

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3655312号

(P3655312)

(45) 発行日 平成17年6月2日(2005.6.2)

(24) 登録日 平成17年3月11日(2005.3.11)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C O 7 K 14/575

C O 7 K 14/575 Z N A

A 6 1 K 51/00

C O 7 K 7/06

C O 7 K 7/08

C O 7 K 7/08

C O 7 K 7/08

A 6 1 K 49/02 A

請求項の数 4 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願平8-504572	(73) 特許権者	インスティテュート フュー ディアグノ スティックフォルシュング ゲセルシャフ ト ミット ベシュレンクター ハフトウ ング
(86) (22) 出願日	平成7年6月21日(1995.6.21)		ドイツ連邦共和国 デー・14050 ベ ルリン スパンダウエル ダム 130
(65) 公表番号	特表平10-506611		アン デュア フライエン ウニベルジテ ート ベルリン
(43) 公表日	平成10年6月30日(1998.6.30)		
(86) 国際出願番号	PCT/DE1995/000837		
(87) 国際公開番号	W01996/002568		
(87) 国際公開日	平成8年2月1日(1996.2.1)	(74) 代理人	
審査請求日	平成14年6月21日(2002.6.21)	弁理士 石田 敬	
(31) 優先権主張番号	P4425778.3	(74) 代理人	
(32) 優先日	平成6年7月13日(1994.7.13)	弁理士 鶴田 準一	
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)	(74) 代理人	
		弁理士 福本 積	
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管疾患の診断のための錯化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の化合物：

Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体、

Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯
体、Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m
-錯体、N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-Phe-(D-Tr
p)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体、N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-(D-Trp)-
Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体、N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-His-Leu-Asp
-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体、N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile
-TrpのTc-99m-錯体、またはN-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp
のTc-99m-錯体。

【請求項2】

下記の化合物：

10

20

Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのRe-錯体、
 Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのRe-錯体、
 Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのRe-錯体、
 N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのRe-錯体、
 N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのRe-錯体、
 N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのRe-錯体、
 N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのRe-錯体、または
 N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのRe-錯体。

【請求項3】

下記の化合物：

Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp、
 Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp、
 Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp、
 N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp、
 N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp、
 N-(4-カルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp、
 N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp、または
 N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか1つの化合物、および、所望により、適切な補助剤または賦形剤を含むことを特徴とする診断薬。

【発明の詳細な説明】

本発明は、血管疾患診断のための新規錯化合物、その製造方法、およびこれらの化合物を含む診断薬に関する。

動脈硬化症は、血管の慢性、進行性疾患であり、この疾患は、以前は、進行した段階においてのみ臨床的に診断できるに過ぎなかった。動脈硬化症によって生じる血管の変化は、今日、従来からの動脈造影法によって測定される。この方法において、コントラスト剤がカテーテルを介して目的の血管に投与され、血管の領域の狭窄がX線によって検出される。この方法の欠陥は、血管系の部分的な領域のみしか観察できないことである。動脈造影法は侵襲性的な方法であるため、その適用時に、例えば、痛み、動脈の穿孔、不整脈、心臓発作のような合併症を引き起こす可能性があり、不幸な条件下において、患者が死に至ることもあり得る。

さらに、超音波の適用に基づく方法、およびMR断層撮影法もまた動脈硬化症の診断に使用される。

現在使用されている方法は全て、動脈硬化した血管の変化が、血流の収縮または動脈壁の有意な変化を観察することによって検出されたので、アテローム発生の進行段階でしか検出されないという点において、大きな欠点を有している。

動脈硬化症の初期検出は、治療食、カルシウム拮抗薬、脂質—および高血圧降下剤の治療効果の制御、血管形成後の再発狭窄症の抑制、冠状動脈心疾患の診断、および血栓症の血

10

20

30

40

50

管沈着物の検出にとって非常に重要である。

動脈硬化症診断のための非侵襲性の方法が開示されている。動脈硬化壁領域に結合する放射性標識抗体または同様の標識低密度リポタンパク質 (LDL) が導かれる (Leesら、1993, J.Nucl.Med.24,154-156;Kalimanら、1985,Circulation,72,300;Virgoliniら、1991,Eur. J.Nucl.Med.,18,944-947)。しかし、これらの方法には決定的な欠点があり、例えば、生体に対する抗体の抗原効果、および患者の血液からのLDLの分離、精製および標識付けに長期間 (数日間) 要することである。これらの大分子はまた血液中で長い半減期を示し、これは全身への高バックグラウンド放射線と共に、動脈硬化傷害の位置測定を不可能ではないにしても困難にする。

Shihら (1990,Proc.Natl.Acad.Sci.,87,1436-1440) は、LDLタンパク質部分の部分配列を合成したが (apo-B-100)、これは動脈硬化プラークになお結合していても、血液中において全体的に短い半減期および高いシグナルノイズ比を示す。プラークへの低い親和性および/またはプラーク中のapo-B-ペプチドのための結合部位の低密度によって、動脈硬化症のいんぴぼの診断を十分に確立することができなかった。

本発明の目的は、特に、早期であるがまだ狭窄症ではない血管疾患の診断のための非侵襲性の診断法に適した新規化合物および薬品を提供することである。

エンドテリンは生理学的に活性なペプチドであり、生体においてホルモン機能および神経調整機能を果たす (MacCumberら、1989,Proc.Natl.Acad.Sci.,7285-7289;Yanagisawaら、1989,Trends Pharmacol.Sci.,10,374-378;LeMonier die Gouvilleら、1989,Life Sci.,45,1499-1513;Yanagisawaら、1988,Nature,332,411-415)。現在までに4種のイソタイプがヒトにおいて確認されている (Inoueら、1989,Proc.Natl.Acad.Sci.,86,2863-2867)。エンドテリン1は、21個のアミノ酸の下記配列を有するポリペプチドである：

Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp

(Yanagisawaら、1988,Nature,332,411-415)

血管エンドテリウムから、エンドテリンの不活性前駆体ビッグエンドテリン (the Big Endotheline) が形成される。ヘプタデカペプチドがエンドテリン変換酵素 (Endothelin-Converting-Enzyme) (ECE) を介して分解した後、エンドテリンが発生し、このエンドテリンは平滑血管筋肉組織の特定の受容体に結合する。これが平滑筋細胞のCa++の促進収縮に導く (Yanagisawaら、Nature,332,411-415;Takuwaら、1991,Contrib.Nephrol.,90,99-104)。

アテローム発生から生じる初期の不可逆的変化の1つは、とりわけ、生長因子 (例えば、PDGF) によって引き起こされる血管壁の平滑筋細胞の増殖である (DesmouliereおよびGabiani,1992,Cerebrovasc.Dis.,2,63-71)。ヒトアテローム症冠動脈の¹²⁵I-エンドテリン1でのインビトロインキュベーションによって、ツニカメディア (Tunica media) およびバサバソラ領域 (Vasa Vasora region) における¹²⁵I-エンドテリン1の結合の増加が現れることが示された (Dashwoodら、1991,J.Cardiovasc.Pharmacol.,17,458-462)。腹部大動脈をバルーンカテーテルによって既に脱エンドテリン化したウサギに、¹²⁵I-エンドテリン1を適用することによって、大動脈の脱エンドテリン化領域における¹²⁵I-エンドテリン1の取込みが増加することが示され、このことは損傷のある血管領域におけるエンドテリン1のための結合部位の高い密度を示している (Kurataら、1992,J.Nucl.Med.,33,845)。この調査から、増殖した平滑筋細胞もまたさらにエンドテリン受容体を発現させると結論付けることができる。

エンドテリン1は、平滑血管筋肉組織に対して強い血管収縮効果を有する (A.M.Doherty, 1992,Medical Chemistry,35,1493-1508)。従って、比較的低濃度のみを生体の静脈内に適用することができる。エンドテリン受容体に結合するが、平滑筋細胞のそのように著しい収縮には導かないエンドテリンの部分配列、エンドテリン誘導體、エンドテリン類似体またはエンドテリン拮抗薬の場合にのみ、高濃度を適用することができる。

エンドテリンは腎臓から非常に速く除去されるので、他の器官または組織によるエンドテリンの取込みによって生じるディスタービングバックグラウンド放射線が非常に少ない。

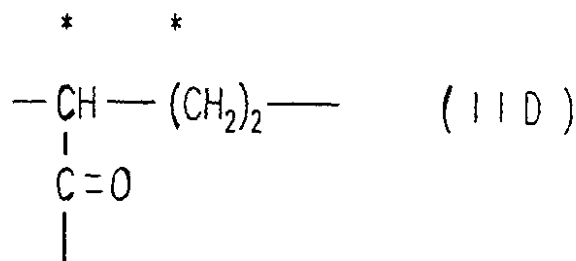
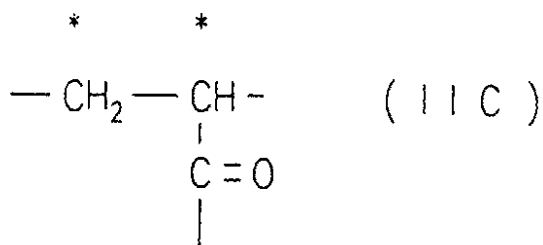
10

20

30

40

50



式中：

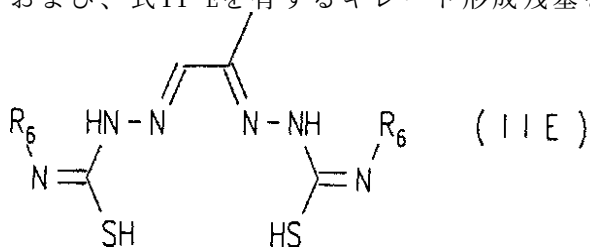
*の印の付いた炭素原子は、式II Bのイミノ基に結合している

n'は、整数1または2を表し、

iは、2～6のいずれかの数字を表し、

TTは、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン、グリシン、セリン、チロシン、トレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、シトルリン、ホモシステイン、ホモセリン、4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリジン、オルニチン、サルコシンまたはタウリンのようなα-アミノ酸、および／または、それらの同族体β-アミノ酸の残基を表し、これらは通常の方法でアミド基を介して結合している、

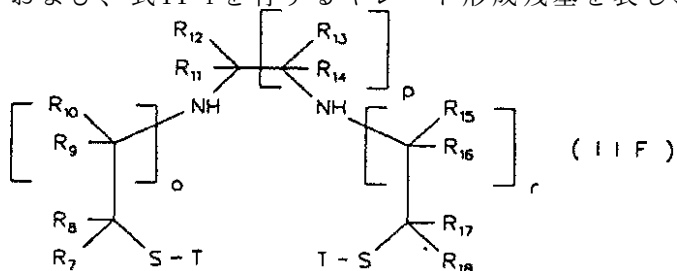
および、式II Eを有するキレート形成残基を表し、



式中：

R₆は、水素または炭素数1～6のアルキル基を表す

および、式II Fを有するキレート形成残基を表し、

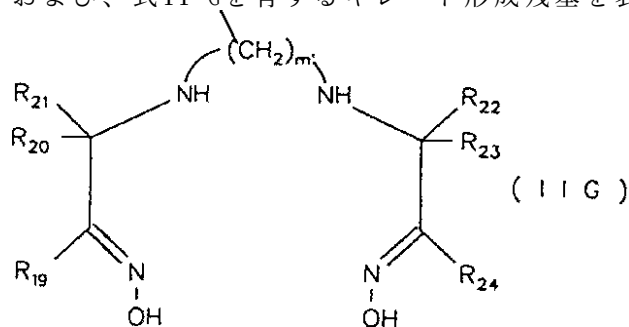


式中：

残基R₇～R₁₈は各々独立して、水素原子、炭素数1～6のアルキル鎖および／またはLとの結合を表し、o、pおよびrは各々整数1または2を表し、

Tは前記と同意義である

および、式II Gを有するキレート形成残基を表し、



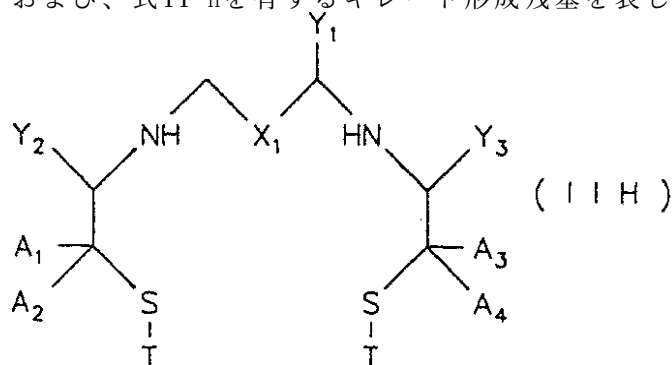
10

式中：

$R_{19} \sim R_{24}$ は、同じであるかまたは異なっており、互いに独立して、水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表し、

m' は、整数2または3を表す

および、式II Hを有するキレート形成残基を表し、



20

式中：

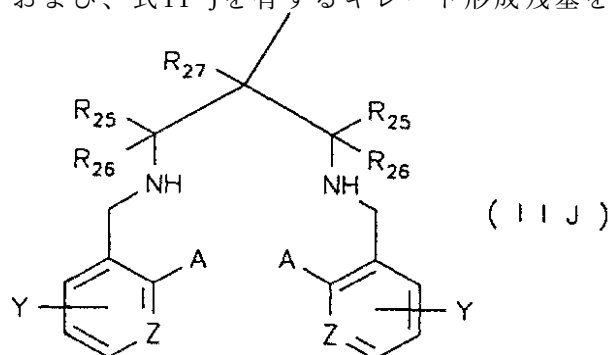
X_1 は、結合、メチレン基または CHY_4 基を表し、

基 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 または Y_4 のうちの1つがLとの結合を表し、残りの基は水素、または選択的に酸素原子を表し、

Tは前記と同意義であり、

A_1 、 A_2 、 A_3 および A_4 は同じであっても異なってもよく、互いに独立して、水素または炭素数1～6のアルキル基を表す

および、式II Jを有するキレート形成残基を表し、



40

式中：

R_{27} は、水素原子、または任意に1つまたは2つのヒドロキシル基で置換された炭素数1～6のアルキル基を表し、

R_{25} および R_{26} は、各々水素原子または共に酸素原子を表し、

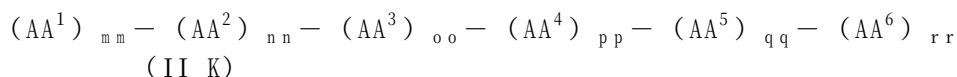
Aは、ヒドロキシルまたはメルカプト基を表し、

Yは、水素原子、カルボキシまたはスルホニル基を表し、

Zは、炭素原子または窒素原子を表す

および、式II Kを有するキレート形成残基を表し、

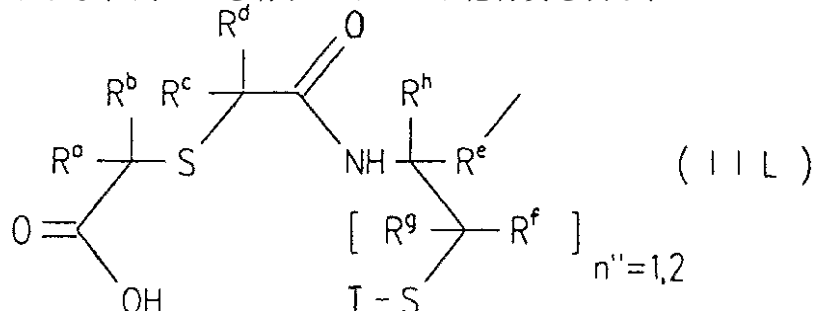
50



式中：

mm、nn、oo、pp、qqおよびrrは、互いに独立して、整数0、1または2を表し、
AA¹～AA⁶は、互いに独立して、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、
トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン、グリシン、セリン、チロシン、トレオ
ニンまたはシステイン（選択的に、硫黄原子部位の水素原子の代わりに前記と同意義のT
基を有する）、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ア
ルギニン、ヒスチジン、シトルリン、ホモシステイン、ホモセリン、4-ヒドロキシプロ
リン、5-ヒドロキシリジン、オルニチン、サルコシンまたはタウリンのようなα-アミ
ノ酸、および／または、それらの同族体β-アミノ酸の残基を表し、これらは通常の方法
でアミド基を介して結合し、それによって任意に各2つの利用可能なシステイン残基が互
いに結合して1つのシスチン残基を形成する

および、式II Lを有するキレート化合物を表し、



式中：

R^a、R^b、R^c、R^d、R^eおよびR^hは、同じであっても異なってもよく、各々水素原子
、および／または、分枝鎖または非分枝鎖の炭素数1～6のアルキル残基を表し、
R^eは、カルボキシ基または非分枝鎖、分枝鎖、環式または多環式の炭素数1～60のアルキ
ル、アルケニル、ポリアルケニル、アルキニル、ポリアルキニル、アリール
、アルキルアリールまたはアリールアルキル基を表し、これは、炭素数20以下であり、
および／またはO、N、S、P、As、Seからの1つまたはそれ以上のヘテロ原子を介して
選択的に中断および／または置換されているヒドロキシー、オキシー、オキソ、カルボ
キシ、アミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノ、アルデヒドまたは
アルコキシ基で選択的に置換されている、

Tは、前記と同意義である；

Lは、結合または水素原子または非分枝鎖、または分枝鎖、環式または多環式の炭素数1
～60のアルキル、アルケニル、ポリアルケニル、アルキニル、ポリアルケニル
、アリール、アルキルアリール、またはアリールアルキル基を表し、これは、炭素原子
最大20個までを有し、および／またはO、N、S、P、As、Seからの1つまたはそれ以上
のヘテロ原子を介して選択的に中断および／または置換されているヒドロキシー、メルカ
プト、アルキルメルカプト、オキソ、オキシー、カルボキシ、アミノカルボニル
、アルコキシカルボニル、アミノ、アルデヒドまたはアルコキシ基1つまたはそれ
れ以上で任意に置換されている、

または、Z₁-R-Z₂残基を表し、

式中：

Rは、直鎖、分枝鎖、飽和または不飽和の炭素数1～20のアルキル基を表し、これは、1
つまたはそれ以上の酸素および／または硫黄原子および／またはカルボニル、NHC(=O)-
、-N(炭素数1～6のアルキル)C(=O)-、-NH-および-N(炭素数1～6のアルキル)基
を介して選択的に中断され、およびヒドロキシーおよび／またはエポキシ基で選択的に置
換されている、

Z₁およびZ₂は、互いに独立して、各々、-O-、-S-、-(C=O)O-、-NH(C=S)NH-、
-(C=O)-、または-NH(C=S)-基である

10

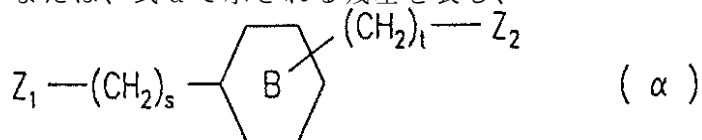
20

30

40

50

または、式 α で示される残基を表し、



式中：

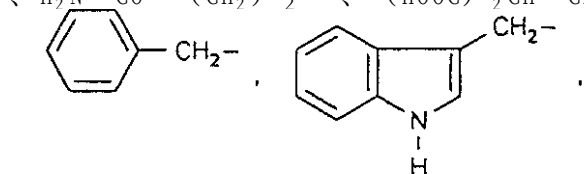
s および t は、互いに独立して、整数 0、1、2 または 3 を表し、環 B は、フェニルまたはシクロヘキシル基を表し、 Z_1 および Z_2 は前記と同意義である；

$A^1 \sim A^{11}$ は、互いに独立して、 $L-\alpha$ または $D-\alpha$ アミノ酸残基、 $-\text{NH}-\text{CH}(Z)-\text{CO}-$ 残基を表し、

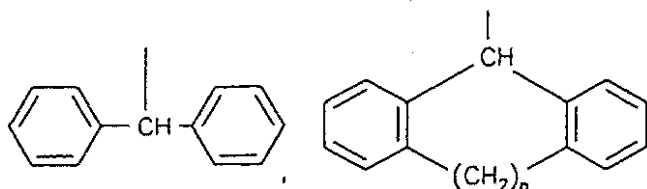
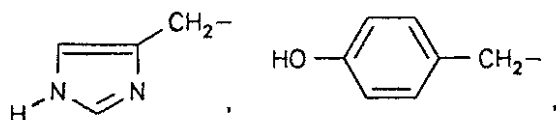
10

式中：

Z は、 $\text{H}-$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $\text{CH}_3-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $\text{HOOC}-\text{CH}_2-$ 、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{NH})-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $\text{HO}-\text{CH}_2-$ 、 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{OH})-$ 、 $\text{HS}-\text{CH}_2-$ 、 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 、 $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $(\text{HOOC})_2\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、の意味であり、



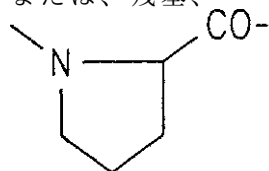
20



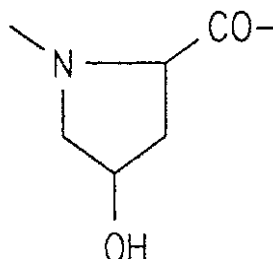
式中：

n は、整数 0、1 または 2 である、

または、残基、



または



30

または、タウリン残基を表す；

および、原子数 21-32、37-39、42-51 および 57-83 を有する金属イオンとそれらの錯体およびそれらの水溶性の塩であり、

これらの物質は、驚くべきことに、動脈硬化プラークをかなり強い程度に濃縮させ、これらの物質の急速除去の結果として生じる他の組織および器官における低いバックグラウンド放射線により、これらは動脈硬化症の非侵襲的診断に特に適している。

一般式 I で示される特に好ましい本発明の化合物は、 $\text{Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp}$ 、 $\text{Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp}$ 、 $\text{Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp}$ 、 $\text{N-(4-ヒドロキシカルボキシ-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp}$ 、 N-(4-ヒドロキシカルボキシ-1

40

50

－オキソ－3－チア－ブチ－1－イル）－Cys－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－Trp、N－（4－ヒドロキシカルボキシ－1－オキソ－3－チア－ブチ－1－イル）－Cys－His－Leu－Asp－Ile－Ile－Trp、N－（メルカプトアセチル）－Gly－Gly－Asp－Phe－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpおよびN－（メルカプトアセチル）－Gly－Gly－Asp－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－Trpである。

本発明の特に好ましい錯化合物は、Asp－Gly－Gly－Cys－Gly－Cys－His－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体、Asp－Gly－Gly－Cys－Gly－Cys－D－Trp－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体、Asp－Gly－Gly－Cys－Gly－Cys－Phe－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体、N－（4－ヒドロキシカルボキシ－1－オキソ－3－チア－ブチ－1－イル）－Cys－Phe－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体、N－（4－ヒドロキシカルボキシ－1－オキソ－3－チア－ブチ－1－イル）－Cys－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体、N－（4－ヒドロキシカルボキシ－1－オキソ－3－チア－ブチ－1－イル）－Cys－His－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体、N－（メルカプトアセチル）－Gly－Gly－Asp－Phe－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体およびN－（メルカプトアセチル）－Gly－Gly－Asp－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体である。

本発明の一般式 I の放射性標識金属錯体が、動脈硬化症血管領域において驚くほど強く濃縮し、この結果、シンチレーションカメラを有するディスプレイまたは核医学において一般的なその他の適切な装置にとって十分な濃度に達する。驚くべき発見は、適用された本発明の物質がインビボでこのような濃度に非常に速く達し、その結合が非常に安定している

ので、受容体に結合している過剰の物質を移動および除去した後でさえも、診断のために高くかつ十分な濃度が残ることであった。さらに、エンドテリン自体は全ての血管領域に有効であるにもかかわらず、非常に様々な方法を介して変化した診断すべき動脈壁領域において、好んで濃縮が起こるということは驚くべきことであった。

適用された本発明の物質は、他の多くの物質の種類および試験された物質と比較して追加的な利点を有し、他の組織および器官において付加的および非特異的に濃縮することがなく、このことは診断薬としての適性にとって決定的なことである。

図 1 および 2 は本発明の化合物のインビボでの濃縮を示す。図 1 は、Asp－Gly－Gly－Cys－Gly－Cys－Phe－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体74MBqの静脈内投与後0.5時間の、WHHLウサギ（A）およびニュージーランド対照標準ウサギ（B）の左側面のシンチグラムである（実施例3c参照）。対照標準ウサギ（B）と対照してみると、濃縮活性が、WHHLウサギ（A）の大動脈弓の領域、左頸動脈および腹大動脈の領域においてインビボで見ることができる。図 2 は、Asp－Gly－Gly－Cys－Gly－Cys－（D－Trp）－Leu－Asp－Ile－Ile－TrpのTc-99m－錯体74MBqの静脈内投与後0.5時間の、右頸動脈をFogartyカテーテルの補助によって4週間早く露出されたニュージーランドウサギの腹側のシンチグラム（A）（実施例2c）、および静脈内投与後5時間の、切開された胸大動脈、露出および未処理頸動脈のオートダイアグラム（B1）およびズダンIII染色（B2）、を示す。B1およびB2の切開された組織の順序は各々、左から右に向かって以下の通りである：胸大動脈、右露出頸動脈、左未処理頸動脈。強度動脈硬化症の右頸動脈がインビボで検出された（A）。インビトロでの検査（B1およびB2）は、未処理左頸動脈と比較して、露出右頸動脈における本発明の化合物の高い沈着と選択的沈着との間の高い相互関係を確認するものである。

本発明の一般式 I の化合物およびその溶液は、前記の必要条件を驚くほど高い程度に満たした。これらは、好ましい薬物動態学により、血管の疾患を評価するための前述した診断薬よりも、疾患組織領域の高い濃縮および優れた対比特性の両方を兼ね備えている。本発明の新規物質を実際に使用することは、それらの高い化学安定性により容易である。

表 1 において、プラーク、および大動脈の非プラーク領域における、本発明の化合物の濃縮（cpm/mm²）が、濃縮ファクター（プラークにおける濃縮と非プラーク大動脈組織における濃縮との比）と共に示されている。本発明の各々の化合物74MBq（2mCi）を、WHHLウサギに耳の血管から投与した。5時間p.i.、そのウサギを殺し、除去された大動脈の定量

10

20

30

40

50

オートラジオグラフィおよびズダンIII染色の両方を行った。異なる組織における本発明の各々の化合物のそのように測定された沈着を表1に示す。

表1

実施例番号	濃縮 (cpm/m ²)		濃縮ファクター プラーク/非プラーク
	プラーク	非プラーク	
1c	501	89	6
2c	3090	431	7
3c	3930	368	11
4c	3912	274	14
5c	833	98	9
6c	353	76	5
7c	619	48	13
8c	513	52	10

本発明の錯体にも存在する錯体形成残基Kが、配位および／または共有結合の形態で、各々の金属イオンに結合できなければならない。

錯体形成残基Kは、本発明の錯体を完成するのに有効かつ十分な結合が生じるように、錯体化される金属イオンおよびその電荷、酸化数、原子およびイオン半径に従って、選択されなければならない。

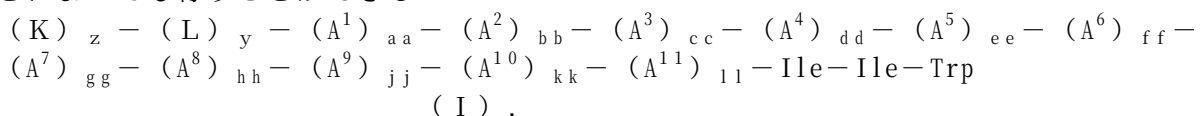
好ましい錯体形成残基は、4-カルボキシエチル-フェニルグリオキサル-ビス-(N-メチルチオセミカルバゾン) N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、6-(4'-イソチオシアナトベンジル)-3,3,9,9-テトラメチル-4,8-ジアザウンデカン-2,10-ジオン-ジオキシム、2-メチル-2-(4-イソチオシアナトベンジル)-N,N'-プロピレン-ビス-サリチリデンアミン、2-メチル-2-(4-イソチオシアナトベンジル)-N,N'-プロピレン-ビス-[5-(スルホ)サリチリデンアミン、N,N'-ビス(2-メルカプトピリジル)メチル]-2-メチル-2-(4-イソチオシアナトベンジル)-1,3-プロパンジアミン、S-ベンゾイルチオアセチルグリシルグリシルグリシン、N,N'-ビス(ベンゾイルチオアセチル)-2,3-ジアミノプロピオン酸、N,N'-ビス(ベンゾイルチオアセチル)-3,4-ジアミノブタン酸、N,N'-ビス(ベンゾイルチオアセチル)-4,5-ジアミノペンタン酸、N,N'-1,2-エチレンジーイル-ビス-(2-メルカプト-1-カルボキシエチルアミン)、Cys (Acm) GlyCys (Acm) GlyGlyArg GlyAspSerである。

本発明による一般式(I)の化合物と金属イオンとの錯体の製造は、当業者によく知られている方法を用いて行うことができ、既知の方法によって、還元剤および要すれば補助リガンドの存在下に、過金属酸塩の形態の放射性金属イオンを一般式(I)の化合物と反応させる。

好ましい金属イオンは、過テクネチウム酸塩または過レニウム酸塩の形態の^{99m}TcまたはReである。

この反応は、室温において、水性媒体中で行うのが好ましい。SH保護基の除去は、当業者によく知られている方法によって、例えば、塩基性加水分解、還元性開裂などによって、系中に行うことができる(例えば、「Protective Groups in Organic Synthesis」、T.W. Greene, John Wiley and Sons 1981を参照)。

発明による一般式(I)の化合物と金属イオンとの錯体の製造は、既知の方法において、適切な放射性陽イオンの適切な塩または酸化物を、一般式(I)の化合物と反応させることによって行うことができる：



好ましい放射性金属イオン例えば、TcおよびReの同位体である。

一般式II Aのキレート化剤Kの製造は、文献(EP0248506を参照)に記載の方法によって行うことができ、その方法は、ジ-、トリ-、テトラ-、ペンタ-またはヘキサペプチドのN-末端アミノ基をクロロアセチル化し、それに続いて、得られるN-クロロアセチルペプチドをチオ炭酸のアルカリ金属塩を用いて変化する方法である。一般式II Aを有す

10

20

30

40

50

るキレート化剤Kのその他の製造方法は、文献（EP0248506を参照）に記載の方法であり、その方法は、対応する活性化（例えばNHS-エステル）およびS-アシル化チオ酢酸誘導体または3-チオプロピオン酸誘導体と、ペプチドとを反応させる方法である。対応する炭酸の活性化は、当業者に既知の方法によって行うことができ、例えば、混合または環状無水物を介して（Org. Prep. Proc. Int. 1975, 7, 215）、または活性エステルを介して（Adv. Org. Chem. Part B, 472）の、カルボージイミド法（Fieser, Reagents for Organic Synthesis 10, 142）によるものである。

一般式II Bを有するキレート化剤Kの製造は、文献（EP0248506を参照）に記載の方法によって行われ、その方法は、1,2-ジアミノプロピオン酸または1,3-ジアミノブタン酸の遊離アミノ基のクロロアセチル化、それに続いて、得られるN,N'-ジクロロアセチル-ジアミノ炭酸をチオ炭酸のアルカリ金属塩を用いて変換する方法である。一般式II Bを有するキレート化剤Kのその他の製造方法は、文献（EP0248506を参照）に記載の方法であり、その方法は、対応する活性化（例えばNHS-エステル）およびS-アシル化チオ酢酸誘導体または3-チオプロピオン酸誘導体と、1,2-ジアミノプロピオン酸または1,3-ジアミノブタン酸とを反応させる方法である。対応する炭酸の活性化は、当業者に既知の方法によって行うことができ、例えば、混合または環状無水物を介して（Org. Prep. Proc. Int. 1975, 7, 215）、または活性エステルを介して（Adv. Org. Chem. Part B, 472）の、カルボージイミド法（Fieser, Reagents for Organic Synthesis 10, 142）によるものである。

一般式II Eを有するキレート化剤Kの製造は、欧州特許出願番号EP0306168に記載されているように、置換1,2-ジカルボニル化合物を、チオセミカルバジドを用いて変換するという既知の方法で行われる。

一般式II Fを有するキレート化剤Kの製造は、本質的に、欧州特許出願番号第EP279417号に記載のように、置換、非置換、保護または非保護アミノチオフエンを用いての、置換または非置換1,2-ジケト-または1,3-ジケト化合物の還元的アミノ化によって行われる。一般式II Gを有するキレート化剤Kの製造は、本質的に、既知の方法によって行われ、欧州特許出願EP0417870号およびEP0502594号に記載のように、2-置換1,3-プロパンジアミンを2-クロロ-2-アルキル-3-ニトロアルカンで変換するか、または、2-置換1,3-プロパンジアミンを1,3-ジカルボニルモノキシムを用いて対応するイミンに変換し、これらが既知の方法によって対応するアミンに還元される。

一般式II Hを有するキレート化剤Kの製造は、既知の方法によって行われ（U.S.-PS4897 255参照）、1,2-または1,3-ジアミノアルカン酸の遊離アミノ基をクロロアセチル化し（EP0248506参照）、それに続いて、得られるN,N'-ジクロロアセチルジアミノ炭酸がチオ炭酸のアルカリ金属塩を用いて変換される。一般式II Hを有するキレート化剤Kのその他の製造法は、文献（U.S.-PS4897255参照）に記載の方法によって行われ、対応する活性化（例えばNHS-エステル）およびS-保護チオ炭酸誘導体を1,2-または1,3-ジアミノアルカン酸と反応させることによって行われる。対応する炭酸の活性化は、当業者に既知の方法によって行われ、例えば、カルボージイミド法（Fieser, Reagents for Organic Synthesis 10, 142）に従い、混合または環状無水物（Org. Prep. Proc. Int. 1975, 7, 215）または活性エステル（Adv. Org. Chem. Part B, 472）を介して行われる。

一般式II Jを有するキレート化剤Kの製造は、本質的に、欧州特許出願EP0417870、EP050 2594およびEP0502595に記載のような既知の方法によって行われ、2-置換1,3-プロパンジアミンを任意に付加的カルボキシル-またはスルホン酸基およびo-置換ベンズアルデヒドで変換し、続いて、得られる Schiff's base を対応するアミンに還元し、任意に保護基を除去する、または置換マロン酸ハロゲン化物を任意に、付加的カルボキシル-またはスルホン酸基およびo-置換ベンジルアミンで変換する。

一般式II Kを有するキレート化剤Kの製造は、固相ペプチド合成によって行われる（Merrifield, J. Am. chem. Soc., 85 (1963), 2149)。この化合物は、文献に記載のペプチド合成に従って化学的に合成される（例えば、The Practice of Peptide Synthesis, M. Bodanszky および A. Bodanszky; Springer Verlag (1984) および Fieser, Reagents for Organic Synthesis 10, 142)。例えば、第一または第二アミンの付加/除去反応を介して、当業者に既

10

20

30

40

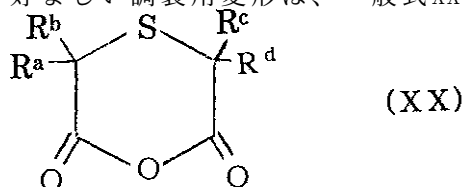
50

知の方法によって、N-保護 α -、 β -または γ -アミノ酸が、活性炭炭化合物（例えば、酸性塩化物、混合無水物、活性エステル）と、N-保護、樹脂結合アミノ酸部位で結合される。文献（Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach; E. Atherton および R. C. Sheppard; Oxford University Press; Oxford, New York, Tokyo）に記載の方法によってアミノ保護基を除去した後、残るアミノ官能基を、文献に記載の方法による第二反応において、N-保護 α -、 β -、または γ -アミノ酸で新たに誘導体化する。アミノ保護基の除去が、再び、既知の方法を用いて行われる。好ましくは、N-保護アミノ酸Fmoc-保護誘導体が使用される。樹脂にペプチドを形成後、完成ペプチドを樹脂から開裂し、例えば調製用HPLCで精製する（固相ペプチド合成、上記参照）。

金属チオニンのシステインに富むアミノ酸配列の製造が、同様の方法で行われる（特許出願W091/17173参照）。

一般式II Lのキレート形成残基Kの製造が、既知の方法で行われる。

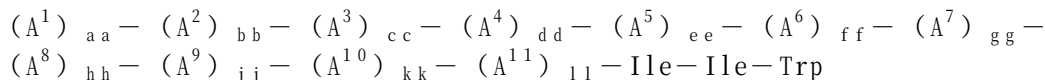
好ましい調製用変形は、一般式XX:



式中:

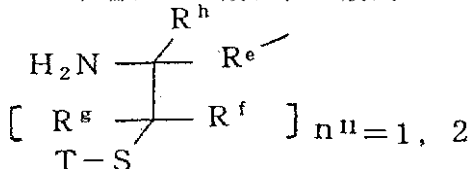
R^a 、 R^b 、 R^c および R^d は前記と同意義である

の環状無水物を、一般式:



式中:

N-末端アミノ酸は、一般式:

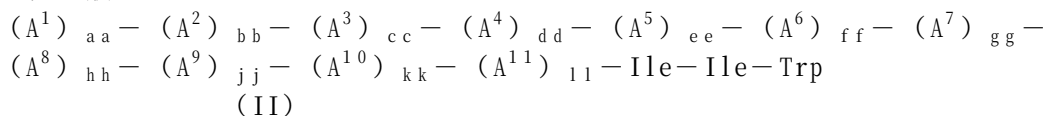


の残基を表す

の化合物と反応させることを特徴とする。

3~25個のアミノ酸残基を有し、C-末端にIle-Ile-Trpのトリペプチドを有するペプチドの製造は、文献（Analysis, Synthesis, Biology Academic Press, New York 1980; Stewart and Young, Solid-Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierre Chemical Co., Rockford IL, 1984; Atherton and Sheppard, Solid-Phase Peptide Synthesis, IRL Press, Oxford, England 1989）から知られる標準的方法に従って行なった。

本発明の目的はさらに、本発明の一般式Iの化合物、および原子数21-32、37-39、42-51および57-83の金属イオンとそれらの化合物との錯体の製造方法であり、この製造方法は、一般式II:



式中:

$A^1 \sim A^{11}$ 、aa、bb、cc、dd、ee、ff、gg、hh、jj、kkおよびllは前記と同意義である

を有する化合物を、選択的に、既知の方法で、一般式III:



式中:

K、L、zおよびyは前記と同意義である

を有する化合物と反応させること、および、任意に、各々既知の方法によって、還元剤、

10

20

30

40

50

要すれば補助リガンドの存在下に、ペルメタレート形態の放射性金属イオンと反応させる、または放射性陽イオンの塩または酸化物と反応させること、を特徴とする。

本発明はさらに診断薬を提供するものであり、この診断薬は、一般式 (I) の化合物と、原子数21-32、37-39、42-51および57-83の金属イオンとの錯体を含むことを特徴とする。金属イオンを適切に選択することによって、この診断薬は種々の診断方法に適したものとなる。

本発明の診断薬が放射線診断に適用される場合、錯塩の中央イオンは放射性でなければならない。

これらは特に、原子数27、29、30-32、37-39、42-51、62、64、70、75および77の元素のイオンである。好ましい同位体は ^{99m}Tc 、 ^{186}Re および ^{111}In である。

10

本発明の目的はさらに、本発明による診断薬の製造方法を含む。

本発明の放射性医薬の製造は既知の方法によって行われ、その方法によれば、一般式 I の本発明の錯生成剤およびそれらのコンジュゲートを、要すれば医薬技術において一般的な添加剤を付加して、水性媒体に溶解または懸濁させ、続いて、その溶液または懸濁液を任意に凍結乾燥または滅菌する。適切な添加剤は、例えば、生理学的に安全な緩衝剤（例えばトロメタミン）、補助リガンドの添加剤（例えば、クエン酸ナトリウムまたは酒石酸ナトリウム）、還元剤（例えば、スズ (II) -クロリド）または、必要であれば、例えば塩化ナトリウムのような電解質または、必要であれば、1つまたは複数の一般的な医薬補助剤（例えば、ラクトース、メチルセルロース、マンニット）および/または界面活性剤（例えば、レシチン、Tween（登録商標）、Myrj（登録商標））である。使用されている添加剤は、それらの組成に関連して、本発明の化合物の製造を可能にするものでなければならない。インビボ核医薬適用の際に、本発明の物質は、 $1 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^4 \text{ nmol/kg}$ 体重の量で、優先的には $1 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^2 \text{ nmol/kg}$ 体重の量で投与される。平均体重70kgと考えれば、診断用途における放射能の量は、1投与当たり0.05-50mCi、優先的には5-30mCiである。

20

投与は通常、本発明の物質の溶液0.1-5mlの静脈、動脈または腹膜注射によって行われる。静脈内投与が好ましい。そのような投与方法および投与量の詳細については、例えば、「Radiotracers for Medical Applications」、CRC-Press, Boca Raton, Floridaに記載されている。本発明の化合物は、原子数27、29、30-32、37-39、42-51、62、64、70、75および77の元素の放射性同位体との錯体の形態で、放射線診断法および放射線療法に使用することができる。

30

本発明の放射性医薬は、放射線診断および放射線療法のための放射性医薬としての適性のための種々の必要条件を満たしている。従って、それらは、静脈内投与後、標的組織の濃縮に著しく適しており、対応する組織の非侵襲的診断を可能にする。本発明の放射性医薬の水溶性は、必要であれば、前記のような医薬技術において一般的な助剤によって、確実なものとなる。

さらに、本発明の放射性医薬は、インビトロで高い安定性を示すだけでなく、インビボでも高い安定性を示し、そのために、錯体に結合している放射性核種の放出または交換が生じないかまたは臨床的に関係しない程度にしか生じない。

本発明の医薬の製造はまた、既知の方法によっても行うことができ、本発明の錯生成剤を、還元剤、好ましくは塩化物または酒石酸塩のようなスズ (II) 塩を加え、任意に医薬技術において一般的な添加剤を加えて、水性媒体に溶解し、続いて滅菌ろ過する。適切な添加剤は、例えば、生理学的に安全な緩衝液（例えば、トロメタミン）、少量の電解質添加剤（例えば、塩化ナトリウム）、安定剤（例えば、グルコネート、ホスフェートまたはホスホネート）である。本発明の医薬は、溶液の形態または凍結乾燥形態で存在し、投与の直前に、例えば、商業的に入手される発生剤から溶離されたTc-99m-過テクネチウム酸塩の溶液、または過レニウム酸塩溶液に添加される。

40

放射性医薬の製造が、コールドキット (Cold Kit) を用いて本発明によって提供される。このコールドキットは、一般式 (I) の本発明の化合物、還元剤、任意に1つまたはそれ以上の補助リガンドを、溶液、乾燥形態、または凍結乾燥形態で含む。このコールドキッ

50

トはさらに、一般式 (I) の本発明の化合物を、放射性金属イオンの過金属酸塩で変換し、一般式 (I) の本発明の化合物の金属イオンとの錯体を形成するための反応規定を含む使用説明書も含んでいる。

このコールドキットは、閉じることができるレセプタクル (receptacle) から成り、所定量のエンドテリン、エンドテリン誘導体、エンドテリン部分配列、エンドテリン類似体およびエンドテリン拮抗薬がペプチド、誘導体、キレートに結合していることを示し、これらは金属イオンを結合することができるものであり、さらにこの化合物を^{99m}Tcで標識付けするために十分な量の還元剤を含み、放射性医薬を製造する機能を有しており、このコールドキットの実施もまた本発明の目的である。

本発明の目的はさらに、疾患の血管変化を図形的に提示する方法であり、この方法は、原子数21-32、37-39、42-51および57-83を有する金属イオンと一般式 (I) との錯体がコントラスト剤として適用されることを特徴とする。

放射診断検査を実施する1つの方法において、放射生医薬組成物が、患者の体重70kg当たり0.1-30mCi、好ましくは0.5-10mCiの量で投与され、患者により放出される放射線が記録される。

下記実施例によって本発明を例示する。

実施例 1

a) Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの合成。

Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpを、Barany and Merrifield, The Peptides: Analysis, Biology, Academic Press, New York, 1980; Stewart and Young, Solid-Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984に従って製造する。

分子量: 計算値 1288.4

観測値 1288 (FAB-MS)

b) Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの^{99m}Tc-錯体。
ホスフェート緩衝液 (Na₂HPO₄、0.5モル/l、pH8.5) 300 μl 中のAsp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp 0.5mgに、0.15モルのクエン酸三ナトリウム二水化物溶液50 μl および0.2モルの塩化スズ (II) 二水化物溶液2.5Lを加える。Mo-99/Tc-99m発生剤からの過テクネチウム酸塩溶液 (0.4ピコ0.9mCi) を、反応混合物に加え、次にこれを室温で10分間インキュベートする。標識の分析をHPLCによって行う。

c) WHHLウサギにおけるAsp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの^{99m}Tc-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮。

b) 標識Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの類似体2mCi (1ml) を、麻酔をかけたWHHLウサギ (Rompun/Ketavet1:2) に耳の血管を通して投与した。WHHLウサギは、失われたまたは欠損したLDL受容体によって、高LDLレベルを示し、そのために自発的な動脈硬化症の血管変化を示す。投与から5時間の実験期間中に、様々な暴露時間および位置の静止写真を、ガンマカメラ (Elcint SP4 HR) で撮影した。投与から5時間後にウサギを殺し、大動脈のオートラジオグラフィーおよびズダンIII染色の両方を行った。WHHLウサギの大動脈弓の領域の動脈硬化症プラークが、インビボで10分p.i.で描かれた。それに続いて行われたオートラジオグラフィーは、全大動脈壁および動脈硬化症プラークの標識を生じた。正常および動脈硬化壁領域間の濃縮ファクターは、プラーク形成 (ズダンIII染色) に依存して6-9であった。結果を、表1に要約する。

実施例 2

a) Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの合成。

Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpを、Barany and Merrifield, The Peptides: Analysis, Biology, Academic Press, New York, 1980; Stewart and Young, Solid-Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984に従って製造する。

分子量: 計算値 1337.5

観測値 1337 (FAB-MS)

10

20

30

40

50

b) Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの^{99m}Tc-錯体。

ホスフェート緩衝液 (Na₂HPO₄、0.5モル/l、pH8.5) 300 μ l 中のAsp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp 0.5mgに、0.15モルのクエン酸三ナトリウム二水化物溶液50 μ l および0.2モルの塩化スズ (II) 二水化物溶液2.5lを加える。Mo-99/Tc-99m発生剤からの過テクネチウム酸塩溶液 (0.4ビス0.9mCi) を、反応混合物に加え、次にこれを室温で10分間インキュベートする。標識の分析をHPLCによって行う。

c) WHHLウサギにおけるAsp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの^{99m}Tc-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮。

WHHLウサギにおけるAsp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-D-Trp-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの^{99m}Tc-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮が、実施例1c)に記載のように行われた。結果を表1に要約する。

実施例 3

a) Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの合成。

Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpを、Baran y and Marrifield, The Peptides: Analysis, Biology, Academic Press, New York, 1980; Stewart and Young, Solid-Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984に従って製造する。

分子量: 計算値 1484.68

観測値 1484 (FAB-MS)

b) Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの^{99m}Tc-錯体。

ホスフェート緩衝液 (Na₂HPO₄、0.5モル/l、pH8.5) 300 μ l 中のAsp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp 0.5mgに、0.15モルのクエン酸三ナトリウム二水化物溶液50 μ l および0.2モルの塩化スズ (II) 二水化物溶液2.5lを加える。Mo-99/Tc-99m発生剤からの過テクネチウム酸塩溶液 (0.4ビス0.9mCi) を、反応混合物に加え、次にこれを室温で10分間インキュベートする。標識の分析をHPLCによって行う。

c) WHHLウサギにおけるAsp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮。

WHHLウサギにおけるAsp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮が、実施例1c)に記載のように行われた。結果を表1に要約する。

実施例 4

a) N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チアープチ-1-イル)-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの合成。

NH₂-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp (E. Atherton, R. C. Sheppard, Solid phase peptide synthesis, Oxford University press, New York, Tokyoによって製造) 109.5mg (0.1ミリモル) を、アルゴン雰囲気下、トリエチルアミン30.36mg (0.3ミリモル) を添加して、水を含まないジメチルホルムアミド3mlに溶解する。0℃で、チオジグリコール酸無水物13.21mg (0.1ミリモル) を加える。続いて、この溶液を0℃で2時間、その後室温で一夜攪拌する。未処理のペプチドを、水を含まないジエチルエーテル10mlを添加して沈殿させ、シリカゲルRP-18でクロマトグラフィーにかけて精製する (溶離: 水/0.1%トリフルオロ酢酸、アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸、線状勾配)。凍結乾燥後、白色粉末を得る。

収量: 48.5mg (39.5% Th.)、白色粉末

分子量: 計算値 1227.4438

観測値 1227 (FAB-MS)

b) N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チアープチ-1-イル)-Cys

s-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体。

実施例4a)に記載のペプチドコンジュゲート $\text{HOOCH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CONH-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp}$ 1mgを、リン酸水素二ナトリウム緩衝液500 μl (0.01モル/l、pH8.5)に溶解し、0.15モルのクエン酸三ナトリウム二水化物溶液50 μl を加える。Mo-99/Tc-99m発生剤からの過テクネチウム酸塩溶液(0.4~0.9mCi)を添加後、0.2モルの塩化スズ(II)二水化物溶液5 μl を加え、この反応混合物を、室温で10分間インキュベートする。標識収量を分析HPLCによって測定し、それは95%を超過する。

c) WHHLウサギにおけるN-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮。

10

N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のWHHLウサギにおけるインビボおよびインビトロ濃縮が、実施例1c)に記載のように行われた。結果を表1に要約する。

実施例 5

a) N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの合成。

$\text{NH}_2\text{-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp}$ (E.Atherton, R.C.Sheppard, Solid phase peptide synthesis, Oxford University press, Oxford, New York, Tokyoによって製造) 94.8mg (0.1ミリモル)を、アルゴン雰囲気下、トリエチルアミン30.36mg (0.3ミリモル)を添加して、水を含まないジメチルホルムアミド3mlに溶解する。0℃で、チオジグリコール酸無水物13.21mg (0.1ミリモル)を加える。続いて、この溶液を0℃で2時間、その後室温で一夜攪拌する。未処理のペプチドを、水を含まないジエチルエーテル10mlを添加して沈殿させ、シリカゲルRP-18でクロマトグラフィーにかけて精製する(溶離:水/0.1%トリフルオロ酢酸、アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸、線状勾配)。凍結乾燥後、白色粉末を得る。

20

収量:39.3mg (36.4% Th.)、白色粉末

分子量:計算値 1080.2738

観測値 1080 (FAB-MS)

b) N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体。

30

実施例5a)に記載のペプチドコンジュゲート $\text{HOOCH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CONH-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp}$ 1mgを、リン酸水素二ナトリウム緩衝液500 μl (0.01モル/l、pH8.5)に溶解し、0.15モルのクエン酸三ナトリウム二水化物溶液50 μl を加える。Mo-99/Tc-99m発生剤からの過テクネチウム酸塩溶液(0.4~0.9mCi)を添加後、0.2モルの塩化スズ(II)二水化物溶液5 μl を加え、この反応混合物を、室温で10分間インキュベートする。標識収量を分析HPLCによって測定し、それは95%を超過する。

c) WHHLウサギにおけるN-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮。

40

N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のWHHLウサギにおけるインビボおよびインビトロでの濃縮が、実施例1c)に記載のように行われた。結果を表1に要約する。

実施例 6

a) N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの合成。

$\text{NH}_2\text{-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp}$ (E.Atherton, R.C.Sheppard, Solid phase peptide synthesis, Oxford University press, Oxford, New York, Tokyoによって製造) 89.9mg (0.1ミリモル)を、アルゴン雰囲気下、トリエチルアミン30.36mg (0.3ミリモル)を添

50

加して、水を含まないジメチルホルムアミド3mlに溶解する。0℃で、チオジグリコール酸無水物13.21mg (0.1ミリモル)を加える。続いて、0℃で2時間、その後室温で一夜攪拌する。未処理のペプチドを、水を含まないジエチルエーテル10mlを添加して沈殿させ、シリカゲルRP-18でクロマトグラフィーにかけて精製する(溶離:水/0.1%トリフルオロ酢酸、アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸、線状勾配)。凍結乾燥後、白色粉末を得る。

収量:26.9mg (26.1% Th.)、白色粉末

分子量:計算値 1031.2038

観測値 1031 (FAB-MS)

b) N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体。 10

実施例6a)に記載のペプチドコンジュゲート $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{Cys}-\text{Leu}-\text{Asp}-\text{Ile}-\text{Ile}-\text{Trp}$ 1mgを、リン酸水素二ナトリウム緩衝液500 μl (0.01モル/l、pH8.5)に溶解し、0.15モルのクエン酸三ナトリウム二水化物溶液50 μl を加える。Mo-99/Tc-99m発生剤からの過テクネチウム酸塩溶液(0.4~0.9mCi)を添加後、0.2モルの塩化スズ(II)二水化物溶液5 μl を加え、この反応混合物を、室温で10分間インキュベートする。標識収量を分析HPLCによって測定し、それは95%を超過する。

c) WHHLウサギにおけるN-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮。 20

N-(4-ヒドロキシカルボキシー-1-オキソ-3-チア-ブチ-1-イル)-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のWHHLウサギにおけるインビボおよびインビトロ濃縮が、実施例1c)に記載のように行われた。結果を表1に要約する。

実施例7

a) N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの合成。

$\text{NH}_2-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Asp}-\text{Phe}-(\text{D}-\text{Trp})-\text{Leu}-\text{Asp}-\text{Ile}-\text{Ile}-\text{Trp}$ (E. Atherton, R. C. Sheppard, Solid phase peptide synthesis, Oxford University press, Oxford, New York, Tokyoによって製造) 122.1mg (0.1ミリモル)を、アルゴン雰囲気下、トリエチルアミン40.48mg (0.4ミリモル)を添加して、水を含まないジメチルホルムアミド3mlに溶解する。0℃において、水を含まないジメチルホルムアミド3ml中のS-トリチル-メルカプト酢酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの溶液[製法:S-トリチル-メルカプト酢酸36.79mg (0.11ミリモル)を、N-ヒドロキシスクシンイミド12.66mg (0.11ミリモル)を添加して、水を含まないジメチルホルムアミド2ml中に溶解する。水を含まないジメチルホルムアミド1ml中のジシクロヘキシルカルボジイミド22.70mg (0.11ミリモル)の溶液を加え、30分間インキュベートする。その後、系中で製造されたS-トリチル-メルカプト酢酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル溶液をカップリングに使用することができる]。続いて、0℃で2時間、その後室温で一夜攪拌する。未処理のペプチドを、水を含まないジエチルエーテル20mlを加えて沈殿させ、アルゴン雰囲気下、5mlトリフルオロ酢酸/5%水/22mgトリブチルシラン中で10分間攪拌する。保護基を含まない未処理のペプチドを、水を含まないジエチルエーテル25mlで沈殿させて分離し、シリカゲルRP-18でクロマトグラフィーにかけて精製する(溶離:水/0.1%トリフルオロ酢酸、アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸、線状勾配)。凍結乾燥後、白色粉末を得る。 40

収量:56.3mg (43.4% Th.)、白色粉末

分子量:計算値 1296.4551

観測値 1296 (FAB-MS)

b) N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体。

実施例7a)に記載のペプチドコンジュゲート $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Asp}-\text{Phe}-(\text{D}-\text{Trp})-\text{Leu}-\text{Asp}-\text{Ile}-\text{Ile}-\text{Trp}$ 1mgを、リン酸水素二ナトリウム緩衝液500 μl (0.0 50

1モル/l、pH8.5) に溶解し、0.15モルのクエン酸三ナトリウム二水化物溶液50 μ lを加える。Mo-99/Tc-99m発生剤からの過テクネチウム酸塩溶液(0.4~0.9mCi)を添加後、0.2モルの塩化スズ(II)二水化物溶液5 μ lを加え、この反応混合物を、室温で10分間インキュベートする。標識収量を分析HPLCによって測定し、それは95%を超過する。

c) WHHLウサギにおけるN-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮。

N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のWHHLウサギにおけるインビボおよびインビトロ濃縮が、実施例1c)に記載のように行われた。結果を表1に要約する。

実施例 8

a) N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trpの合成。

NH₂-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp (E.Atherton, R.C.Sheppard, Solid phase peptide synthesis, Oxford University press, Oxford, New York, Tokyoによって製造) 107.4mg (0.1ミリモル) を、アルゴン雰囲気下、トリエチルアミン40.48mg (0.4ミリモル) を添加して、水を含まないジメチルホルムアミド3mlに溶解する。0℃において、水を含まないジメチルホルムアミド3ml中のS-トリチルーメルカプト酢酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの溶液[製法:S-トリチルーメルカプト酢酸36.79mg (0.11ミリモル) を、N-ヒドロキシスクシンイミド12.66mg (0.11ミリモル) を添加して、水を含まないジメチルホルムアミド2ml中に溶解する。水を含まないジメチルホルムアミド1ml中のジシクロヘキシルカルボジイミド22.70mg (0.11ミリモル) の溶液を加え、30分間インキュベートする。ろ過後、系中でそのように製造されたS-トリチルーメルカプト酢酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル溶液をカップリングに使用することができる]。続いて、0℃で2時間、その後室温で一夜攪拌する。未処理のペプチドを、水を含まないジエチルエーテル20mlを加えて沈殿させ、アルゴン雰囲気下、5mlトリフルオロ酢酸/5%水/22mgトリブチルシラン中で10分間攪拌する。保護基を含まない未処理のペプチドを、水を含まないジエチルエーテル25mlで沈殿させて分離し、シリカゲルRP-18でクロマトグラフィーにかけて精製する(溶離:水/0.1%トリフルオロ酢酸、アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸、線状勾配)。凍結乾燥後、白色粉末を得る。

収量:46.3mg (40.3% Th.)、白色粉末

分子量:計算値 1049.2851

観測値 1049 (FAB-MS)

b) N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体。

実施例8a)に記載のペプチドコンジュゲートHS-CH₂-CONH-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp 1mgを、リン酸水素二ナトリウム緩衝液500 μ l (0.01モル/l、pH8.5) に溶解し、0.15モルのクエン酸三ナトリウム二水化物溶液50 μ lを加える。Mo-99/Tc-99m発生剤からの過テクネチウム酸塩溶液(0.4~0.9mCi)を添加後、0.2モルの塩化スズ(II)二水化物溶液5 μ lを加え、室温で10分間インキュベートする。標識収量を分析HPLCによって測定し、それは95%を超過する。

c) WHHLウサギにおけるN-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のインビボおよびインビトロ濃縮。

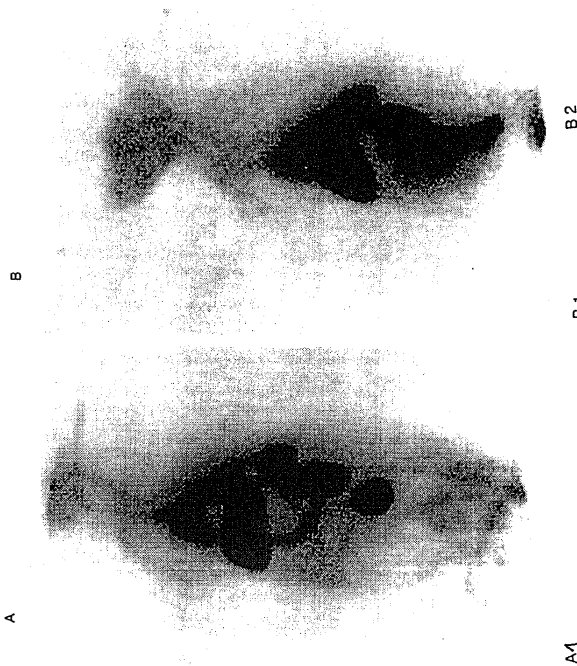
N-(メルカプトアセチル)-Gly-Gly-Asp-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-TrpのTc-99m-錯体のWHHLウサギにおけるインビボおよびインビトロ濃縮が、実施例1c)に記載のように行われた。結果を表1に要約する。

図1は、Tc-99m-Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-Phe-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp 74MBqの静脈内投与後0.5時間のWHHLウサギ(A)およびニュージーランド対照標準ウサギ(B)の左側面のシンチグラムを示す(実施例3c参照)。対照標準ウサギ(B)と対照してみると、濃縮活性が、WHHLウサギ(A)の大動脈弓の領域、左頸動脈および腹大動脈の領域においてインビボで観察することができる。

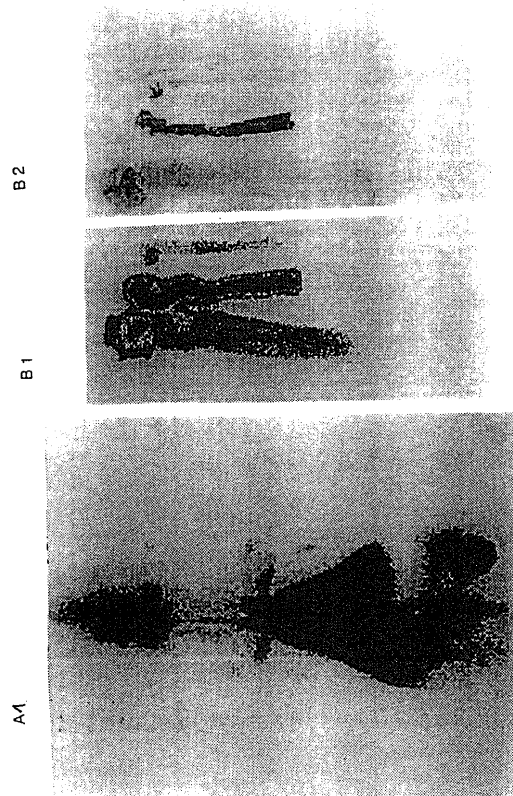
図2は、 $Tc-99m-Asp-Gly-Gly-Cys-Gly-Cys-(D-Trp)-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp$ 74MBqの静脈内投与後0.5時間の、右頸動脈をFogartyカテーテルの補助によって4週間早く露出されたニュージーランドウサギの腹側のシンチグラム(A)、および静脈内投与後5時間で除去された胸大動脈、露出および未処理頸動脈のオートダイアグラム(B1)およびズダンIII染色(B2)を示す。(実施例3c参照)。B1およびB2の切開された組織の順序は各々、左から右に向かって以下の通りである：胸大動脈、右露出頸動脈、左未処理頸動脈。

強度動脈硬化症の右頸動脈がインビボで検出された(A)。インビトロでの検査(B)は、未処理左頸動脈と比較して、露出右頸動脈における医薬の高い沈着と選択的沈着との間の高い相互関係を確認するものである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 西山 雅也

(74)代理人

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 ディンケルボルク ルドガー

ドイツ連邦共和国 デー・1 3 5 8 5 ベルリン エムデンツァイレ 5

(72)発明者 ヒルガー クリストフ ステファン

ドイツ連邦共和国 デー・1 3 3 5 3 ベルリン オステンデルシュトラッセ 3アー

(72)発明者 ゼムラー ヴォルフハルト

ドイツ連邦共和国 デー・1 6 5 4 8 グリエニッケ ローザ・ルクセンブルク・シュトラッセ
1 6

(72)発明者 シュベック ウルリッヒ

ドイツ連邦共和国 デー・1 3 4 6 5 ベルリン フュルステンダム 2 0

(72)発明者 ヘンクライン ペーター

ドイツ連邦共和国 デー・1 0 3 6 5 ベルリン シュルツェ・ボーゼン・シュトラッセ 2 5

審査官 鈴木 恵理子

(56)参考文献 特開平07-149799 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C07K 14/575

A61K 49/00 ~ 04

A61K 51/08

CA(STN)

BIOSIS(DIALOG)

REGISTRY(STN)