよく、いずれかが独立にDまたはL配置であることが好ましい。

【0046】

本発明のいくつかの化合物は高親和性のRGDベースのペクターである。本明細書において「高親和性のRGDベースのペクター」とは、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンの競合結合アッセイにおいて既知の高親和性リガンドエキスタチンとの競合により決定される K_i 値が10nM未満、好ましくは5nM未満の化合物を指す。このような競合アッセイを行う方法は当技術分野において十分公知である。

10

【0047】

本発明はまた、有効量（例えば、*in vivo*イメージングにおいて画像コントラストを強調するために有効な量）の一般式Iの化合物またはその塩を、1以上の医薬上許容されるアジュバント、賦形剤もしくは希釈剤とともに含んでなる医薬組成物も提供する。

【0048】

本発明はさらに、有効量の一般式Iの化合物またはそれらの酸付加塩を、1以上の医薬上許容されるアジュバント、賦形剤もしくは希釈剤とともに含んでなる疾病の治療のための医薬組成物を提供する。

【0049】

その他の典型的なスパーサー(W_1)エレメントには構造型多糖、貯蔵型多糖、ポリアミノ酸、ならびにそれらのメチルおよびエチルエステル、ならびにポリペプチド、オリゴ糖およびオリゴヌクレオチドが挙げられ、それらは酵素切断部位を包含してもしなくてもよい。

20

【0050】

本発明の造影剤のレポーター部分(Z_1)は*in vivo*診断イメージング法において直接的または間接的に検出可能ないずれの部分でもよい。造影剤はひとつのレポーターを包含するのが好ましい。検出可能な放射線を放出するか、放出を引き起こしうる（例えば、放射性崩壊により）部分が好ましい。

【0051】

MRイメージングのためには、レポーターは非ゼロ核スピン同位体（ ^{19}F など）または不對電子スピンを有する物質、従って常磁性、超常磁性、フェリ磁性、強磁性特性のいずれかを有し；光イメージングのためには、レポーターは光散乱体（例えば、着色または非着色粒子）、光吸収体または光放射体；磁気計測的イメージングのためには、レポーターは検出可能な磁性特性を有し；電気インピーダンスイメージングのためには、レポーターは電気インピーダンスに作用し；シンチグラフィ、SPECT、PETなどのためにはレポーターは放射性核種である。

30

【0052】

一般的に言えば、レポーターは(1)キレート可能な金属または多原子金属含有イオン（すなわちTc0など）、ここで金属は原子番号の大きい金属（例えば、原子番号が37を超える）、常磁性種（例えば、遷移金属またはランタニド）、または放射性同位体、(2)不對電子部位である共有結合した非金属種（例えば、持続性の遊離ラジカル中の酸素または炭素）、原子番号の大きい非金属、または放射性同位体、(3)原子番号の大きい原子を含有し、協力的磁性行動（例えば、超常磁性、フェリ磁性、強磁性）を示すか、もしくは放射性核種を含有する多原子クラスターまたは結晶である。

40

【0053】

特に好ましいレポーター基(Z_1)の例をより詳細に以下に記載する。

【0054】

キレート金属レポーターは好ましくは以下の群より選択される； ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{47}Sc 、 ^{67}Ga 、 ^{51}Cr 、 $^{177\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{67}Cu 、 ^{167}Tm 、 ^{97}Ru 、 ^{188}Re 、 ^{177}Lu 、 ^{199}Au 、 ^{203}Pb 、および ^{141}Ce 。

50

【0055】

金属イオンはリンカー部分上のキレート基によりキレートされるのが望ましい。好適なキレート基のさらなる例はUS-A-4647447、W089/00557、US-A-5367080、US-A-5364613に開示されている。

【0056】

存在しているキレート剤のメタレーションの方法は当業者の技術の範囲内である。金属は3つの常法：直接的取り込み、テンプレート合成および／またはトランスメタレーションのいずれによってもキレート部分に取り込むことができる。直接的な取り込みが好ましい。

【0057】

このように、例えばキレート剤含有部分の水溶液を好ましくは約4～約11のpH範囲の水溶液中の金属塩に単に曝すか、または混合することにより、金属イオンがキレート剤と容易に錯体を形成することが望ましい。この塩はいずれの塩でもよいが、好ましくはこの塩はハロゲン塩のような水溶性の金属塩が好ましく、より好ましくはこの塩は金属イオンとキレート剤との結合を妨害しないように選択する。

【0058】

キレート剤含有部分は、好ましくはpHが約5～約9の間の水溶液中、より好ましくはpHが約6～約8の間である。キレート剤含有部分は至適pHにするためクエン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、リン酸塩およびホウ酸塩のようなバッファー塩と混合することができる。好ましくはこのバッファー塩はその後の金属イオンとキレート剤との結合を妨害しないよう選択する。

【0059】

以下に示す同位体または同位体対は、放射性同位体標識方法またはキレート剤を変更する必要なくイメージングおよび治療双方に使用できる； $^{47}\text{Sc}_{21}$ ； $^{141}\text{Ce}_{58}$ ； $^{188}\text{Re}_{75}$ ； $^{177}\text{Lu}_{71}$ ； $^{199}\text{Au}_{79}$ ； $^{47}\text{Sc}_{21}$ ； $^{131}\text{I}_{53}$ ； $^{67}\text{Cu}_{29}$ ； $^{131}\text{I}_{53}$ および $^{123}\text{I}_{53}$ ； $^{188}\text{Re}_{75}$ および $^{99\text{m}}\text{Tc}_{43}$ ； $^{90}\text{Y}_{39}$ および $^{87}\text{Y}_{39}$ ； $^{47}\text{Sc}_{21}$ および $^{44}\text{Sc}_{21}$ ； $^{90}\text{Y}_{35}$ および $^{123}\text{I}_{53}$ ； $^{146}\text{Sm}_{62}$ および $^{153}\text{Sm}_{62}$ ；ならびに $^{90}\text{Y}_{39}$ および $^{111}\text{In}_{49}$ 。

【0060】

好ましい非金属原子レポーターには、 ^{123}I 、 ^{131}I および ^{18}F などの放射性同位体ならびに ^1F のような非ゼロ核スピン原子、およびIのような重原子が含まれる。

【0061】

本発明のさらなる実施形態では、特にヨウ素またはフッ素の放射性同位体の使用が考慮される。例えば、ペプチドまたはリンカーが共有結合形成反応においてヨウ素またはフッ素により化学的に置換できる、例えばヒドロキシフェニルまたはp-ニトロベンゾイル官能価を包含する置換基のような置換基を含んでなる場合には、そのような置換基を当技術分野で十分公知の方法により各々ヨウ素またはフッ素の放射性同位体で標識できる。これらの種は治療的および診断的イメージング適用に使用できる。それと同時に、同じペプチドリリンカー上でキレート剤に結合している金属もまた治療的または診断的イメージング適用のいずれかに使用できる。

【0062】

本発明の好ましい実施形態は、特に腫瘍イメージングで使用するための一般式Iの放射性同位体標識剤に関するものである。

【0063】

本発明の診断薬は、特殊なイメージング技術を用いて所望のコントラストを生じさせるに十分な量をイメージングのために患者に投与してよい。レポーターが金属の場合、適切なコントラストの増強を達成するには、一般的には患者体重1kgあたりキレート化イメージング金属イオン0.001～5.0mmolの用量が効果的である。レポーターが放射性核種の場合は、体重70kgあたりでは通常0.01～100mCiの用量、好ましくは0.1～50mCiで十分である。

【0064】

治療用途としては本発明の化合物の用量は処置する症状によるが、一般に1pmol/kg～1mmol/kg体重のオーダーである。

10

20

30

40

50

【0065】

従って本発明の化合物は十分当技術分野の範囲内で生理的に許容される担体または賦形剤を用いて投与用として処方することができる。例えば、所望により医薬上許容される賦形剤を添加した化合物を水性媒体中に懸濁または溶解させ、次いで得られた溶液または懸濁液を滅菌すればよい。

【0066】

式Iの化合物はin vivoイメージングにおいて検出可能であるばかりでなく、病状の治療においても治療上有効でありうる。従って例えばベクターまたはレポーター部分が、例えばベクター部分の放射性核種レポーターの放射線療法効果により治療上の有効性を有する可能性がある。

10

【0067】

このように式Iの化合物の治療用組成物（薬物）の製造における使用、および人体または動物体の好ましくは癌の治療における治療的または予防的処置法における使用は、本発明のさらなる態様にあたると考えられる。

【0068】

本願に関して使用できるレポーターのさらなる例はW098/47541の63～66頁および70～86頁に記載され、これらのページ上で開示されていることは参照によりそのまま本明細書の一部とする。これにより前述のページで開示された各々すべてのレポーターまたはそれらの一部は本願に含まれる本発明の明細書の一部とみなされる。

【0069】

さらなる態様において、本発明は造影剤を人体または動物体に投与し、その身体の少なくとも一部を画像化することを含む診断方法で使用するための造影剤の製造を目的とした式Iの化合物の使用を提供する。

20

【0070】

またさらなる態様において、本発明は身体、例えば血管系に造影剤を投与し、シンチグラフィ、PETまたはSPECT手法を用いて造影剤が分布したその身体の少なくとも一部を画像化することを含んでなり、該造影剤としては式Iの薬剤を用いる、人体または動物体を画像化する方法を提供する。

【0071】

またさらなる態様において、本発明は式Iで定義される化合物を含む造影剤組成物をあらかじめ投与された人体または動物体の強調画像を得る方法であって、その身体の少なくとも一部を画像化することを含んでなる方法を提供する。

30

【0072】

さらなる態様においては、本発明は癌に伴う症状、好ましくは血管新生に対処するための薬物、例えば細胞傷害剤による人体または動物体の治療効果を監視する方法を提供し、該方法は式Iの薬剤を身体に投与し、その薬剤の細胞レセプター、好ましくは内皮細胞レセプター、特に $\alpha v \beta 3$ レセプターによる取り込みを検出し、この投与および検出が任意ではあるが好ましくは例えば該薬物による治療前、治療中および治療後に繰り返し行うことを含んでなる。

【0073】

本発明の化合物はすべて化学合成の既知の方法を用いて合成できるが、特に有用なのは自動ペプチド合成装置を用いるMerrifieldの固相法(J. Am. Chem. Soc., 85:2149(1964))である。このペプチドおよびペプチドキレートは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて精製し、in vitroスクリーニングで試験する前に質量分析および分析的HPLCにより同定してよい。

40

【0074】

以下、限定されるものではないが実施例により本発明をさらに説明する。

【実施例】

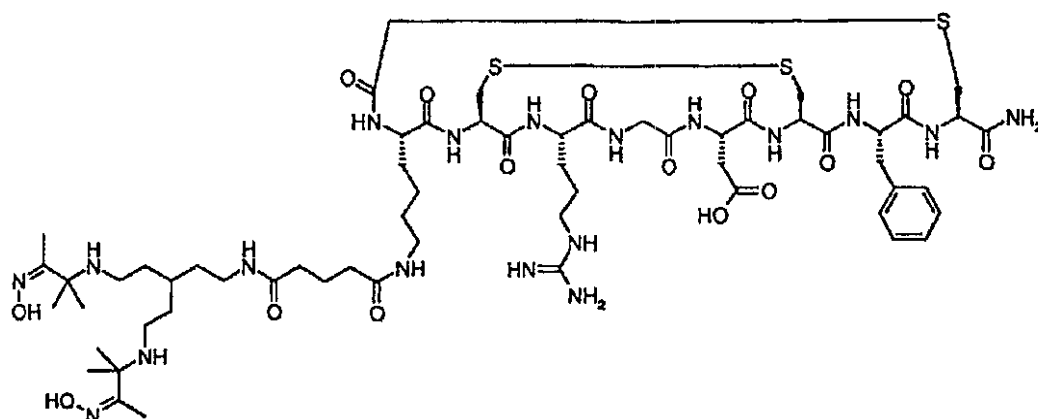
【0075】

<実施例1>

50

ジスルフィド [Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ [CH₂CO-Lys(cPn216-グルタリル)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂

【化 1 5】



10

【 0 0 7 6 】

分子量=1407.754

実際の質量=1406.662

分子式=C₆₀H₉₈N₁₈O₁₅S₃

20

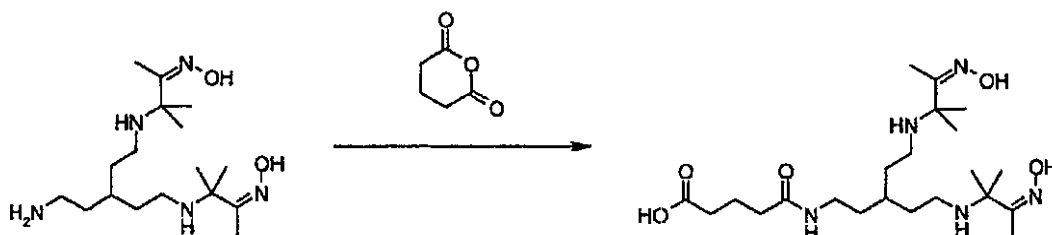
1a) cPn216キレート の合成

テクネチウムキレート cPn216 の合成の詳細については特許出願 GB0116815.2 を参照。

【 0 0 7 7 】

1b) cPn216-グルタル酸中間体の合成

【化 1 6】



30

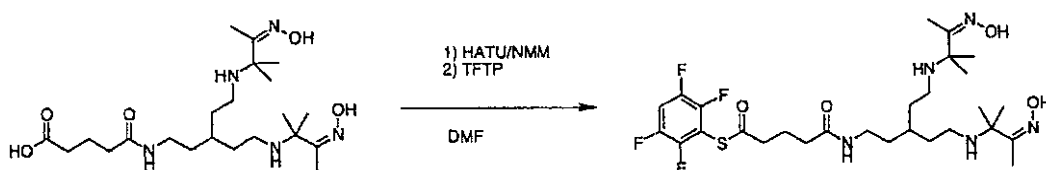
【 0 0 7 8 】

cPn216(100mg, 0.29mmol)をDMF(10mL)に溶かし、攪拌しながら無水グルタル酸(33mg, 0.29mmol)を少量ずつ加える。この反応物を23時間攪拌したところ、目的生成物へと完全に変換された。RP-HPLCの後、純粋な酸が十分な収量で得られた。

【 0 0 7 9 】

1c) cPn216-グルタル酸のテトラフルオロチオフェニルエステルの合成

【化 1 7】



40

【 0 0 8 0 】

DMF(2mL)中のcPn216-グルタル酸(300mg, 0.66mmol)にHATU(249mg, 0.66mmol)およびNMM(132μL, 1.32mmol)を加えた。混合物を5分間攪拌した後、テトラフルオロチオフェノール(

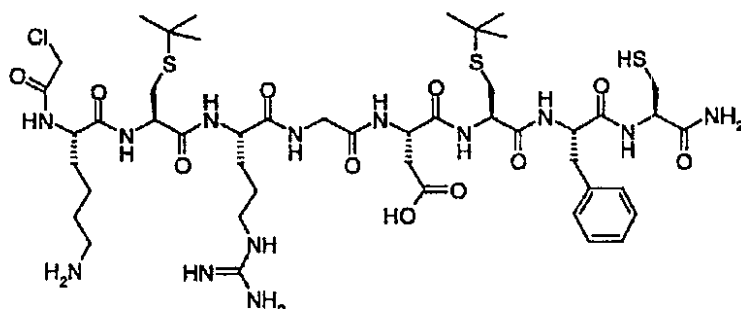
50

0.66mmol, 119mg)を加えた。この溶液を10分間攪拌した後、反応混合物を20%アセトニトリル/水(8mL)で希釈し、生成物をRP-HPLCにより精製し、凍結乾燥した後110gの目的生成物が得られた。

【0081】

1d) $\text{ClCH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-NH}_2$ の合成

【化18】



10

【0082】

分子量=1118.844

実際の質量=1117.464

分子式= $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{ClN}_{13}\text{O}_{11}\text{S}_3$

このペプチドはABI 433A自動ペプチド合成装置にて、1mmolのアミノ酸カートリッジを用い、0.25mmolスケールでRink Amide AM樹脂で開始して合成した。これらのアミノ酸は結合前にHBTUを用いて予め活性化した。N-末端アミン基はDMF中の無水クロロ酢酸溶液を用いて30分間クロロアセチル化した。

20

【0083】

ペプチドおよび側鎖保護基(tBu以外)の樹脂からの同時除去はTIS(5%)、 H_2O (5%)およびフェノール(2.5%)を含有するTFA中で2時間行った。

【0084】

後処理の後、295mgの粗ペプチドが得られた(分析HPLC: グラジェント A= $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ およびB= $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ として10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna 3 μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.18分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

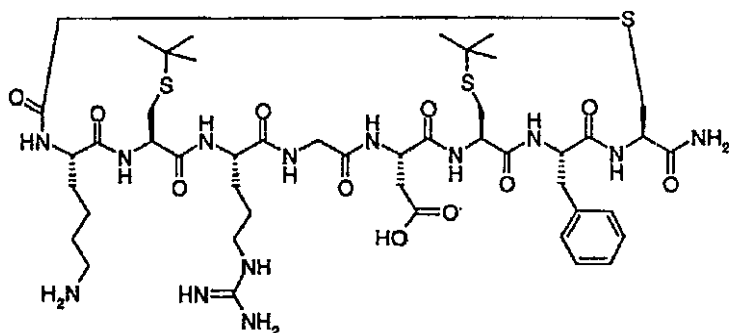
【0085】

理論値M+H 1118.5、測定値1118.6。

【0086】

1e) チオエーテルシクロ [$\text{CH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys}$]- NH_2 の合成

【化19】



40

【0087】

50

分子量=1082.383

実際の質量=1081.487

分子式=C₄₆H₇₅N₁₃O₁₁S₃

295mgのClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-NH₂を水/アセトニトリルに溶かした。混合物をアンモニア水でpH8に調整し、16時間攪拌した。

【0088】

後処理の後、217mgの粗ペプチドが得られた(分析HPLC: グラジェント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.42分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

10

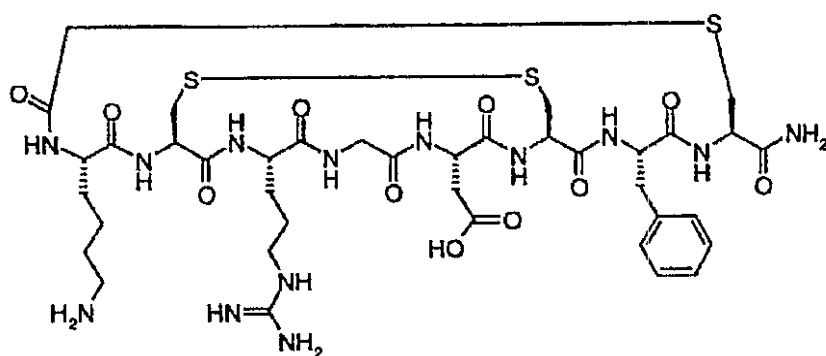
【0089】

理論値M+H 1882.5、測定値1882.6。

【0090】

1f)ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂の合成

【化20】



20

【0091】

分子量=968.150

実際の質量=967.346

分子式=C₃₈H₅₇N₁₃O₁₁S₃

217mgのチオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-NH₂をアニソール(500μl)、DMSO(2mL)およびTFA(100mL)の溶液で60分間処理し、その後真空中でTFAを除去し、ジエチルエーテルを添加することによりペプチドを沈殿させた。

30

【0092】

分取HPLC(Phenomenex Luna 10μ C18 (2) 250x50mmカラム)による粗物質(202mg)の精製は、A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして60分間にわたり0~30%のBを流速50mL/分で用いて行った。凍結乾燥後、112mgの純粋な物質が得られた(分析HPLC: グラジェント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5~50%のB; Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間5.50分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

40

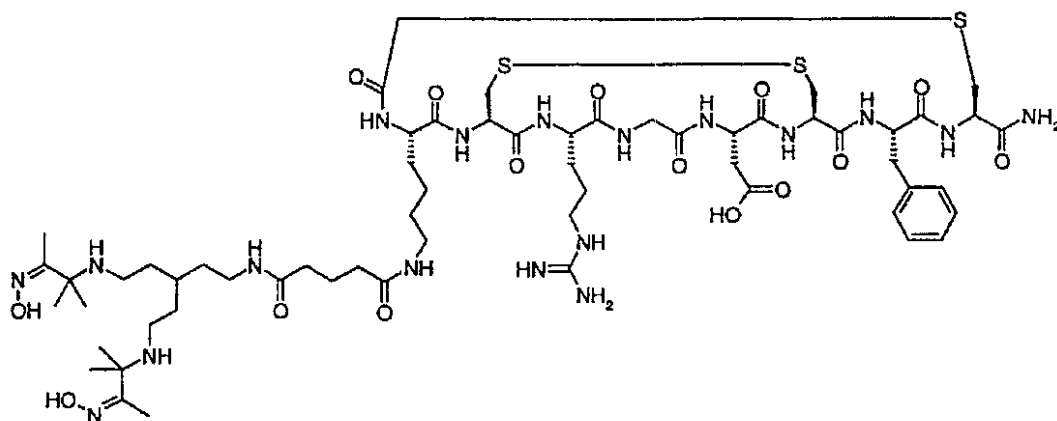
【0093】

理論値M+H 968、測定値971。

【0094】

1g)ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys(cPn216-グルタリル)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂の合成

【化21】



10

【0095】

分子量=1407.754

実際の質量=1406.662

分子式=C₆₀H₉₈N₁₈O₁₅S₃

1.7mgのジスルフィド [Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ [CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-NH₂、9.1mgのcPn216キレート活性エステルおよび6μLのN-メチルモルホリンをDMF(0.5μL)に溶かした。混合物を3時間攪拌した。

20

【0096】

分取HPLC(Phenomenex Luna 5μ C18 (2) 250x21.20mmカラム)による反応混合物の精製は、A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして40分間にわたり0~30%のBを流速10mL/分で用いて行った。凍結乾燥後、5.7mgの純粋な物質が得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり0~30%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間7.32分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

【0097】

理論値M+H 1407.7、測定値1407.6。

【0098】

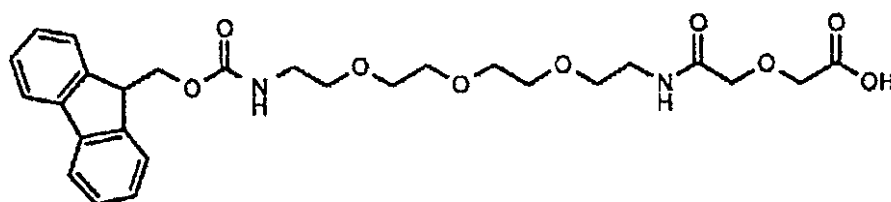
30

<実施例2>

ジスルフィド [Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ [CH₂CO-Lys(cPn216-グルタリル)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys₆-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ (ただし、n=1)

2a)17-(Fmoc-アミノ)-5-オキソ-6-アザ-3,9,12,15-テトラオキサヘプタデカン酸

【化22】



40

【0099】

この構成ブロックをFmoc化学を用いて固相に結合させる。この構成ブロックの結合型を端的に(PEG)_n(ただし、nは正の整数)と表される。

【0100】

1,11-ジアジド-3,6,9-トリオキサウンデカン

乾燥THF(100ml)中、乾燥テトラエチレングリコール(19.4 g, 0.100mol)および塩化メタンスルホン(25.2g, 0.220mol)の溶液をアルゴン下で維持し、氷水浴中で0℃まで冷却した

50

。このフラスコに乾燥THF(25ml)中、トリエチルアミン(22.6g, 0.220mol)溶液を45分間にわたって滴下した。1時間後、冷却浴をはずし、攪拌を4時間続けた。水(60ml)を加えた。この混合物に炭酸水素ナトリウム(6g, pH8まで)およびアジ化ナトリウム(14.3g, 0.220mol)をこの順序で加えた。THFを留去し、この水溶液を24時間還流させた(二相となった)。この混合物を冷却し、エーテル(100ml)を加えた。水相を塩化ナトリウムで飽和させた。相を分け、水相をエーテル(4x50ml)で抽出した。合した有機相をブライン(2x50ml)で洗浄し、乾燥させた(MgSO₄)。濾過および濃縮すると22.1g(91%)の黄色オイルが得られた。この生成物をさらに精製することなく次の工程で用いた。

【0101】

11-アジド-3,6,9-トリオキサウンデカンアミン

5%塩酸(200ml)中、激しく機械攪拌した1,11-ジアジド-3,6,9-トリオキサウンデカン(20.8g, 0.085mol)の懸濁液に、エーテル(150ml)中のトリフェニルホスフィン(19.9g, 0.073mol)溶液を室温で3時間にわたって加えた。この反応混合物をさらに24時間攪拌した。相を分け、水相をジクロロメタン(3x40ml)で抽出した。この水相を氷水浴中で冷却し、KOHを添加することによりpHを約12に調整した。生成物をジクロロメタン(5x50ml)で抽出した。合した有機相を乾燥させた(MgSO₄)。濾過および濃縮すると14.0g(88%)の黄色オイルが得られた。MALDI-TOF質量分析法(マトリックス: α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸)により分析したところ予測されたように219にM+Hピークが得られた。¹H(500MHz)および¹³C(125MHz)NMR分光光度測定を用いてさらに特性決定したところこの構造が確認された。

【0102】

17-アジド-5-オキソ-6-アザ-3,9,12,15-テトラオキサヘプタデカン酸

ジクロロメタン(100ml)中、11-アジド-3,6,9-トリオキサウンデカンアミン(10.9g, 50.0mmol)の溶液に無水二グリコール酸(6.38g, 55.0mmol)を加えた。反応混合物を一晩攪拌した。HPLC分析(カラムVydac 218TP54; 溶媒: A=水/0.1%TFAおよびB=アセトニトリル/0.1%TFA; グラジエントは20分間にわたって4~16%のB; 流速1.0ml/分; 214および284nmにてUV検出)を行ったところ、出発材料が保持時間18.3分の生成物に完全に変換していたことが分かった。この溶液を濃縮すると定量的収量の黄色シロップが得られた。この生成物をLC-MS(ESイオン化)により分析したところ、予測されたように[MH]⁺は335にあった。¹H(500MHz)および¹³C(125MHz)NMR分光光度測定も構造に一致した。この生成物をさらに精製することなく次の工程で用いた。

【0103】

17-アミノ-5-オキソ-6-アザ-3,9,12,15-テトラオキサヘプタデカン酸

水(100ml)中、17-アジド-5-オキソ-6-アザ-3,9,12,15-テトラオキサヘプタデカン酸(8.36g, 25.0mmol)の溶液をH₂(g)-Pd/C(10%)を用いて還元した。LC-MS分析(カラム Vydac 218TP54; 溶媒: A=水/0.1%TFAおよびB=アセトニトリル/0.1%TFA; グラジエント20分にわたって4~16%のB; 流速1.0ml/分; 214および284nmにてUV検出、ESイオン化では出発材料については335に、生成物については309にM+Hが得られる)により出発材料が完全に変換したことが示されるまで反応を進めた。この溶液を濾過し、そのまま次の工程に用いた。

【0104】

17-(Fmoc-アミノ)-5-オキソ-6-アザ-3,9,12,15-テトラオキサヘプタデカン酸

上記で得られた17-アミノ-5-オキソ-6-アザ-3,9,12,15-テトラオキサヘプタデカン酸の水溶液(アミノ酸25.0mmolに相当)に重炭酸ナトリウム(5.04g, 60.0mmol)およびジオキサン(40ml)を加えた。ジオキサン(40ml)中のFmoc-クロリド(7.11g, 0.275mol)の溶液を滴下した。この反応混合物を一晩攪拌した。ジオキサンを蒸発除去し(rotavapor)、水相を酢酸エチルで抽出した。この水相を塩酸を添加することにより酸性化し、沈殿した物質をクロロホルムで抽出した。有機相を乾燥させ(MgSO₄)、濾過および濃縮したところ11.3g(85%)の黄色シロップが得られた。構造はLC-MS分析(カラムVydac 218TP54; 溶媒: A=水/0.1%TFAおよびB=アセトニトリル/0.1%TFA; グラジエントは20分にわたって40~60%のB; 流速1.0ml/分; 214および254nmにてUV検出、ESイオン化では、5,8分の生成物ピークに関して予測されたように531にM+Hが得られる)により確認した。この分析により副生成物の含量は

10

20

30

40

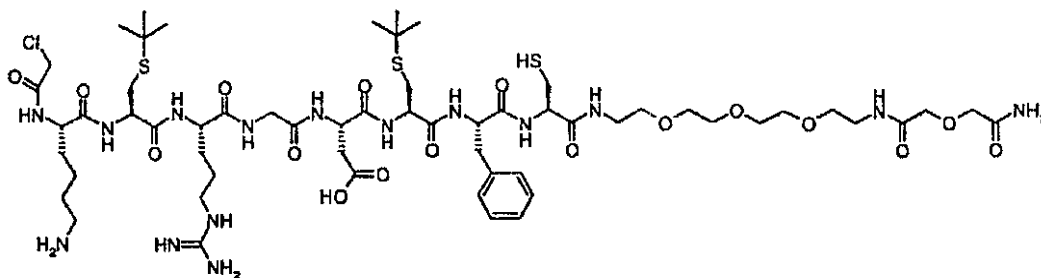
50

極めて低いことが分かり、この材料をさらに精製することなく用いた。

【0105】

2b) $\text{ClCH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)}_n\text{-NH}_2$ (ただし、 $n=1$) の合成

【化23】



10

【0106】

分子量=1409.163

実際の質量=1407.612

分子式= $\text{C}_{58}\text{H}_{98}\text{ClN}_{15}\text{O}_{17}\text{S}_3$

PEGユニットを、HATU活性化を媒介に0.25mmolスケールで開始し、Rink Amide AM樹脂に手作業で結合させた。残りのペプチドは1mmolアミノ酸カートリッジを用いABI 433A自動ペプチド合成装置にて構築した。これらのアミノ酸は結合前にHBTUを用いて予め活性化した。N-末端アミン基はDMF中の無水クロロ酢酸溶液を用いて30分間クロロアセチル化した。

20

【0107】

ペプチドおよび側鎖保護基(tBu以外)の樹脂からの同時除去はTIS(5%)、 H_2O (5%)およびフェノール(2.5%)を含有するTFA中で2時間行った。

【0108】

後処理の後、322mgの粗ペプチドが得られた(分析HPLC: グラジエント $\text{A}=\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ および $\text{B}=\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ として10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna $3\mu\text{m}$ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.37分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

30

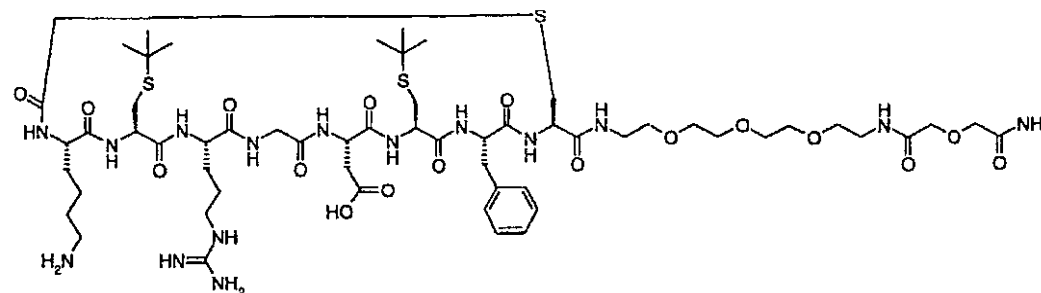
【0109】

理論値M+H 1409、測定値1415。

【0110】

2c) チオエーテルシクロ $[\text{CH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys}]_2\text{-(PEG)}_n\text{-NH}_2$ (ただし、 $n=1$) の合成

【化24】



40

【0111】

分子量=1372.702

実際の質量=1371.635

50

分子式=C₅₈H₉₇N₁₅O₁₇S₃

322mgのClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂を水/アセトニトリルに溶かした。混合物をアンモニア水でpH8に調整し、16時間攪拌した。

【0112】

後処理の後、粗ペプチドが得られた(分析HPLC: グラジェント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.22分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

【0113】

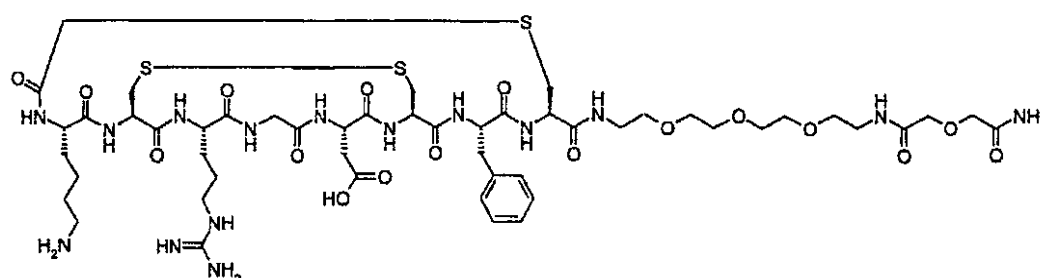
理論値M+H 1373、測定値1378。

10

【0114】

2d)ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=1)の合成

【化25】



20

【0115】

分子量=1258.469

実際の質量=1257.494

分子式=C₅₀H₇₉N₁₅O₁₇S₃

チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂をアニソール(200μL)、DMSO(2mL)およびTFA(100mL)の溶液で60分間処理し、その後TFAを真空下で除去し、ジエチルエーテルを添加することによりペプチドを沈殿させた。

30

【0116】

分取HPLC(Phenomenex Luna 5μ C18 (2) 250x21.20mmカラム)による粗物質70mgの精製は、A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして40分間にわたり0~30%のBを流速10mL/分で用いて行った。凍結乾燥後、46mgの純粋な物質が得られた(分析HPLC: グラジェント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり0~30%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.80分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

【0117】

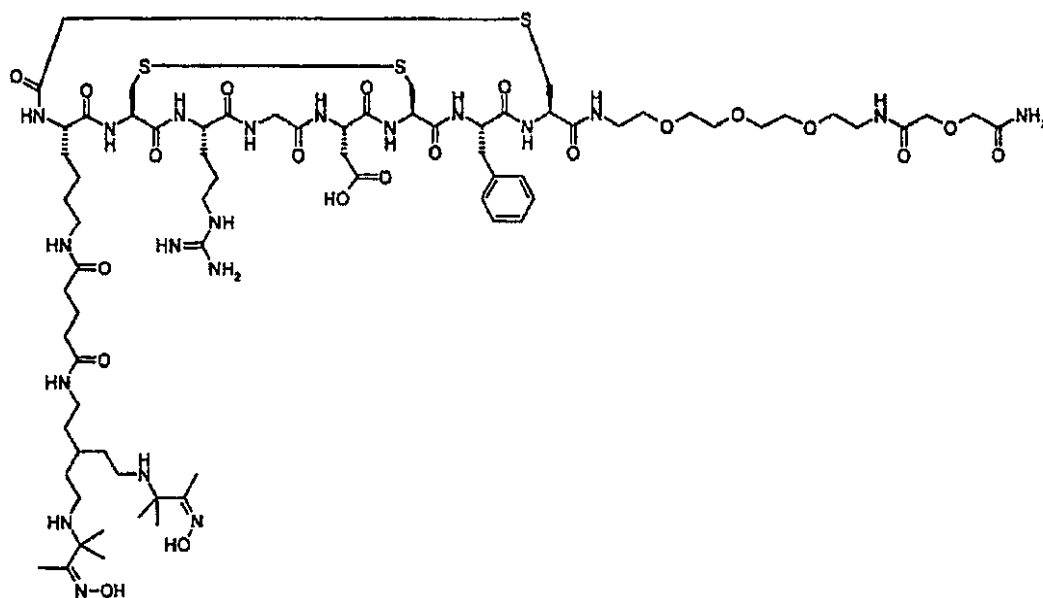
理論値M+H 1258.5、測定値1258.8。

40

【0118】

2e)ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys(cPn216-グルタリル)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=1)の合成

【化26】



10

【0119】

分子量=1698.073

実際の質量=1696.810

分子式=C₇₂H₁₂₀N₂₀O₂₁S₃

13mgの[Cys²⁻⁶]シクロ[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂、9.6mgのcPn216キレートエステルおよび8μLのN-メチルモルホリンをDMF(0.5mL)に溶かした。この混合物を2時間半攪拌した。

20

【0120】

分取HPLC(Phenomenex Luna 5μ C18 (2) 250x21.20mmカラム)による反応混合物の精製は、A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして40分間にわたり0~30%のBを流速10mL/分で用いて行った。凍結乾燥後、14.2mgの純粋な物質が得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり0~30%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間7.87分)。

30

【0121】

理論値M+H 1697.8、測定値1697.9。

【0122】

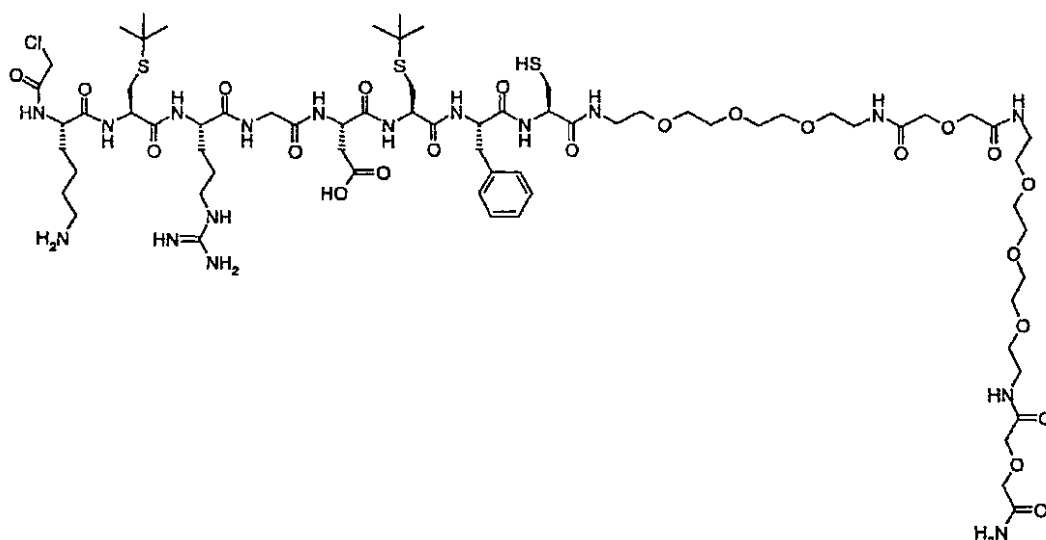
<実施例3>

ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys(cPn216-グルタリル)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=2)の合成

3a)ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=2)の合成

40

【化27】



10

【0123】

分子量=1699.482

実際の質量=1697.759

分子式=C₇₀H₁₂₀ClN₁₇O₂₃S₃

ペプチドの構築は実施例2b)と同様に、両PEGユニットを手作業により結合させた。

20

【0124】

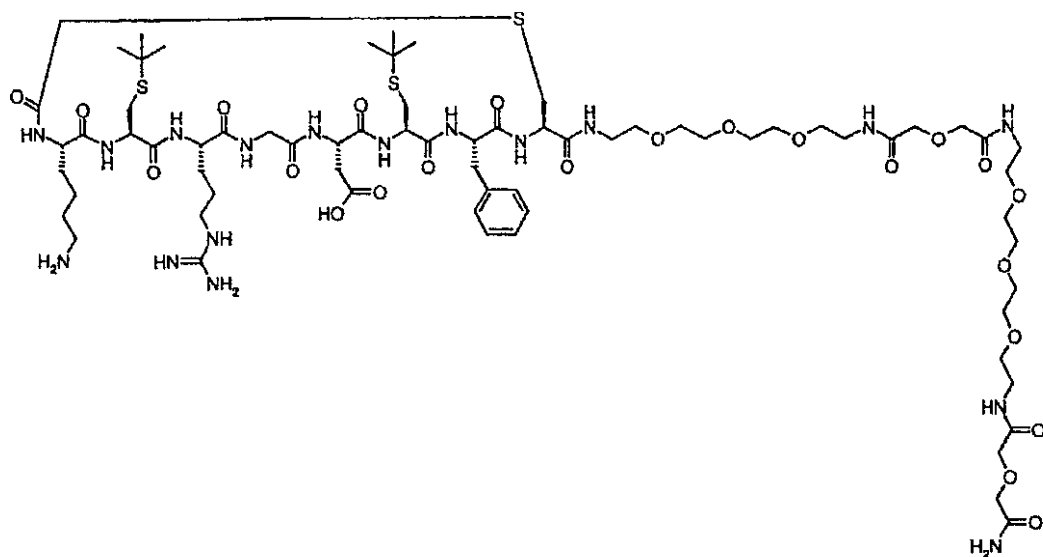
後処理の後、粗ペプチドが得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x 4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.40分)。

【0125】

3b)チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=2)の合成

【化28】

30



40

【0126】

分子量=1663.021

実際の質量=1661.783

分子式=C₇₀H₁₁₉N₁₇O₂₃S₃

50

ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂ (ただし、n=2)を水/アセトニトリルに溶かし、アンモニア水でpH8に調整し、16時間攪拌した。

【0127】

後処理の後、380mgの粗ペプチドが得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.28分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

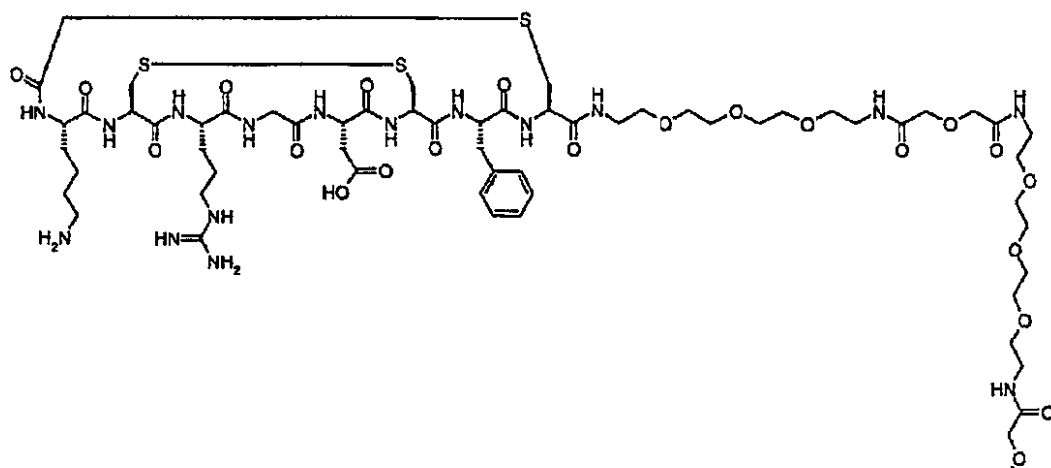
【0128】

理論値M+H 1663、測定値1670。

【0129】

3c)ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=2)の合成

【化29】



【0130】

分子量=1548.788

実際の質量=1547.642

分子式=C₆₂H₁₀₁N₁₇O₂₃S₃

380mgのチオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ (ただし、n=2)をアニソール(500μl)、DMSO(2mL)およびTFA(100mLの溶液で60分間処理し、その後真空下でTFAを除去し、ジエチルエーテルを添加することによりペプチドを沈殿させた。

【0131】

分取HPLC(Phenomenex Luna 10μ C18 (2) 250x50mmカラム)による粗物質(345mg)の精製は、A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして60分間にわたり0~30%のBを流速50mL/分で用いて行った。凍結乾燥後、146mgの純粋な物質が得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり0~30%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間7.42分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

【0132】

理論値M+H 1548.6、測定値1548.8。

【0133】

3d)ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys(cPn216-グルタリル)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ (ただし、n=2)の合成

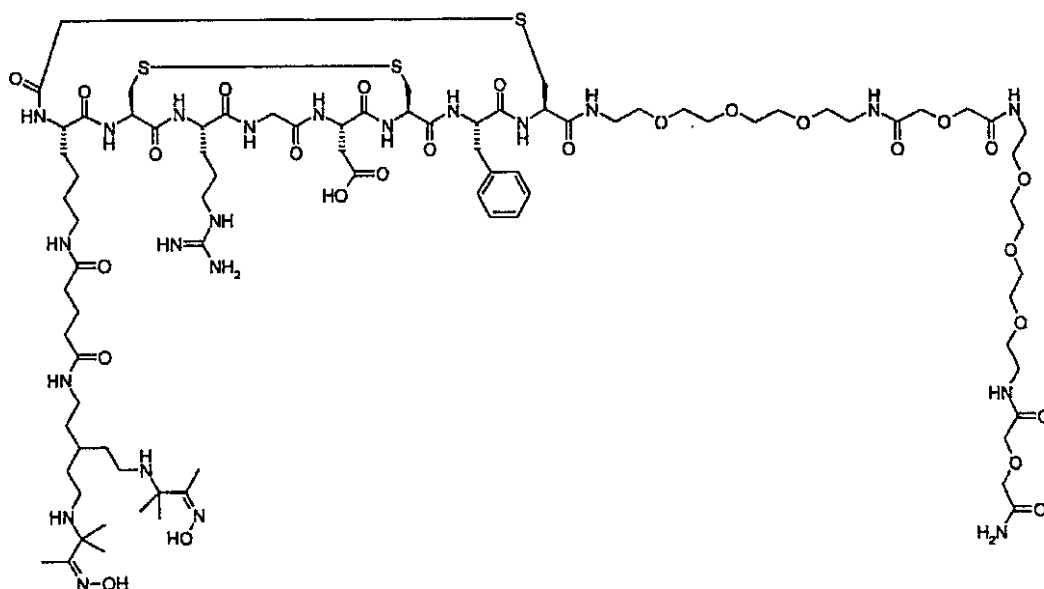
【化30】

10

20

30

40



10

【0134】

分子量=1988.392

実際の質量=1986.958

分子式=C₈₄H₁₄₂N₂₂O₂₇S₃

146mgの[Cys²⁻⁶]シクロ[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)₂-NH₂、110mgのcPn216キレート活性エーテルおよび76μLのN-メチルモルホリンをDMF(6mL)に溶かした。この混合物を9時間攪拌した。

20

【0135】

分取HPLC(Phenomenex Luna 10μ C18 (2) 250x50mmカラム)による反応混合物の精製は、A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして60分間にわたり0~30%のBを流速50mL/分で用いて行った。凍結乾燥後、164mgの純粋な物質が得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり0~30%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間8.13分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

30

【0136】

理論値M+H 1988.0、測定値1988.0。

【0137】

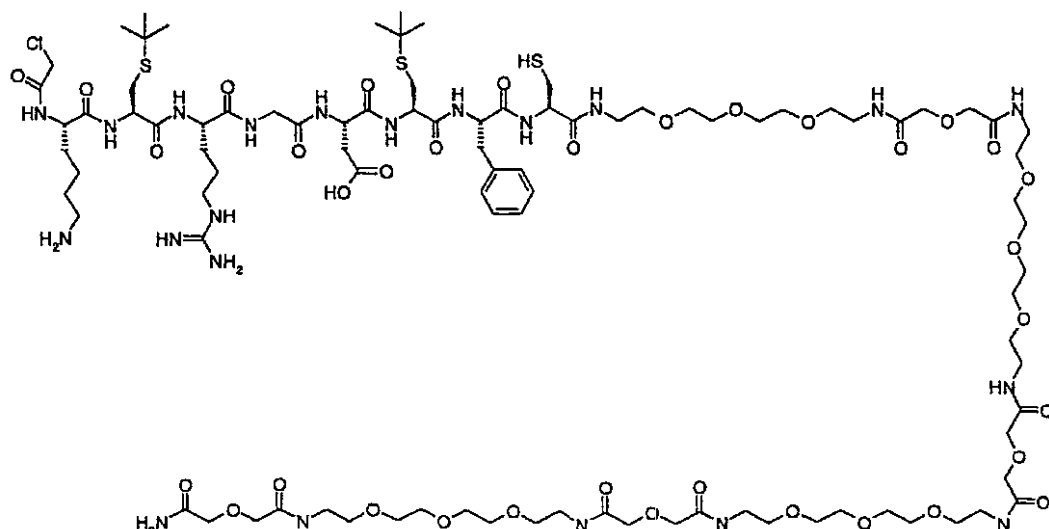
<実施例4>

ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys(cPn216-グルタリル)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=4)の合成

4a)ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=4)の合成

40

【化31】



10

20

30

40

50

【0138】

分子量=2280.120

実際の質量=2278.055

分子式=C₉₄H₁₆₄CIN₂O₁₀S₃

ペプチドの構築は実施例2b)と同様に、4種全てのPEGユニットを手作業で結合させた。

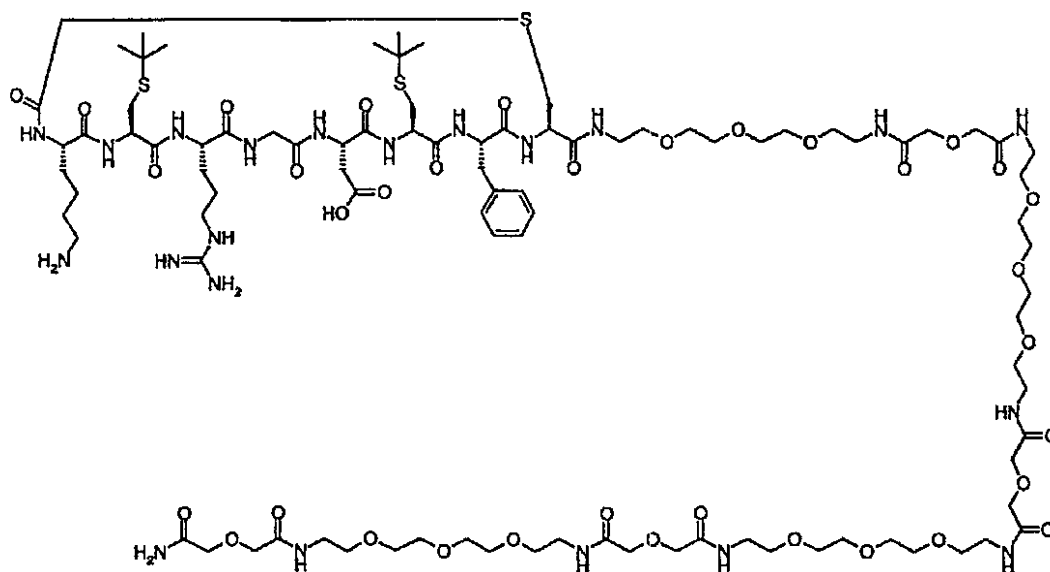
【0139】

後処理の後、粗ペプチドが得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分n; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.50分)。

【0140】

4b)チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=4)の合成

【化32】



【0141】

分子量=2243.659

実際の質量=2242.078

分子式=C₉₄H₁₆₃N₂O₁₀S₃

ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)₄-NH₂を水/アセトニトリルに溶かした。この混合物をアンモニア水でpH8に調整し、16時間攪拌した。

【0142】

後処理の後、粗ペプチドが得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間6.37分)。生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

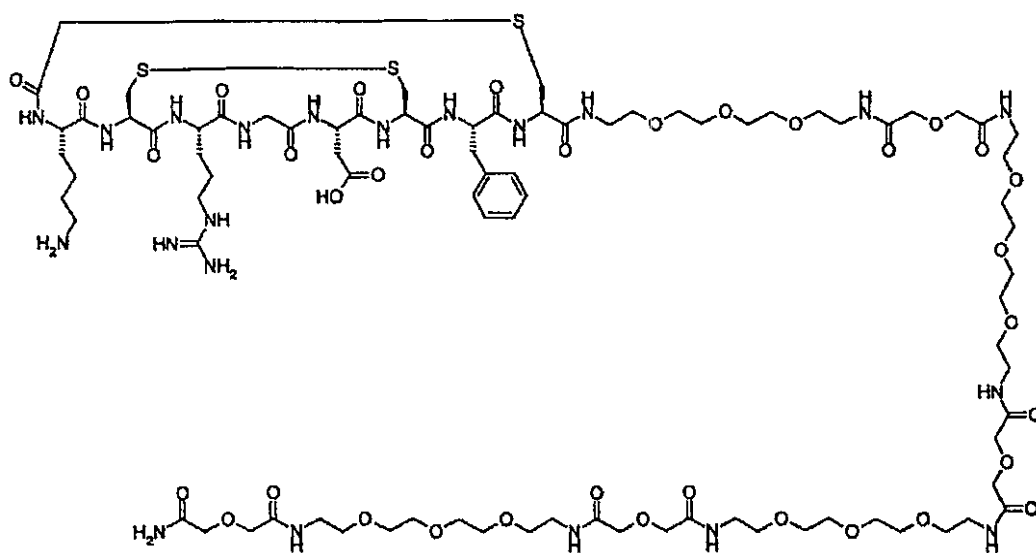
【0143】

理論値[(M+2H)/2] 1122.0、測定値1122.5。

【0144】

4c)ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=4)の合成

【化33】



【0145】

分子量=2129.426

実際の質量=2127.937

分子式=C₈₆H₁₄₅N₂₁O₃₅S₃

チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)₄-NH₂をアニソール(100μL)、DMSO(1mL)およびTFA(50mL)で60分間処理し、その後真空下でTFAを除去し、ジエチルエーテルを添加することによりペプチドを沈殿させた。

【0146】

分取HPLC(Phenomenex Luna 5μ C18 (2) 250x21.20mmカラム)による粗物質(345mg)の精製は、A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして40分間にわたり5~50%のBを流速10mL/分で用いて行った。凍結乾燥後、12mgの純粋な物質が得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5~50%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間4.87分)。

【0147】

4d)ジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys(cPn216-グルタリル)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(ただし、n=4)の合成

【化34】

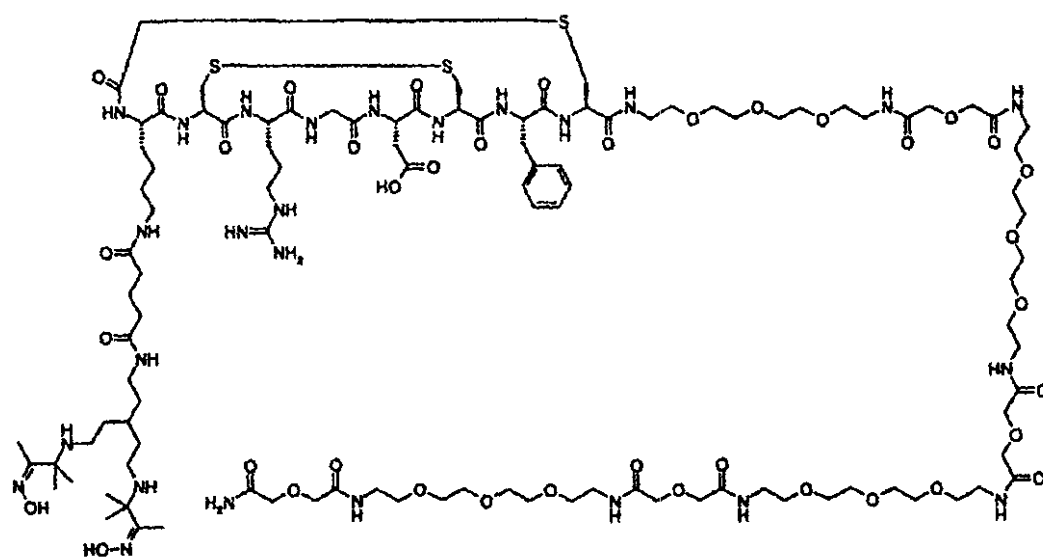
10

20

30

40

50



50

【0148】

分子量=2569.029

実際の質量=2567.253

分子式=C₁₀₈H₁₈₆N₂₆O₃₉S₃。

【0149】

12mgのジスルフィド[Cys²⁻⁶]チオエーテルシクロ[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)₄-NH₂、5.2mgのcPn216キレート活性エーテルおよび2μLのN-メチルモルホリンをDMF(0.5mL)に溶かした。この混合物を7時間攪拌した。

【0150】

分取HPLC(Phenomenex Luna 5μ C18 (2) 250x21.20mmカラム)による反応混合物の精製は 10
、A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして40分間にわたり5～50%のBを流速10mL/分で用いて行った。凍結乾燥後、8mgの純粋な物質が得られた(分析HPLC: グラジエント A=H₂O/0.1%TFAおよびB=CH₃CN/0.1%TFAとして10分間にわたり5～50%のB; カラム Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50x4.6mm; 流速2mL/分; 検出 UV 214nm; 生成物の保持時間5.17分)。
生成物のさらなる特性決定は質量分析を用いて行った。

【0151】

理論値[(M+2H)/2] 1284.6、測定値1284.9。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006491 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 7/00 (74) Common Representative: AMERSHAM HEALTH AS;
P.O. Box 4220 Nydalen, Nycoveien 1-2, N-N-0401 Oslo
(NO).
- (21) International Application Number: PCT/NO02/00250
- (22) International Filing Date: 8 July 2002 (08.07.2002) (81) Designated States (national): All, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0116815.2 10 July 2001 (10.07.2001) GB
20014954 11 October 2001 (11.10.2001) NO
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMER-
SHAM HEALTH AS [NO/NO]; P.O. Box 4220 Nydalen,
Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): CUTHBERTSON,
Alan [GB/NO]; Amersham Health AS, P.O. Box 4220 Ny-
dalen, Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO). INDREVOLL,
Bård [NO/NO]; Amersham Health AS, P.O. Box 4220 Ny-
dalen, Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO). SOLBAKKEN,
Magne [NO/NO]; Amersham Health AS, P.O. Box 4220
Nydalen, Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/006491 A2

(54) Title: PEPTIDE-BASED COMPOUNDS

(57) Abstract: The invention relates to new peptide-based compounds for use as diagnostic imaging agents or as therapeutic agents wherein the agents comprise targeting vectors which bind to integrin receptors.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

1

Peptide-based compoundsField of invention

The present invention relates to new peptide-based compounds and their use in therapeutically effective treatments as well as for diagnostic imaging techniques. More specifically the invention relates to the use of such peptide-based compounds as targeting vectors that bind to receptors associated with angiogenesis, in particular integrin receptors, e.g. the $\alpha v \beta 3$ integrin receptor. Such contrast agents may thus be used for diagnosis of for example malignant diseases, heart diseases, endometriosis, inflammation-related diseases, rheumatoid arthritis and Kaposi's sarcoma. Moreover such agents may be used in therapeutic treatment of these diseases.

15 Background of invention

New blood vessels can be formed by two different mechanisms: vasculogenesis or angiogenesis. Angiogenesis is the formation of new blood vessels by branching from existing vessels. The primary stimulus for this process may be inadequate supply of nutrients and oxygen (hypoxia) to cells in a tissue. The cells may respond by secreting angiogenic factors, of which there are many; one example, which is frequently referred to, is vascular endothelial growth factor (VEGF). These factors initiate the secretion of proteolytic enzymes that break down the proteins of the basement membrane, as well as inhibitors that limit the action of these potentially harmful enzymes. The other prominent effect of angiogenic factors is to cause endothelial cells to migrate and divide. Endothelial cells that are attached to the basement membrane, which forms a continuous sheet around blood vessels on the contraluminal side, do not undergo mitosis. The combined effect of loss of attachment and signals from the receptors for angiogenic factors is to cause

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

2

the endothelial cells to move, multiply, and rearrange themselves, and finally to synthesise a basement membrane around the new vessels.

5 Angiogenesis is prominent in the growth and remodelling of tissues, including wound healing and inflammatory processes. Tumors must initiate angiogenesis when they reach millimetre size in order to keep up their rate of growth. Angiogenesis is accompanied by characteristic changes in endothelial cells
10 and their environment. The surface of these cells is remodelled in preparation for migration, and cryptic structures are exposed where the basement membrane is degraded, in addition to the variety of proteins which are involved in effecting and controlling proteolysis. In the
15 case of tumours, the resulting network of blood vessels is usually disorganised, with the formation of sharp kinks and also arteriovenous shunts. Inhibition of angiogenesis is also considered to be a promising strategy for antitumour therapy. The transformations accompanying angiogenesis are also very
20 promising for diagnosis, an obvious example being malignant disease, but the concept also shows great promise in inflammation and a variety of inflammation-related diseases, including atherosclerosis, the macrophages of early atherosclerotic lesions being potential sources of angiogenic
25 factors. These factors are also involved in re-vascularisation of infarcted parts of the myocardium, which occurs if a stenosis is released within a short time.

Further examples of undesired conditions that are associated
30 with neovascularization or angiogenesis, the development or proliferation of new blood vessels are shown below. Reference is also made in this regard to WO 98/47541.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

3

Diseases and indications associated with angiogenesis are e.g. different forms of cancer and metastasis, e.g. breast, skin, colorectal, pancreatic, prostate, lung or ovarian cancer.

5

Other diseases and indications are inflammation (e.g. chronic), atherosclerosis, rheumatoid arthritis and gingivitis.

- 10 Further diseases and indications associated with angiogenesis are arteriovenous alformations, astrocytomas, choriocarcinomas, glioblastomas, gliomas, hemangiomas (childhood, capillary), hepatomas, hyperplastic endometrium, ischemic myocardium, endometriosis, Kaposi sarcoma, macular
- 15 degeneration, melanoma, neuroblastomas, occluding peripheral artery disease, osteoarthritis, psoriasis, retinopathy (diabetic, proliferative), scleroderma, seminomas and ulcerative colitis.
- 20 Angiogenesis involves receptors that are unique to endothelial cells and surrounding tissues. These markers include growth factor receptors such as VEGF and the Integrin family of receptors. Immunohistochemical studies have demonstrated that a variety of integrins perhaps most
- 25 importantly the α_v class are expressed on the apical surface of blood vessels [Conforti, G., et al. (1992) Blood 80: 37-446] and are available for targeting by circulating ligands [Pasqualini, R., et al. (1997) Nature Biotechnology 15: 542-546]. The $\alpha_5\beta_1$ is also an important integrin in promoting the
- 30 assembly of fibronectin matrix and initiating cell attachment to fibronectin. It also plays a crucial role in cell migration [Bauer, J. S., (1992) J. Cell Biol. 116: 477-487]

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

4

as well as tumour invasion and metastasis [Gehlsen, K. R., (1988) J. Cell Biol. 106: 925-930].

5 The integrin $\alpha v\beta 3$ is one of the receptors that is known to be associated with angiogenesis. Stimulated endothelial cells appear to rely on this receptor for survival during a critical period of the angiogenic process, as antagonists of the $\alpha v\beta 3$ integrin receptor/ligand interaction induce apoptosis and inhibit blood vessel growth.

10

Integrins are heterodimeric molecules in which the α - and β -subunits penetrate the cell-membrane lipid bilayer. The α -subunit has four Ca^{2+} binding domains on its extracellular chain, and the β -subunit has a number of extracellular

15

Many ligands (eg. fibronectin) involved in cell adhesion contain the tripeptide sequence arginine-glycine-aspartic acid (RGD). The RGD sequence appears to act as a primary

20 recognition site between the ligands presenting this sequence and receptors on the surface of cells. It is generally believed that secondary interactions between the ligand and receptor enhance the specificity of the interaction. These secondary interactions might take place between moieties of

25 the ligand and receptor that are immediately adjacent to the RGD sequence or at sites that are distant from the RGD sequence.

RGD peptides are known to bind to a range of integrin

30 receptors and have the potential to regulate a number of cellular events of significant application in the clinical setting. (Ruoslahti, J. Clin. Invest., 87: 1-5 (1991)). Perhaps the most widely studied effect of RGD peptides and

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

5

mimetics thereof relate to their use as anti-thrombotic agents where they target the platelet integrin GpIIb/IIIa.

Inhibition of angiogenesis in tissues by administration of either an $\alpha v\beta 3$ or $\alpha v\beta 5$ antagonist has been described in for example WO 97/06791 and WO 95/25543 using either antibodies or RGD containing peptides. EP 578083 describes a series of mono-cyclic RGD containing peptides and WO 90/14103 claims RGD-antibodies. Haubner et al. in the J. Nucl. Med. (1999); 40: 1061-1071 describe a new class of tracers for tumour targeting based on monocyclic RGD containing peptides. Biodistribution studies using whole-body autoradiographic imaging revealed however that the ^{125}I -labelled peptides had very fast blood clearance rates and predominantly hepatobiliary excretion routes resulting in high background.

Cyclic RGD peptides containing multiple bridges have also been described in WO 98/54347 and WO 95/14714. Peptides derived from in vivo biopanning (WO 97/10507) have been used for a variety of targeting applications. The sequence CDCRGDCFC (RGD-4C), has been used to target drugs such as doxorubicin (WO 98/10795), nucleic acids and adenoviruses to cells (see WO 99/40214, WO 99/39734, WO 98/54347, WO 98/54346, US 5846782). Peptides containing multiple cysteine residues do however suffer from the disadvantage that multiple disulphide isomers can occur. A peptide with 4 cysteine residues such as RGD-4C has the possibility of forming 3 different disulphide folded forms. The isomers will have varying affinity for the integrin receptor as the RGD pharmacophore is forced into 3 different conformations.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

6

Further examples of RGD comprising peptide-based compounds are found in PCT/NO01/00146 and PCT/NO01/00390, the content of which are incorporated herein by reference.

- 5 The efficient targeting and imaging of integrin receptors associated with angiogenesis in vivo demands therefore a selective, high affinity RGD based vector that is chemically robust and stable. Furthermore, the route of excretion is an important factor when designing imaging agents in order to
10 reduce problems with background. These stringent conditions are met by the bicyclic structures described in the present invention.

Description of the invention

- 15 Viewed from one aspect the invention provides new peptide-based compounds of Formula I as defined in the claims. These compounds have affinity for integrin receptors, e.g. affinity for the integrin $\alpha v\beta 3$.
- 20 The compounds of Formula I comprise at least two bridges, wherein one bridge forms a disulphide bond and the second bridge comprises a thioether (sulphide) bond and wherein the bridges fold the peptide moiety into a 'nested' configuration.
- 25 The compounds of the current invention thus have a maximum of one disulphide bridge per molecule moiety. Compounds defined by the present invention are surprisingly stable in vivo and under the conditions employed during labelling, e.g. during
30 labelling with technetium.

These new compounds may be used in therapeutically effective treatments as well as for imaging purposes.

PCT/NO02/00250

7

$$\begin{array}{ccccccc}
 & Z_1 - W_1 & & S & - & S & \\
 & | & & | & & | & \\
 R_1 - C(=O) - X_1 - X_2 - X_3 - G - D - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 & & & & & & \\
 | & & & & & & | \\
 S - & & & & & & (CH_2)_h
 \end{array}$$

(I)

wherein

10 D represents aspartic acid, and

n represents a positive integer between 1 and 10, and
h represents a positive integer 1 or 2, and

X₂ and X₄ represent independently an amino acid residue capable of forming a disulphide bond, preferably a cysteine or a homocysteine residue, and

25 X₃ represents arginine, N-methylarginine or an arginine
mimetic, preferably an arginine, and

WO 03/006491

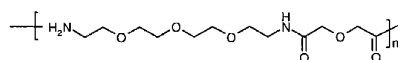
PCT/NO02/00250

8

X₅ represents a hydrophobic amino acid or derivatives thereof, preferably a tyrosine, a phenylalanine, a 3-iodo-tyrosine or a naphthylalanine residue, and more preferably a phenylalanine or a 3-iodo-tyrosine residue, and

X₆ represents a thiol-containing amino acid residue, preferably a cysteine or a homocysteine residue, and

X₇ is absent or represents a homogeneous biomodifier moiety preferably based on a monodisperse PEG building block comprising 1 to 10 units of said building block, said biomodifier having the function of modifying the pharmacokinetics and blood clearance rates of the said agents. In addition X₇ may also represent 1 to 10 amino acid residues preferably glycine, lysine, aspartic acid or serine. In a preferred embodiment of this invention X₇ represents a biomodifier unit comprised of polymerisation of the monodisperse PEG-like structure, 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoic acid of Formula II,



(II)

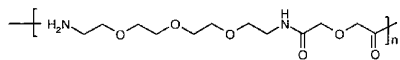
wherein n equals an integer from 1 to 10 and where the C-terminal unit is an amide moiety.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

9

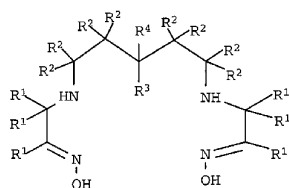
W₁ is absent or represents a spacer moiety and is preferentially derived from glutaric and/or succinic acid and/or a polyethyleneglycol based unit and/or a unit of Formula II



(II)

5

Z₁ is an antineoplastic agent, a chelating agent or a reporter moiety that can be represented by a chelating agent of Formula III



(III)

15 where:

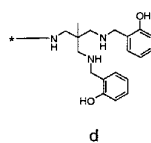
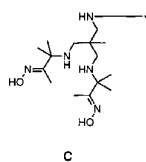
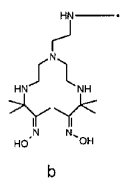
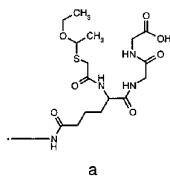
each R¹, R², R³ and R⁴ is independently an R group;
 each R group is independently H or C₁₋₁₀ alkyl, C₃₋₁₀ alkylaryl, C₂₋₁₀ alkoxyalkyl, C₁₋₁₀ hydroxyalkyl, C₁₋₁₀ alkylamine, C₁₋₁₀ fluoroalkyl, or 2 or more R groups, together with the atoms

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

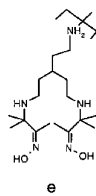
10

to which they are attached form a carbocyclic, heterocyclic, saturated or unsaturated ring, or can represent a chelating agent given by formulas a, b, c and d.



5

A preferred example of a chelating agent is represented by formula e.



10

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

11

Conjugates comprising chelating agents of Formula III can be radiolabelled to give good radiochemical purity, RCP, at room temperature, under aqueous conditions at near neutral pH. The risk of opening the disulphide bridges of the peptide component at room temperature is less than at an elevated temperature. A further advantage of radiolabelling the conjugates at room temperature is a simplified procedure in a hospital pharmacy.

10 The role of the spacer moiety W_1 is to distance the relatively bulky chelating agent from the active site of the peptide component. The spacer moiety W_1 is also applicable to distance a bulky antineoplastic agent from the active site of the peptide.

15 It is found that the biomodifier, X_7 , modifies the pharmacokinetics and blood clearance rates of the compounds. The biomodifier effects less uptake of the compounds in tissue i.e. muscle, liver etc. thus giving a better
20 diagnostic image due to less background interference. The secretion is mainly through the kidneys due to a further advantage of the biomodifier.

However the compounds defined in Formula I may also comprise
25 chelating agents, Z_1 , as defined in Table I.

In some aspects of the invention, Z_1 comprises a reporter moiety where said reporter moiety comprises a radionuclide. Further definitions of chelating agents are listed in the
30 following Table I.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

12

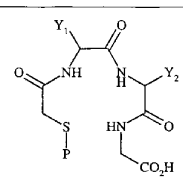
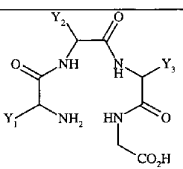
Table I:

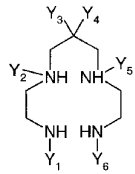
Class of ligand	Structure	Definitions
Amineoxime		Y 1-8 can be H, alkyl, aryl or combinations thereof and Y4 or Y5 contains a suitable functionality such that it can be conjugated to the peptide vector - e.g. preferably alkylamine, alkylsulphide, alkoxy, alkyl carboxylate, arylamine, aryl sulphide or α-haloacetyl X= C or N when $m'=n'=1$ X= N when $m'=n'=2$

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

13

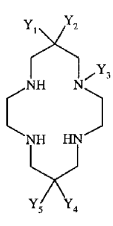
Class of ligand	Structure	Definitions
MAG3 type		P = protecting group (preferably, benzoyl, acetyl, EOE); Y1, Y2 contains a suitable functionality such that it can be conjugated to the peptide vector; preferably H (MAG3), or the side chain of any amino acid, in either L or D form.
G4 type ligands		Y1, Y2, Y3 - contains a suitable functionality such that it can be conjugated to the peptide vector; preferably H, or the side chain of any amino acid, in either L or D form.

Class of ligand	Structure	Definitions
Tetra-amine ligands		Y1-Y6 can be H, alkyl, aryl or combinations thereof where the Y1-6 groups contain one or more functional moieties such that the chelate can be conjugated to the vector - e.g. preferably alkylamine, alkylsulphide, alkoxy, alkyl carboxylate, arylamine, aryl sulphide or α-haloacetyl

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

15

Class of ligand	Structure	Definitions
Cyclic type ligands		Y1-5 can be H, alkyl, aryl or combinations thereof and where Y1-5 groups contain one or more functional moieties such that the chelate can be conjugated to the vector - e.g. preferably alkylamine, alkylsulphide, alkoxy, alkyl carboxylate, arylamine, aryl sulphide or α-haloacetyl

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

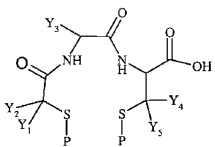
16

Class of ligand	Structure	Definitions
Diaminedi phenol		Y1, Y2 - H, alkyl, aryl and where Y1 or Y2 groups contains a functional moiety such that the chelate can be conjugated to the vector - e.g. preferably alkylamine, alkylsulphide, alkoxy, alkyl carboxylate, arylamine, aryl sulphide or α-haloacetyl W= C, N $m'=n' = 1$ or 2
HYNIC		V= linker to vector or vector itself.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

17

Class of ligand	Structure	Definitions
Amide thiols		P = protecting group (preferably, benzoyl, acetyl, EOE); Y 1-5 = H, alkyl, aryl; or Y3 is a L or D amino acid side-chain or glycine, and the carboxylate may be used for conjugation to the vector via an amide bond. Alternatively the R₁₋₅ groups may contain additional functionality such that the chelate can be conjugated to the vector - e.g. alkylamine, alkylsulphide, alkoxy, alkyl carboxylate, arylamine, aryl sulphide or α-haloacetyl.

In some aspects of the invention of Formula I the Z₁ moiety comprises the binding of a ¹⁸F isotope or an isotope of Cu, incorporation into the agent either as a prosthetic group or
 5 by substitution or addition reactions. The resulting compound may thus be used in Positron Emission Tomography (PET) Imaging.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

18

In one aspect of the present invention of formula I Z₁ is represented by an antineoplastic agent. In this aspect the compound will target an angiogenic site associated with cancer and bring the antineoplastic agent to the diseased area.

5 The antineoplastic agent may be represented by cyclophosphamide, chloroambucil, busulphan, methotrexate, cytarabine, fluorouracil, vinblastine, paclitaxel, doxorubicin, daunorubicin, etoposide, teniposide, cisplatin, 10 amsacrine, docetaxel, but a wide range of other antineoplastic agents may also be used.

The peptide component of the conjugates described herein have preferably no free amino- or carboxy-termini. This 15 introduces into these compounds a significant increase in resistance against enzymatic degradation and as a result they have an increased in vivo stability as compared to many known free peptides.

20 As used herein the term 'amino acid' refers in its broadest sense to proteogenic L-amino acids, D-amino acids, chemically modified amino acids, N-methyl, C α -methyl and amino acid side-chain mimetics and unnatural amino acids such as naphthylalanine. Any naturally occurring amino acid or 25 mimetics of such natural occurring amino acids are preferred.

Some preferred embodiments of the compounds of formula I are illustrated by compounds I-IV below:

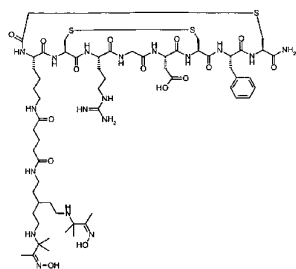
30

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

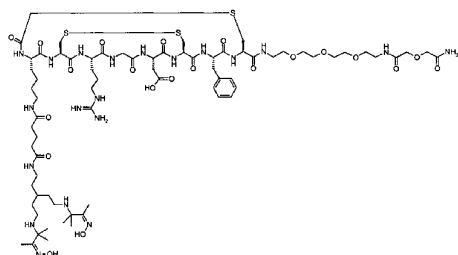
19

Compound I



5

Compound II



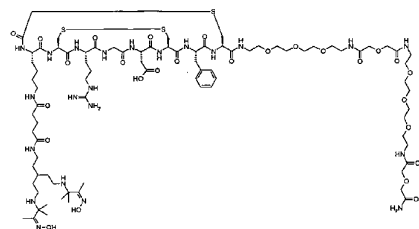
10

WO 03/006491

20

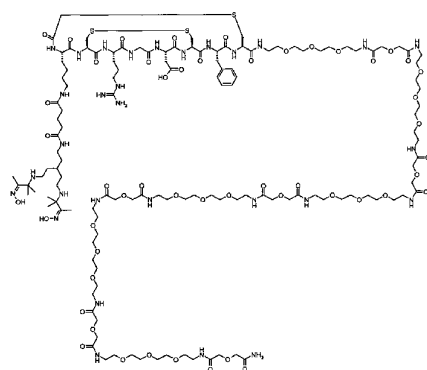
PCT/NO02/00250

Compound III



5

Compound IV



WO 03/006491

PCT/NO02/00250

21

In most cases, it is preferred that the amino acids in the peptide are all in the L-form. However, in some embodiments of the invention one, two, three or more of the amino acids in the peptide are preferably in the D-form. The inclusion
5 of such D-form amino acids can have a significant effect on the serum stability of the compound.

According to the present invention, any of the amino acid residues as defined in formula I may preferably represent a naturally occurring amino acid and independently in any of
10 the D or L conformations.

Some of the compounds of the invention are high affinity RGD based vectors. As used herein the term 'high affinity RGD based vector' refers to compounds that have a K_i of < 10 nM and preferably < 5 nM, in a competitive binding assay for $\alpha v \beta 3$ integrin and where the K_i value was determined by competition with the known high affinity ligand echistatin. Methods for carrying out such competition assays are well
15 known in the art.

20 The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising an effective amount (e.g. an amount effective for enhancing image contrast in in vivo imaging) of a compound of general formula I or a salt thereof, together
25 with one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, excipients or diluents.

The invention further provides a pharmaceutical composition for treatment of a disease comprising an effective amount of
30 a compound of general formula I, or an acid addition salt thereof, together with one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, excipients or diluents.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

22

Other representative spacer (W_1) elements include structural-type polysaccharides, storage-type polysaccharides, polyamino acids and methyl and ethyl esters thereof, and polypeptides, oligosaccharides and
5 oligonucleotides, which may or may not contain enzyme cleavage sites.

The reporter moieties (Z_1) in the contrast agents of the invention may be any moiety capable of detection either
10 directly or indirectly in an in vivo diagnostic imaging procedure. Preferably the contrast agent comprises one reporter. Preferred are moieties which emit or may be caused to emit detectable radiation (e.g. by radioactive decay).

15 For MR imaging the reporter will either be a non zero nuclear spin isotope (such as ^{19}F) or a material having unpaired electron spins and hence paramagnetic, superparamagnetic, ferrimagnetic or ferromagnetic properties; for light imaging the reporter will be a light
20 scatterer (e.g. a coloured or uncoloured particle), a light absorber or a light emitter; for magnetometric imaging the reporter will have detectable magnetic properties; for electrical impedance imaging the reporter will affect electrical impedance; and for scintigraphy, SPECT, PET, and
25 the like, the reporter will be a radionuclide.

Stated generally, the reporter may be (1) a chelatable metal or polyatomic metal-containing ion (i.e. TcO , etc), where the metal is a high atomic number metal (e.g. atomic number
30 greater than 37), a paramagnetic species (e.g. a transition metal or lanthanide), or a radioactive isotope, (2) a covalently bound non-metal species which is an unpaired electron site (e.g. an oxygen or carbon in a persistent free

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

23

radical), a high atomic number non-metal, or a radioisotope,
(3) a polyatomic cluster or crystal containing high atomic
number atoms, displaying cooperative magnetic behaviour
(e.g. superparamagnetism, ferrimagnetism or ferromagnetism)
5 or containing radionuclides.

Examples of particular preferred reporter groups (Z_1) are
described in more detail below.

10 Chelated metal reporters are preferably chosen from the
group below; ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{47}Sc , ^{67}Ga , ^{51}Cr , $^{177\text{m}}\text{Sn}$, ^{67}Cu ,
 ^{167}Tm , ^{97}Ru , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{199}Au , ^{203}Pb and ^{141}Ce .

The metal ions are desirably chelated by chelant groups on
15 the linker moiety. Further examples of suitable chelant
groups are disclosed in US-A-4647447, WO89/00557, US-A-
5367080, US-A-5364613.

Methods for metallating any chelating agents present are
20 within the level of skill in the art. Metals can be
incorporated into a chelant moiety by any one of three
general methods: direct incorporation, template synthesis
and/or transmetallation. Direct incorporation is preferred.

25 Thus it is desirable that the metal ion be easily complexed
to the chelating agent, for example, by merely exposing or
mixing an aqueous solution of the chelating agent-containing
moiety with a metal salt in an aqueous solution preferably
having a pH in the range of about 4 to about 11. The salt
30 can be any salt, but preferably the salt is a water soluble
salt of the metal such as a halogen salt, and more
preferably such salts are selected so as not to interfere
with the binding of the metal ion with the chelating agent.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

24

The chelating agent-containing moiety is preferably in aqueous solution at a pH of between about 5 and about 9, more preferably between pH about 6 to about 8. The chelating agent-containing moiety can be mixed with buffer salts such as citrate, carbonate, acetate, phosphate and borate to produce the optimum pH. Preferably, the buffer salts are selected so as not to interfere with the subsequent binding of the metal ion to the chelating agent.

10 The following isotopes or isotope pairs can be used for both imaging and therapy without having to change the radiolabeling methodology or chelator: $^{47}\text{Sc}_{21}$; $^{141}\text{Ce}_{58}$; $^{188}\text{Re}_{75}$; $^{177}\text{Lu}_{71}$; $^{199}\text{Au}_{79}$; $^{47}\text{Sc}_{21}$; $^{131}\text{I}_{53}$; $^{67}\text{Cu}_{29}$; $^{131}\text{I}_{53}$ and $^{123}\text{I}_{53}$; $^{188}\text{Re}_{75}$ and $^{99\text{m}}\text{Tc}_{43}$; $^{90}\text{Y}_{39}$ and $^{87}\text{Y}_{39}$; $^{47}\text{Sc}_{21}$ and $^{44}\text{Sc}_{21}$; $^{90}\text{Y}_{39}$ and $^{123}\text{I}_{53}$; $^{146}\text{Sm}_{62}$ and $^{153}\text{Sm}_{62}$; and $^{90}\text{Y}_{39}$ and $^{111}\text{In}_{49}$.

Preferred non-metal atomic reporters include radioisotopes such as ^{123}I , ^{131}I and ^{18}F as well as non zero nuclear spin atoms such as ^{19}F , and heavy atoms such as I.

20 In a further embodiment of this invention, the use of radioisotopes of iodine or fluorine is specifically contemplated. For example, if the peptide or linker is comprised of substituents that can be chemically substituted by iodine or fluorine in a covalent bond forming reaction, such as, for example, substituents containing hydroxyphenyl or p-nitrobenzoyl functionality, such substituents can be labeled by methods well known in the art with a radioisotope of iodine or fluorine respectively. These species can be used in therapeutic and diagnostic imaging applications. While, at the same time, a metal attached to a chelating agent on the same peptide-linker can also be used in either therapeutic or diagnostic imaging applications.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

25

A preferred embodiment of the invention relates to a radiolabelled agent of general formula (I), particularly for use in tumour imaging.

5

The diagnostic agents of the invention may be administered to patients for imaging in amounts sufficient to yield the desired contrast with the particular imaging technique.

Where the reporter is a metal, generally dosages of from 0.001 to 5.0 μ moles of chelated imaging metal ion per kilogram of patient bodyweight are effective to achieve adequate contrast enhancements. Where the reporter is a radionuclide, dosages of 0.01 to 100 mCi, preferably 0.1 to 50 mCi will normally be sufficient per 70kg bodyweight.

15

The dosage of the compounds of the invention for therapeutic use will depend upon the condition being treated, but in general will be of the order of from 1 μ mol/kg to 1 mmol/kg bodyweight.

20

The compounds according to the invention may therefore be formulated for administration using physiologically acceptable carriers or excipients in a manner fully within the skill of the art. For example, the compounds,

optionally with the addition of pharmaceutically acceptable excipients, may be suspended or dissolved in an aqueous medium, with the resulting solution or suspension then being sterilized.

30 The compounds of formula I may be therapeutically effective in the treatment of disease states as well as detectable in vivo imaging. Thus for example the vector on the reporter moiety may have therapeutic efficacy, e.g. by

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

26

virtue of the radiotherapeutic effect of a radionuclide reporter of the vector moiety.

- Use of the compounds of formula I in the manufacture of therapeutic compositions (medicament) and in methods of therapeutic or prophylactic treatment, preferably treatment of cancer, of the human or animal body are thus considered to represent further aspects of the invention.
- 10 Further examples of the reporters which may be used in the context of the current application are given on pages 63-66 and 70-86 of WO98/47541 and the disclosures made on these pages are incorporated herein by reference in their entirety. It is hereby asserted that each and every reporter or part thereof disclosed on the aforementioned pages is considered to be part of the description of the invention contained in this application.

- Viewed from a further aspect the invention provides the use of a compound of formula I for the manufacture of a contrast medium for use in a method of diagnosis involving administration of said contrast medium to a human or animal body and generation of an image of at least part of said body.

- 25 Viewed from a still further aspect the invention provides a method of generating an image of a human or animal body involving administering a contrast agent to said body, e.g. into the vascular system and generating an image of at least a part of said body to which said contrast agent has distributed using scintigraphy, PET or SPECT modalities, wherein as said contrast agent is used an agent of formula I.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

27

Viewed from a still further aspect the invention provides a method of generating enhanced images of a human or animal body previously administered with a contrast agent composition comprising a compound as defined by formula I, which method comprises generating an image of at least part of said body.

Viewed from a further aspect the invention provides a method of monitoring the effect of treatment of a human or animal body with a drug to combat a condition associated with cancer, preferably angiogenesis, e.g. a cytotoxic agent, said method involving administering to said body an agent of formula I and detecting the uptake of said agent by cell receptors, preferably endothelial cell receptors and in particular $\alpha v\beta 3$ receptors, said administration and detection optionally but preferably being effected repeatedly, e.g. before, during and after treatment with said drug.

The compounds of the present invention can be synthesised using all the known methods of chemical synthesis but particularly useful is the solid-phase methodology of Merrifield employing an automated peptide synthesiser (J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964)). The peptides and peptide chelates may be purified using high performance liquid chromatography (HPLC) and characterised by mass spectrometry and analytical HPLC before testing in the in vitro screen.

The present invention will now be further illustrated by way of the following non-limiting examples.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

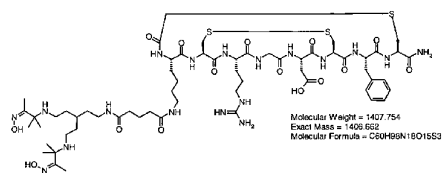
28

Examples:

Example 1:

Synthesis of disulfide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaryl)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂

5

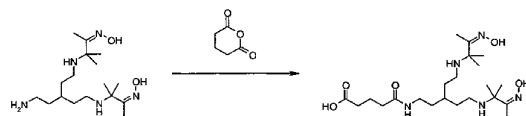


1 a) Synthesis of cPn216 chelate

10 For details of the synthesis of technetium chelate cPn216 the reader is referred to patent filing GB0116815.2

1 b) Synthesis of cPn216-glutaric acid intermediate

15



cPn216 (100 mg, 0.29 mmol) was dissolved in DMF (10 mL) and glutaric anhydride (33 mg, 0.29 mmol) added by portions with stirring. The reaction was stirred for 23 hours to afford complete conversion to the desired product. The pure acid was obtained following RP-HPLC in good yield.

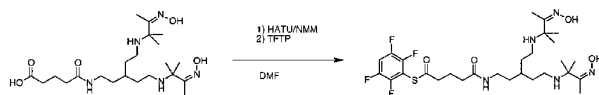
20

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

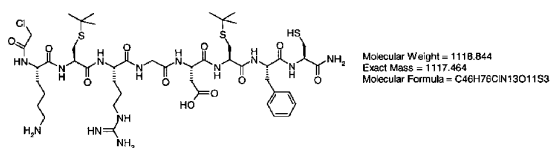
29

1 c) Synthesis of tetrafluorothiophenyl ester of cPn216-glutaric acid



- 5 To cPn216-glutaric acid (300 mg, 0.66 mmol) in DMF (2 mL) was added HATU (249 mg, 0.66 mmol) and NMM (132 μ L, 1.32 mmol). The mixture was stirred for 5 minutes then tetrafluorothiophenol (0.66 mmol, 119 mg) was added. The solution was stirred for 10 minutes then the reaction mixture
- 10 was diluted with 20 % acetonitrile/water (8 mL) and the product purified by RP-HPLC yielding 110 mg of the desired product following freeze-drying.

15 1 d) Synthesis of ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-NH₂



- 20 The peptide was synthesised on an ABI 433A automatic peptide synthesiser starting with Rink Amide AM resin on a 0.25 mmol scale using 1 mmol amino acid cartridges. The amino acids were pre-activated using HBTU before coupling. N-terminal amine groups were chloroacetylated using a solution of chloroacetic anhydride in DMF for 30 min.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

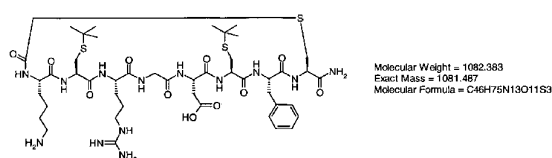
30

The simultaneous removal of peptide and side-chain protecting groups (except tBu) from the resin was carried out in TFA containing TIS (5 %), H₂O (5 %) and phenol (2.5 %) for two hours.

- 5 After work-up 295 mg of crude peptide was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 6.42 min). Further product
- 10 characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, M+H at 1118.5, found, at 1118.6).

1 e) Synthesis of thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-

- 15 Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-NH₂



295 mg of ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-NH₂ was dissolved in water/acetonitrile. The mixture was adjusted to pH 8 with ammonia solution and stirred for 16

- 20 hours.

After work-up 217 mg of crude peptide was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV

25 214 nm; product retention time, 6.18 min). Further product

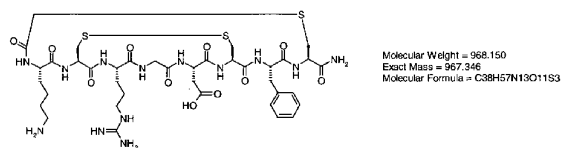
WO 03/006491

PCT/NO02/00250

31

characterisation was carried out using mass spectrometry:
Expected, M+H at 1882.5, found, at 1882.6).

- 1 f) Synthesis of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-
5 Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂



- 217 mg of thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-
10 Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-NH₂ was treated with a solution of
anisole (500 µL), DMSO (2 mL) and TFA (100 mL) for 60 min
following which the TFA was removed in vacuo and the peptide
precipitated by the addition of diethyl ether.

- Purification by preparative HPLC (Phenomenex Luna 10 µ
15 C18 (2) 250 x 50 mm column) of the crude material (202 mg)
was carried out using 0-30 % B, where A = H₂O/0.1 % TFA and B
= CH₃CN/0.1 % TFA, over 60 min at a flow rate of 50 mL/min.
After lyophilisation 112 mg of pure material was obtained
(Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A =
20 H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex
Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV
214 nm; product retention time, 5.50 min). Further product
characterisation was carried out using mass spectrometry:
Expected, M+H at 968, found, at 971).

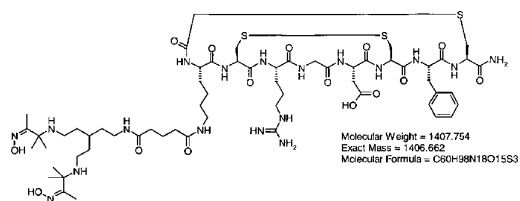
25

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

32

1 g) Synthesis of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaryl)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-NH₂



5 9.7 mg of disulphide[Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-NH₂, 9.1 mg of cPn216 chelate active ester and 6 µL of N-methylmorpholine was dissolved in DMF (0.5 mL). The mixture was stirred for 3 hours.

Purification by preparative HPLC (Phenomenex Luna 5 µ
10 C18 (2) 250 x 21.20 mm column) of the reaction mixture was carried out using 0-30 % B, where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA, over 40 min at a flow rate of 10 mL/min. After lyophilisation 5.7 mg of pure material was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 0-30 % B over 10 min where A =
15 H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 7.32 min). Further product characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, M+H at 1407.7, found, at 1407.6).

20

Example 2:

Synthesis of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaryl)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n = 1.

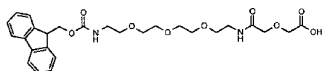
25

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

33

2 a) Synthesis of 17-(Fmoc-amino)-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoic acid



- 5 This building block is coupled to the solid-phase using Fmoc chemistry. The coupled form of this building block will be referred to in short as (PEG)_n where n is a positive integer.

1,11-Diazido-3,6,9-trioxaundecane

- 10 A solution of dry tetraethylene glycol (19.4 g, 0.100 mol) and methanesulphonyl chloride (25.2 g, 0.220 mol) in dry THF (100 ml) was kept under argon and cooled to 0 °C in an ice/water bath. To the flask was added a solution of
- 15 triethylamine (22.6 g, 0.220 mol) in dry THF (25 ml) dropwise over 45 min. After 1 hr the cooling bath was removed and stirring was continued for 4 hrs. Water (60 ml) was added. To the mixture was added sodium hydrogencarbonate (6 g, to pH 8) and sodium azide (14.3 g, 0.220 mmol), in that order. THF was
- 20 removed by distillation and the aqueous solution was refluxed for 24 h (two layers formed). The mixture was cooled and ether (100 ml) was added. The aqueous phase was saturated with sodium chloride. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with ether (4 x 50 ml). Combined
- 25 organic phases were washed with brine (2 x 50 ml) and dried (MgSO₄). Filtration and concentration gave 22.1 g (91%) of yellow oil. The product was used in the next step without further purification.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

34

11-Azido-3,6,9-trioxaundecanamine

To a mechanically, vigorously stirred suspension of 1,11-diazido-3,6,9-trioxaundecane (20.8 g, 0.085 mol) in 5% hydrochloric acid (200 ml) was added a solution of triphenylphosphine (19.9 g, 0.073 mol) in ether (150 ml) over 3 hrs at room temperature. The reaction mixture was stirred for additional 24 hrs. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 x 40 ml). The aqueous phase was cooled in an ice/water bath and pH was adjusted to ca 12 by addition of KOH. The product was extracted into dichloromethane (5 x 50 ml). Combined organic phases were dried (MgSO₄). Filtration and evaporation gave 14.0 g (88%) of yellow oil. Analysis by MALDI-TOF mass spectroscopy (matrix: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) gave a M+H peak at 219 as expected. Further characterisation using ¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR spectroscopy verified the structure.

17-Azido-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoic acid

To a solution of 11-azido-3,6,9-trioxaundecanamine (10.9 g, 50.0 mmol) in dichloromethane (100 ml) was added diglycolic anhydride (6.38 g, 55.0 mmol). The reaction mixture was stirred overnight. HPLC analysis (column Vydac 218TP54; solvents: A = water/0.1% TFA and B = acetonitrile/0.1% TFA; gradient 4-16% B over 20 min; flow 1.0 ml/min; UV detection at 214 and 284 nm), showed complete conversion of starting material to a product with retention time 18.3 min. The solution was concentrated to give quantitative yield of a yellow syrup. The product was analysed by LC-MS (ES ionisation) giving [MH]⁺ at 335 as expected. ¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR spectroscopy was in agreement with structure

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

35

The product was used in the next step without further purification.

17-Amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoic acid

5

A solution of 17-azido-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoic acid (8.36 g, 25.0 mmol) in water (100 ml) was reduced using H₂(g)-Pd/C (10%). The reaction was run until LC-MS analysis showed complete conversion of starting material (column Vydac 218TP54; solvents: A = water/0.1% TFA and B = acetonitrile/0.1% TFA; gradient 4-16% B over 20 min; flow 1.0 ml/min; UV detection at 214 and 284 nm, ES ionisation giving M+H at 335 for starting material and 309 for the product). The solution was filtered and used directly in the next step.

10

15

17-(Fmoc-amino)-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoic acid

To the aqueous solution of 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoic acid from above (corresponding to 25.0 mmol amino acid) was added sodium bicarbonate (5.04 g, 60.0 mmol) and dioxan (40 ml). A solution of Fmoc-chloride (7.11 g, 0.275 mol) in dioxan (40 ml) was added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight. Dioxan was evaporated off (rotavapor) and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate. The aqueous phase was acidified by addition of hydrochloric acid and precipitated material was extracted into chloroform. The organic phase was dried (MgSO₄), filtered and concentrated to give 11.3 g (85%) of a yellow syrup. The structure was confirmed by LC-MS analysis (column Vydac 218TP54; solvents: A = water/0.1% TFA and B = acetonitrile/0.1% TFA; gradient 40-60% B over 20 min; flow 1.0 ml/min; UV detection at 214 and 254 nm, ES ionisation

20

25

30

WO 03/006491

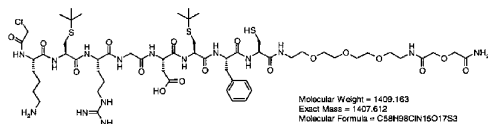
PCT/NO02/00250

36

giving M+H at 531 as expected for the product peak at 5,8 minutes). The analysis showed very low content of side products and the material was used without further purification.

5

2 b) Synthesis of ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂ where n= 1



10 The PEG unit was coupled manually to Rink Amide AM resin, starting on a 0.25 mmol scale, mediated by HATU activation. The remaining peptide was assembled on an ABI 433A automatic peptide synthesiser using 1 mmol amino acid cartridges. The amino acids were pre-activated using HBTU
15 before coupling. N-terminal amine groups were chloroacetylated using a solution of chloroacetic anhydride in DMF for 30 min.

The simultaneous removal of peptide and side-chain protecting groups (except tBu) from the resin was carried out
20 in TFA containing TIS (5 %), H₂O (5 %) and phenol (2.5 %) for two hours.

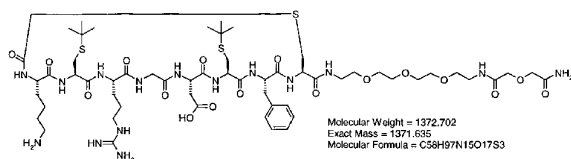
After work-up 322 mg of crude peptide was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex
25 Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 6.37 min). Further product characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, M+H at 1409, found, at 1415).

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

37

2 c) Synthesis of thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)n-NH₂ where n = 1

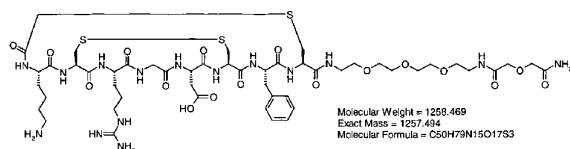


5

322 mg of ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)n-NH₂ was dissolved in water/acetonitrile. The mixture was adjusted to pH 8 with ammonia solution and stirred for 16 hours.

After work-up crude peptide was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 6.22 min). Further product characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, M+H at 1373, found, at 1378).

2 d) Synthesis of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)n-NH₂ where n = 1



20

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

38

Thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ was treated with a solution of anisole (200 μL), DMSO (2 mL) and TFA (100 mL) for 60 min following which the TFA was removed in vacuo and the peptide

5 precipitated by the addition of diethyl ether.

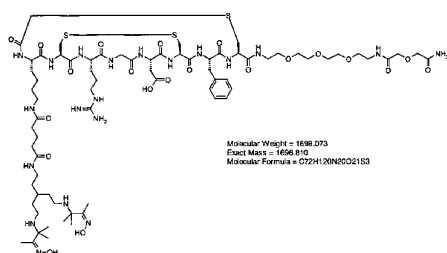
Purification by preparative HPLC (Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21.20 mm column) of 70 mg crude material was carried out using 0-30 % B, where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA, over 40 min at a flow rate of 10 mL/min.

10 After lyophilisation 46 mg of pure material was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 0-30 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 6.80 min). Further product

15 characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, M+H at 1258.5, found, at 1258.8).

2 e) Synthesis of disulfide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaryl)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂

20 where n = 1



13 mg of [Cys²⁻⁶] cyclo[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂, 9.6 mg of cPn216 chelate active ester

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

39

and 8 μ L of N-methylmorpholine was dissolved in DMF (0.5 mL).
The mixture was stirred for 2 hours and 30 minutes.

Purification by preparative HPLC (Phenomenex Luna 5 μ
C18 (2) 250 x 21.20 mm column) of the reaction mixture was
5 carried out using 0-30 % B, where A = H₂O/0.1 % TFA and B =
CH₃CN/0.1 % TFA, over 40 min at a flow rate of 10 mL/min.
After lyophilisation 14.2 mg of pure material was obtained
(Analytical HPLC: Gradient, 0-30 % B over 10 min where A =
H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex
10 Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV
214 nm; product retention time, 7.87 min). Further product
characterisation was carried out using mass spectrometry:
Expected, M+H at 1697.8, found, at 1697.9).

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

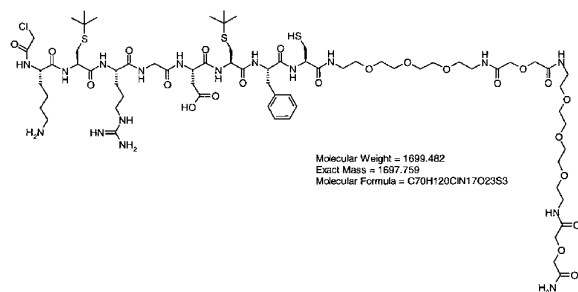
40

Example 3:

Synthesis of disulfide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaryl)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n = 2.

5

3 a) Synthesis of ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂ where n = 2



10 Assembly of peptide as for example 2 b), both PEG units coupled manually.

After work-up crude peptide was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2)

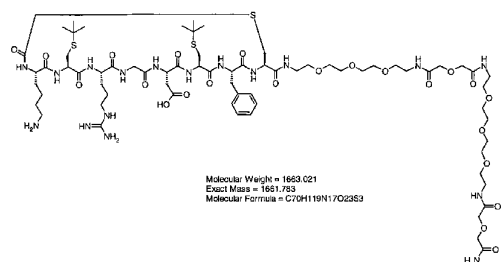
15 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 6.40 min).

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

41

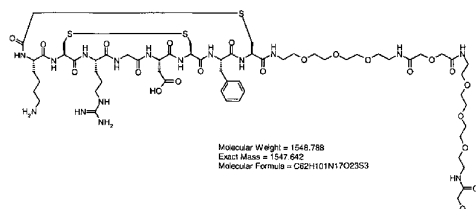
3 b) Synthesis of thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n=2



5 ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂ where n=2 was dissolved in water/acetonitrile. The mixture was adjusted to pH 8 with ammonia solution and stirred for 16 hours.

After work-up 380 mg of crude peptide was obtained
10 (Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 6.28 min). Further product characterisation was carried out using mass spectrometry:
15 Expected, M+H at 1663, found, at 1670).

3 c) Synthesis of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n= 2.



WO 03/006491

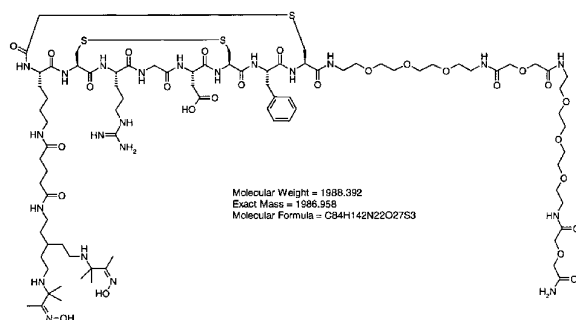
PCT/NO02/00250

42

380 mg of thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n=2 was treated with a solution of anisole (500 μ L), DMSO (2 mL) and TFA (100 mL) for 60 min following which the TFA was removed in vacuo and the peptide precipitated by the addition of diethyl ether.

Purification by preparative HPLC (Phenomenex Luna 10 μ C18 (2) 250 x 50 mm column) of the crude material (345 mg) was carried out using 0-30 % B, where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA, over 60 min at a flow rate of 50 mL/min. After lyophilisation 146 mg of pure material was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 0-30 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 7.42 min). Further product characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, M+H at 1548.6, found, at 1548.8).

3 d) Synthesis of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaryl)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n= 2.



WO 03/006491

PCT/NO02/00250

43

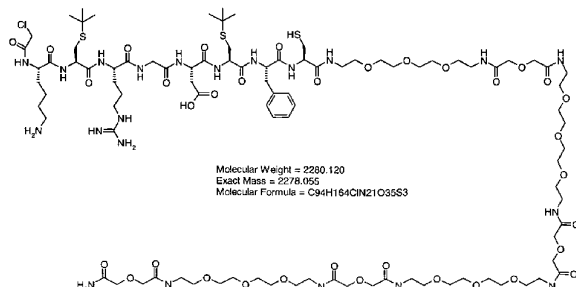
- 146 mg of [Cys²⁻⁶] cyclo[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)₂-NH₂, 110 mg of cPn216 chelate active ester and 76 µL of N-methylmorpholine was dissolved in DMF (6 mL).
 5 The mixture was stirred for 9 hours.

- Purification by preparative HPLC (Phenomenex Luna 10 µ C18 (2) 250 x 50 mm column) of the reaction mixture was carried out using 0-30 % B, where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA, over 60 min at a flow rate of 50 mL/min.
 10 After lyophilisation 164 mg of pure material was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 0-30 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 8.13 min). Further product
 15 characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, M+H at 1988.0, found, at 1988.0).

Example 4:Synthesis of disulfide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-

- 20 Lys(cPn216-glutaryl)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n= 4.

4 a) Synthesis of ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)_n-NH₂ where n= 4



WO 03/006491

PCT/NO02/00250

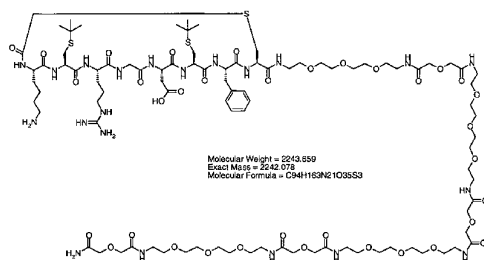
44

Assembly of peptide as for example 2 b), all four PEG units coupled manually.

After work-up crude peptide was obtained (Analytical

- 5 HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 6.50 min).

- 10 4 b) Synthesis of thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n = 4



- C1CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)₄-NH₂ was dissolved in water/acetonitrile. The mixture
15 was adjusted to pH 8 with ammonia solution and stirred for 16 hours.

After work-up crude peptide was obtained (Analytical

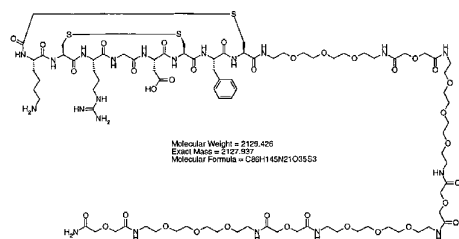
- HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2)
20 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 6.37 min). Further product characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, [(M+2H)/2] at 1122.0, found, at 1122.5).

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

45

4 c) Synthesis of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n = 4



5

Thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)₄-NH₂ was treated with a solution of anisole (100 μ L), DMSO (1 mL) and TFA (50 mL) for 60 min following which the TFA was removed in vacuo and the peptide

10 precipitated by the addition of diethyl ether.

Purification by preparative HPLC (Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21.20 mm column) of the crude material (345 mg) was carried out using 5-50 % B, where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA, over 40 min at a flow rate of 10 mL/min.

15 After lyophilisation 12 mg of pure material was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 4.87 min).

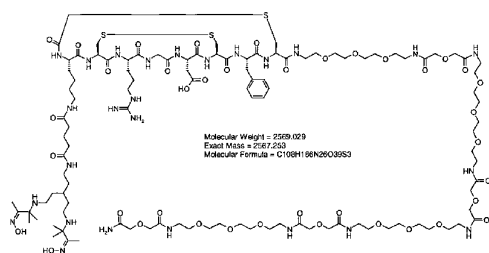
20

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

46

4 d) Synthesis of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys(cPn216-glutaryl)-Cys²-Arg-Gly-Asp-Cys⁶-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ where n= 4.



5

12 mg of disulphide [Cys²⁻⁶] thioether cyclo[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)₄-NH₂, 5.2 mg of cPn216 chelate active ester and 2 µL of N-methylmorpholine was dissolved in DMF (0.5 mL). The mixture was stirred for 7 hours.

10

Purification by preparative HPLC (Phenomenex Luna 5 µ C18 (2) 250 x 21.20 mm column) of the reaction mixture was carried out using 5-50 % B, where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA, over 40 min at a flow rate of 10 mL/min.

15

After lyophilisation 8 mg of pure material was obtained (Analytical HPLC: Gradient, 5-50 % B over 10 min where A = H₂O/0.1 % TFA and B = CH₃CN/0.1 % TFA; column, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4.6 mm; flow, 2 mL/min; detection, UV 214 nm; product retention time, 5.17 min). Further product

20

characterisation was carried out using mass spectrometry: Expected, [(M+2H)/2] at 1284.6, found, at 1284.9).

WO 03/006491

47

PCT/NO02/00250

SEQUENCE LISTING

<110> Amersham Health AS
5
<120> Peptide based compound

10 <130> NO 20014954

<150> NO20014954
15 <151> 2001-10-11

<160> 1

20 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
25 <211> 8
<212> PRT
30 <213> Artificial sequence

<220>
35 <223> Synthetic peptide
<220>

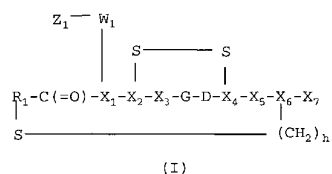
<221> DISULFID
40 <222> (2)..(5)
<223> Disulphide bridge between amino acid residue 2 and 5.

45 <220>

<221> THIOETH
50 <222> (1)..(8)
<223> Thioether bridge between amino acid residue 1 and 8.

55 <400> 1
Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

1. A compound of general formula (I)



G represents glycine
D represents aspartic acid

X₁ represents an amino acid residue wherein said amino possesses a functional side-chain such as an acid or e.

X₃ represents arginine, N-methylarginine or an arginine
tic,

X₆ represents a thiol-containing amino acid residue,

25 X₇ is absent or represents a biomodifier moiety

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

49

Z₁ represents an antineoplastic agent, a chelating agent or a reporter moiety and

W₁ is absent or represents a spacer moiety

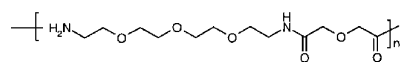
- 5 2. A compound as claimed in claim 1 wherein any of the amino acid residues are independently in the D or L conformation.
3. A compound as claimed in claim 1 wherein R₁ represents -
10 (CH₂)-.
4. A compound as claimed in any of claims 1 to 3 wherein X₁ represents aspartic acid, glutamic acid, lysine, homolysine or a diaminoalkylic acid or derivatives thereof.
- 15 5. A compound as claimed in any of the previous claims wherein X₂, X₄ and X₆ independently represent a cysteine or homocysteine residue.
- 20 6. A compound as claimed in any of the previous claims wherein X₃ represents an arginine residue.
7. Compound as claimed in any of the previous claims wherein X₅ represents a tyrosine, a phenylalanine, a 3-iodo-
25 tyrosine or a naphthylalanine residue.
8. A compound as claimed in any of the previous claims wherein X₇ is absent or comprises 1-10 units of a monodisperse PEG building block.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

50

9. A compound as claimed in any of the previous claims wherein X₇ is absent or comprises 1-10 units of Formula II



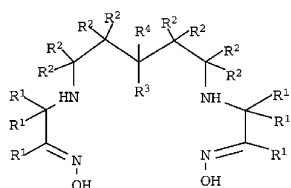
(II)

5

10. A compound as claimed in any of the previous claims wherein X₇ represent 1- 10 amino acid residues

10 11. A compound as claimed in any of the previous claims wherein X₇ represent glycine, lysine, aspartic acid or serine residues, preferably glycine.

12. A compound as claimed in any of the previous claims
15 where Z₁ is a chelating agent of Formula III



(III)

where:

each R¹, R², R³ and R⁴ is independently an R group;
each R group is independently H or C₁₋₁₀ alkyl, C₃₋₁₀ alkylaryl,
20 C₂₋₁₀ alkoxyalkyl, C₁₋₁₀ hydroxyalkyl, C₁₋₁₀ alkylamine, C₁₋₁₀
fluoroalkyl, or 2 or more R groups, together with the atoms

WO 03/006491

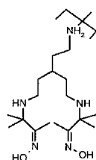
PCT/NO02/00250

51

to which they are attached form a carbocyclic, heterocyclic, saturated or unsaturated ring.

13. A compound as claimed in any of the previous claims

5 where Z₁ is



e

10 14. A compound as claimed in any of the previous claims wherein Z₁ comprises a reporter moiety.

15 15. A compound as claimed in claim 14 wherein the reporter moiety comprises metal radionuclides, paramagnetic metal

ions, fluorescent metal ions, heavy metal ions or cluster ions.

16. A compound as claimed in claims 14 and 15 wherein the reporter moiety comprises ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Ga, ⁵¹Cr,

20 ^{177m}Sn, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁷Tm, ⁹⁷Ru, ¹⁸⁸Re, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹⁹Au, ²⁰³Pb, ¹⁴¹Ce or ¹⁸F.

17. A compound as claimed in claims 1-16 wherein the reporter moiety is ^{99m}Tc.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

52

18. A compound as claimed in claims 1-11 where Z_1 is an antineoplastic agent.

19. A compound as claimed in claim 18 where Z_1 represent
 5 cyclophosphamide, chloroambucil, busulphan, methotrexate, cytarabine, fluorouracil, vinblastine, paclitaxel, doxorubicin, daunorubicin, etoposide, teniposide, cisplatin, amsacrine or docetaxel.

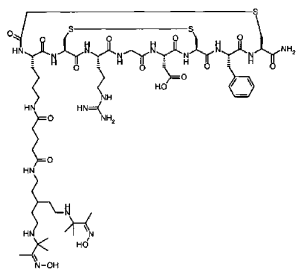
10

20. A compound as claimed in any of the previous claims where W_1 is glutaric or succinic acid

21. A compound as claimed in claim 1 defined by the
 15 following formulas

Compound I

20

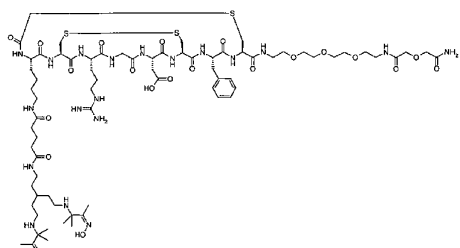


WO 03/006491

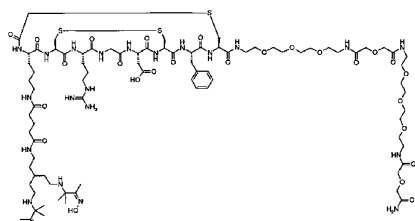
53

PCT/NO02/00250

Compound II



Compound III

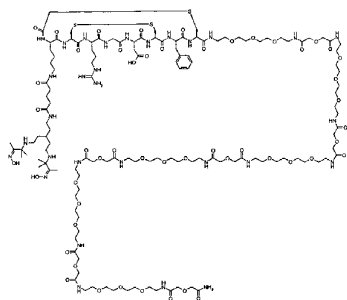


5 Compound IV

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

54



22. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of a compound of general Formula (I) or a salt thereof, together with one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, excipients or diluents for use in enhancing image contrast in in vivo imaging or for treatment of a disease.

23. Use of a compound as claimed in any one of claims 1 to 21 in the preparation of a contrast medium for use in a method of diagnosis involving administering said contrast medium to a human or animal body and generating an image of at least part of said body.

24. A method of generating images of a human or animal body involving administering a contrast agent to said body, and generating an image of at least a part of said body to which said contrast agent has distributed, characterised in that said contrast agent comprises a compound as claimed in any one of claims 1 to 21.

WO 03/006491

PCT/NO02/00250

55

25. A method of generating enhanced images of a human or animal body previously administered with a contrast agent composition comprising a compound as claimed in claim 1, which method comprises generating an image of at least part
5 of said body.

26. A method of monitoring the effect of treatment of a human or animal body with a drug to combat a condition associated with cancer, said method involving administering
10 to said body a compound or composition as claimed in any one of claims 1 to 22 and detecting the uptake of said compound or composition by cell receptors, said administration and detection optionally but preferably being effected repeatedly, e.g. before, during and after treatment with said
15 compound or composition.

27. A method of treating cancer or a related disease in a human or animal body which comprises the administration of an effective amount of a compound or composition as claimed in
20 any one of claims 1 to 22.

28. Use of a compound as claimed in any one of claims 1 to 12 for the manufacture of a medicament for the therapeutic or prophylactic treatment of cancer or a related disease in a
25 human or animal.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006491 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 47/48, 49/00, 51/08 (74) Common Representative: AMERSHAM HEALTH AS; P.O. Box 4220 Nydalen, Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO).
- (21) International Application Number: PCT/NO02/00250 (81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 8 July 2002 (08.07.2002) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 10 July 2001 (10.07.2001) GB 0116815.2 11 October 2001 (11.10.2001) NO 20014954
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMERSHAM HEALTH AS [NO/NO]; P.O. Box 4220 Nydalen, Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): CUTHBERTSON, Alan [GB/NO]; Amersham Health AS, P.O. Box 4220 Nydalen, Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO); INDREVOLL, Bård [NO/NO]; Amersham Health AS, P.O. Box 4220 Nydalen, Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO); SOLBAKKEN, Magne [NO/NO]; Amersham Health AS, P.O. Box 4220 Nydalen, Nycoveien 1-2, N-0401 Oslo (NO); ARCHER, Colin, Mill [GB/GB]; Amersham Health plc, The Grove Centre, White Lion Road, Amersham, Buckinghamshire HP7 9LL (GB); WADSWORTH, Harry, John [GB/GB]; Amersham Health plc, The Grove Centre, White Lion Road, Amersham, Buckinghamshire HP7 9LL (GB); ENGELL, Torggrim [NO/NO]; Amersham Health AS, Nycoveien 2, Postboks 4220, Nydalen, N-0401 Oslo (NO).
- Published: with international search report — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 24 December 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/006491 A3

(54) Title: PEPTIDE-BASED COMPOUNDS FOR TARGETING INTERGALIN RECEPTORS

(57) Abstract: The invention relates to new peptide-based compounds for use as diagnostic imaging agents or as therapeutic agents wherein the agents comprise targeting vectors which bind to integrin receptors.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/ru 02/00250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48 A61K49/00 A61K51/08		
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) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01 77145 A (INDREVOLL BAARD ; CUTHBERTSON ALAN (NO); NYCOMED IMAGING AS (NO)) 18 October 2001 (2001-10-18) examples claims -/-	1-17, 20-26
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 document 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 ** Inter 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 October 2003		Date of mailing of the international search report 10/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 spo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Dullaart, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/JP 02/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	RAJOPADHYE M ET AL: "Synthesis, evaluation and Tc-99m complexation of a hydrazinonicotinyl conjugate of a gp IIB/IIIA antagonist cyclic peptide for the detection of deep vein thrombosis" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 7, no. 8, 22 April 1997 (1997-04-22), pages 955-960, XP004136163 ISSN: 0960-894X abstract figures tables 1,2	1-17, 20-26
X	RAJOPADHYE M ET AL: "Synthesis and technetium-99m labeling of cyclic GP IIB/IIIA receptor antagonists conjugated to 4,5-bis(mercaptoacetamido)-pentanoic acid (MAPT)" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 6, no. 15, 6 August 1996 (1996-08-06), pages 1737-1740, XP004135593 ISSN: 0960-894X abstract figures page 1739	1-17, 20-26
X	US 5 888 474 A (LISTER-JAMES JOHN ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) examples claims	1-17, 20-26
X	PEARSON D A ET AL: "THROMBUS IMAGING USING TECHNETIUM-99M-LABELED HIGH-POTENCY GPIIB/IIIA RECEPTOR ANTAGONISTS. CHEMISTRY AND INITIAL BIOLOGICAL STUDIES" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 39, no. 7, 1996, pages 1372-1382, XP002061485 ISSN: 0022-2623 schemes 1-5 figure 1 tables 1,2	1-17, 20-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT, ... 02/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARRIS T D ET AL: "Tc-99m-labeled fibrinogen receptor antagonists: design and synthesis of cyclic RGD peptides for the detection of thrombi" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 6, no. 15, 6 August 1996 (1996-08-06), pages 1741-1746, XP004135594 ISSN: 0960-894X abstract figures page 1744, last paragraph - page 1745	1-17, 20-26
X	LIU SHUANG ET AL: "99mTc-labeling of a hydrazinonicotinamide-conjugated vitronectin receptor antagonist useful for imaging tumors" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 12, no. 4, 6 July 2001 (2001-07-06), pages 624-629, XP002259284 & ISSN: 1043-1802 abstract figures tables page 628, left-hand column	1-17, 20-26
X	SIVOLAPENKO G B ET AL: "Imaging of metastatic melanoma utilising a technetium-99m labelled RGD-containing synthetic peptide" EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE 1998 GERMANY, vol. 25, no. 10, 1998, pages 1383-1389, XP002259285 ISSN: 0340-6997 abstract page 1385, left-hand column, paragraph RESULTS - page 1387, left-hand column	1-17, 20-26
Y	WO 93 12819 A (RHOMED INC) 8 July 1993 (1993-07-08) examples ----- -/--	1-17, 20-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/JP 02/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UEHARA T ET AL: "The integrity of the disulfide bond in a cyclic somatostatin analog during ^{99m} Tc complexation reactions - Preparation and preliminary evaluation" NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NEW YORK, NY, US, vol. 26, no. 8, November 1999 (1999-11), pages 883-890, XP004185286 ISSN: 0969-8051 abstract figures 1,2 page 887, paragraph DISCUSSION - page 889	1-17, 20-26
Y	HALLAHAN D E ET AL: "Targeting drug delivery to radiation-induced neoantigens in tumor microvasculature" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 74, no. 1-3, 6 July 2001 (2001-07-06), pages 183-191, XP004297523 ISSN: 0168-3659 abstract page 188, paragraph 3.3 page 188, paragraph DISCUSSION - page 190	1-28
Y	MERRIFIELD R B: "SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS. I. THE SYNTHESIS OF A TETRAPEPTIDE" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 85, 20 July 1963 (1963-07-20), pages 2149-2154, XP000994867 ISSN: 0002-7863 cited in the application the whole document	1-28
P,X	WO 02 20610 A (SRINIVASAN ANANTHACHARI ; ERION JACK L (US); MALLINCKRODT INC (US); SC) 14 March 2002 (2002-03-14) page 5, line 4 - page 6, line 15 examples claims 4,9,14,22	1-11, 18-20, 22,27,28
Y	WO 99 51638 A (FOK KAM F ; SEARLE & CO (US); TJOENG FOE S (US)) 14 October 1999 (1999-10-14) example 4	1-11, 18-20, 22,27,28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/NO 02/00250
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 24-26 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, and claim 27 to a method of treatment of the human/animal body, a search has been carried out, based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☒ Claims Nos.: 1-17, 20 and 22-26 in part, 18-19 and 27-28 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/NO 02/00250

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-17, 20 and 22-26 in part, 18-19 and 27-28

Present claims 1-20 and 22-28 relate to an extremely large number of possible compounds, as well as to methods using these compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. With regard to the compounds for which Z1 is an antineoplastic agent, as defined in claims 18-19, no support other than their mere mentioning could be found in the present application. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds prepared in the examples and to those compounds specifically claimed.

In this respect it is pointed out, that the second subject of the objection for lack of unity of invention has not been searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No
PCT/JP 02/00250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0177145	A	18-10-2001	
		AU 5068301 A	23-10-2001
		CA 2405469 A1	18-10-2001
		CN 1436195 T	13-08-2003
		EP 1272507 A2	08-01-2003
		WO 0177145 A2	18-10-2001
US 5888474	A	30-03-1999	
		US 5849260 A	15-12-1998
		US 5811394 A	22-09-1998
		US 5443815 A	22-08-1995
		US 5879658 A	09-03-1999
		US 5968476 A	19-10-1999
		US 5736122 A	07-04-1998
		US 6019958 A	01-02-2000
		AT 213168 T	15-02-2002
		AU 3276093 A	28-06-1993
		AU 721198 B2	29-06-2000
		AU 3415197 A	06-11-1997
		CA 2124458 A1	10-06-1993
		DE 69232418 D1	21-03-2002
		DE 69232418 T2	31-10-2002
		DK 614379 T3	13-05-2002
		EP 0614379 A1	14-09-1994
		ES 2172513 T3	01-10-2002
		JP 7506086 T	06-07-1995
		US 5965108 A	12-10-1999
		US 5981477 A	09-11-1999
		US 5972308 A	26-10-1999
		US 5985241 A	16-11-1999
		WO 9310747 A2	10-06-1993
		US 6017509 A	25-01-2000
		US 5993775 A	30-11-1999
		US 5783170 A	21-07-1998
		US 5866097 A	02-02-1999
		US 5849261 A	15-12-1998
		US 6183722 B1	06-02-2001
		US 5807537 A	15-09-1998
		US 5814297 A	29-09-1998
		AT 196094 T	15-09-2000
		AU 677208 B2	17-04-1997
		AU 4384593 A	13-12-1993
		CA 2136330 A1	25-11-1993
		DE 69329382 D1	12-10-2000
		DE 69329382 T2	15-03-2001
		DK 641222 T3	11-12-2000
		EP 0641222 A1	08-03-1995
		EP 1004322 A2	31-05-2000
		ES 2150945 T3	16-12-2000
		JP 3380738 B2	24-02-2003
		JP 10291939 A	04-11-1998
		JP 2941057 B2	25-08-1999
		JP 7508289 T	14-09-1995
		WO 9323085 A1	25-11-1993
		US 6083481 A	04-07-2000
		US 5925331 A	20-07-1999
		US 6074627 A	13-06-2000
		US 6248304 B1	19-06-2001
WO 9312819	A	08-07-1993	
		US 5346687 A	13-09-1994

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/ 02/00250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9312819 A		US 5460785 A	24-10-1995
		US 5443816 A	22-08-1995
		US 5738838 A	14-04-1998
		US 5556609 A	17-09-1996
		AT 197767 T	15-12-2000
		AU 683833 B2	27-11-1997
		AU 3427293 A	28-07-1993
		CA 2127284 C	05-02-2002
		DE 69231586 D1	04-01-2001
		DE 69231586 T2	19-07-2001
		DK 629133 T3	02-04-2001
		EP 0629133 A1	21-12-1994
		ES 2155447 T3	16-05-2001
		WO 9312819 A1	08-07-1993
		US 5861139 A	19-01-1999
		US 5700444 A	23-12-1997
		US 5759515 A	02-06-1998
		US 5759516 A	02-06-1998
		US 5690905 A	25-11-1997
		US 5718882 A	17-02-1998
		US 5567408 A	22-10-1996
		US 5670133 A	23-09-1997
		US 5985240 A	16-11-1999
WO 0220610 A	14-03-2002	AU 8884701 A	22-03-2002
		WO 0220610 A2	14-03-2002
WO 9951638 A	14-10-1999	AU 3545399 A	25-10-1999
		CA 2325342 A1	14-10-1999
		EP 1070085 A1	24-01-2001
		JP 2002510709 T	09-04-2002
		WO 9951638 A1	14-10-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/02	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 9/08	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 35/04	
	A 6 1 K 49/02	A
	A 6 1 K 43/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘
- (74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎
- (72)発明者 クスバートソン、アラン
ノルウェー国、エヌー０４０１ オスロ、ニコバイエン １－２、ピー・オー・ボックス ４２２
０ ニイダレン、アメルシャム・ヘルス・アクスイエ・セルスカブ内
- (72)発明者 インドレボル、バード
ノルウェー国、エヌー０４０１ オスロ、ニコバイエン １－２、ピー・オー・ボックス ４２２
０ ニイダレン、アメルシャム・ヘルス・アクスイエ・セルスカブ内
- (72)発明者 ソルバッケン、マグネ
ノルウェー国、エヌー０４０１ オスロ、ニコバイエン １－２、ピー・オー・ボックス ４２２
０ ニイダレン、アメルシャム・ヘルス・アクスイエ・セルスカブ内
- (72)発明者 アーチャー、コリン・ミル
イギリス国、エイチピー７・９エルエル、バッキンガムシャー、アメルシャム、ホワイト・ライオ
ン・ロード、ザ・グローブ・センター、アメルシャム・ヘルス・ピーエルシー内
- (72)発明者 エンゲル、トルグリム
ノルウェー国、エヌー０４０１ オスロ、ニイダレン、ポストボックス ４２２０、ニコバイエン
２、アメルシャム・ヘルス・アクスイエ・セルスカブ内
- (72)発明者 ワッズワース、ハリー・ジョン
イギリス国、エイチピー７・９エルエル、バッキンガムシャー、アメルシャム、ホワイト・ライオ
ン・ロード、ザ・グローブ・センター、アメルシャム・ヘルス・ピーエルシー内

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA22 CC27 CC41 EE59 FF31 FF34 FF66
4C084 AA02 AA07 AA12 BA32 BA33 BA34 BA41 MA05 MA17 MA23
NA12 NA13 ZA332 ZA362 ZA392 ZA402 ZA452 ZA672 ZA682 ZA812
ZA962 ZB112 ZB152 ZB262
4C085 HH03 HH05 HH07 JJ02 JJ03 KA09 KA28 KA29 KA30 KB07
KB09 KB10 KB11 KB18 KB20 KB82 LL01 LL07 LL18
4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 EA20 EA50 FA10