

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6063384号
(P6063384)

(45) 発行日 平成29年1月18日 (2017. 1. 18)

(24) 登録日 平成28年12月22日 (2016. 12. 22)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 51/00 (2006. 01)
 A 6 1 K 47/50 (2017. 01)
 A 6 1 P 9/00 (2006. 01)
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)
 A 6 1 P 31/00 (2006. 01)

A 6 1 K 49/02 C
 A 6 1 K 43/00
 A 6 1 K 47/48
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 35/00

請求項の数 7 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-533311 (P2013-533311)
 (86) (22) 出願日 平成23年10月11日 (2011. 10. 11)
 (65) 公表番号 特表2014-506869 (P2014-506869A)
 (43) 公表日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2011/054481
 (87) 国際公開番号 WO2012/049624
 (87) 国際公開日 平成24年4月19日 (2012. 4. 19)
 審査請求日 平成26年10月9日 (2014. 10. 9)
 (31) 優先権主張番号 10187619.1
 (32) 優先日 平成22年10月14日 (2010. 10. 14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 590000248
 コーニンクレッカ フィリップス エヌ
 ヴェ
 KONINKLIJKE PHILIPS
 N. V.
 オランダ国 5656 アーエー アイン
 ドーフェン ハイテック キャンパス 5
 High Tech Campus 5,
 NL-5656 AE Eindhove
 n
 (74) 代理人 100107766
 弁理士 伊東 忠重
 (74) 代理人 100070150
 弁理士 伊東 忠彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プレターゲットキット、プレターゲット方法及びその使用試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ターゲット化医用イメージング及び/又は治療のためのキットであり、
 当該キットは少なくとも1つのプレターゲットプローブ及び少なくとも1つのエフェク
 タープローブを含み、

前記プレターゲットプローブは、第1のターゲット部及び第1の生体直交反応性基を、
 前記エフェクタープローブは、ラベル又は医薬的活性化化合物を有するエフェクター部及び
 第2の生体直交反応性基を含み、

前記第1のターゲット部は、ペプチド、タンパク質、抗体断片、二重特異的抗体、及び
 腫瘍ターゲット化ポリマーからなる群から選択され、

前記ラベルは、³H、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、¹⁹F、⁵¹Cr、⁵²Fe
 、⁵²Mn、⁵⁵Co、⁶⁰Cu、⁶¹Cu、⁶²Zn、⁶²Cu、⁶³Zn、⁶⁴Cu
 、⁶⁶Ga、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷⁰As、⁷¹As、⁷²As、⁷⁴As、⁷⁵Se
 、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁷⁷Br、⁸⁰Br、⁸²Br、⁸²Rb、⁸⁶Y、⁸⁸Y、⁸
⁹Sr、⁸⁹Zr、⁹⁷Ru、⁹⁹Tc、¹¹⁰In、¹¹¹In、¹¹³In、¹¹⁴
 In、¹¹⁷Sn、¹²⁰I、¹²²Xe、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹⁶⁶Ho
 、¹⁶⁷Tm、¹⁶⁹Yb、¹⁹³Pt、¹⁹⁵Pt、²⁰¹Tl及び²⁰³Pbからな
 る群から選択され、

前記医薬的活性化化合物は、²⁴Na、³²P、³³P、⁴⁷Sc、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu
 、⁷⁶As、⁷⁷As、⁸⁰Br、⁸²Br、⁸⁹Sr、⁹⁰Nb、⁹⁰Y、¹⁰³Ru

10

20

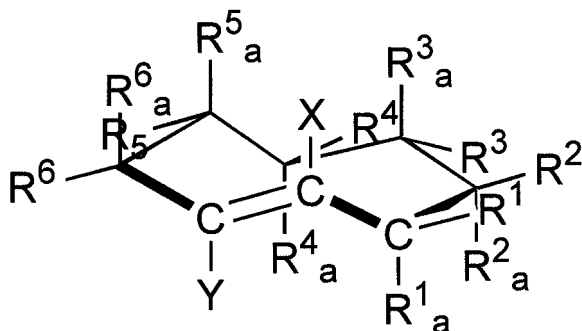
、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹²¹Sn、¹²⁷Te、¹³¹I、¹⁴⁰La、¹⁴¹Ce、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁴⁴Pr、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁹Tb、¹⁵¹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁹Gd、¹⁶¹Tb、¹⁶⁵Dy、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Er、¹⁷²Tm、¹⁷⁵Yb、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²¹¹At、²¹¹Bi、²¹²Bi、²¹²Pb、²¹³Bi、²¹⁴Bi、²²³Ra、及び²²⁵Acからなる群から選択され、

前記第1及び第2の生体直交反応性基のいずれか一方がジエノフィルであり、前記第1及び第2の生体直交反応性基の他方がテトラジンであり、

前記ジエノフィルは、式(1)を満たす8-員環ジエノフィルであり：

【化1】

10



(1)

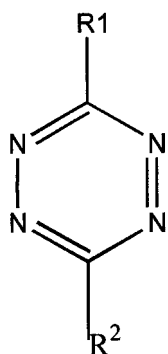
20

ここでRの位置はエクソトリアルであり、R_aの位置はアキシアルであり、R⁴_aは-O-または-CH₂-CO-O-を有する置換基であり、X、Y、R及びその他のR_aは、Hである、キット。

【請求項2】

請求項1に記載のキットであり、前記テトラジンが、下式(5)の化合物であり、

【化5】



(5)

30

ここでR¹及びR²はそれぞれ独立して、H、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2,6-ピリミジル、2,5-ピリミジル、3,5-ピリミジル、2,4-ピリミジル及びフェニルからなる群から選択される置換基を表す、キット。

【請求項3】

請求項2に記載のキットであり、

前記フェニルは、NO₂、F、Cl、CF₃、CN、COOH、COOR、CONH₂、CONHR、CONR₂、CHO、COR、SO₂R、SO₂OR、NO、Arの1以上の電子吸引基で置換され、ここでRはC₁~C₆アルキルであり、Arは芳香族基である、キット。

【請求項4】

請求項2又は3に記載のキットであり、

50

前記テトラジンは、スパーサーを介して前記プレターゲットプローブ又は前記エフェクタープローブへの少なくとも1つのリンケージを含む、キット。

【請求項5】

第1のターゲット部と生体直交反応性基とを含むプレターゲット試薬であり、前記第1のターゲット部が請求項1に記載のペプチド、タンパク質、抗体断片、二重特異的抗体、及び腫瘍ターゲット化ポリマーからなる群から選択されるものであり、前記生体直交反応性基が請求項1に定めた式(1)のジエノフィルである、プレターゲット試薬。

【請求項6】

ターゲット化医用イメージング及び/又は治療のためのキットであり、

当該キットは少なくとも1つのプレターゲットプローブ及び少なくとも1つのエフェクタープローブを含み、

前記プレターゲットプローブは、第1のターゲット部及び第1の生体直交反応性基を、前記エフェクタープローブは、ラベル又は医薬的活性化化合物を有するエフェクター部及び第2の生体直交反応性基を含み、

前記第1のターゲット部は、ペプチド、タンパク質、抗体断片、二重特異的抗体、及び腫瘍ターゲット化ポリマーからなる群から選択され、

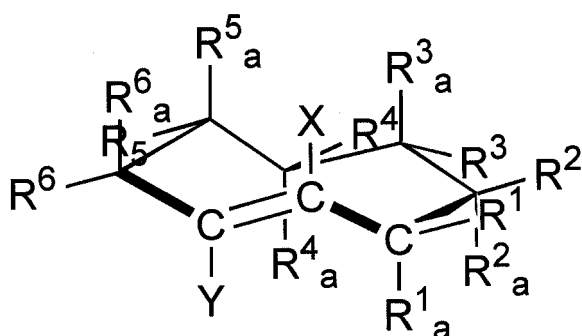
前記ラベルは、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{51}Cr 、 ^{52}Fe 、 ^{52}Mn 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Zn 、 ^{62}Cu 、 ^{63}Zn 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{70}As 、 ^{71}As 、 ^{72}As 、 ^{74}As 、 ^{75}Se 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{114}In 、 ^{117}Sn 、 ^{120}I 、 ^{122}Xe 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{166}Ho 、 ^{167}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{193}Pt 、 ^{195}Pt 、 ^{201}Tl 及び ^{203}Pb からなる群から選択され、

前記医薬的活性化化合物は、 ^{24}Na 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{76}As 、 ^{77}As 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Nb 、 ^{90}Y 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{131}I 、 ^{140}La 、 ^{141}Ce 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{144}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{149}Tb 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{172}Tm 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{223}Ra 、及び ^{225}Ac からなる群から選択され、

前記第1及び第2の生体直交反応性基のいずれか一方がジエノフィルであり、前記第1及び第2の生体直交反応性基の他方がテトラジンであり、

前記ジエノフィルが式(1)を満たす8-員環ジエノフィルであり：

【化6】



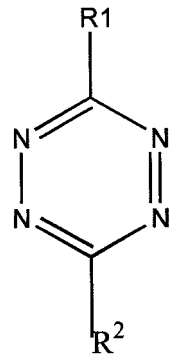
(1)

ここで、Rの位置はエクソトリアルであり、R_aの位置はアキシアルであり、R⁴_aは-O-または-CH₂-CO-O-を有する置換基であり、X、Y、R及びその他のR_aは、Hである、キット。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のキットであり、前記テトラジンが以下式 (5) で表され、

【化 10】



(5)

10

ここで R¹ 及び R² はそれぞれ独立して、2 - ピリジル、フェニル、及び NO₂、CN、COOH、COOR、CONH₂、CONHR、CONR₂、CHO、COR、SO₂R、SO₂OR、NO、Ar の 1 以上の電子吸引基で置換されたフェニル (R は C₁ ~ C₆ アルキルであり、Ar とは芳香族基を表す) からなる群から選択される置換基を表す、キット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ターゲット医療用イメージング及び / 又は治療のためのプレターゲット方法に関し、お互いに対して生体直交反応性を示す非生物的化学基の使用からなる。本発明はまた、プレターゲットキットに関連し、少なくとも 1 つのプレターゲットプローブ及び少なくとも 1 つのエフェクタープローブを含み、前記プレターゲットプローブが、第 1 のターゲット部及び第 1 の生体直交反応性基を含み、前記エフェクタープローブが、ラベル又は医薬的活性化化合物などのエフェクター部及び第 2 の生物直交反応性基を含む。本発明はまた、前記方法及びキットで使用されるプレターゲット試薬に関する。本発明は、特に核イメージング及び放射線治療に関連する。

30

【背景技術】

【0002】

医用診断及び治療の多くの分野で、治療薬 (医薬) 又は診断 (イメージング、画像化) 試薬を、患者などの対象体の体内の、特定のサイト又は定められた領域に選択的に輸送することが望まれる。

【0003】

器官又は組織の活性ターゲット化は、前記望ましい活性部 (例えば造影剤又は細胞毒性化合物) を、対象となる前記ターゲットサイトで又はその近くで細胞表面に結合するか又は細胞取り込みを促進するターゲット構成物に直接又は間接的に共役させること (conjugation) で達成される。かかる試薬をターゲットするために使用される前記ターゲット部は、通常、細胞表面ターゲット (例えば膜レセプター)、構造タンパク質 (例えばアミロイド斑)、又は細胞内ターゲット (例えば RNA、DNA、酵素、細胞シグナル伝達経路) への親和性を持つ構成物である。これらの部分は、特定の疾患又は不全に蓄積されることが知られている、抗体 (断片)、タンパク質、アプタマー、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、同様にペプチド、ペプチド及び有機薬物化合物などであり得る。又は、造影剤 / 治療薬は、DNA、タンパク質及び膜合成及び炭水化物吸収などでの疾患 (例えば感染又は癌) の際にアップレギュレートされる代謝経路をターゲットすることも可能である。これらの疾患組織では、前記マーカーは、疾患細胞を健康組織から識別することができ、早期検出、特異的診断及び (ターゲット) 治療のための独自の可能性を提供

40

50

する。

【 0 0 0 4 】

一般に分子イメージング／治療薬の成功、特に核イメージング／治療薬の成功のための重要な判断基準は、高いターゲット取り込みと、一方で非ターゲット組織及び血流からの迅速な消失（腎及び／又は肝胆蔵系を介して）を示す、ということである。しかしこれはしばしば問題となり：例えば、ヒトでのイメージング研究では、前記腫瘍サイトでの放射性ラベル化抗体の最大濃度が24時間以内に達成されるが、循環中の前記ラベル化抗体の濃度が、イメージングを成功させるために十分低いレベルに減少するまでにさらに数日を必要とする、ことが示されている。

ターゲット組織での遅い又は不十分な蓄積と、非ターゲット領域からの遅い消失というこの問題（特に核イメージング及び治療で）は、プレターゲット方法の適用を導くことになった。

【 0 0 0 5 】

プレターゲットとは、ターゲット方法の1つのステップを意味し、そこでは、第1のターゲット（例えば細胞表面）がプレターゲットプローブで提供される。前記プレターゲットプローブは、第2のターゲットを含み、これは最終的には、第2のターゲット部を持つさらなるプローブ（前記エフェクタープローブ）によりターゲットされることとなる。

【 0 0 0 6 】

従って、プレターゲットでは、プレターゲットプローブが第1のターゲットへ結合される。前記プレターゲットプローブはまた、第2のターゲットを持ち、これは、診断（イメージング）及び／又は治療試薬への前記エフェクタープローブの特異的共役を容易にする。前記プレターゲットプローブを形成する前記構成物が前記ターゲットサイトに局所化されると（例えば24時間後）、自然消失が不十分である場合にはクリーニング試薬を使用して前記血液から過剰量を除去する。第2のインキュベーションステップで（好ましくは短時間、例えば1から6時間）で、前記エフェクタープローブは、その第2のターゲット部を介してプレターゲットプローブに結合される。前記第2のターゲット（前記プレターゲットプローブ上に存在する）及び前記第2のターゲット部（前記エフェクタープローブ上に存在する）は、高特異性高親和性を持って迅速に結合し、体内で安定化される。

【 0 0 0 7 】

プレターゲット方法の一般的概念は、図1でイメージングについて概説されている。ここで前記エフェクタープローブは、イメージングモダリティのための検出可能なラベルを含むイメージングプローブである。前記エフェクタープローブは、その第2のターゲット基を介して前記（プレ）結合したプレターゲットプローブへ結合する。

【 0 0 0 8 】

第2のターゲット／第2のターゲット部ペアのための共通の例は、ビオチン／ストレプトアビジン又は抗体／抗原システムである。有効であるためには、前記エフェクタープローブは、体内から迅速に排泄（例えば腎臓を介して）されて、非ターゲット蓄積が比較的低く、前記望ましい高腫瘍蓄積を与えることが必要である。従って、これらのプローブは通常は小さい。

【 0 0 0 9 】

核イメージング及び放射線治療では、プレターゲットの概念は、さらに有利となり、前記時間消費性プレターゲットステップが放射性核を用いることなく実施され、一方放射性核を用いる前記第2のターゲットステップはより迅速に実施され得る、からである。後者は、より短寿命の放射性核の使用を可能にし、例えばSPECT試薬の代わりにPET試薬を使用することで患者への放射線暴露を最小化し得る、からである。多配座リガンドシステム（ストレプトアビジン、デンドリマー）と組合せて、MRIでプレターゲット方法を用いることで、ターゲットサイトでのシグナルを増幅させることを可能にする。さらに、一般的に、この方法は汎用の造影剤の使用を容易にする。

【 0 0 1 0 】

一般的に、生物学における（例えば抗体 - 抗原）、及び特にプレターゲット（ビオチン

10

20

30

40

50

- ストレプトアビジン、抗体 / ハプテン、アンチセンスオリゴヌクレオチド) での高度に選択的な相互作用を実行する構造体は非常に大きい。その結果、第 1 のターゲット基としてのペプチド及び小有機部分でプレターゲットすることは、代謝イメージング及び細胞内ターゲットイメージングと同様に、前記第 2 ターゲットのサイズが小さい第 1 の基の使用を的外れとすることから、不十分のままであった。

【 0 0 1 1 】

さらに、現在のプレターゲットシステムは、その生物学的性質に伴うファクタで妨げられる。ビオチンは内因性の分子であり、その共役は血清酵素ビオチニダーゼで切断され得る。アンチセンスプレターゲットが使用される場合には、前記オリゴヌクレオチドは、RNA アーゼ及び DNA アーゼの攻撃対象とされ得る。タンパク質及びペプチドはまた、天然の分解経路の対象とされる。これらの相互作用はさらに、それらの非共有結合性及び動的性質で損なわれ、及びオンターゲット滞留時間に限定され得る。また、内因性ビオチンは、ストレプトアビジン結合についてビオチン共役(conjugates)と競合する。最後に、ストレプトアビジンは非常に免疫性である。

【 0 0 1 2 】

最近の進展は、前記天然 / 生体ターゲット構造 (即ち、ビオチン / ストレプトアビジン、抗体 / ハプテン、アンチセンスオリゴヌクレオチド) に基づくのみプレターゲットに関連する欠点を回避することである。

【 0 0 1 3 】

これについての参照は、国際出願公開第 2 0 1 0 / 0 5 1 5 3 0 号であり、プレターゲットが、テトラジンなどの特定のジエンとトランス - シクロオクテノール (T C O) などのジエノフィルとの反応に基づき説明されている。

【 0 0 1 4 】

これについてのさらなる参照は、Li らの Chemical Communications、2010、46 (42)、p . 8043 - 8045 であり、3, 6 - ジアリール - s - テトラジン及び ¹⁸F ラベル化トランス - シクロオクテンとのディールスアルダー反応に基づく生体共役のための放射性ラベル化方法を記載している。

【 0 0 1 5 】

Ross らの「Angew. Chem. Int., Ed 2010、49、p . 3375 - 3378」は、逆電子要求ディールスアルダー反応を用いることによる腫瘍プレターゲットに関する。

【 0 0 1 6 】

Blackman らの「J. Am. Chem. Soc、2008、130、p . 13518 - 13519」は、逆電子要求ディールスアルダー反応に基づく、迅速生体共役を記載する。

【 0 0 1 7 】

Royzen らの「J. Am. Chem. Soc、2008、130、p . 3760 - 3761」は、金属錯体により誘導された官能基化トランス - シクロオクテンの光化学合成に関する。

【 0 0 1 8 】

かかるシステムに基づいて、比較的迅速な反応が得られるけれど、これは前記ビオチン - ストレプトアビジンシステムの反応性とは異なる。従って、この欠点を回避するために、前記反応の第 1 の要求、即ち速度を犠牲にする。従って、前記の生体分子に基づかないシステムであり、なお望ましい迅速な反応速度を持つシステムを提供することが望まれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 9 】

【特許文献 1】国際出願公開第 2 0 1 0 / 0 5 1 5 3 0 号

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

【非特許文献1】Li et al、Chemical Communications、2010、46(42)、p. 8043 - 8045

【非特許文献1】Rossin et al、Angew. Chem. Int., Ed 2010、49、p. 3375 - 3378

【非特許文献2】Blackman et al、J. Am. Chem. Soc、2008、130、p. 13518 - 13519

【非特許文献3】Royzen et al、J. Am. Chem. Soc、2008、130、p. 3760 - 3761

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 2 1 】

本発明は、プレターゲットキット、プレターゲット方法及びその使用試薬を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

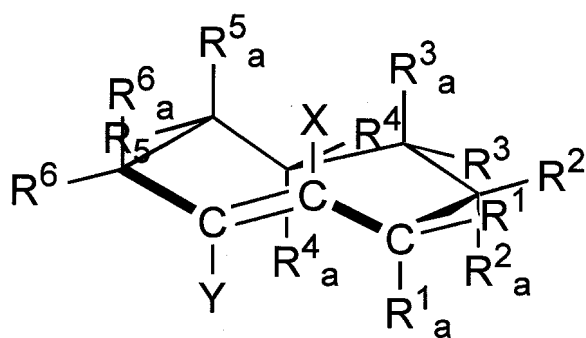
【 0 0 2 2 】

前記望みに対応するために、本発明は、1つの側面で、ターゲット化医用イメージング及び/又は治療のためのキットを提供し、前記キットは少なくとも1つのプレターゲットプローブ及び少なくとも1つのエフェクタープローブを含み、前記プレターゲットプローブが第1のターゲット部及び第1の生体直交反応性基を、前記エフェクタープローブが、ラベル又は医薬的活性化合物などのエフェクター部及び第2の生体直交反応性基を含み、前記第1及び第2の生体直交反応性基のいずれか一方がジエノフィルであり、前記第1及び第2の生体直交反応性基の他方がジエンであり、前記ジエノフィルが式(1)を満たす8-員環ジエノフィルであり：

20

【 0 0 2 3 】

【化1】



30

(1)

ここでRの位置はエカトリアルであり、R_aの位置はアキシャルであり、X、Y、R及びR_aのそれぞれは独立して、H又は最大6の場合において、アルキル、アリール、O-アリール、O-アルキル、S-アリール、S-アルキル、S(O)-アリール、S(O)-アルキル、S(O)₂-アリール、S(O)₂-アルキル、Si-アリール、Si-アルキル、Si-O-アルキル、OCO-アルキル、OCO-アリール、SCO-アルキル、SCO-アリール、OCS-アルキル、OCS-アリール、SCS-アルキル、SCS-アリール、F、Cl、Br、I、N₃、SO₂H、SO₃H、SO₄H、PO₄H、OH、SH、NO₂、NO、CN、OCN、SCN、NCO、NCS、CF₃、NR'R''(R'及びR''はそれぞれ独立してH又はアルキル、アリールである)、C(=O)O-アルキル、C(=O)O-アリール、C(=S)O-アルキル、C(=S)O-アリール、C(=O)S-アリール、C(=S)S-アルキル、C(=S)S-アリール、C(=O)NR'R''(ここでR'及びR''はそれぞれ独立してH、アリール又はアルキルである)、NR'CO-アルキル(ここでR'はH、アルキル又はアリールである)、

40

50

NR'CO-アリアル(ここでR'はH、アルキル又はアリアルである)、NR'C(=O)O-アルキル(ここでR'はH、アルキル又はアリアルである)、NR'C(=O)O-アリアル(ここでR'はH、アルキル又はアリアルである)、OCONR'-アルキル(ここでR'はH、アルキル又はアリアルである)、OCONR'-アリアル(ここでR'はH、アルキル又はアリアルである)、NR'CONR''-アルキル(ここでR'及びR''はそれぞれ独立してH、アルキル又はアルールである)、NR'CONR''-アリアル(ここでR'及びR''はそれぞれ独立してH、アルキル又はアルールである)、NR'CSNR''-アルキル(ここでR'及びR''はそれぞれ独立してH、アルキル又はアルールである)、NR'CSNR''-アリアル(ここでR'及びR''はそれぞれ独立してH、アルキル又はアルールである)、CR'NR''(ここでR'及びR''はそれぞれ独立してH、アルキル又はアルールである); かなる群から選択される置換基を表し; R_aの1つは、場合によりスペーサーを介して前記プレターゲットプロープ又は前記エフェクタープロープへのリンカー部に含まれ; R又はR_a部分の2つが共に環を形成してよく; 及び少なくとも1つかつ最大4つのR_aは水素ではない。

10

【0024】

他の側面で、本発明は、プレターゲット方法、並びに同方法で使用するプレターゲット試薬、及びこのキットが使用されるターゲット化医用イメージング又は治療を提供する。

【0025】

さらなる側面で、本発明は、動物又はヒトでのプレターゲット方法の使用のための前記式(1)を満たす化合物である。

20

【0026】

さらに他の側面は、本発明は、レトロディールスアルダー反応に基づくプレターゲット方法でのジエノフィル反応物として1以上のアキシャル置換基を持つトランスシクロオクテンの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、前記のプレターゲット方法の一般的スキームを示す。

【図2】図2は、(3,6)-ジ-(2-ピリジル)-s-テトラジン及びE-シクロオクテンとの間の[4+2]ディールスアルダー反応、続いてレトロディールスアルダー反応により生成物とN₂が形成される反応スキームを示す。前記トランスシクロオクテン誘導体は古典的ディールスアルダー反応でのような電子吸引性基を含まないことから、このタイプのディールスアルダー反応は古典的反応とは区別され、しばしば「逆電子要求ディールスアルダー反応」と称する。以下の記載で、両方の反応ステップの連続、即ち最初のディールスアルダーシクロ付加(通常逆電子要求ディールスアルダーシクロ付加)及び続くレトロディールスアルダー反応は、短く「レトロディールスアルダー反応」又は「レトロ-D A」と称する。

30

【図3】図3の(a)及び(b)は、レトロディールスアルダー化学を用いるプレターゲットのための一般的スキームを示す。

【図4】図4は、TCO-変性mAb(B)及び放射性ラベル化テトラジン(A)が関与するレトロ-D Aにより、腫瘍プレターゲットのスキームを示す。

40

【図5】実施例で参照される化合物の合成スキームを示す。

【図6】実施例で参照される化合物の合成スキームを示す。

【図7】実施例で参照される化合物の合成スキームを示す。

【図8】実施例で参照される化合物の合成スキームを示す。

【図9】実施例で参照される化合物の合成スキームを示す。

【図10】実施例で参照される化合物の合成スキームを示す。

【図11】図11は、シクロオクテノールの立体化学、以下説明するE-マイナー及びE-メジャー異性体及びZ異性体の比較を示す。

【図12】図12はテトラジン-DOTAプロープ28の構造を示す。

【図13】図13は、3つの異なるシクロオクテンジエノフィルのマウス中でのインビボ

50

安定性を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、生きたマウスの S P E C T / C T 投影像を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、テトラジンブローブ 2 8 の別合成手順、及び対応する G d - 錯体、2 8 - G d ^{I I I} の合成を示す。

【図 1 6】図 1 6 は、テトラジンモデルブローブ 3 5、3 8、4 0 及び 4 2 の合成経路を示す。

【図 1 7】図 1 7 は新規 T C O の合成経路を示す。

【図 1 8】図 1 8 は、低濃度の P B S 中で T C O (2 0 a 又は 2 0 b) 及び 1 7 7 L u - テトラジン 2 8 (1 当量) 添加キャリアとの基準化反応収率を与える。

【図 1 9】図 1 9 は、血液消失について補正された C C 4 9 結合 T C O 2 0 b のインビボ安定性を示す。データ点は、平均を表し、エラーバーは、1 標準偏差 (n = 3) を表す。

【図 2 0】図 2 0 は、C C 4 9 - T C O (2 0 b) 構造体の血液曲線を示す。データ点は、平均を表し、エラーバーは、1 標準偏差 (n = 3) を表す。

【図 2 1】図 2 1 は、無腫瘍マウスでの C C 4 9 - T C O (2 0 b) の生体内分布を表す。バーは平均を表し、エラーバーは、1 標準偏差 (n = 3) を表す。

【図 2 2】図 2 2 は、無腫瘍マウス (n = 3) での ^{1 2 5} I - C C 4 9 及び ^{1 2 5} I - C C 4 9 - T C O 4 4 b (7 . 5) の血中動態を示す。データは、1 グラム当たりのパーセント注入用量 (% I D / g) として、1 標準偏差 (誤差バー) と共に表される。

【図 2 3】図 2 3 は、m A b 注入 4 日後無腫瘍マウス (n = 3) での ^{1 2 5} I - C C 4 9 (白棒) 及び ^{1 2 5} I - C C 4 9 - T C O 4 4 b (7 . 5) (黒棒) の生体分布を表す。バーは、1 グラム当たりのパーセント注入用量 (% I D / g) として、1 標準偏差 (誤差バー) と共に表される。

【図 2 4】図 2 4 は、C C 4 9 へ共役された T C O 4 4 b のインビボ安定性を示す。データ点は、3 回の測定の平均と 1 標準偏差 (誤差バー) と共に示され、これは 2 次多項式でフィッティング (P r i s m G r a p h P a d v . 5 . 0 1) されている。

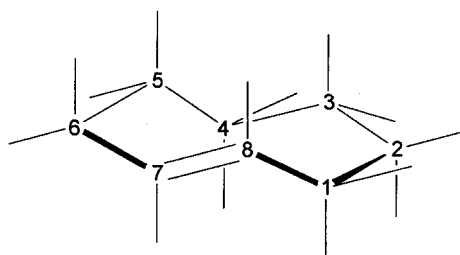
【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明で使用される歪シクロオクテングジエノフィルは以下 E - シクロオクテンとする。前記従来命名を参照する上で理解されるべきことは、置換 X 又は Y の結果として、前記置換基の位置及び分子量に依存して、同じシクロオクテン異性体が形式的に Z 異性体となり得る、ということである。本発明及び本発明のいずれの置換変更例において、形式的に「E」又は「Z」、即ち「シス」又は「トランス」異性体かどうかは、無置換トランス - シクロオクテン又は無置換 E - シクロオクテンの誘導体と考えられる。用語「トランス - シクロオクテン」(T C O) 並びに E - シクロオクテンは、互いに交換可能に使用され、本発明の全てのジエノフィルについて維持され、又置換基が形式的に逆の命名を必要とする場合であっても、維持される。即ち、本発明は、シクロオクテンに関し、ここで以下で炭素原子 1 及び 6 と数字付けされた炭素原子が E (エントゲーゲン) 即ちトランス位置にある。

【0029】

【化 2】



一般的意味において、本発明は、ジエノフィルとして、誘導体化されたトランス - シク

10

20

30

40

50

ロオクテン、例えばトランス - シクロオクテノールの形態を使用するシステムにおいて、前記異性体は、リンカー構造に誘導体化するために使用される前記ヒドロキシル基が、アキシャル位置となるように選択されるという認識に基づく。E - シクロオクテノールは、所謂冠型立体配座であるが、2つの異性体を有し、その1つはOHをエクソトリアル位置に持ちメジャー異性体となり、他の1つはOHをアキシャル位置に持ちマイナー異性体となる。後者異性体は、本発明により選択され以下「E - マイナー」と表記する。

【0030】

理論に縛られるものではないが、本発明者は、この知見に基づき、TCOの1以上のアキシャル置換基の存在が、前記レトロディールスアルダー反応に基づくプレターゲット方法でのより高い反応性の必要性に答えることができるものである、と考える。

10

【0031】

広い意味で、本発明は従って、前記の式(1)を参照して与えられた置換基の定義を超えるものである。1以上のアキシャル置換基が存在するという事実は、結果としてより高いHOMOエネルギーとなる、と考えられる。当業者に知られるHOMOは、最高占有分子軌道の略である。本発明によれば、MOPACシミュレーションが前記TCOのHOMOエネルギーを決定するために使用される。MOPAC(分子軌道パッケージ)は計算化学の分野ではよく知られたソフトウェアである。前記MOPACソフトウェアは、AMITIEやPM3を含むいくつかのよく知られた半経験的分子軌道計算方法を取り込んでいる。用語AMI及びPM3は異なるハミルトニアン、即ちオースチンモデル1及びパラメータ化モデル3ハミルトニアンを意味する(AMIについては、M. J. S. Dewar、et al、J. Am. Chem. Soc、107、3902(1985); PM3についてはJ. J. P. Stewart、J. Comput. Chem.、10、209(1989)及びJ. Comput. Chem.、10、221(1989)を参照)。

20

【0032】

本発明においては、コンピュータ環境下で、シクロオクテン誘導体の分子構造を与え、それぞれの分子構造を形成について最低エネルギーを決定することにより最適化し、前記AMI及びPM3ハミルトニアンを決定し、及びそれにより最高占有分子軌道(HOMO)を決定する、ことを含む方法が使用される。

【0033】

表6のMOPACデータは、アキシャル置換基の存在は、トランス - シクロオクテン環に増加したHOMOエネルギーを与える目的に役立つ、ということを示す。

30

【0034】

本発明は、さらに、具体的な実施態様及び添付図面を参照して説明されるが、本発明はこれらに限定されるものではなく、特許請求の範囲にのみ限定される。請求項の全ての参照符号は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されてはならない。記載される図面は概略的なものであり限定するものではない。図面で、いくつかの要素のサイズは誇張されている場合があるが、これは説明のためだけに描かれており寸法通りではない場合がある。用語「含む」は、本発明の説明及び特許請求の範囲で使用される場合には、他の要素又はステップを排除するものではない。単数名詞を示す定冠詞もしくは不定冠詞「1つの」、「ひとつの」、「the」は、特に記載がない限り、複数を含む。

40

【0035】

さらに留意すべきことは、詳細な説明及び特許請求の範囲で使用される用語「含む」は、続いて列挙される手段に限定されるものではなく、他の要素及びステップを排除するものではない、ということである。従って、「手段A及びBを含む装置」なる表現の範囲は、部品A及びBのみからなる装置に限定されるものではない。本発明に関しては、これは、前記装置の単に関連する部品がA及びBである、ということ意味する。

【0036】

いくつかの化学式で、「アルキル」及び「アリアル」が参照される。この観点で、「アルキル」とは、それぞれ独立して、場合によりO、N又はSなどの1~3のヘテロ原子を

50

含み得る、炭素原子 10 まで、好ましくは 1 ~ 6 の炭素原子の、脂肪族、直鎖、分岐又は環状アルキル基を示し、「アリール」とは、それぞれ独立して、場合により N 又は S などの 1 ~ 3 のヘテロ原子を含み得る、炭素原子 10 までの芳香族又はヘテロ芳香族基を示す。いくつかの式で、基又は置換基は、「A」、「B」、「X」、「Y」、及び種々の番号付き「R」基などの文字を参照して示される。これらの文字の定義は、それぞれの式に付されており、即ち特に記載のない限り異なる式ではこれらの文字はそれぞれ独立して異なる意味を持ち得る。

【0037】

本発明のさらなる好ましい実施態様では、以下いくつかの化学式において、「アルキル」及び「アリール」が参照される。この側面で、「アルキル」とは、それぞれ独立して、場合により 1 ~ 10 の O、N 又は S などのヘテロ原子を含み得る、10 までの炭素原子の、脂肪族、直鎖、分岐、飽和、不飽和及び / 又は環状ヒドロカルビル基を示し、及び「アリール」とは、それぞれ独立して、20 炭素原子までの芳香族又はヘテロ芳香族基を示し、これは場合により置換されており、且つ場合により 1 ~ 10 の O、N 又は S などのヘテロ原子を含み得る。「アリール」基はまた、「アルキルアリール」又は「アリールアルキル」基（簡単例：ベンジル基）を含む。「アルキル」、「アリール」、「アルキルアリール」及び「アリールアルキル」が含み得る炭素原子の数は、かかる用語に先行する指定用語により示される（砂割、 C_{1-10} アルキルとは、前記アルキル基が炭素原子を 1 ~ 10 含み得る、ということの意味する）。本発明のいくつかの化合物は、キラル中心及び / 又は互変異性体（トートマー）を含み得るが、全てのエナンチオマー、ジアステレオマー及び互変異性体は本発明の範囲に含まれる。

【0038】

レトロディールスアルダー反応

前記レトロディールスアルダーカップリング化学は一般的には、1 対の反応物を含み、これらはカップリングして不安定な中間体を形成し、前記中間体はレトロディールスアルダー反応の唯一の副生成物として小分子（これは出発物質に依存し、例えば N_2 、 CO_2 、 RCN など）を除去して安定な生成物を形成する。前記一対の反応物は、1 つの反応物として（即ち 1 つの生体直交反応性基）、テトラジンの誘導体、例えば電子欠乏テトラジンなどの好適なジエン、及び他の反応物として（即ち他の生体直交反応性基）、式（1）による歪シクロオクテンを含む。

【0039】

例えば電子欠乏性（置換）テトラジンと本発明の歪 E - シクロオクテンとの例外的に速い反応により、中間体を経て、 N_2 を $[4 + 2]$ レトロディールスアルダーシクロ付加での唯一の副生成物として除去することで安定なジヒドロピリダジンへ再編成される連結中間体となる。これは図 2 に示される。

【0040】

前記 2 つの反応種は非生物学的であり、従って、インビボで迅速に代謝されることはない。それらは生体直交性であり、例えばこれらは生理的媒体中でお互いに選択的に反応する。その利点は、前記ジエン及びシクロオクテンは共に、細胞の内部又は表面及び血清などの他の全ての領域において生体分子とは本質的に反応しない、ということである。従って、本発明の前記化合物及び方法は、生体細胞、組織又は器官で使用され得る。さらに、前記反応基は比較的小さく、生体サイズを大きく変化させることなく生体サンプル又は生体器官内に導入可能である。 $[4 + 2]$ レトロディールスアルダー反応を用いることで、抗体などの大きいサイズの第 1 のターゲット部と、ラベル化剤、又は小さい反応相手、例えばテトラジン又はシクロオクテンを用いる他の分子と結合させることが可能となる。より有利には、比較的小さい、例えばペプチドである第 1 のターゲット部は、ラベル化剤又は小さい（適合化された）反応相手、例えばテトラジン又はシクロオクテンを用いる他の分子と結合させることが可能となる。プレターゲットプローブ及びエフェクタープローブのサイズ及び性質は、第 2 のターゲット及び第 2 のターゲット部でそれほど影響されず、（プレ）ターゲット方法を小さいターゲット部のために使用されることを可能にする。この

ために、他の組織がターゲットされ得ることとなり、即ち前記プローブの目標は、抗体 - ストレプトアビジンによる現在のプレターゲット方法の場合のように、血管系及び間質空間に限定されるものではない。

【0041】

前記逆電子要求ディールスアルダー反応、及び反応性化学種のペアの挙動についての参考文献は：「Thalhammer, F; Wallfahner, U; Sauer, J, Tetrahedron Letters, 1990, 31(47), 6851 - 6854」; 「Wijnen, JW; Zavarise, S; Engberts, JBFN, Journal Of Organic Chemistry, 1996, 61, 2001 - 2005」; 「Blackman, ML; Royzen, M; Fox, JM, Journal Of The American Chemical Society, 2008, 130(41), 13518 - 19」; 「R. Rossin, P. Renart Verkerk, Sandra M. van den Bosch, R. C. M. Vuld ers, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, Angew Chem Int Ed 2010, 49, 3375」; 「N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, Angew Chem Int Ed 2009, 48, 7013」及び「Devaraj et al, Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 1 - 5」を含む。

10

【0042】

理解されるべきことは、広い意味で、本発明により、前記カップリング化学は、プレターゲットで使用され得る基本的にいずれのペアの、分子、基又は部分に適用され得る。即ち、かかる対の1つは、第1のターゲット部を持ち、これは第1のターゲットへ結合でき、及びさらに少なくとも1つの第2のターゲットを含む。他の1つは、前記第2のターゲットとの結合に使用される好適な第2のターゲット部であり、さらに、治療作用（通常は医薬活性化化合物）を発揮するか、又はイメージング技術（即ちラベル）を適用されるか、又はその両方のために好適な部分を含む。

20

【0043】

従って、本発明によれば、プレターゲットプローブ及びエフェクタープローブのいずれかは、前記のアキシャル置換されたシクロオクテンで官能基化され、かつ他方はテトラジン又は他の好適なジエンで官能基化されている。これは図3に示される。スキーム上（図3a）は、プレターゲットプローブを示し、これはジピリジルテトラジンを含み、これはリンカー部（場合によりフレキシブルなスペーサーを含む）を介して前記第1のターゲット部としての抗体へ結合されており、及びエフェクタープローブがリンカー（フレキシブルなスペーサー）を介して検出可能なラベルに結合されている（第2のターゲット化部分としての）シクロオクテンを有する。スキーム下（図3b）は、丁度逆の場合を示し、即ちプレターゲットプローブがシクロオクテンを含み、及びエフェクタープローブがテトラジンを含む。

30

【0044】

図には立体化学が明記されていないが、本発明において前記シクロオクテンが前記式（1）によるアキシャル置換シクロオクテンであることは、理解される。

40

【0045】

ジエノフィル

本発明の基本的な成果は、ジエノフィルが選択されること、即ち前記の式（1）によるアキシャル置換TCO、これにより前記生体直交カップリング反応の反応速度を10倍以上増加させることができる、ということである。又は言い換えると、反応時間は当初必要とされていた時間のほんの10%である、ということである。さらに言い換えると、1つの反応物の濃度が10倍低くてよいことである。

【0046】

広い意味で、ジエノフィルは、少なくとも1つアキシャル置換基を持つトランス - シク

50

ロオクテンであり、即ち少なくとも1つの飽和炭素原子の少なくとも1つの位置が水素ではない、ということである。

【0047】

前記の通り、少なくとも1つ且つ最大4の R_a は水素ではなく、これはかかる R_a が置換基又はリンカー構造に一部であることを意味する。好ましくは非水素の R_a の数は1又は2である。

【0048】

より好ましくは、少なくとも1つ、最大4の非水素 R_a は、 R^2_a 、 R^3_a 、 R^4_a 及び R^5_a からなる群から選択される位置にある。さらに好ましくは、 R^2_a 、 R^3_a 、 R^4_a 及び R^5_a の1又は2が非水素である。最も好ましくは、置換基又はリンカー構造が、 R^3_a 及び R^4_a の1つ又は両方として存在することである。

10

【0049】

好ましくは、前記置換基は前記式(1)の説明に定義された基から選択される。より好ましくは、前記置換基 R_a はアルキル基又はO-アルキル基、より好ましくはメチル又はO-t-ブチル基である。

【0050】

留意すべきことは、 R_a の前記オプショ^ン及び選択は、エカトリアル位置(即ち前記式(1)のR基)に、他の炭素原子又は同じ炭素原子上にいずれかの置換基が存在するかどうかには関係ない、ということである。好ましくは、1又は2のアキシャル置換基に加えてまた、1又は2のエカトリアル置換基が存在し、前記置換基が好ましくはリンカー構造の一部分であるR又は R_a を含む。しかし、他の選択では、合成の努力と反応性の間のバランスをとるために、1又は2の R_a が水素ではなく、かつ全ての他のR及び R_a は水素である。

20

【0051】

さらなる選択では、X及び/又はYは、O-アルキル又はアルキルであり、さらの好ましくはメチルである。

【0052】

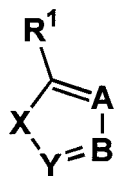
ジエン

当業者は、前記レトロディールスアルダー反応で反応性であるジエンの多くを認識する。好ましくは、ジエンは、以下式(2)から(5)に示される。

30

【0053】

【化3】



(2)

ここで、 R^1 は、H、アルキル、アリール、 CF_3 、 CF_2 、 CF_2-R' 、 OR' 、 SR' 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 、 $C(=O)SR'$ 、 $C(=S)OR'$ 、 $C(=S)SR'$ 、 $C(=O)R'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''$ 、 $NR'C(=O)R''$ 、 $NR'C(=S)R''$ 、 $NR'C(=O)OR''$ 、 $NR'C(=S)OR''$ 、 $NR'C(=O)SR''$ 、 $NR'(=S)SR''$ 、 $NR'C(=O)NR''R''$ 、 $NR'C(=S)NR'R''R''$ (ここで、 R' 、 R'' 、 R''' はそれぞれ独立してH、アリール又はアルキルである)からなる群から選択され；A及びBはそれぞれ独立して、アルキル置換炭素、アリール置換炭素、窒素、 N^+O^- 、 N^+R (A及びBは共に炭素でない場合にRはアルキルである)からなる群から選択され；Xは、O、N-アルキル及びC=Oからなる群から選択され、及びYは、CRであり、RはH、アルキル、アリール、 $C(=O)OR'$ 、 $C(=O)SR'$ 、

40

50

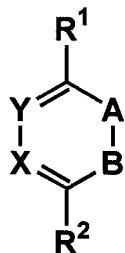
$C(=S)OR'$ 、 $C(=S)SR'$ 、 $C(=O)NR'R''$ （ここで、 R' 、 R'' はそれぞれ独立してH、アリール又はアルキルである）からなる群から選択される。

【0054】

シクロオクテンの反応相手として特に好適なジエンは：

【0055】

【化4】



10

(3)

であり、ここで、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立して、水素、アルキル、アリール、 CF_3 、 CF_2-R' 、 NO_2 、 OR' 、 SR' 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $OC(=O)R'$ 、 $SC(=O)R'$ 、 $OC(=S)R'$ 、 $SC(=S)R'$ 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'R''$ 、 $C(=O)OR'$ 、 $C(=O)SR'$ 、 $C(=S)OR'$ 、 $C(=S)SR'$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''$ 、 $NR'C(=O)R'$ 、 $NR'C(=S)R'$ 、 $NR'C(=O)OR'$ 、 $NR'C(=S)OR'$ 、 $NR'C(=O)SR'$ 、 $NR'C(=S)SR'$ 、 $OC(=O)NR'R''$ 、 $SC(=O)NR'R''$ 、 $OC(=S)NR'R''$ 、 $SC(=S)NR'R''$ 、 $NR'C(=O)NR'R''$ 、 $NR'C(=S)NR'R''$ （ここで R' 及び R'' はそれぞれ独立してH、アリール及びアルキルであり、 R''' は独立してアリール又はアルキルである）からなる群から選択され；Aは、N-アルキル、N-アリール、 $C=O$ 及び CN -アルキルからなる群から選択され；BはO又はSであり；Xは、N、CH、C-アルキル、C-アリール、 $CC(=O)R'$ 、 $CC(=S)R'$ 、 $CS(=O)R'$ 、 $CS(=O)_2R'$ 、 $CC(=O)O-R'$ 、 $CC(=O)S-R'$ 、 $CC(=S)O-R'$ 、 $CC(=S)S-R'$ 、 $CC(=O)NR'R''$ 、 $CC(=S)NR'R''$ （ここで R' 及び R'' はそれぞれ独立してH、アリール又はアルキル基であり、 R''' は独立してアリール又はアルキルである）から成る群から選択され；Yは、CH、C-アルキル、C-アリール、N及び N^+O^- からなる群から選択される。

20

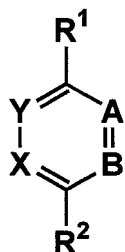
30

【0056】

シクロオクテンの反応相手として特に好適な他のジエンは：

【0057】

【化5】



40

(4)

であり、

ここで、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立して、水素、アルキル、アリール、 CF_3 、 CF_2-R' 、 NO_2 、 OR' 、 SR' 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $OC(=O)R'$

50

$'$ 、 $SC(=O)R'''$ 、 $OC(=S)R'''$ 、 $SC(=S)R'''$ 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'''$ 、 $S(=O)_2NR''R'''$ 、 $C(=O)OR'$ 、 $C(=O)SR'$ 、 $C(=S)OR'$ 、 $C(=S)SR'$ 、 $C(=O)NR''R'''$ 、 $C(=S)NR''R'''$ 、 $NR''R'''$ 、 $NR''C(=O)R'''$ 、 $NR''C(=S)R'''$ 、 $NR''C(=O)OR'''$ 、 $NR''C(=S)OR'''$ 、 $NR''C(=O)SR'''$ 、 $NR''C(=S)SR'''$ 、 $OC(=O)NR''R'''$ 、 $SC(=O)NR''R'''$ 、 $OC(=S)NR''R'''$ 、 $SC(=S)NR''R'''$ 、 $NR''C(=O)NR''R'''$ 、 $NR''C(=S)NR''R'''$ （ここで R' 及び R'' はそれぞれ独立してH、アリール又はアルキルであり、 R''' は独立してアリール又はアルキルである）からなる群から選択され；Aは、N、C-アルキル、C-アリール及び N^+O^- からなる群から選択され；BはNであり；Xは、N、CH、C-アルキル、C-アリール、 $CC(=O)R'$ 、 $CC(=S)R'$ 、 $CS(=O)R'$ 、 $CS(=O)_2R''R'''$ 、 $CC(=O)O-R'$ 、 $CC(=O)S-R'$ 、 $CC(=S)O-R'$ 、 $CC(=S)S-R'$ 、 $CC(=O)NR''R'''$ 、 $CC(=S)NR''R'''$ （ここで R' 及び R'' はそれぞれ独立してH、アリール又はアルキルであり、 R''' は独立してアリール又はアルキルである）から成る群から選択され；Yは、CH、C-アルキル、C-アリール、N及び N^+O^- からなる群から選択される。

10

【0058】

特に有用なテトラジン誘導体は、電子欠乏テトラジン、即ち一般的に電子供与として保持せず、好ましくは電気吸引性置換基を持つ基又は部分で置換されたテトラジンである。

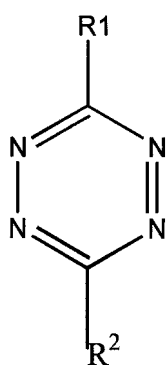
20

【0059】

これらの電子欠乏テトラジンは一般的には次の構造式を満足し：

【0060】

【化6】



30

(5)

ここで R^1 及び R^2 はそれぞれ独立して、H、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2,6-ピリミジル、2,5-ピリミジル、3,5-ピリミジル、2,4-ピリミジル又はフェニルであって、これらは場合により NO_2 、F、Cl、 CF_3 、CN、COOH、COOR、CONH₂、CONHR、CONR₂、CHO、COR、SO₂R、SO₂OR、NO、Arなどの1以上の電子吸引基で置換されていてもよい（RはC₁~C₆アルキルであり、Arとは芳香族基、特にフェニル、ピリジル又はナフチル基を表す）、からなる群から選択される置換基を表す。

40

【0061】

式(2)から(5)のそれぞれによる化合物で、 R^1 及び R^2 基（そのX及びY基を含む）は、さらに、以下説明するような好適なリンカー又はスペーサーを含み得る。同様に且つ独立して、前記式(1)のジエノフィルはさらに、以下説明するような好適なリンカー又はスペーサーを含み得る。

【0062】

50

1つの実施態様によると、本発明はターゲットイメージングのために使用される。

この実施態様によると、特異的第1のターゲットのイメージングが、前記プレターゲットプローブの前記第1のターゲット部の特異的な結合及びこの結合を前記エフェクタープローブに含まれる検出可能なラベルを用いて検出することにより達成され得る。

【0063】

第1のターゲット

本発明で使用する「第1のターゲット」は、診断及び/又はイメージング方法で検出されるターゲット、及び/又は変更され、結合され又は医薬活性化化合物、又は他の治療方法により対処されるターゲットに関連する。

【0064】

前記第1のターゲットは、ヒト又は動物体内又は病原体や寄生虫のいずれの好適なターゲット、例えば、細胞膜や細胞壁などの細胞、細胞膜受容体のような受容体、ゴルジ体やミトコンドリアなどの細胞内構造、酵素、受容体、DNA、RNA、ウイルスまたはウイルス粒子、抗体、タンパク質、炭水化物、単糖類、多糖類、サイトカイン、ホルモン、ステロイド、ソマトスタチン受容体、モノアミン酸化酵素、ムスカリン受容体、心筋神経系、例えば白血球上ロイコトリエン受容体、ウロキナーゼプラスミノージェン活性化因子受容体(μPAR)、葉酸受容体、アポトーシスマーカー、(抗)血管新生マーカー、ガストリン受容体、ドーパミン系、セロトニン作動系、GABA作動性システム、アドレナリン作動系、コリン作動系、オポイド受容体、GPIIb/IIIa受容体や他の血栓関連受容体、フィブリン、カルシトニン受容体、タフシン受容体、インテグリン受容体、VEGF/EGF受容体、EGFマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、P/E/L-セレクチン受容体、LDL受容体、P-糖蛋白質、ニューロテンシン受容体、神経ペプチド受容体、サブスタンスP受容体、NK受容体、CCR受容体、シグマ受容体、インターロイキン受容体、単純ヘルペスウイルスチロシンキナーゼ、ヒトチロシンキナーゼを含む群から選択され得る。

【0065】

本発明の特に具体的な実施態様によると、前記第1のターゲットはレセプターなどのタンパク質である。又は、前記第1のターゲットは、感染や癌などの疾患の際にアップレギュレートされる代謝経路であり得、例えばDNA合成、タンパク質合成、膜合成及び炭水化物取り込みなどである。疾患組織で、前記マーカーは健康な組織とは異なり、早期検出、特異的診断及び治療、特にターゲット治療のためのユニークな可能性を提供し得る。

【0066】

プレターゲットプローブ

プレターゲットプローブは、興味対象の前記第1のターゲットへ結合し得る部分を含む。

【0067】

ターゲット部分は通常は、細胞表面ターゲット(例えば膜レセプター)、構造タンパク質(例えばアミロイド斑)、又は細胞内ターゲット(例えば、RNA、DNA、酵素、細胞シグナル伝達系)に親和性を持つ構造体である。これらの部分は、抗体(断片)、タンパク質、アプタマー、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、並びに特定の疾患又は異常において蓄積されることが知られているペプチド、ペプチド及び有機医薬化合物である得る。

【0068】

本発明のキットで使用される好適な第1のターゲット部分の具体的な実施態様は、本書に記載され、レセプター結合性ペプチド及び抗体を含む。本発明の特定の実施態様は、ペプチドなどの小さいターゲット部分の使用に関し、それにより細胞透過性ターゲットプローブを得ることが可能となる。

【0069】

本発明で使用する「第1のターゲット部分」は、第1のターゲットに結合する前記ターゲットプローブの部分に関する。第1のターゲット部分の具体的例示はレセプターに結

10

20

30

40

50

合するペプチド又はタンパク質である。第1のターゲット部分の他の例示は細胞性化合物に結合する抗体又はその断片である。抗体は、非タンパク質性化合物に、並びにタンパク質又はペプチドに産生させることも可能である。他の第1のターゲット部分は、アプタマー、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖と同様に、ペプチド及び有機医薬化合物からも作成され得る。第1のターゲット部分は好ましくは、高特異性、高親和性で、場合により共有結合で結合し、前記第1のターゲットとの結合は好ましくは体内安定である。

【0070】

前記列挙の第1のターゲットの特異的ターゲットを可能にするために、前記ターゲットプローブの第1のターゲット部分は、限定されるものではないが、Fab2、Fab、scFVなどの抗体断片、二重特異的抗体、ポリマー（EPR効果による腫瘍ターゲット化）、タンパク質、ペプチド例えばオクトレオチド及び誘導体、VIP、MSH、LHRH、走化性ペプチド、ボンベシン、エラスチン、ペプチド類似物、炭水化物、単糖類、多糖類、ウイルス、全細胞、ファージ、医薬物、化学療法剤、レセプター作動薬及び拮抗剤、サイトカイン、ホルモン、ステロイドが含まれる。本発明に含まれる有機化合物の例は、エストロゲン、例えばエストラジオール、アンドロゲン、プロゲステロン、コルチコステロイド、パクリタキセル、エトボシド、ドキソルブリン、メトトレキサート、葉酸及びコレステロールであり、又はそれらから誘導される。

【0071】

本発明の1つの特定の実施態様によると、前記第1のターゲットは、レセプターであり、好適な第1のターゲット化部分は、限定されるものではないが、このようなレセプターのリガンド又はその一部分であってなお前記レセプターに結合するもの、例えばレセプター結合性タンパク質リガンドの場合のレセプター結合性ペプチドを包含する。

【0072】

タンパク質性の第1のターゲット部分の他の例は、アルファ、ベータ、ガンマインターフェロンなどのインターフェロン、インターロイキン、及び腫瘍成長因子などのタンパク質成長因子、例えばアルファ、ベータ腫瘍成長因子、血小板由来成長因子（PDGF）、μPARターゲットタンパク質、アポリポタンパク質、LDL、アネキシンV、エンドスタチン及びアンジオスタチンを含む。

【0073】

第1のターゲット部分の他の例は、例えば前記第1のターゲットと相補的である、DNA、RNA、PNA及びLNAを含む。

【0074】

本発明の1つの特定の実施態様によると、細胞内の第1のターゲットへ結合し得る小さい脂質親和性第1のターゲット部分が使用される。

【0075】

本発明のさらなる特定の実施態様によると、前記第1のターゲット及び第1のターゲット部分は、癌、炎症、感染症、心血管疾患などの組織又は疾患、血栓、アテローム性動脈硬化症などの心臓欠陥疾患、脳卒中などの低酸素サイト、腫瘍、心臓血管疾患、脳疾患、アポトーシス、血管形成、器官、およびレポーター遺伝子/酵素などの特異的ターゲット化又は強調ターゲット化を可能にするように選択させる。これは、組織、細胞又は疾患特異的発現を用いて第1のターゲットを選択することで達成できる。例えば、膜葉酸レセプターは、葉酸エステル及びメトトレキサートなどの類似物の細胞内蓄積を媒介する。発現は正常組織では限定されているが、種々の腫瘍細胞タイプではレセプターが過剰発現している。

【0076】

1つの実施態様によると、前記ターゲットプローブ及び前記エフェクタープローブは、多量体化合物であって、複数の第1の及び/又は第2のターゲット及び/又はターゲット部分を含む。これらの多量体化合物は、ポリマー、 dendrimer、リポソーム、ポリマー粒子又は他のポリマー性構造体であり得る。検出シグナルの増幅の特に興味あること

は、１以上の第２のターゲットを持つターゲットプローブであり、これはいくつかのエフェクタープローブの結合を可能にする。

【００７７】

プレターゲットプローブはさらに、前記の第１の生体直交反応基を持つ。この基は、「第２のターゲット」として、即ち前記レトロディールスアルダーカップリング化学の第１の反応相手を与える前記ターゲットプローブの部分として作用する。

【００７８】

前記第２のターゲットは前記の通り、前記カップリング反応のいずれかの相手となり得る。即ち、１つの実施態様では、電子欠乏テトラジンである。他の実施態様では、前記式（１）のアキシャル置換ＴＣＯである。

【００７９】

前記プレターゲットでは、前記第１のターゲット部分及び前記第１の生体直交反応基はお互いに直接リンクされている。これらはまた、お互いにリンカーを介して結合され、さらにこれらは共に第１のターゲット足場（*scaffolds*）、例えばポリペプチドなどの生体ポリマーにリンクされ得る。即ち、最も単純な意味で、前記リンカー部は１つの結合である。好適なリンカー部はさらに、限定されるものではないが、２から２００、特に３から１１３、及び好ましくは５から５０の間の繰り返し単位のポリエチレングリコール鎖（*PEG*）を含む。前記*PEG*鎖長を調節することで、生理的システム中での前記プローブの循環時間を変更することができる。これはプレターゲットプローブについて特に関係がある（前記第１のターゲット部分と前記第１のターゲットをリンクする最初のターゲットステップが、比較的遅いプロセスを含み、比較的長い循環時間を必要とするからである）。リンカー部は場合により生体ポリマー断片、例えばオリゴ又はポリペプチド又はポリラクチドを含む。

【００８０】

理解されるべきは、本発明は、前記ジエンとジエノフィルが前記プレターゲット又はエフェクタープローブのいずれかに付着され得るいずれか考えられる方法を含む、ということである。例えばリジンやシステインなどの反応性アミノ酸によりこれらのプローブへ共役させる方法は当業者に知られている。

【００８１】

エフェクタープローブ

エフェクタープローブは、望ましい診断、イメージング、及び／又は治療の効果を与えることのできるエフェクター部分を含む。前記エフェクタープローブは第２のターゲット部分を含む。

【００８２】

前記第２のターゲット部分は、利用可能な第２のターゲットの反応相手、即ち前記プレターゲットプローブ内に含まれる前記生体直交反応基を形成する前記エフェクタープローブの部分である。理解されるべきことは、前記第２のターゲットが前記式（１）のアキシャル置換ＴＣＯであるという範囲において、前記第２のターゲット部分はテトラジンなどのジエンであり、又はその逆である、ということである。

【００８３】

前記エフェクター部分は例えば検出可能なラベルであり得る。ここで使用される「検出可能なラベル」とは、前記エフェクタープローブの部分であり、例えば細胞、組織又は器官内に存在する場合に前記プローブの検出を可能にする部分を意味する。本発明の範囲に含まれる検出可能なラベルの１つのタイプは造影剤である。異なるタイプの検出可能なラベルが本発明の範囲に含まれ以下説明される。

【００８４】

従って、本発明の特定の実施態様によれば、本発明のプレターゲットキット及び方法はイメージングにおいて使用され、特に医用イメージングにおいて使用される。前記第１のターゲットを識別するために、エフェクタープローブとして、１以上の検出可能なラベルを含むイメージングプローブが使用される。前記イメージングプローブの検出可能なラベ

10

20

30

40

50

ルの特定の例は、MRI - イメージング可能構造体、スピンラベル、光学ラベル、超音波応答構造体、X線応答部分、放射性核種、(生体)発光及びFRETタイプの色素などの従来のイメージングシステムで使用される造影提供部分である。本発明に含まれる検出可能なラベルの例は、限定されるものではないが、蛍光分子、例えば自動発光分子、試薬に接触すると発光する分子、放射性ラベル；ビオチン、例えばアビジンによるビオチンの結合を介して検出される；蛍光タグ、常磁性金属を含むMRIのためのイメージング構造体、米国特許第4、741、900号及び5、326、856号に記載されたイメージング試薬を含む。イメージングに使用される放射性核種は、例えば ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{51}Cr 、 ^{52}Fe 、 ^{52}Mn 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Zn 、 ^{62}Cu 、 ^{63}Zn 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{70}As 、 ^{71}As 、 ^{72}As 、 ^{74}As 、 ^{75}Se 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{10}In 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{114}In 、 ^{117}Sn 、 ^{120}I 、 ^{122}Xe 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{166}Ho 、 ^{167}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{193}Pt 、 ^{195}Pt 、 ^{201}Tl 及び ^{203}Pb からなる群から選択される同位体であり得る。

10

【0085】

他の元素及び同位体で、治療のためなどに使用されるものはまた、ある応用においてイメージングのために適用され得る。

【0086】

MRIイメージング可能部分は、例えば常磁性イオン又は超常磁性粒子であり得る。前記常磁性イオンは、Gd、Fe、Mn、Cr、Co、Ni、Cu、Pr、Nd、Yb、Tb、Dy、Ho、Er、Sm、Eu、Ti、Pa、La、Sc、V、Mo、Ru、Ce、Dy、Tlからなる群から選択される元素であり得る。超音波応答部分は、マイクロバブル、リン脂質からなるシェル及び/又は(生分解性)ポリマー、及び/又はヒト血清アルブミンを含み得る。前記マイクロバブルは、フッ化ガス又は液体で充填され得る。

20

【0087】

X線応答部分は、限定されるものではないが、ヨウ素、バリウム、硫酸バリウム、ガストログラフィンを含み、又ベシクル、リポソーム又はヨウ素化合物及び/又は硫酸バリウムで充填されたポリマー性カプセルを含み得る。

【0088】

さらに、本発明に含まれる検出可能なラベルはまた、抗体結合により、例えば検出可能なラベル化抗体の結合により又はサンドイッチタイプのアッセイにより結合抗体を検出することにより、検出され得るペプチド又はポリペプチドを含む。1つの実施態様では、検出可能なラベルは小さいサイズの有機PET及びSPECTラベル、例えば ^{18}F 、 ^{11}C 又は ^{123}I である。この小さいサイズにより、有機PET又はSPECTラベルは、細胞内事象をモニターするのに理想的に好適であり、というのはそれらは一般に前記ターゲット装置の特性及び特にその膜輸送へ大きくは影響しないからである。PETラベル及び第2のターゲット部分としていずれかの前記レトロディールスアルダー活性部分を含むイメージングプローブは脂質親和性であり、結合相手を見出すまで細胞内を又は細胞から受動的に拡散され得る。さらに、両方の成分は、血液脳関門の横断を排除せず、従って脳内の領域をイメージングすることを可能にする。

30

40

【0089】

前記エフェクタープローブが、ランタニド(例えばGd)などの金属に基づくMRIの造影強化のための脱着可能なラベルを含むことができ、これは好ましくはキレートに形で提供される。かかる場合には、エフェクタープローブは好ましくは、かかる金属と配位錯体を形成し得る構造部分を持つ。ここで好ましい例は、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸(H_4dota)、及び1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン- , , , -テトラメチル-1,4,7,10-四酢酸(H_4dotma)から誘導される大環状ランタニド(III)キレートである。

50

【0090】

前記エフェクター部分はまた、医薬活性化合物などの治療部分である得る。医薬活性化合物の例はここで与えられている。治療プローブは、場合によりまた検出可能なラベルを含む。

【0091】

従って、他の実施態様によると、本発明の前記プレターゲットキット及び方法は、ターゲット治療に使用される。これは、第2のターゲット部分及び1以上の医薬活性試薬（即ち、医薬又は放射線治療での放射性同位元素）を含むエフェクタープローブを利用することにより達成される。ターゲット医薬輸送において使用するための好適な医薬は当技術分野で知られている。場合により、治療プローブはまた、1以上のイメージング試薬などの検出可能なラベルを含むことができる。治療のために使用される放射性同位核種は、例えば、 ^{24}Na 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{76}As 、 ^{77}As 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Nb 、 ^{90}Y 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{131}I 、 ^{140}La 、 ^{141}Ce 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{144}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{149}Tb 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{172}Tm 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{223}Ra 、及び ^{225}Ac からなる群から選択される同位体であり得る。

【0092】

あるいは、治療プローブ内の医薬は、光動的治療のための増感剤から選択される。

【0093】

あるいは、前記治療プローブは、インビボで治療実体、例えばT細胞、ナチュラルキラー細胞又はその他の内因性構造体、例えばタンパク質に結合する認識部分を含む。

【0094】

エフェクタープローブにおいて、前記第2のターゲット部分、即ち第2の生体直交反応基及び前記エフェクター部分は、お互いに直接リンクされ得る。これらはまた、リンカーを介してお互いに結合され、さらにこれらは共に第2のターゲット足場（scaffold）に結合され得る。上で考察したように、前記リンカーは、独立して、同じ部分、例えば前記のポリエチレングリコールから選択されることができる。前記第2のターゲット足場は、例えばポリペプチドなどの生体ポリマーであり得る。

【0095】

本発明はまた、レトロディールスアルダー反応を用いるプレターゲット方法に関する。ここで、好適なジエン、好ましくは前記式（2）から（5）のいずれか1つの化合物で、又は前記式（1）のシクロオクテンでそれぞれ官能基化された第1のターゲット部分を含むプレターゲットプローブ（例えば抗体及び抗体断片又はレセプター結合ペプチド）を対象物に注入する。前記ターゲット（例えば初期の（primary）又は転移性腫瘍性病変、動脈硬化性プラーク、梗塞領域、炎症又は感染サイトなど）への結合及び前記循環及び非ターゲット組織（例えば血液、肝臓、脾臓、腎臓など）からの除去の後、例えばE-シクロオクテン又はテトラジン誘導体（即ち、前記プレターゲットプローブ内の前記生体直交反応基の対向反応相手）をそれぞれ担持する第2のターゲット部分、及び医薬又はイメージング可能ラベルを含むエフェクタープローブが注入される。前記エフェクタープローブは前記第1のターゲット部分に結合し、且つ高いコントラストを提供し、又は前記疾患サイトを選択的に治療する。

【0096】

本発明はまた、疾患（感染や癌など）の際にアップレギュレートされる一般的な代謝経路、例えばDNA、タンパク質及び膜合成及び炭水化物取り込みなどのターゲット化に関する。好適なプローブは、当該技術で現在使用されている代謝トレーサーに類似する、ジエン又はジエノフィルラベル化アミノ酸、糖、核酸及びコリン、 $[\text{}^1\text{}^1\text{C}]$ -メチオニン、 $[\text{}^1\text{}^8\text{F}]$ -フルオロデオキシグルコース（FDG）、デオキシ- $[\text{}^1\text{}^8\text{F}]$ -フルオ

10

20

30

40

50

ロチミジン（FLT）及び $[^{11}\text{C}]$ -コリンを含む。高い代謝や増殖を行う細胞はこれらをより多く取り込む。この方法で、例えばテトラジン又はE-シクロオクテン誘導体がこれらの又は他の経路に入り細胞内及び/又は細胞上に蓄積される。十分な蓄積がなされ遊離プローブを洗浄した後、検出可能にラベル化された又は医薬担持（細胞透過性）テトラジンプローブ又はE-シクロオクテンプローブ（又は本発明により他のジエン/ジエノフィル担持プローブ）は、前記蓄積されたE-シクロオクテン、テトラジン代謝物それぞれに結合するために送られる。通常のFDG（フッ素18フルオロデオキシグルコース）タイプのイメージングでの利点は、放射能を導入する前に前記ターゲット部分を高蓄積させる十分な時間があり、それにより前記ターゲットと非ターゲットとの比率を増加させることができる、ということである。又は、疾患に特異的な代謝経路及び/又は代謝物がターゲットされ得る。

10

【0097】

本発明はまた、細胞内ターゲットのプレターゲットに関する。サイズが小さいことから、有機PETラベル（18F、11C）は細胞内事象をモニターするために理想的であり、というのは一般に前記ターゲット装置及び特に（大きいかつ極性の放射性金属キレート構造共役と対照的に）前記膜輸送に対して大きな影響を与えないからである。本発明で使用する前記置換テトラジン部分及び前記E-シクロオクテンは、小さいことは必須ではなく、それらは比較的非極性であり、タンパク質、mRNA、シグナル伝達経路などの細胞内イメージングのために使用され得る。前記第2の（例えばPET標識）置換テトラジン部分又はE-シクロオクテンプローブ（即ちエフェクタープローブ）は、その結合相手を見出すまで細胞内で又は細胞外へ受動的に拡散することができ、又は能動的な取り込み機構の対象となる。両方の成分が血液脳関門を横断することを排除しないので、これらの性質はまた、脳内でプレターゲットのためにレトロディールスアルダー反応の使用を可能にする。

20

【0098】

本発明はまた、プレターゲットシグナル増幅及び/又は多価性装備に関する。少なくとも1つの第1のターゲット装置が、多数のテトラジン部分を含む dendrimer、ポリマー又はナノ粒子へ共役される。レセプター結合後、核イメージング（例えば放射性金属キレート、放射性ハロゲンなど）又はMRI（例えばGdキレート）のための1以上の造影部分に共役された（1又はそれ以上の）シクロオクテンが注入される。その結果前記続くレトロディールスアルダー反応により、前記ターゲット組織でMRI造影剤は高濃度となる。さらに、前記ターゲットサイトでの多価性は、前記アキシャル置換TCOEフェクター共役の反応速度を増加させ、例えばMRI造影剤の効果的なターゲット蓄積を可能にする。当然、前記アキシャル置換TCOEはまた、前記ターゲット装置共役で、及び前記レセプターと共役された前記テトラジン（又は本発明の他のジエン）で使用され得る。

30

【0099】

共役経路及びキット

本発明はさらに、イメージング剤と医薬をペプチドなどのターゲット構造体に共役させる経路としてレトロディールスアルダー反応を使用することに関する。前記エフェクターは、有機PET又はSPECT核ラベル化合成基、PET/SPECT/MRI用金属錯体及び超音波イメージングのためのマイクロバブルを含みことができるが、しかしまた、放射線治療用線及び線放射体及び一般に細胞毒性抗癌剤を含み得る。前記イメージング剤/治療薬は、ペンダントテトラジン又はその他の好適なジエン部分で官能基化され、前記ターゲット基が前記アキシャル置換TCOE誘導体で官能基化されるか、又はそれらの逆が可能である。

40

【0100】

現在の経路は特に核イメージング及び放射線治療のために試薬にとって有利である：放射性核の減衰の点から、最も時間を要するステップ（対象物の体内で実際のターゲット化）をプレターゲットステップとして実施することは有利である。本発明によれば、前記第2のターゲット化のための前記の非常に速いレトロディールスアルダー化学を得るために

50

アキシャル置換TCOの選択することで、既存の方法と比べてより短寿命の種を含む広い範囲の放射線核種を使用することを可能にする。アキシャル置換TCO官能基化エフェクタープローブ及び好適なジエン、例えばテトラジン担持プレターゲットプローブは、インビボで、エフェクター部分（例えば放射性核）を持続的に血液循環させる必要がなく、非常に低い濃度でカップリングさせることを可能にする。理解されるべきことは、このことは、ジエン特にテトラジンと結合されたアキシャル置換TCO担持プレターゲットプローブ、官能基化エフェクタープローブについても該当する、ということである。さらに、前記反応基は有利には安定であり、及び従って副反応を容易に生じることなくより長い寿命反応性を表す。

【0101】

理解されるべきことは、前記方法は、患者へ放射線投与を最小化するなどの利点を与えるということである。またこれは、SPECT（即ち、シングルフォトンエミッションコンピュータトモグラフィ）剤の代わりにPET（即ちポジトロンエミSSIONトモグラフィ）剤の使用を可能にするということである。さらには前記増大した反応性は、インビボにおいてより低濃度で適用することを可能にする。

【0102】

本発明は、特に、マルチモーダルイメージング、場合により同じターゲットを可視化させる異なるイメージング剤を用いる、マルチモーダルイメージングに好適である。又は前記イメージングプローブは、少なくとも2つの異なるラベルを有しマルチモーダルイメージングを可能にする。

【0103】

本発明の前記改良[4+2]レトロディールスアルダー化学の分子イメージングへの適用は、プレターゲット方法を、全てのタイプ及びサイズのターゲット構造体へ適用可能にするものである。これは、細胞内及び代謝イメージングが、プレターゲット蓄積から達成可能となる、高ターゲット蓄積及び低バックグラウンドにより、利益を得ることを可能にする。同様に、プレターゲットシグナル増幅方法、例えばポリテトラジン及び/又はポリアルキレンデンドリマー又はリボソームは、より小さく、かつより広範囲のターゲット装置を利用可能なものとする。

【0104】

前記反応相手が非生物学的であり生体直交性であることから、アキシャル置換TCOを前記ジエノフィルとして用いる[4+2]レトロディールスアルダー反応を用いるプレターゲットは、内因性競合及び代謝/分館には邪魔されず安定な共有結合を可能にする。ターゲット代謝経路、及び例えば正常細胞に対して腫瘍細胞でその高い濃度の対応するテトラジン代謝誘導体は、高濃度の人工テトラジンレセプターの装備又は細胞中又はターゲット細胞の表面で他の化学的ハンドルの装備を可能にし、場合により低レベルであり得る内因細胞表面レセプターの使用を回避することを可能にする。

【0105】

本発明のさらなる具体的実施態様はキットに関し、このキットは代謝前駆体とイメージングプローブを含み、より具体的には、前記イメージングプローブは検出可能なラベルを含み、これは通常のイメージングシステムで使用される造影剤である。かかる検出可能なラベルは、限定されるものではないが、MRI-イメージング可能な構造体、スピンラベル、光学ラベル、超音波応答剤、X線応答剤、放射性核及びFRET-タイプの色素が挙げられる。本発明の具体的な実施態様では、レポータープローブが使用される。かかるレポータープローブは、酵素の基質であり、前記酵素はより具体的には前記細胞には内因性でなく、遺伝子治療又は外部試薬の感染により導入されたものであり得る。ここで細胞又は組織に関して非内因性とは、前記遺伝子が天然には存在せず及び/又は細胞又は組織で発現しないものを意味する。又は、かかるレポータープローブは、レセプター又はポンプの方法で細胞内に導入された分子であり、内因性であるか、又は遺伝子治療又は外部試薬の感染により細胞内に導入されたものであり得る。又は前記レポータープローブは、細胞又は組織環境内である（変化）条件に反応する分子であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 6 】

本発明はまた、前記キットのための試薬を含む。1つのかかる試薬は、プレターゲット剤であり、第1のターゲット部分及び生体直交反応基を含み、前記生体直交反応基が、[4 + 2]レトロディールスアルダー反応の相手である。具体的な反応相手はこれまで説明されたものであり、即ち一般的には、電子欠乏性テトラジン又はその他の前記好適なジエンであるか、又は本発明によるアキシャル置換されたシクロオクテンのいずれかである。本発明はまた、これらの試薬を、ターゲット医用イメージング又はターゲット治療での使用に関し、及びかかる方法でのそれらの試薬の使用に関する。具体的には、本発明はこれらの試薬のプレターゲット方法での使用、及びかかる方法での使用のためのこれらの試薬に関する。他のかかる試薬は、イメージングプローブであり、検出可能なラベル及び生体直交反応基を含み、前記生体直交反応基が、[4 + 2]レトロディールスアルダー反応の反応相手である。

10

【 0 1 0 7 】

本発明はまた、イメージングプローブに関し、検出可能なラベル及び生体直交反応基を含み、前記生体直交反応基が、[4 + 2]レトロディールスアルダー反応の反応相手である。本発明はさらに、治療プローブに関し、医薬活性化合物及び生体直交反応基を含み、前記生体直交反応基が、[4 + 2]レトロディールスアルダー反応の反応相手である。

【 0 1 0 8 】

本発明の一部はまた、プレターゲット方法であり、これは前記プレターゲット試薬を対象物に投与し、及び前記試薬を前記対象物のシステム内に、前記第1の対象物部分が第1のターゲットに到達する有効な時間の間循環させ、続いて非結合の試薬を前記体内から除去することを含む。通常このための時間は12から96時間であり、特に約48時間である。

20

【 0 1 0 9 】

さらに、本発明はイメージング方法を提供するものであり、前記方法は、前記のプレターゲット方法を実行し、続いてまた本発明によるイメージングプローブを投与し、前記プレターゲット試薬及び前記イメージングプローブ中の前記生体直交反応基が [4 + 2]レトロディールスアルダー反応の反応相手を形成させることを含む。同様に、本発明は、対象物内で、ターゲット医学治療の方法を提供し、前記方法は、前記プレターゲット方法を実行し、続いてまた本発明による治療プローブを投与し、前記プレターゲット試薬及び前記イメージングプローブ中の前記生体直交反応基が [4 + 2]レトロディールスアルダー反応の反応相手を形成させることを含む。

30

【 0 1 1 0 】

本発明はまた、前記イメージング又は治療方法で使用するための前記プレターゲット試薬を含む。

【 0 1 1 1 】

まとめると、レトロディールスアルダー化学に基づき、生体直交プレターゲット分子イメージング及び治療が患者に大きな利益をもたらす。一方で、これは、癌及び血液循環器系疾患の顕著な画像を取得することを可能にする。他方で、放射性化合物及び一般的に潜在的に毒性の医薬物の投与から生じる本来的な副作用は、疾患組織へ到達する有効用量が増加することから、大きく低減され得る。さらには、疾患を生じる追跡可能な分子事象の収集を大きく広げるものである。特にこの技術は、血管からずっと離れたターゲット組織へのアクセスを可能にし、情報の豊富な細胞内環境のイメージングを容易にするものである。

40

【 0 1 1 2 】

本発明は、以下の非限定的な実施例及び添付された非限定的な図面に基づいて説明される。

【 実施例 】

【 0 1 1 3 】

材料

50

全ての試薬及び溶媒は、市販品（試薬はSigma - Aldrich、Acros、ABCR、Invitrogen及びMerckから入手、通常及び重水素化溶媒はBiosolve、Merck及びCambridge Isotope Laboratoriesから入手）から入手し、特に記載されていない限りさらに精製することなく使用した。1 - アミノ - 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 - ドデカオキサノトリアコンタン - 39 - 酸 (21) はPolypureから入手。 ^{111}In 塩化物及び ^{125}I ヨウ化ナトリウム溶液はPerkinElmerから入手した。水は蒸留して、milli-Q水濾過システム (Millipore) で脱イオン化 (18 M Ωcm) した。前記ラベル緩衝液は、Chelex - 100樹脂 (BioRad Laboratories) で一晚処理し、次に0.22 μm を通して4で貯蔵した。Iodogenヨウ素化チューブ、ピシンコニン酸 (BCA) アッセイのキット、ゲルコード青色タンパク質染色溶液及びZeba脱塩スピンカラム (40 kDa MW カットオフ、0.5 - 2 mL) はPierce Protein Research (Thermo Fisher Scientific) から入手した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) pH 7.4を調製するための錠剤はCalbiochem (Merck) から入手した。Amicon Ultra - 4及びUltra - 15遠心濾過ユニット (50 kDa MW カットオフ) はMilliporeから入手した。マウス血清はInnovative Researchから入手した。テトラジン28の合成及び放射性ラベル化は、Rossinらの「Angew Chem Int Ed 2010, 49, 3375」に記載の方法で実施した。

【0114】

方法

NMRスペクトルは CDCl_3 又は $[\text{D}_6]$ DMSO中で、Bruker DPX300スペクトルメータ又はBruker Avance600スペクトルメータで測定した。 ^{13}C NMR多重性 ($q = 4$ 級、 $t = 3$ 級、 $s = 2$ 級及び $p = 1$ 級) はDEPTパルスシーケンスを用いて識別した。高分解能ESIスペクトル (HRMS) は、Agilent ESI - TOF質量分析装置で、陽イオンモードで測定された。

【0115】

分取用カラムクロマトグラフは、Combiflash Companion装置 (Teledyne Isco) によりSilicycleシリカカラムを用いて行った。分取用HPLCは、Agilent 1200装置を用いて実施され、C18 Zorbaxカラム (21.2 x 150 mm、5 μm 粒子) で、水及びMeCN (0.1% TFA 含有) の勾配を用いて行った。分析放射性 - HPLCは、Gabi放射性検出装置 (Raytest) を付けたAgilent 1100システムを用いて行った。サンプルを、Agilent Eclipse XDB - C18カラム (4.6 x 150 mm、5 μm 粒子) に負荷し、0.1% TFAを含む水中でMeCNの直線的勾配 (2分間は19% MeCNで、次に11分間45% MeCNに増加) を用いて1 mL / 分で溶出した。UV波長は254 nmと設定された。サイズ排除 (SEC) HPLCは、Gabi放射性検出装置 (Raytest) を付けたAgilent 1200システムを用いて行った。サンプルを、BioSep - SEC - S 2000カラム (300 x 7.8 mm、5 μm 粒子、Phenomenex) に負荷し、20 mMリン酸、150 mM NaCl、pH 6.8を用いて、1 mL / 分で溶出した。UV波長は260及び280 nmに設定された。

【0116】

^{111}In 及び ^{177}Lu ラベル化の収率は、ITLC - SG ストリップ (Pall) を使用する放射性TLCにより決定され、0.9% NaCl水溶液中の200 mM EDTAで溶出させ、発光イメージング装置 (FLA - 7000、Fujifilm) 上で画像化された。これらの条件で、遊離の ^{111}In 及び ^{177}Lu は、 $R_f = 0.9$ で移動し、一方 $^{111}\text{In} / ^{177}\text{Lu}$ - テトラジンは最初の位置にとどまった。 ^{125}I ラベル化収率はまた、ITLC - SG ストリップ (Pall) を使用する放射性TLCにより行い、1:1 MeOH / 酢酸エチル混合物で溶出させ、発光イメージング装置上で画像化

された。この条件で、遊離の ^{125}I 及び ^{125}I -SHPPは、 $R_f = 0.9$ で移動し、一方 ^{125}I -mAbは最初の位置にとどまった。

【0117】

等電点電気泳動(IEF)分析及びSDS-PAGEはPhast gelシステムを用いて、IEF-3-9ゲル及び7.5%PAGE均一ゲル(GE Healthcare Life Sciences)をそれぞれ使用して行った。前記IEF標準溶液(広いPI、 $\text{pH} 3 \sim 10$)はGE Healthcareから入手し、タンパク質MW標準溶液(精度及び色標準)はBioRadから入手した。電気泳動で、前記ゲルを2時間ゲルコード青で染色し、水中で脱染色し、次に慣用のフラットベッドスキャナーでデジタル化した。

10

【0118】

CC49の濃度は、NanoDrop 1000スペクトルメータ(吸収波長280nm; Thermo Fisher Scientific)又はBCA試験で決定された。

【0119】

LS174T腫瘍モデル。ヒト大腸癌細胞下部LS174TはATCCから入手し、10%熱不活性化ウシ胎児血清(Gibco)、ペニシリン(100U/mL)、ストレプトマイシン(100 μg /mL)及び2mMのGlutamaxを追加したEagleの最小必要培地(Sigma)中に保持した。ヌードメスBalb/Cマウス(20~25g体重、Charles River Laboratories)に、100 μL の滅菌PBS中の 5×10^6 細胞を皮下接種した。

20

【0120】

実施例 1

図3aで概要が示される抗体ヘテトラジン誘導体部分をリンクする例として、分子1(図5参照)が合成された。E-シクロオクテンから誘導される、対応するプローブ2の例は、図6で表される。両方の分子はPEG鎖を含む。分子1はN-ヒドロキシスクシンイミド部分を含み、これは前記抗体中のアミノ基を持つ前記分子とカップリングするために使用される。分子2のDOTA誘導部分は、MRIイメージングのためのGd又は核イメージング及び治療(SPECT)のためのLu-177などの希土類金属イオンを担持するために使用され得る。

30

【0121】

1の合成は図5に概説されている。出発テトラジン誘導分子5は、Blackmanらの「Blackman, M L; Royzen, M; Fox, J M, Journal of The American Chemical Society, 2008, 130(41), 13518-19)」により合成された。これは、無水グルタル酸との反応で酸6に変換され、次にそのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル7へ変換される。このN-ヒドロキシスクシンイミドエステルは、市販(IRIS biochem)のPEG誘導体8と反応させて酸9とし、さらにそのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル1に変換する。

【0122】

2の合成は図6に概説されている。(E)-シクロオク-4-テノールは、Yapらの「Yap, G P A; Royzen, M; Fox, J M, Journal of The American Chemical Society, 2008, 130(12), 3760-61)」により合成した。市販(Aldrich)のイソシアネート誘導体11で、これはエステル12へ変換され、次に加水分解されて酸13へ変換される。13から形成されるN-ヒドロキシスクシンイミドエステル14は、DOTA及びPEG誘導アミン18との反応で最終生成物2が合成される。DOTA誘導体18は前記17の脱保護の後合成され、17はDOTAKEN誘導体15とPEG誘導体16から合成され、両方共市販品が利用できる(それぞれMacrocyclics及びIRIS Biotechから入手)。

40

50

【 0 1 2 3 】

実施例 2

この例は実施例 1 の分子の逆対 (ペア) を示す、前記抗体へ共役した後前記プレターゲット部分を形成するための前記 E - シクロオクテン誘導体 3 は図 7 に示されている。前記テトラジン / D O T A 誘導体プローブ 4 は、図 3 b で概説されるエフェクタープローブとして作用し得るものであり、図 8 に示される。

【 0 1 2 4 】

E - シクロオクテン誘導体 3 は、市販 (I R I S b i o c h e m) の P E G 誘導体 8 (図 5 参照) と N - ヒドロキシスクシンイミドエステル 1 4 との反応により酸 1 9 を形成し、次にこの酸から N - ヒドロキシスクシンイミド誘導体を形成する (図 7) 。

10

【 0 1 2 5 】

前記テトラジン / D O T A 誘導 プローブ の合成は図 8 に概説されている。このプローブは、D O T A と P E G 誘導体アミン 1 8 (図 6 参照) と N - ヒドロキシスクシンイミドエステル 7 (図 5 参照) との反応で合成される。

【 0 1 2 6 】

実施例 3

この例は図 9 に示され、(E) - 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 1 - (4 - ((シクロオク - 4 - テン - 1 - イルオキシ) メチル) フェニル) - 1 - オキソ - 5 , 8 , 1 1 , 1 4 , 1 7 , 2 0 , 2 3 , 2 6 , 2 9 , 3 2 , 3 5 , 3 8 - ドデカオキサ - 2 - アザヘンテトラコンタ - 4 1 - ノエート (T C O - O - P E G ₁₀ - N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) 、メジャー及びマイナー異性体、それぞれ 2 3 a 及び 2 3 b) の合成のスキームを示す。

20

【 0 1 2 7 】

本化合物の (数字) a は E - メジャー異性体、及び本化合物の (数字) b は E - マイナー異性体を表す。

【 0 1 2 8 】

(E - メジャー) - 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 4 - ((シクロオク - 4 - テニルオキシ) メチル) ベンゾエート (2 0 a) 。 (E) - シクロオク - 4 - テノール (約 1 3 % の Z 異性体を含む、1 0 _a メジャー異性体) は文献記載の手順「M . R o y z e n , G . P . A . Y a p , J . M . F o x , J A m C h e m S o c 2 0 0 8 , 1 3 0 , 3 7 6 0) . 」により合成した。

30

【 0 1 2 9 】

6 0 % の水素化ナトリウム分散物 (1 . 8 g , 4 5 m m o l) を、氷冷された、6 0 m L の D M F 中の 1 0 a (1 . 7 0 g , 1 3 . 5 m m o l) に添加した。室温で 4 時間撹拌後、4 - プロモメチル安息香酸 (3 . 8 5 g , 1 7 . 9 m m o l) を小分けにして添加し、前記分散物を室温で一晩撹拌した。混合物を水 (1 0 0 m L) に投入し、t - ブチルメチルエーテル (1 0 0 m L) を加えて、さらに 3 7 % 塩酸水 (5 m L) を添加した。分離後、水層を t - ブチルメチルエーテルで抽出した (2 x 1 0 0 m L) 。有機層を集めて、水 (2 5 m L) で洗浄し、M g S O ₄ 上で乾燥して、蒸発させた。4 : 1 ヘキサン / 酢酸エチルを用いて、残渣を薄シリカ層に通した。蒸発後得られた残渣をヘプタン (5 0 m L) に 7 0 での溶解させた後冷却して 1 9 a を得た。生成物をジクロロメタン (4 0 m L) に溶解し、N - ヒドロキシスクシンイミド (0 . 5 7 g , 4 . 9 m m o l) を添加し、混合物を氷冷し、次に N , N ' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (1 . 0 3 g , 4 . 9 m m o l) を添加した。3 0 分後、氷冷バスを外し、反応混合物を室温で 1 8 時間撹拌した。濾過して蒸発させた後、残渣はシリカのカラムクロマトグラフィにより、ヘプタン中の酢酸エチル勾配 (0 ~ 1 5 %) を用いて精製した。次に、残渣を t - ブチルメチルエーテル (2 0 m L) 中に溶解し、これをヘプタン (5 0 m L) 中に投入して、2 0 a (1 . 4 2 g , 2 9 %) を白色個体として得た。

40

¹ H N M R (3 0 0 M H z , C D C l ₃) : = 8 . 1 0 (d , J = 8 . 5 H z , 2 H) 、 7 . 4 5 (d , J = 8 . 5 H z , 2 H) 、 5 . 6 0 (m , 1 H) 、 5 . 3 4 (m , 1 H

50

)、4.54 (d、 $J = 13.4 \text{ Hz}$ 、1H)、4.47 (d、 $J = 13.4 \text{ Hz}$ 、1H)、3.09 (m、1H)、2.91 (s、4H)、2.43 - 1.40 (m、10H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz、 CDCl_3) : δ = 169.0 (q)、161.5 (q)、146.7 (q)、135.1 (t)、132.1 (t)、130.4 (t)、127.0 (t)、123.7 (q)、85.3 (t)、68.0 (s)、40.5 (s)、37.7 (s)、34.2 (s)、32.7 (s)、31.4 (s)、25.4 (s) ; HRMS (ESI、 m/z) : 計算値 : $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{Na}^+ ([\text{M} - \text{Na}]^+)$: 380.1474、実測値 : 380.1472。

【0130】

(E - メジャー) - 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 1 - (4 - ((シクロオク - 4 - テ - 1 - イルオキシ)メチル)フェニル) - 1 - オキソ - 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38 - ドデカオキサ - 2 - アザヘンテトラコンタ - 41 - ノエート (23a)。

【0131】

ジクロロメタン (2 mL) 中の 20a (100 mg、0.280 mmol) の溶液を、氷冷して攪拌されたジクロロメタン (2 mL) 中の 21 (175 mg、0.283 mmol) 及びトリエチルアミン (290 μL 、2.08 mmol) の溶液中に滴下した。反応混合物を室温で 16 時間攪拌した。蒸発させて得られた粗中間物 22a をジクロロメタン (5 mL) 中に溶解し氷冷した。ビス (2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) カーボネート (170 mg、0.664 mmol) 及びピリジン (28 μL 、0.35 mmol) を添加し反応混合物を室温で 3 時間攪拌した。混合物を濾過し、蒸発させ、生成物をシリカカラムクロマトグラフで、ジクロロメタン中のメタノール勾配 (5 ~ 10%) を用いて精製し、23a を粘稠なオイル状物として得た (119 mg、39%)。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz、 CDCl_3) : δ = 7.79 (d、 $J = 8.2 \text{ Hz}$ 、2H)、7.36 (d、 $J = 8.2 \text{ Hz}$ 、2H)、7.00 (s、1H)、5.59 (m、1H)、5.33 (m、1H)、4.49 (d、 $J = 12.5 \text{ Hz}$ 、1H)、4.42 (d、 $J = 12.5 \text{ Hz}$ 、1H)、3.85 (t、 $J = 6.5 \text{ Hz}$ 、2H)、3.8 - 3.5 (m、48H)、3.09 (m、1H)、2.90 (t、 $J = 6.5 \text{ Hz}$ 、2H)、2.85 (s、4H)、2.43 - 1.40 (m、10H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz、 CDCl_3) : δ = 167.0 (q)、165.4 (q)、164.8 (q)、140.8 (q)、133.5 (t)、131.7 (q)、130.4 (t)、125.3 (t)、83.4 (t)、68.7 (s)、68.4 (s)、68.0 (s)、67.6 (s)、68.4 (s)、63.9 (s)、38.9 (s)、37.9 (s)、36.1 (s)、32.6 (s)、31.1 (s)、30.3 (s)、29.8 (s)、23.7 (s) ; HRMS (ESI、 m/z) : 計算値 : $\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{H}^+ ([\text{M} - \text{H}]^+)$: 957.5171、実測値 : 957.5174。

【0132】

(E - マイナー) 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 4 - ((シクロオク - 4 - テニルオキシ)メチル)ベンゾエート (20b)。

【0133】

(E) - シクロオク - 4 - テノール (10b、マイナー異性体) は前記文献の手順で合成された。60%水素化ナトリウム (2.1 g、53 mmol) を、氷冷した 50 mL テトラヒドロフラン中の 10b (2.53 g、20.1 mmol) の溶液中に添加した。室温で 4 時間攪拌後、混合物を再び冷却し、そこに 4 - ブロモメチル安息香酸 (4.53 g、21.1 mmol) を小分けにして 5 分間で添加した。25 mL のテトラヒドロフランを添加し懸濁液を室温で 4 日間攪拌した。氷を添加し、次に 12.0 g のクエン酸を添加した。混合物を 2 回 150 mL の *t* - ブチルメチルエーテルで抽出した。有機層を 25 mL の水で洗浄し、乾燥して溶媒を揮発させた。残渣は、80 g のシリカゲルクロマトグラフで、溶出液としてヘプタン中の酢酸エチルの量を徐々に増加させて精製した。生成物の分画 (生成物と出発物質アルコールとの完全な分離ではない) を集め、約 30 mL ヘプタ

10

20

30

40

50

ン(- 150 ℃へ冷却)から再結晶させて、白色固体として19bを得た(0.86g、17%)。これをジクロロメタン40mLに溶解させた。N-ヒドロキシスクシンイミド(0.48g、4.17mmol)を添加し、混合物を氷で冷却した。N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(0.80g、3.88mmol)を添加し、混合物を30分間氷冷して攪拌し、次に室温で18時間攪拌した。濾過し、ジクロロメタンで洗浄し、ロータリーエバポレータ処理し、残渣を25gのシリカゲル上で、溶出液ヘプタン-酢酸エチルを使用するクロマトグラフィにより生成物を得た。蒸発生成物画分を75mLのt-ブチルメチルエーテルと混合し、混合物を60 ℃に温めて溶液を作った。前記溶液を20mLへ濃縮した。ここにヘプタンをゆっくりと添加することで生成物を沈殿させた。濾過して集め、ヘプタンで洗浄して、1.05gの20bを得た(15%)。

10

$^1\text{H NMR}$ (300MHz、 CDCl_3): δ = 8.10 (d、J = 8.5Hz、2H)、7.46 (d、J = 8.5Hz、2H)、5.73 (m、1H)、5.52 (m、1H)、4.60 (d、J = 13.4Hz、1H)、4.45 (d、J = 13.4Hz、1H)、3.65 (m、1H)、2.92 (s、4H)、2.43 - 1.10 (m、10H); $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz、 CDCl_3): δ = 169.0 (q)、161.5 (q)、146.7 (q)、135.1 (t)、132.1 (t)、130.4 (t)、127.0 (t)、123.7 (q)、85.3 (t)、68.0 (s)、40.5 (s)、37.7 (s)、34.2 (s)、32.7 (s)、31.4 (s)、25.4 (s); HRMS (ESI、m/z): 計算値: $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{Na}^+$ ($[\text{M} - \text{Na}]^+$): 380.1474、実測値: 380.1472。

20

【0134】

(E-マイナー)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 1-(4-(シクロオク-4-テ-1-ニルオキシ)メチル)フェニル)-1-オキソ-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-ドデカオキサ-2-アザヘンテトラコンタ-41-ノエート(23b)

この化合物は、20bを出発物質として23aと同様の方法で得られた。23bは粘稠オイルとして93%収率で得られた。 $^1\text{H NMR}$ (300MHz、 CDCl_3): δ = 7.80 (d、J = 8.2Hz、2H)、7.43 (d、J = 8.2Hz、2H)、6.83 (s、1H)、5.67 (m、1H)、5.55 (m、1H)、4.57 (d、J = 12.5Hz、1H)、4.48 (d、J = 12.5Hz、1H)、3.85 (t、J = 6.5Hz、2H)、3.8 - 3.5 (m、49H)、2.90 (t、J = 6.5Hz、2H)、2.84 (s、4H)、2.43 - 0.90 (m、10H); $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz、 CDCl_3): δ = 169.2 (q)、167.6 (q)、167.0 (q)、143.4 (q)、136.2 (t)、133.8 (q)、131.6 (t)、127.4 (t)、127.1 (t)、74.7 (f)、71.1 (s)、70.9 (s)、70.6 (s)、70.2 (s)、70.1 (s)、66.1 (s)、40.5 (s)、40.1 (s)、34.9 (s)、33.3 (s)、32.5 (s)、30.2 (s)、28.0 (s)、25.9 (s); HRMS (ESI、m/z): 計算値: $\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{H}^+$ ($[\text{M} - \text{H}]^+$): 957.5171、実測値: 957.5179。

30

実施例4

40

この実施例は、(E)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 1-(4-(シクロオク-4-テ-1-ニルオキシ)カルボニル)アミノ)フェニル)-1-オキソ-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-ドデカオキサ-2-アザヘンテトラコンタ-41-ノエートの合成スキームを表す図10において説明される。

【0135】

前記化合物(数字)aはE-メジャー異性体を、及び化合物(数字)bはE-マイナー異性体を示す。

【0136】

(E-メジャー)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 4-(シクロオク

50

- 4 - テ - 1 - ニルオキシ)カルボニル)アミノ)ベンゾエート 14 a

N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (9.50 g, 0.046 mol) を、小分けして、氷冷した 4 - アミノ安息香酸 (5.84 g, 0.043 mol) と N - ヒドロキシスクシンイミド (5.0 g, 0.044 mol) と 60 mL のイソプロパノールとの混合物に添加した。室温で 16 時間攪拌後、前記懸濁物を濾過し、得られた固体をイソプロパノール 60 mL 中でさらに 1 時間攪拌した。濾過及び真空乾燥して得られた粗固体生成物 24 を 100 mL のジクロロメタンと混合し氷冷した。トルエン中の 20 % ホスゲン溶液 (26 mL, 49.4 mmol) を添加及び 30 分間攪拌後、溶液を得た。蒸発させて得られた固体を 100 mL のトルエンで 2 回洗浄し、高真空乾燥した。4.03 g の 25 (36 %) が白色固体として得られた。固体を小分けして、35 mL のジクロロメタン中 10 a (1.40 g, 11.1 mmol) の溶液に添加した。懸濁液を一晩攪拌し、その後 2 時間 40 に暖めた。これをシリカ上でジクロロメタンで溶出し、次いでトルエンから再結晶させた後、固体の 1.77 の 14 a (41 %) を得た。得られた生成物は約 12 % の Z 異性体を含み、これはクロマトグラフ又は再結晶では除去できなかった。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.06 (d, J = 8.8 Hz, 2H)、7.51 (d, J = 8.8 Hz, 2H)、6.82 (m, 1H)、5.57 (m, 2H)、3.48 (m, 1H)、2.91 (s, 4H)、2.40 (m, 3H)、2.23 - 1.50 (m, 7H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 169.7 (q)、161.6 (q)、152.7 (q)、135.2 (t)、133.4 (t)、132.5 (t)、119.4 (q)、117.9 (t)、82.3 (t)、41.3 (s)、38.9 (s)、34.6 (s)、32.8 (s)、31.3 (s)、26.0 (s); HRMS (ESI, m/z): 計算値: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ ([M - Na] $^+$): 409.1376、実測値: 409.1372

(E - メジャー) - 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 1 - (4 - ((シクロオク - 4 - テ - 1 - ニルオキシ)カルボニル)アミノ)フェニル) - 1 - オキソ - 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38 - ドデカオキソ - 2 - アザヘンテトラコンタ - 41 - ノエート 27 a

ジクロロメタン (2 mL) 中の 14 a (100 mg, 0.26 mmol) 溶液を、氷冷攪拌されたジクロロメタン (2 mL) 中の 21 (160 mg, 0.26 mmol) 及びトリエチルアミン (400 μL , 2.9 mmol) へ滴下した。反応混合物を室温で 16 時間攪拌した。蒸発させて得られた粗中間物 26 a をジクロロメタン (5 mL) に溶解させ、氷冷した。ビス (2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) カーボネート (89 mg, 0.35 mmol) を添加し反応混合物を室温で 16 時間攪拌した。混合物を濾過し、3 mL の水で 3 回、3 mL の食塩水で 1 回抽出した。硫酸マグネシウム上で乾燥した後、溶媒を揮発させて、粘稠なオイルとして 1.23 g の 27 a を得た (47 %)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.77 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.46 (d, J = 8.7 Hz, 2H)、7.16 (s, 1H)、6.93 (s, 1H)、5.56 (m, 2H)、4.46 (m, 1H)、3.84 (t, J = 6.5 Hz, 2H)、3.8 - 3.5 (m, 48H)、2.90 (t, J = 6.5 Hz, 2H)、2.84 (s, 4H)、2.43 - 1.50 (m, 10H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 169.2 (q)、167.2 (q)、167.1 (q)、153.2 (q)、141.6 (q)、135.2 (t)、133.4 (f)、129.3 (q)、128.6 (t)、118.1 (t)、81.7 (s)、70.9 (s)、70.6 (s)、70.2 (s)、66.1 (s)、41.4 (s)、40.1 (s)、38.9 (s)、34.6 (s)、32.9 (s)、32.5 (s)、31.4 (s)、28.4 (s)、25.9 (s); HRMS (ESI, m/z): 計算値: $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_{19}\text{H}^+$ ([M - H] $^+$): 986.5073、実測値: 986.5085。

(E - マイナー) - 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 4 - ((シクロオク - 4 - テ - 1 - ニルオキシ)カルボニル)アミノ)ベンゾエート 14 b

この化合物は、14 a と類似の方法で、出発物質を 10 b として、収率 32 % で得られ

た。10bが純粋に得られたことから、この生成物はZ異性体を含まなかった。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz、 CDCl_3) : δ = 8.04 (d、 J = 8.9 Hz、2 H)、7.55 (d、 J = 8.9 Hz、2 H)、7.11 (s、1 H)、5.61 (m、2 H)、5.05 (m、1 H)、2.92 (s、4 H)、2.36 (m、4 H)、2.23 - 1.20 (m、6 H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz、 CDCl_3) : δ = 169.8 (q)、161.6 (q)、152.7 (q)、144.6 (q)、135.7 (t)、132.5 (t)、132.1 (t)、119.4.0 (q)、118.0 (t)、72.1 (t)、41.3 (s)、34.6 (s)、32.9 (s)、30.3 (s)、28.5 (s)、26.0 (s) ; HRMS (ESI、 m/z) : 計算値 : $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ ([$M - \text{Na}$] $^+$) : 409.1376、実測値 : 409.1367.

10

(E - マイナー) - 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 1 - (4 - ((シクロオク - 4 - テ - 1 - ニルオキシ)カルボニル)アミノ)フェニル) - 1 - オキソ - 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38 - ドデカオキサ - 2 - アザヘンタトラコンタ - 41 - ノエート 27b

この化合物は出発物質14bを用いて27aと類似の方法で89%収率で得られた。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz、 CDCl_3) : δ = 7.79 (d、 J = 8.7 Hz、2 H)、7.54 (d、 J = 8.7 Hz、2 H)、7.44 (s、1 H)、6.90 (m、1 H)、5.60 (m、2 H)、5.03 (m、1 H)、3.83 (t、 J = 6.5 Hz、2 H)、3.8 - 3.5 (m、48 H)、2.89 (t、 J = 6.5 Hz、2 H)、2.84 (s、4 H)、2.50 - 1.20 (m、10 H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz、 CDCl_3) : δ = 169.2.0 (q)、167.2 (q)、167.0 (q)、153.2 (q)、141.6 (q)、135.7 (t)、132.1 (t)、129.3 (q)、128.5 (t)、118.3 (t)、71.0 (s)、70.9 (s)、70.6 (s)、70.1 (s)、66.0 (s)、.41.4 (s)、40.1 (s)、34.6 (s)、32.9 (s)、32.5 (s)、30.3 (s)、28.4 (s)、25.9 (s) ; HRMS (ESI、 m/z) : 計算値 : $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_{19}\text{H}^+$ ([$M - \text{H}$] $^+$) : 986.5073、実測値 : 986.5058.

20

実施例 5

テトラジン放射性ラベル化

DOTA 共役テトラジン (28 ; 図 12、Rossinらの「Angew Chem Int Ed 2010、49、3375」に記載)を、0.2 M 酢酸アンモニウム pH 7.0 中に溶解し、使用前に -80 で保存した。28の一定量を [^{111}In] 塩化インジウム又は、[^{177}Lu] 塩化ルテチウムの適切な量と組み合わせて、ゆっくりと撹拌しつつ37 で10分間インキュベートした。次に、5 μL の10 mM DTPAを添加して溶液をさらに5分間インキュベートした。支持体添加ラベル化反応を、前記テトラジンに対して0.9モル当量の InCl_3 又は LuCl_3 を添加することで実施した。通常は定量的ラベル収率及び98%を超える放射化学純度がこの方法で得られた。

30

【0137】

トランスシクロオクテン (TCO) NHS エステル 14、20、23、27 との mAb 共役

40

ここで、続くステップと同様、全ての化合物の数字は、前記 a 異性体も b 異性体も意味するものとする。

【0138】

通常、1 mg の CC49 (5 mg / mL PBS 溶液) が、250 μL PBS の全容積内、TCO - NHS 構造体 0.6 モル (動力学測定) 又は10モル当量 (インビボ研究) で変性される。pH は1 M 炭酸ナトリウム緩衝液で9に調節された。反応は、暗室で室温30分間撹拌下実施された。続いて、TCO - 変性 mAb を Amicon Ultra - 15 遠心装置を用いてPBSで激しく洗浄した。抗体あたりのTCO基の数は、以下概説するテトラジン滴定で決定された。

【0139】

50

テトラジン - D O T A 2 8 は担持体付加 ^{177}Lu で放射線ラベル化された。約 0.6 モル当量の T C O で変性された m A b (25 μg) を、3 モル当量の $^{177}\text{Lu} - 28$ (0.5 nM) と反応させた。約 10 モル当量の T C O で変性された m A b (25 μg) を、15 モル当量の $^{177}\text{Lu} - 28$ (2.5 nM) と反応させた。前記反応は、50 μL の P B S pH 7.4 中で、37 で 10 分間行った。反応混合物は S D S - P A G E 及び蛍光イメージャで分析され、反応収率は、前記 m A b に対応するバンドの放射線から決定された。計数 (カウント) は A I D A I m a g e A n a l y z e r ソフトウェア (R a y t e s t) を用いて定量化された。前記 T C O - m A b 共役収率は、80 ~ 90 % の範囲であることが見出された。

m A b 放射性ラベル化

50 μL の P B S 中の $[^{125}\text{I}]$ ヨウ化物 (5 ~ 15 M B q) の適切な量に、D M S O 中の B o l t o n - H u n t e r 試薬 (N - スクシミジル - 3 - [4 - ヒドロキシフェニル] プロピオネート (S H P P)) の 1 m g / m L 溶液の 1 μL 、及び P B S 中のクロラミン - T (N - クロロ - 4 - メチルベンゼンスルホンアミド、ナトリウム塩) の 4 m g / m L の 25 μL を添加した。得られた溶液を 10 ~ 20 秒混合して、5 μL D M F 及び 100 μL トルエンをバイアルに投入し、及び $^{125}\text{I} - \text{SHPP}$ を有機層に抽出し、次にこれをガラスバイアルに移した。トルエンを N_2 のゆっくりとした流れで除去し、その後 C C 49 - T C O 溶液 (50 ~ 250 μL P B S 中の 0.1 ~ 0.5 m g) を加え、pH を 1 M 炭酸塩緩衝液で 9 に調節し、及び反応混合物を室温で 30 分間ゆっくりと振り混ぜながらインキュベートした。インキュベート後、前記ラベル化収率を放射性 - I T L C で決定した。粗反応混合物を次に、生理食塩水で前平衡化させた Z e b a スピン脱塩カラムに負荷した。前記反応バイアルを 20 μL 生理食塩水でリンスし、リンスされたものも前記カラムに同様に負荷した。Z e b a 精製後、 $^{125}\text{I} - \text{CC49} - \text{T C O}$ 溶液の放射性純度を放射性 - I T L C 及び S D S - P A G E で決定し；タンパク質濃度は B C A アッセイで決定した。

【 0 1 4 0 】

通常、この手順で、70 % を超える $^{125}\text{I} - \text{SHPP} \text{ m A b}$ 共役及び、精製 $^{125}\text{I} - \text{CC49} - \text{T C O}$ の放射性純度は 98 % を超えるものが得られた。

反応速度

テトラジン D O T A 2 8 は、比活性 3 M B q / μg の担持体付加 ^{177}Lu で、放射線ラベル化した。 $^{177}\text{Lu} - 28$ (33 nM) は、pH 7.4 の 200 μL の P B S 中で 37 5 分間 1 当量の T C O で変性された C C 49 と増加する濃度 (0.33、1、及び 1.67 μM) で反応させた。選択された時間で (15、30、45、60、90、120、180 及び 300 秒)、20 μL のサンプルを取り出し、テトラジン 6 (図 5 ; R o s s i n らの「A n g e w C h e m I n t E d 2010、49、3375」に記載) で失活させた (D M F 中 5 m g / m L の 1.5 μL)。それぞれの混合物の一定量を S D S - P A G E 及び蛍光イメージャで分析し、シクロ付加反応収率は、前記 m A b に対応するバンドの放射能から決定された。係数 (カウント) は、A I D A I m a g e A n a l y z e r ソフトウェア (R a y t e s t) で定量化した。

【 0 1 4 1 】

【表 1】

表 1 : CC49-TCO 構成物と ^{177}Lu -28 との間の二次反応速度定数。
O = リンクエーテル ; C = リンクカルバメート

	スペーサーなし [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	PEG ₁₀ スペーサー [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
TCO O メジャー	(20a) 19600 ± 1400	(23a) 16500 ± 1400
TCO O マイナー	(20b) 136700 ± 2300	(23b) 156400 ± 3100
TCO C メジャー	(14a) 11350 ± 550	(27a) 11030 ± 250
TCO C マイナー	(14b) 66550 ± 8800	(27b) 111600 ± 1800

10

実施例 6

インビボでのトランスシクロオクテン安定性

無腫瘍性マウス (群あたり $n = 3$) に、CC49-PEG₁₀-TCO-O メジャー (CC49-23a ; CC49 あたり 8.4 TCO ; マウスあたり $300 \mu\text{g} / 100 \mu\text{L}$)、CC49-PEG₁₀-TCO-C マイナー (CC49-27b ; CC49 あたり 3.3 TCO ; マウスあたり $\mu\text{g} / 100 \mu\text{L}$) 及びスペーサーなし CC49-TCO-O メジャー (CC49-20a ; CC49 あたり 8.0 TCO ; マウスあたり $300 \mu\text{g} / 100 \mu\text{L}$) を静脈注射した。選択された時点 (注射後、1 時間から 4 日まで) で、伏在静脈から血液サンプルが取り出され、ヘパリン含有バイアルに集められた。血液サンプルを秤量し、過剰の ^{111}In -テトラジン 28 が添加された。37 °C で 20 分間インキュベートした後、一定量の血液が PBS で 10 倍希釈され SDS-PAGE で分析された。シクロ付加収率は、mAb に対応するバンドでの放射能から決定され、係数 (カウント) は AIDA Image Analyzer ソフトウェアで定量化された。それぞれの時点で血液中に存在する mAb の量 (% ID / g 血液) が対応する ^{125}I -CC49-TCO (マウスあたり $300 \mu\text{g} / 100 \mu\text{L}$ 、約 0.2 MBq) を注射されたマウス ($n = 3$) の 3 つの別の群で評価された。データは、mAb のクリアランスが補正され、 $t = 0$ で 100 % ID TCO に標準化された。

20

30

【0142】

この実験の結果は、PEG₁₀ スペーサーを介して CC49-TCO が共役された構造体を注射された両方の群のマウスにおいて、血液からの mAb クリアランスによる TCO の生理的減少の他に、時間と共に循環する反応性 TCO 基の量がさらに減少した、ということを示す (図 12A 及び B)。これは、スペーサーなしで TCO が mAb と共役された構成物を注射されたマウスの場合では起こらなかった。このことは、前記 CC49-PEG₁₀-TCO 構成物に関してインビボでスペーサーなしの CC49-TCO 構成物の高い安定性を示唆する。

40

【0143】

実施例 7

生体内分布実験

二重同位体生体内分布実験が、PEG₁₀ スペーサー有り及び無しの ^{125}I -ラベル化 CC49-TCO 構成物を腫瘍保持マウス ($n = 3$) に静脈内注射し (マウスあたり $100 \mu\text{g} / 100 \mu\text{L}$ 、約 0.2 MBq)、24 又は 72 時間後、 ^{111}In -テトラジン 28 (マウスあたり $21 \mu\text{g} / 75 \mu\text{L}$ 、約 0.8 MBq) を注射して実施した。テトラジン投与後 3 時間、動物をイソフルランで麻酔し頸椎脱臼により屠殺した。血液を心臓穿刺により取り出し、対象となる器官及び組織を取り出し、ドライプロットティングし秤量した。サンプルの放射能は、% ID / g を決定するための標準品と共に 計数器で測定

50

した。エネルギー窓は、 ^{125}I 及び ^{111}In についてそれぞれ、 $10 \sim 80 \text{ keV}$ 、 $100 \sim 510 \text{ keV}$ とした。放射性ラベル化 mAb 及び ^{111}In -テトラジンの分布が表 2 ～ 5 に示される。

【 0 1 4 4 】

【表 2】

表 2 : ^{177}Lu -テトラジン 28 (マウス当たり $21 \mu\text{g} / 75 \mu\text{L}$ 、約 0.5 MBq) 注射後 3 時間、 ^{125}I -CC49-PEG₁₀-TCO-Oメジャー (CC49-23a ; マウス当たり $100 \mu\text{g} / 100 \mu\text{L}$ 、約 0.2 MBq) 注射後 27 又は 99 時間後の二重同位体生体内分布データ。データは $\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ で表される。

10

	1 日プレターゲット (n=2)		4 日プレターゲット (n=2)	
	^{125}I -mAb	^{177}Lu - テトラジン	^{125}I -mAb	^{177}Lu - テトラジン
血液	5.55 ± 1.85	1.06 ± 0.34	0.23 ± 0.05	0.04 ± 0.01
腫瘍	15.81 ± 0.22	3.09 ± 0.01	10.99 ± 4.24	0.86 ± 0.39
心臓	0.94 ± 0.09	0.20 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.00
肺	1.46 ± 0.31	0.32 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.05
肝臓	2.82 ± 1.56	0.61 ± 0.15	0.67 ± 0.16	0.31 ± 0.03
脾臓	1.21 ± 0.47	0.30 ± 0.09	0.38 ± 0.09	0.20 ± 0.00
腎臓	1.49 ± 0.40	1.73 ± 0.31	0.15 ± 0.03	1.73 ± 0.22
筋	0.32 ± 0.13	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01
骨	0.47 ± 0.18	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
脳	0.18 ± 0.09	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00

20

30

【 0 1 4 5 】

【表 3】

表 3 : ^{111}In -テトラジン 28 (マウス当たり $21 \mu\text{g}/75 \mu\text{L}$ 、約 0.5 MBq) の投与後 3 時間、CC49-TCO-OMeジャー (CC49-20a ; マウス当たり $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) 投与後 27 時間又は 75 時間後の単一同位体生体内分布データ。データは $\% \text{ID}/\text{g} \pm \text{SD}$ で表される。

	1 日プレターゲット (n=3) ^{111}In -テトラジン	3 日プレターゲット (n=2) ^{111}In -テトラジン
血液	2.39 ± 1.77	0.79 ± 0.39
腫瘍	2.40 ± 0.16	3.11 ± 0.80
心臓	0.84 ± 0.71	0.30 ± 0.03
肺	1.13 ± 0.55	0.58 ± 0.07
肝臓	2.05 ± 1.03	0.88 ± 0.13
脾臓	0.83 ± 0.46	0.43 ± 0.03
腎臓	2.84 ± 0.35	3.16 ± 0.57
筋	0.33 ± 0.22	0.21 ± 0.02
骨	0.33 ± 0.16	0.15 ± 0.00
脳	0.10 ± 0.06	0.26 ± 0.11

10

20

【 0 1 4 6 】

30

【表 4】

表 4 : ^{111}In -テトラジン 28 (マウス当たり $21\ \mu\text{g}/75\ \mu\text{L}$ 、約 $0.5\ \text{MBq}$) 注射後 3 時間、 ^{125}I -CC49-TCO-Cマイナー (CC49-14b ; マウス当たり $100\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$ 、約 $0.2\ \text{MBq}$) 投与後 27 時間又は 75 時間後の二重同位生体内分布データ。データは $\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ で表される。

	1 日プレターゲット (n=4)		3 日プレターゲット (n=4)	
	^{125}I -mAb	^{111}In -テトラジン	^{125}I -mAb	^{111}In -テトラジン
血液	5.09 ± 0.59	1.12 ± 0.09	1.82 ± 0.76	0.54 ± 0.11
腫瘍	14.52 ± 2.46	2.59 ± 0.35	19.13 ± 5.99	2.76 ± 1.36
心臓	1.87 ± 0.55	0.46 ± 0.12	0.71 ± 0.28	0.24 ± 0.07
肺	3.06 ± 1.08	0.79 ± 0.24	1.44 ± 0.49	0.50 ± 0.11
肝臓	4.99 ± 1.51	1.17 ± 0.35	2.85 ± 0.50	0.84 ± 0.21
脾臓	2.20 ± 0.87	0.53 ± 0.14	1.14 ± 0.34	0.34 ± 0.09
腎臓	1.93 ± 0.71	3.12 ± 0.33	0.74 ± 0.24	2.82 ± 0.28
筋	0.73 ± 0.12	0.22 ± 0.07	0.49 ± 0.15	0.16 ± 0.04
骨	0.95 ± 0.30	0.27 ± 0.08	0.45 ± 0.19	0.20 ± 0.07
脳	0.19 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.01

10

20

【 0 1 4 7 】

【表 5】

表 5 : ^{111}In -テトラジン 28 (マウス当たり $21\ \mu\text{g}/75\ \mu\text{L}$ 、約 $0.5\ \text{MBq}$) 注射後 3 時間、 ^{125}I -CC49-TCO-Oマイナー (CC49-20b ; マウス当たり $100\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$ 、約 $0.2\ \text{MBq}$) 投与後 27 時間又は 75 時間後の二重同位生体内分布データ。データは $\% \text{ID}/\text{g} \pm \text{SD}$ で表される。

	1 日プレターゲット (n=3)		3 日プレターゲット (n=3)	
	^{125}I -mAb	^{111}In -テトラジン	^{125}I -mAb	^{111}In -テトラジン
血液	6.45 ± 1.46	1.61 ± 0.45	2.20 ± 0.41	0.59 ± 0.10
腫瘍	18.46 ± 4.14	3.42 ± 0.40	17.56 ± 4.77	2.56 ± 0.65
心臓	1.80 ± 0.30	0.50 ± 0.04	0.70 ± 0.12	0.22 ± 0.03
肺	3.19 ± 0.53	0.97 ± 0.16	1.38 ± 0.28	0.46 ± 0.07
肝臓	4.79 ± 2.22	1.41 ± 0.45	2.17 ± 0.63	0.64 ± 0.06
脾臓	2.07 ± 0.46	0.65 ± 0.12	0.99 ± 0.33	0.35 ± 0.08
腎臓	1.76 ± 0.38	3.39 ± 0.84	0.69 ± 0.09	2.59 ± 0.24
筋	0.80 ± 0.20	0.24 ± 0.06	0.40 ± 0.14	0.18 ± 0.09
骨	0.75 ± 0.17	0.40 ± 0.05	0.29 ± 0.05	0.16 ± 0.02
脳	0.25 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.01

前記生体内分布データは、前記第 1 の CC49-PEG₁₀-TCO-Oメジャー 23a に関してスペーサーの無い CC49-TCO 構成物のインビボでのより高い安定性を確認する。テトラジンの注射前に CC49-PEG₁₀-TCO (CC49-23a) で処理されたマウスでは、腫瘍内に存在する高い mAb 量 ($15.81 \pm 0.22\ \% \text{ID}/\text{g}$) は、前記 TCO 及びテトラジンとの反応により、 $3.09 \pm 0.01\ \% \text{ID}/\text{g}$ の ^{177}Lu 蓄積を与える結果となった (表 3)。残念なことに、 ^{177}Lu -テトラジンと血液中循環する高濃度の mAb-TCO との反応はまた、低腫瘍対血液比率 ($T/B = 3.1 \pm 1.0$) を与える結果となった。前記 T/B は、前記放射性ラベル化テトラジンが mAb 後 4 日で投与される場合には、mAb クリアランスにより改善された (21.3 ± 4.0)。しかしこの時点では腫瘍中には約 4 倍低い ^{177}Lu -テトラジン蓄積がまた観測された ($0.86 \pm 0.39\ \% \text{ID}/\text{g}$)。絶対的なテトラジン蓄積の減少は、組織から mAb-TCO が放出された結果ではなく ($10.99 \pm 4.24\ \% \text{ID}/\text{g}$ の ^{125}I -mAb はなお腫瘍に存在する)、注射の間に 4 日間でインビボでの TCO 分解によると考えられる。

【0148】

逆に、前記マウスが PEG₁₀ スペーサーの無い CC49-TCO 構成物で処理される場合、 ^{111}In -テトラジンの腫瘍での取り込みの減少は、mAb 注射後 1 日に対して mAb 注射後 3 日でも観測されなかった (表 4 ~ 表 6)。同時に、前記 T/B 比率は、血液から mAb-TCO クリアランスのために約 2 から 4 以上に増加した。この時間の間の前記腫瘍結合 TCO の維持された反応性は、前記第 1 の CC49-PEG₁₀-TCO に対してそのより高い安定性を強化する。

【0149】

実施例 8

10

20

30

40

50

イメージング実験

腫瘍保持マウスに PEG10 スペースー無しの CC49-TCO 構成物を投与した後 3 又は 4 日後に ^{111}In -テトラジン 28 (マウス当たり $21\text{ }\mu\text{g}/75\text{ }\mu\text{L}$ 、 $20\sim 50\text{ MBq}$) を注射した。約 1 時間後、マウスを麻酔し、麻酔のためのノーズコーンと呼吸モニターセンサを付けた動物ベッドに置いた。シングルフォトンエミッションコンピュータトモグラフィ (SPECT) は、4 ヘッドマルチピンホール小動物用 SPECT/CT イメージングシステム (NanoSPECT、Bioscan Inc.) を用いてテトラジン注射後 2 時間で実施した。前記 SPECT 取得 (全 1 時間) は、 1.4 mm 直径ピンホールで、及び 1 視野当たり $120\sim 140$ 秒の取得時間で実施された。 ^{111}In のエネルギー窓は、 $245\text{ keV}\pm 15\%$ 及び $171\text{ keV}\pm 20\%$ に設定された。最初のスキャンから 2 から 4 日後、マウスを過剰麻酔により安楽死させ、第 2 の SPECT/CT スキャンを一晩取得した。それぞれの SPECT 測定の前に CT スキャン (1 投影当たり 2 秒、360 投影) を実行して放射能分布の解剖学的情報を得た。前記取得後、データは製造者のソフトウェア (InVivoScope 1.39、patch 1) で繰り返し再構成した。興味対象領域 (ROI) は手動で、腫瘍、肝臓、腎臓及び大腿筋で 3 回描かれた。既知量の ^{111}In を充填したファントムを、組織放射能定量化のためにスキナーを校正するために使用した。CC49-TCO-Oマイナー (CC49-20b)、CC49-TCO-Oメジャー (CC49-20a) 及び CC49-TCO-Cマイナー (CC49-14b) を注射された 3 マウスのそれぞれの時間でのイメージが、図 13 A~C にそれぞれ示される。

【0150】

図 13 の左側は、CC49-TCO-Oマイナー (CC49-20b) (A)、CC49-TCO-Oメジャー (CC49-20a) (B) 又は CC49-TCO-Cマイナー (CC49-14b) (C) の注射の 3 から 4 日後に、 ^{111}In -テトラジン 28 (マウス当たり $21\text{ }\mu\text{g}/75\text{ }\mu\text{L}$ 、約 40 MBq) を注射後 2 時間での生きたマウスの SPECT/CT 投影画像である。図 13 の右側は、最初のイメージング実験の後 2 から 4 日後の同じマウスの死後 SPECT/CT スキャンを示す。

【0151】

マウスでの縦 SPECT/CT 研究は、CC49-TCO-O (メジャー及びマイナーの両方) での前処理後 3 日で腫瘍への ^{111}In -テトラジン取り込みを示し、それによりこれらの TCO-構成物のインビボでの安定性を確認する (図 13 A 及び B)。この時点で、非腫瘍結合の mAb-TCO のほとんどが循環系から除去され、従って、腫瘍以外の可視化される器官は、 ^{111}In -テトラジン尿中排泄による腎臓及び膀胱のみである。重要なことは、血液中及び肝臓などの血液の多い器官には放射能が見られないということである。バックグランド放射能が非常に低いことは、前記第 1 世代の CC49-PEG₁₀-TCO で得られる結果に関して基本的な改善となり (R. Rossin, P. Renart, Verkerk, Sandra M. van den Bosch, R. C. M. Volders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard の「Angew Chem Int Ed 2010, 49, 3375」参照)、これは患者の骨髄及び投与制限される器官へのより低暴露を与えることとなる。

【0152】

注目すべきことは、CC49-TCO-O で処理されたマウスの腫瘍は、 ^{111}In -テトラジン注射後 72 から 96 時間でもなお高い放射能を持つということであり、これは前記 TCO-テトラジンシクロ付加生成物のインビボでの高い安定性を示唆するものである。後の時点で、いくらかの活性がなおマウス腎臓で見られ、いくらかが肝臓に蓄積されているが、これは抗原脱離、及びテトラジン注射の時点で血液中になお循環する mAb の除去によると考えられる。長期間腫瘍での放射能が維持されることはまた、癌患者でプレターゲット RIT が目的とされる場合に非常に重要となる。事実、治療用放射性核がより長くターゲット組織に結合すると、前記腫瘍へ輸送される容量は高くなる。

驚くべきことに、CC49-TCO-Cマイナーの投与の後に ^{111}In -テトラジン

を注射されたマウスではむしろ低放射能取り込みが観察されたということであり、これは前記2つの処置の間の4日の遅延によると考えられる(図13C)。しかしこの場合においても、腫瘍でのシグナルは、最初のスキャン後2日でもなお存在し、このことはインビボでのディールスアルダー反応から得られるシクロ付加生成物のインビボでの安定性を確認するものである。

【0153】

実施例9

この実施例は、トランスシクロオクテンの種々の位置での種々の置換基のインシリコ試験に関する。種々の置換シクロオクテンについて、HOMOエネルギーをMOPACソフトウェア(Cambridge software Mopac Pro version 8.03)を用いて計算された。得られた結果を以下表6に示す。

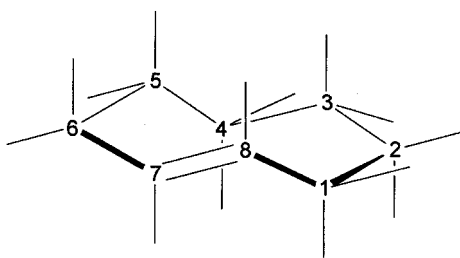
10

表6 異なる置換基についてMOPACで決定されたHOMOエネルギー。

ここで(a)はアキシャル；(e)はエクソトリアルを示す。炭素原子は次の構造式により番号付けされている。

【0154】

【化7】



20

【0155】

【表 6】

1/6	2/5	3/4	7/8	HOMO (eV)
				- 9.23
CH2-tBu (a)				-9.24
CH2-tBu (e)				-9.19
	CH2-tBu (a)			-9.17
	CH2-tBu (e)			-9.20
		CH2-tBu (a)		-9.15
		CH2-tBu (e)		-9.20
			CH2-tBu	-8.93
OH (a)				-9.28
OH (e)				-9.39
	OH (a)			-9.28
	OH (e)			-9.41
		OH (a)		-9.23
		OH (e)		-9.40
			OH	-8.80
O-Me (a)				-9.25
O-Me (e)				-9.37
	O-Me (a)			-9.13
	O-Me (e)			-9.24
		O-Me (a)		-9.12
		O-Me (e)		-9.37
			O-Me	-8.96
Me (a)				-9.23
Me (e)				-9.23
	Me (a)			-9.22
	Me (e)			-9.22
		Me (a)		-9.17
		Me (e)		-9.22
			Me	-8.93
O-tBu (a)				-9.20
O-tBu (e)				-9.31
	O-tBu (a)			-8.95
	O-tBu (e)			-9.12
		O-tBu (a)		-8.99
		O-tBu (e)		-9.30
			O-tBu	-8.95

10

20

30

40

tBu (a)				-9.21
tBu (e)				-9.22
	tBu (a)			-9.17
	tBu (e)			-9.22
		tBu (a)		-9.15
		tBu (e)		-9.19
			tBu	-8.88
O-Phe (a)				-8.94
O-Phe (e)				-9.05
	O-Phe (a)			-8.88
	O-Phe (e)			-8.96
		O-Phe (a)		-9.01
		O-Phe (e)		-9.23
			O-Phe	-8.69
O-Bz (a)				-9.36
O-Bz (e)				-9.37
	O-Bz (a)			-9.02
	O-Bz (e)			-9.23
		O-Bz (a)		-9.07
		O-Bz (e)		-9.36
			O-Bz	-8.58

10

20

実施例 10

30

テトラジン 28 の他の合成手順及び対応する Gd - 錯体、28 - Gd

図 15 に、5 - オキソ - 5 - (6 - (6 - (ピリジン - 2 - イル) - 1, 4 - ジヒドロ - 1, 2, 4, 5 - tテトラジン - 3 - イル)ピリジン - 3 - イルアミノ)ペンタン酸 (30) の合成経路が示される。

【0156】

6 - (6 - (ピリジン - 2 - イル) - 1, 4 - ジヒドロ - 1, 2, 4, 5 - テトラジン - 3 - イル)ピリジン - 3 - アミン (29) は文献手順 (M. L. Blackman, M. Royzen, M. J. Fox, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 13518 - 13519) に従って合成した。29 (428 mg, 1.69 mmol) 及び無水グルタル酸 (231 mg, 2.03 mmol) の THF (10 mL) 中混合物を 60 に 40 時間、アルゴン不活性雰囲気下で加熱した。冷却後、オレンジ色の沈殿を THF (5 mL) で洗浄し、乾燥してオレンジ色固体として 30 を得た (537 mg, 87%)

40

^1H - NMR (400 MHz, DMSO - d_6) : δ = 12.1 (br. s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.82 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.64 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.15 (dd, J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 2.4 Hz, 1H), 8.0 - 7.9 (m, 3H), 7.53 (dt, J_1 = 1.8 Hz, J_2 = 4.8 Hz, 1H), 2.43 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.83 (q, J = 7.4 Hz, 2H) ; ^{13}C - NMR (100 MHz, DMSO - d_6) : δ = 174.2, 171.6,

50

148.6、147.3、146.3、146.1、141.4、138.9、137.4、137.2、126.6、125.3、121.3、120.9、35.3、32.9、20.2; MS (ESI, m/z): 計算値: $C_{17}H_{18}N_7O_3^+$ ($[M+U]^+$): 368.15、実測値: 368.25

5 - オキソ - 5 - (6 - (6 - (ピリジン - 2 - イル) - 1, 2, 4, 5 - テトラジン - 3 - イル) ピリジン - 3 - イルアミノ) ペンタン酸 (6)

化合物 30 (166 mg; 0.452 mmol) を酢酸 (3 mL) 中に懸濁させ、亜硝酸ナトリウム (93.5 mg; 1.36 mmol) を添加した。紫色懸濁液への急速な着色が観察された。攪拌 15 分後、反応混合物を濾過し、水 (2 x 6 mL) 及びアセトン (3 mL) で洗浄し乾燥して、紫色固体として生成物を得た (152 mg、92%)。

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.13 (s, 1H)、10.58 (s, 1H)、9.05 (d, J = 2.3 Hz, 1H)、8.94 (d, J = 4.2 Hz, 1H)、8.62 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.60 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.43 (dd, J_1 = 2.3 Hz, J_2 = 8.8 Hz, 1H)、8.16 (td, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.7 Hz, 1H)、7.73 (ddd, J_1 = 1.1 Hz, J_2 = 4.4 Hz, J_3 = 7.4 Hz), 2.50 (t, J = 7.3 Hz, 2H)、2.33 (t, J = 7.3 Hz, 2H)、1.86 (q, J = 7.3 Hz, 2H); ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 174.1 (q)、172.0 (q)、163.0 (q)、162.7 (q)、150.6 (t)、150.2 (q)、143.8 (q)、141.3 (t)、138.4 (q)、137.7 (t)、126.5 (t)、126.1 (t)、124.8 (t)、124.1 (t)、35.4 (s)、32.9 (s)、20.2 (s); HRMS (ESI, m/z): 計算値: $C_{17}H_{16}N_7O_3^+$ ($[M+H]^+$): 366.1314、実測値: 366.1313。

tert - ブチル (37, 41 - ジオキソ - 41 - (6 - (6 - (ピリジン - 2 - イル) - 1, 2, 4, 5 - テトラジン - 3 - イル) ピリジン - 3 - イル) アミノ) - 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 - ウンデカオキサ - 36 - アザヘンテトラコンチル) カルバメート (31)

PyBOP (148 mg、0.284 mmol) を、6 (94.4 mg、0.258 mmol)、アミノ - PEG₁₀ - アミノ - Boc (150 mg、0.233 mmol)、及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (新規に蒸留した。100 mg、0.774 mmol) の DMF (2 mL) 中混合物に 0 で添加した。混合物を室温に暖め、攪拌を 15 分間続けた。透明、暗赤色溶液を揮発させて乾燥し、生成物をクロロホルム (5 mL) に再度溶解させ、0.2 M の KH_2PO_4 (pH = 4.3, 3.3 mL) 溶液及び飽和 Na_2CO_3 (2.3 mL) 溶液で洗浄し、その後ジエチルエーテル (20 mL) 中で沈殿させた。沈殿は遠心装置で収集し、シリカ上で、クロロホルム中のメタノールの勾配 (0 ~ 10%) を用いてカラムクロマトグラフにより精製し、紫色ワックス状固体として 31 を得た (148 mg、64%)。

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.07 (d, J = 2.2 Hz, 1H)、8.97 (d, J = 4.6 Hz, 1H)、8.73 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.72 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.63 (dd, J_1 = 2.3 Hz, J_2 = 8.8 Hz, 1H)、8.03 (td, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.7 Hz, 1H)、7.59 (ddd, J_1 = 1.1 Hz, J_2 = 4.6 Hz, J_3 = 7.4 Hz), 7.01 (s, 1H)、5.14 (s, 1H)、3.9 - 3.2 (broad s, 48H)、2.60 (t, J = 7.1 Hz, 2H)、2.37 (t, J = 7.1 Hz, 2H)、2.09 (q, J = 7.1 Hz, 2H)、1.43 (s, 9H); ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 173.8 (q)、173.1 (q)、163.8 (q)、163.7 (q)、151.3 (t)、150.5 (q)、144.0 (q)、142.7 (t)、139.2 (q)、137.9 (t)、127.0 (t)、126.9 (t)、125.5 (t)、124.7 (t)、79.5 (q)、70.5 (s)、70.1 (s)、40.7 (s)、39.7 (s)、36.5 (s)、35.5 (s)、28.8 (p)、2

10

20

30

40

50

1.9 (s); HRMS (ESI, m/z): 計算値: $C_{46}H_{74}N_9O_{15}^+$ ($[M+H]^+$): 992.5304、実測値: 992.5301

2, 2', 2'' - (10 - (2, 40, 44 - トリオキソ - 44 - ((6 - (6 - (ピリジン - 2 - イル) - 1, 2, 4, 5 - テトラジン - 3 - イル)ピリジン - 3 - イル)アミノ) - 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 - ウンデカオキサ - 3, 39 - ジアザテトラテトラコンチル) - 1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - 1, 4, 7 - トリイル)トリ酢酸 (28)

生成物 31 (72.3 mg、0.0727 mmol) を DCM (1 mL) 中に溶解して、TFA (1 mL) を添加した。混合物を室温で 1 時間攪拌した。蒸発させた後、残渣をアセトニトリル (1.5 mL) に溶解し、ジエチルエーテル (15 mL) で沈殿させた。紫色沈殿をろ過して分離し、32 の TFA 塩を定量的に得た。これを DMF (1.5 mL) 中に溶解し、DOTA-NHS (69.6 mg、0.075 mmol) 及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (新たに蒸留した 44 mg、0.341 mmol) を添加した。混合物を室温で 30 分攪拌した。透明な暗赤色 / 紫色溶液を揮発させて、粗生成物を水に溶解し、分取用 HPLC で精製した。凍結乾燥後、28 (80.5 mg、収率 87% を超える) が得られた。

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.22 (d, J = 2.4 Hz, 1H)、9.10 (dd, J₁ = 4.7 Hz, J₂ = 1.1 Hz, 1H)、8.78 (d, J = 8.7 Hz, 1H)、8.75 (d, J = 7.8 Hz, 1H)、8.59 (dd, J₁ = 2.4 Hz, J₂ = 8.7 Hz, 1H)、8.32 (td, J₁ = 7.8 Hz, J₂ = 1.7 Hz, 1H)、8.08 (ddd, J_{1i} = 1.1 Hz, J₂ = 4.7 Hz, J₃ = 7.8 Hz)、3.9 - 3.1 (m, 80H)、2.60 (t, J = 7.3 Hz, 2H)、2.34 (t, J = 7.3 Hz, 2H)、2.02 (q, J = 7.3 Hz, 2H); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ = 172.8 (q)、172.5 (q)、163.8 (q)、163.5 (q)、151.3 (t)、150.9 (q)、144.5 (q)、142.0 (t)、139.3 (q)、138.5 (t)、127.3 (t)、126.9 (t)、125.6 (t)、124.9 (t)、70.5 (s)、70.3 (s)、69.9 (s)、69.5 (s)、39.2 (s)、36.4 (s)、35.2 (s)、21.7 (s); HRMS (ESI, m/z): 計算値: $C_{57}H_{92}Ni_3O_{20}^+$ ($[M+H]^+$): 1278.6582、実測値: 1278.6557

28 の Gd^{III} - 錯体 (28 - Gd^{III})

化合物 28 (204 mg、0.160 mmol) を水溶性酢酸アンモニウム (0.1 M、pH = 5.5、5 mL) 中に溶解し、酢酸ガドリニウム (III) 水和物 (96.8 mg、0.239 mmol) を添加した。前記混合物を室温で 30 分攪拌し、直ぐに分取 HPLC で精製した。凍結乾燥後、Gd^{III} - 錯体が、紫色固体として得られた (188 mg、82% 収率)。MS (ESI, m/z): 計算値: $C_{57}H_{89}Ni_3O_{20}Gd^+$ ($[M+H]^+$): 1433.56、実測値: 1433.58。

実施例 11

新型テトラジンプロープの化学合成

他のテトラジン部分を持ついくつかのテトラジン型プロープが合成された。

合成経路は図 16 に示されている。

【0157】

3 - (5 - ブチルアミド - 2 - ピリジル) - 6 - (5 - (トリフルオロメチル) - 2 - ピリジル) - 12, 4, 5 - テトラジン (35)

2 - シアノ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジン (200 mg、1.16 mmol)、2 - シアノ - 5 - アミノ - ピリジン (300 mg、2.52 mmol) 及び硫黄 (80 mg、2.52 mmol) をエタノール (2 mL) 中、アルゴン不活性雰囲気下で攪拌した。ヒドラジン水和物 (0.60 g; 12.0 mmol) を添加し、混合物を 80 °C で一晩加熱した。反応混合物を冷却し、水 (2 mL) を添加した。遠心分離して得た固体を水 / エ

タノール = 1 / 2 で洗浄し、乾燥して粗生成物 33 を 135 mg 得た。遠心分離の上澄みを集めて水を加えることでさらに粗生成物 バッチ を沈殿させ (188 mg)、遠心分離して乾燥させた。

この粗生成物アミン (33) 及び無水酪酸 (285 mg、1.80 mmol) を、THF (5 mL) 中で一晩 65 ° で撹拌した。反応混合物を濃縮して残渣をヘキサン / ジエチルエーテル = 3 / 1 中で撹拌した。この懸濁液をガラスフィルタで濾過し、残渣を、溶出液としてヘキサン / アセトン 混合物 を用いてシリカカラムクロマトグラフし、粗生成物 34 (約 60 % 純度) を 90 mg 得た。前記粗アミド化ジヒドロテトラジン 34 (62 mg) を、THF (1.5 mL) と水 (2.0 mL) との混合物に懸濁させた。撹拌の間に、 NaNO_2 (88 mg、1.28 mmol) を添加し、その後水 (1 mL) 中の硫酸 (130 mg、1.33 mmol) 溶液を、0 ° で滴下した。赤色懸濁液への急速な着色が観察された。撹拌 3 分後、反応混合物をクロロホルムと水で希釈し、紫色沈殿を得、これをガラスフィルタで濾過して分離した。濾液の有機層を濃縮し、ジエチルエーテルで希釈して、第 2 の紫色固体生成物 を析出させた。固体と一緒に、クロロホルム及びジエチルエーテルの混合物で粉碎し、濾過して、純粋なテトラジン 35 (約 25 mg、2 - シアノ - 5 - トリフルオロメチル - ピリジンから計算して全収率 8 %) を得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 9.2 (s, 1H)、8.9 (d, 1H)、8.75 (多重シグナル、3H)、8.3 (d, 1H)、2.45 (t, 2H)、1.8 (m, 2H)、1.05 (t, 3H) ppm. $^{19}\text{F NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$): δ = -62.9 ppm. LC - MS / PDA: クロマトグラムの 1 つのピーク、 m/z = 390.2 ($\text{M} + \text{H}^+$) 及び 800.8 ($2\text{M} + \text{Na}^+$)、 m_{ax} = 329 及び 526 nm

3 - (5 - フルオロ - 2 - ピリジル) - 6 - (5 - ブタンアミド - 2 - ピリジル) - 1, 2, 4, 5 - テトラジン (38)

2 - シアノ - 5 - フルオロ - ピリジン (100 mg、0.82 mmol)、2 - シアノ - 5 - アミノ - ピリジン (200 mg、1.68 mmol) 及び硫黄 (55 mg、1.72 mmol) を、エタノール (1.5 mL) 中アルゴン不活性雰囲気下で撹拌した。ヒドラジン水和物 (0.35 g、7.0 mmol) を添加し、混合物を 90 ° で一晩加熱した。反応混合物を冷却し、エタノール (5 mL) を添加した。ガラスフィルタで濾過して固体を得、これをヘキサンで洗浄して、乾燥して、粗生成物 36 を 90 mg 得た。

【0158】

続いて、この組成アミン生成物 36 及び無水酪酸 (93 mg; 0.59 mmol) を、THF (1.5 mL) 中で 65 ° で撹拌加熱した。アルゴン下で一晩反応させた後、反応混合物を冷却し、いくつかのヘキサン (約 3 mL) で希釈してガラスフィルタで濾過した。残渣を、溶出溶媒としてヘキサン / アセトン混合物でシリカカラムクロマトグラフにより精製し、純粋なアミド化生成物 37 (約 28 mg、2 - シアノ - 5 - フルオロ - ピリジンから計算して全収率 10 %) を得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 9.25 (bs, 1H, NH)、8.7 (s, 1H)、8.5 (s, 1H, NH)、8.4 (multiplesignals, 2H)、8.2 (m, 1H)、8.1 (m, 1H)、7.95 (m, 1H)、7.5 (m, 1H)、2.4 (t, 2H)、1.75 (m, 2H)、1.05 (t, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 172.8、161.6、159.0、146.6、146.1、143.5 (d)、141.6、139.3、136.8、136.6、136.4、127.0、124.0、123.8、122.6、121.5、38.9、18.8、13.5 ppm (C - F カップリングによる、いくつかの炭素シグナルはダブルット)。LC - MS / PDA: クロマトグラムの 1 つのピーク m/z = 342.1 ($\text{M} + \text{H}^+$)、 m_{ax} = 288 nm.

アミド化ジヒドロテトラジン 37 (28 mg; 0.082 mmol) を、THF (2 mL) 及び水 (2 mL) の混合物中に懸濁させた。撹拌の間に、 NaNO_2 (85 mg; 1.23 mmol)、及び水 (2 mL) 中の硫酸 (120 mg; 1.23 mmol) を 0

で滴下した。紫色懸濁液への急速な着色が観察された。攪拌3分後、クロロホルムと水を添加した。紫色のクロロホルム層を水で2回洗浄し、濃縮した。固体表面对残渣を少量のクロロホルム中で攪拌し、そこにヘキサンを添加した。ほとんど無色の上澄みをデカントし、固体を乾燥させて21mgの紫色粉末(収率75%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 8.8 (多重シグナル、5H)、7.75 (m、1H)、2.45 (t、2H)、1.8 (m、2H)、1.05 (t、3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$): δ = 173.4、162.9、162.6、162.4、159.8、146.0、143.2、141.3、139.7 and 139.4、138.8、126.9、125.8 (d)、125.2、124.4、124.2、39.0、18.7、13.5 ppm (C-Fカップリングによる、炭素シグナルのいくつかはダブルット). $^{19}\text{F NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$): δ = -120.4 ppm. LC-MS/PDA: クロマトグラムの1つのピーク m/z = 340.2 ($\text{M} + \text{H}^+$)、 m_{ax} = 324 及び 529 nm.

3-(2-ピリジル)-6-メチル-1,2,4,5-テトラジン(40)

2-シアノピリジン(500mg、4.8mmol)、アセタミジンヒドロクロリド(2.00g、21.2mmol)及び硫黄(155mg、4.8mmol)をエタノール(5mL)中でアルゴン不活性雰囲気下で攪拌した。ヒドラジン水和物(2.7g; 55.2mmol)を添加して混合物を20℃で一晩攪拌した。混濁混合物を濾過し、濾液を蒸発乾燥させ、オレンジ色粗生成物39を2.9g得た。

【0159】

続いて、この粗生成物(800mg)をTHF(3mL)及び酢酸(4mL)の混合物中に懸濁させた。水(3mL 9中の NaNO_2 (2.0g; 29.0mmol))を0℃で添加した。直ぐに赤/紫色懸濁液となった。0℃で5分間攪拌後、クロロホルムと水を添加した。紫色クロロホルム層を水で2回洗浄し、その後濃縮した。固体表面对残渣を、クロロホルムとヘキサンの1:1混合物中で攪拌し、その後濾過した。濾液を濃縮し、粗生成物を、クロロホルム/アセトン混合物を溶出溶媒として用いてシリカクロマトグラフで精製し、純粋な生成物40を得た(48mg、2-シアノピリジンから計算して全収率21%)。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.96 (d、2H)、8.65 (d、2H)、7.99 (t、2H)、7.56 (dd、3H)、3.17 (s、3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 168.1、163.6、150.9、150.3、137.4、126.3、123.9、21.4 ppm. LC-MS/PDA: クロマトグラムから1つのピーク、 m/z = 174.3 ($\text{M} + \text{H}^+$)、 m_{ax} = 274 及び 524 nm.

3,6-ビス(4-ピリジル)-1,2,4,5-テトラジン(42)

4-シアノピリジン(858mg; 8.24mmol)及びヒドラジン水和物(1.24g; 24.7mmol)を、アルゴン不活性雰囲気下で90℃で16時間加熱した。混合物を室温に冷却し、水で希釈した。オレンジ色の沈殿(41)を濾過し、水(3mL)で洗浄し、続いてDMSO(10mL)中に溶解した。DDC(372mg; 1.64mmol)をこの溶液に添加した。直ぐに暗赤色溶液が観察された。60分後、飽和水素化炭酸ナトリウム(20mL)を添加し、生成物をクロロホルムで抽出した(30mL、3回)。有機層を集めて Na_2SO_4 で乾燥し、蒸発させて乾燥して、表題の化合物をピンク色固体として得た(52mg; 4-シアノピリジンから計算した全収率5%)。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.97 (d、4H)、8.52 (d、4H) ppm. LC-MS/PDA: クロマトグラムからの1ピーク、 m/z = 237.2 ($\text{M} + \text{H}^+$)、 m_{ax} = 271 及び 523 nm.

実施例 12

さらなるトランス-シクロオクテン構成物の化学合成

詳細な合成経路は図17に示される。

【0160】

(E-メジャー)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 2-(シクロオク-4-

10

20

30

40

50

テン - 1 - ニルオキシ) アセテート (4 4 a)

T H F (4 0 m L) 中の 1 0 a (1 . 7 3 g 、 1 3 . 7 3 m m o l 、 約 1 0 % のシス異性体が混入) の氷冷溶液に、オイル中の水素化ナトリウム (6 0 % 、 2 . 6 0 g 、 6 5 . 0 m m o l) を添加した。室温で 1 5 分間混合物を撹拌した後、5 0 で 1 時間加熱した。混合物を氷冷し、プロモ酢酸 (2 . 5 0 g 、 1 7 . 9 m m o l) を添加した。得られた懸濁液を 1 時間氷冷して撹拌し、その後約 2 5 で 6 4 時間撹拌し、さらに T H F を撹拌可能にするために添加した (合計約 1 0 0 m L) 。 5 0 で 1 時間加熱後、混合物を冷却し水をゆっくりと添加した。ロータリーエバポレーターでほとんどの T H F を除去し、さらに水を加えた (合計 5 0 m L) 。水性混合物を、M T B E で抽出し (2 x 7 5 m L) 、その後有機層を 2 5 m L の水で洗浄した。水性層を集めて、1 6 g のクエン酸で酸性化し、生成物を 2 x 7 5 m L の M T B E で抽出した。乾燥しロータリーエバポレーターで除去し、残渣をカラムクロマトグラフで精製した (4 0 g 、 S i O ₂) 。生成物画分を集め、痕跡量の M T B E を含むヘプタンから再結晶させた。これにより 8 1 0 m g の生成物 4 3 a を得た (8 1 0 m g 、 4 . 4 0 m m o l 、 3 2 % 少量のシス異性体を含む) 。

¹ H - N M R (C D C l ₃) : = 1 . 4 - 2 . 4 5 (m 、 1 0 H) 、 3 . 1 - 3 . 2 (m 、 1 H) 、 3 . 9 - 4 . 1 (A B 、 2 H) 、 5 . 3 - 5 . 6 5 (m 、 2 H) .

生成物 4 3 a を 3 0 m L のジクロロメタンに溶解した。N - ヒドロキシコハク酸イミド (7 1 5 m g 、 6 . 2 2 m m o l) を添加し、混合物を氷冷した。D C C (1 . 4 2 g 、 6 . 8 9 m m o l) を添加し、混合物を氷冷して 3 0 分撹拌し、その後室温で 4 時間撹拌した。濾過して、ロータリーエバポレーターで濃縮し、4 0 g のシリカ上で、ヘプタン/酢酸エチル勾配を使用するクロマトグラフにより、4 4 a を得た。生成物画分を集め、少量の M T B E を含むヘプタンから再結晶した。生成物はこすると結晶化した。濾過後、生成物 1 8 0 m g が得られた (0 . 6 4 m m o l 、 1 5 % 、シス異性体が約 2 0 % 混在) 。

¹ H - N M R (C D C l ₃) : = 1 . 4 - 2 . 4 5 (m 、 1 0 H) 、 2 . 8 (s 、 4 H) 、 3 . 1 - 3 . 2 (m 、 1 H) 、 4 . 3 (s 、 2 H) 、 5 . 3 - 5 . 6 5 (m 、 2 H) .

(E - マイナー) - 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 2 - (シクロオク - 4 - テン - 1 - ニルオキシ) アセテート (4 4 b)

T H F (3 0 m L) 中の 1 0 b (0 . 7 8 g 、 6 . 1 9 m m o l) の氷冷溶液に、オイル中の水素化ナトリウム (6 0 % を超える、0 . 9 4 g 、 2 3 . 5 m m o l) を添加した。室温で 1 5 分間混合物を撹拌した後、5 0 で 1 時間加熱した。混合物を氷冷し、プロモ酢酸 (1 . 4 1 g 、 1 0 . 1 4 m o l) を添加した。この懸濁液を約 2 5 で 2 0 時間撹拌し (サンプルはカップリングが生じていないことを示した) 、続いて 5 5 で 6 時間、2 5 で 3 日間、さらに 6 時間 5 5 で撹拌した。ロータリーエバポレーター及び 5 0 m L M T B E により、次いで氷及び 2 5 m L 水によりほとんどの T H F を除去した。層分離させ、水層を 3 0 m L の M T B E で抽出した。有機層を合せて 2 5 m L の水で洗浄した。水層を合せて氷で冷却し、5 0 m L の M T B E を添加し、続いて 5 . 1 g のクエン酸を添加した。層分離させ、水層を 5 0 m L の M T B E で抽出した。乾燥させロータリーエバポレーターで濃縮して得られた残渣 (4 3 b) を次のステップに使用した。

¹ H - N M R (C D C l ₃) : = 1 . 2 - 2 . 4 5 (m 、 1 0 H) 、 3 . 6 5 - 3 . 7 5 (m 、 1 H) 、 4 . 1 (s 、 2 H) 、 5 . 4 5 - 5 . 6 5 (m 、 2 H) .

生成物 4 3 b を 3 0 m L のジクロロメタンに溶解した。N - ヒロソキシスクシンイミド (1 . 6 0 g 、 1 3 . 9 1 m m o l) を添加し、混合物を氷冷した。D C C (3 . 1 1 g 、 1 5 . 1 0 m m o l) を添加し、混合物を氷冷して 3 0 分、その後室温で 3 時間撹拌した。濾過して、ロータリーエバポレーターで濃縮し、4 0 g のシリカ上で、トルエン及び次いでジクロロメタンを溶出溶媒として用いてクロマトグラフして 4 4 b を得、これをプロモ酢酸の N H S エステルと混合した。混合物を 2 5 m L M T B E 中に溶解させ、2 5 m L のヘプタンを溶液に添加した。2 時間撹拌後、混合物を濾過した (固体はプロモ酢酸の N H S エステル) 。濾液をロータリーエバポレーターし、残渣を暖めた M T B E に溶解し、いくつかのヘプタンを添加して溶液を室温に冷却した。これにより沈殿を得た。ろ過し

10

20

30

40

50

て生成物 4 4 b を 3 0 m g 得た (0 . 1 1 m m o l 、 2 %) 。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ = 1 . 1 - 2 . 4 5 (m 、 1 0 H) 、 2 . 8 5 (s 、 4 H) 、 3 . 6 5 - 3 . 7 5 (m 、 1 H) 、 4 . 4 (s 、 2 H) 、 5 . 4 - 5 . 7 (m 、 2 H) 。

(E - メジャー) - 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 2 - (シクロオク - 4 - テン - 1 - イルオキシ) - 2 - フェニルアセテート (4 6 a)

THF (4 0 m L) 中の 1 0 a (3 . 0 g 、 2 3 . 8 m m o l 、 1 0 % 未満のシス異性体混入) 溶液にオイル中の 6 0 % NaH (3 . 0 g 、 7 5 . 0 m m o l) を添加した。混合物を室温で 1 0 分間攪拌し、1 . 5 時間 5 0 に加熱した。氷冷後、DL - 2 - プロモフェニル酢酸 (3 . 8 7 g 、 1 8 . 0 m m o l) を小分けにして添加した。THF (2 0 m L) を得られた濃いペースト状物に添加し、得られた懸濁液を 2 5 で 1 8 時間攪拌した。THF のほとんどをロータリーエバポレーターで 5 5 で除去した後、5 5 m L の MTBE を加えた。混合物を冷水で冷却して、いくらかの氷を加え、続いて 5 0 m L の水を添加した。層を分離し、水層を 5 0 m L の MTBE で抽出した。連続した有機層を 2 5 m L の水で洗浄した。水層を集めて氷冷し、5 0 m L の MTBE を添加し、続いて 1 0 g のクエン酸を加えた。層を分離し、水層を 5 0 m L の MTBE で抽出した。乾燥してロータリーエバポレーターして残った 5 . 0 5 g の生成物 4 5 a をそのまま次のステップに使用した。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ = 1 . 2 - 2 . 4 5 (m 、 1 0 H) 、 3 . 0 5 - 3 . 1 5 (m 、 1 H) 、 4 . 8 (2 s 、 1 H) 、 5 . 1 5 - 5 . 3 (m 、 1 H) 、 5 . 4 5 - 5 . 6 5 (m 、 1 H) 、 7 . 3 - 7 . 5 (m 、 5 H) 。

生成物 4 5 a を 5 0 m L のジクロロメタンに溶解した。N - ヒドロキシスクシンイミド (2 . 5 1 g 、 2 1 . 8 m m o l) を添加して、混合物を氷冷した。DCC (5 . 0 3 g 、 2 4 . 4 m m o l) を添加し、混合物を氷中で 1 5 分、その後室温で 3 時間攪拌した。濾過、ロータリーエバポレーター、さらにトルエン/ジクロロメタン勾配を使用する 5 5 g のシリカ上でクロマトグラフにより、2 . 8 g の 4 6 a を得た (7 . 8 3 m m o l 、 1 0 a に基づき 3 3 % 収率、約 5 % のシス異性体が混入) 。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ = 1 . 4 - 2 . 4 5 (m 、 1 0 H) 、 2 . 7 (s 、 4 H) 、 3 . 2 5 - 3 . 3 5 (m 、 1 H) 、 3 . 3 5 - 3 . 4 5 (m 、 1 H) 、 5 . 2 (s 、 2 H) 、 5 . 3 5 - 5 . 6 5 (m 、 2 H) 、 7 . 3 5 - 7 . 5 5 (m 、 5 H) 。

(E - マイナー) - 2 , 5 - 2 , 5 - ジオキソピリジン - 1 - イル 2 - (シクロオク - 4 - テ - 1 - ニルオキシ) - 2 - フェニルアセテート (4 6 b)

0 における THF (6 0 m L) 中の 1 0 b の溶液 (1 . 0 g 、 7 . 9 m m o l) に、オイル中 6 0 % NaH (1 . 2 6 g 、 3 1 . 5 m m o l) を添加し、その混合物を 1 . 5 時間 5 0 に加熱した。0 に冷却後、DL - 2 - プロモフェニル酢酸 (2 . 2 2 g 、 1 0 . 3 m m o l) を、THF (5 m L) 中の溶液として添加し、粘稠懸濁液を激しく室温で 1 6 時間攪拌した。さらに 2 4 時間 4 0 で加熱した後、混合物を水 (1 0 0 m L) 中のクエン酸 (9 . 2 g) 溶液中へ投入した。水性混合物を MTBE で抽出し (3 x 5 0 m L) 、 Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を蒸発させて黄色油状物を得た。カラムクロマトグラフィ (SiO_2 、 CH_2Cl_2 / MeOH 2 %) で精製し、生成物、未反応 TCO 及び副生成物の混合物を得た。さらなる精製は、MTBE 及び 3 3 % NaOH 溶液で塩基性にした水中に溶解することにより達成された。水層を MTBE で洗浄し、クエン酸で酸性化し、ついで MTBE で抽出した (3 x) 。有機層を集めて Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を蒸発させて、化合物 4 5 b を黄色油状物として得た (4 6 3 m g 、 1 . 8 m m o l 、 2 3 % 収率) 。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ = 1 . 2 - 2 . 4 5 (m 、 1 0 H) 、 3 . 7 - 3 . 8 (m 、 1 H) 、 4 . 9 及び 4 . 9 5 (2 s 、 1 H) 、 5 . 4 - 5 . 7 (m 、 2 H) 、 7 . 3 - 7 . 5 5 (m 、 5 H) 。

4 5 b (4 6 3 m g 、 1 . 8 m m o l) 及び N - ヒドロキシスクシンイミド (2 5 0 m g 、 2 . 2 m m o l) の THF (9 m L) 溶液に、0 で、DCC (3 7 2 m g 、 1 . 8

10

20

30

40

50

mmol)のTHF(2mL)中溶液を添加した。反応混合物を室温で16時間攪拌し、その後沈殿を濾過により除去した。濾液を真空で濃縮しカラムクロマトグラフィ(SiO₂、ヘプタン/酢酸エチル勾配25%~40%)により精製して、46b(451mg、1.3mmol、71%収率)で無色シロップ状物として得た。

¹H-NMR(CDCl₃): = 1.1 - 2.6 (m, 10H)、2.8 (s, 4H)、3.8 - 3.9 (m, 1H)、5.2 and 5.3 (2s, 2H)、5.4 - 5.75 (m, 2H)、7.3 - 7.6 (m, 5H)。

(E-メジャー)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 2-(シクロオク-4-テ-1-ニルオキシ)-2-メチルプロパノエート(49a)

氷浴中で冷やされたTHF(120mL)中の10a(3.0g、23.8mmol)の溶液に、オイル中の60%水素化ナトリウム(3.8g、95mmol)を添加した。氷冷バスを取り除き、混合物を室温で30分間攪拌し、次に50 で1時間攪拌した。氷冷後、D9-プロモプロピオン酸(3.3mL、35.6mmol)をゆっくりと添加した。混合物は添加の間に非常に粘稠となり、THF(50mL)で希釈した。添加を完了した後氷冷バスを外し、反応混合物を室温で16時間攪拌した。反応の進行は、NMRで追跡し、16時間後40%の変換が示された。反応混合物を次にさらに24時間35 で攪拌して84%の変換を達成した。反応混合物を真空で濃縮し、MTBEで希釈し、その後水(200mL)で失活させた。層を分離させ、水層を水(60mL)中のクエン酸(22.5g)の溶液で酸性化した。水性層をMTBEで抽出した(3×200mL)。有機層を合せて、Na₂SO₄で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、47aを含む混合物(5.19g)を得た。これをさらに精製することなく次のステップで使用した。

¹H-NMR(CDCl₃): = 1.1 - 2.45 (m)、1.4 (d) (13H)、3.1 - 3.2 (m, 1H)、3.9 - 4.0 (q, 1H)、5.3 - 5.65 (m, 2H)。

-70 でTHF(200mL)中のジイソプロピルアミンの溶液(13mL、92mmol)に、ヘキサン中2.5Mのn-ブチリチウム(32mL、80mmol)をゆっくりと添加した。混合物をゆっくりと-20 に暖め、再び-70 に冷却した。化合物47a(5.19g)をTHF溶液として添加し、得られた混合物を-20 に暖めた。この温度でヨードメタン(10.7mL、1.72mmol)を添加し、混合物を5 に暖めた。サンプルを取り、NMR分析によれば、反応は完了した。反応混合物を水(200mL)中のクエン酸(40g)溶液中に注ぎ、MTBEで抽出した(3×150mL)。有機層を集めて水溶性クエン酸で及びブラインで洗浄した。Na₂SO₄上で乾燥した後溶媒を蒸発させて黄色オイル状物を得た(9.4g)。カラムクロマトグラフィ(SiO₂、CH₂Cl₂/MeOH1~4%勾配)で精製し、純粋な48aを黄色シロップ状物として得た(1.15g、5.4mmol、2ステップで収率23%)。

¹H-NMR(CDCl₃): = 1.1 - 2.45 (m)及び1.4 (2s) (16H)、3.2 - 3.3 (m, 1H)、5.3 - 5.7 (m, 2H)。

48a(1.15g、5.4mmol)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(622mg、5.4mmol)のTHF(27mL)中溶液に、0 で、DCC(1.12g、5.4mmol)のTHF(5mL)中溶液を添加した。添加後、混合物を室温に暖め、その温度で16時間攪拌した。混合物をMTBEで希釈し、沈殿を濾過して除いた。溶媒を蒸発させた後残渣をカラムクロマトグラフィ(SiO₂、ヘプタン/酢酸エチル20~40%勾配)で精製した。ヘプタン/酢酸エチルから結晶化により、49aを無色結晶として得た(707mg、2.3mmol、収率42%)。

¹H-NMR(CDCl₃): = 1.5 - 2.4 (m)、1.55 (s)、1.60 (s) (16H)、2.85 (s, 4H)、3.2 - 3.3 (m, 1H)、5.4 - 5.65 (m, 2H)。

(E-マイナー)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 2-(シクロオク-4-テ-1-ニルオキシ)-2-メチルプロパノエート(49b)

氷冷したTHF(60mL)中の10b(1.5g、11.9mmol)の溶液中に、6

10

20

30

40

50

0%オイル中の水素化ナトリウム(1.5 g、11.9 mmol)を添加した。氷冷バスを外して混合物を50℃で1.5時間撹拌した。氷冷して、DL-プロモプロピオン酸(1.7 mL、17.8 mmol)をゆっくりと添加した。混合物は添加の間に非常に粘稠になり、THF(35 mL)で希釈した。添加を終了後、氷冷バスを外し、反応混合物を室温で16時間撹拌した。混合物は次に43℃にさらに24時間加熱した。反応混合物を真空中で濃縮し、MTBEで希釈し、水で失活させた(200 mL)。層分離させ、水性層を水中のクエン酸で酸性化した。水性層をMTBEで抽出した(3×100 mL)。有機層を集め、Na₂SO₄で乾燥し、溶媒を蒸発させて47bを含む混合物を得た(2.26 g)。その物質はさらに精製することなく次のステップで使用した。

¹H-NMR(CDCl₃): δ = 1.2-2.5 (m) 及び 1.5 (2d) (13H)、3.65-3.75 (m, 1H)、3.95-4.15 (2q, 1H)、5.4-5.65 (m, 2H)。

THF(100 mL)中のジイソプロピルアミン(5.6 mL、39.6 mmol)の溶液中に、-70℃で、ヘキサン中2.5 Mのn-ブチルリチウム(13.5 mL、33.8 mmol)をゆっくりと添加した。混合物を次に0℃にゆっくり暖め、再び-70℃に冷却した。THF中の溶液として化合物47b(2.26 g)を添加し、混合物を-20℃に暖めた。この温度で、ヨードメタン(4.6 mL、73.9 mmol)を添加し、この混合物を15℃に暖めた。サンプルを取り、NMR分析によれば反応は終了した。反応混合物を水(140 mL)中のクエン酸(20 g)に注ぎ、MTBEで抽出した(3×100 mL)。有機層を集めて、水性クエン酸で及びブラインで洗浄した。Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を蒸発させて黄色シロップ状物を得た(4.6 g)。カラムクロマトグラフィ(SiO₂、CH₂Cl₂/MeOH 1%~4%勾配)で繰り返し精製して純粋な48bを白色結晶性固体として得た(181 mg、0.85 mmol、2ステップで収率7%)。

¹H-NMR(CDCl₃): δ = 1.1-2.45 (m) 及び 1.45 (2s) (16H)、3.9-4.0 (m, 1H)、5.45-5.65 (m, 2H)。

THF(5 mL)中の48b(181 mg、0.85 mmol)とN-ヒドロキシスクシンイミド(98 mg、0.85 mmol)との溶液に、0℃でDCC(175 mg、0.85 mmol)のTHF中溶液を添加した。添加後、混合物を室温に暖め、その温度で5時間撹拌した。混合物をMTBEで希釈し、沈殿を濾過して除いた。蒸発後の残渣をカラムクロマトグラフィ(SiO₂、ヘプタン/酢酸エチル25%勾配)で精製して、49bを白色固体として得た(257 mg、0.83 mmol)。

¹H-NMR(CDCl₃): δ = 0.8-2.6 (m)、1.55 (s)、1.60 (s) (16H)、2.85 (s, 4H)、3.8-3.9 (m, 1H)、5.4-5.7 (m, 2H)。

(E-メジャー)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 4-(シクロオク-4-テ-1-ニルオキソ)ベンゾエート(52a)

THF(50 mL)中の10a(3.54 g、27.38 mmol)の氷冷溶液にオイル中水素化ナトリウム(60%、2.5 g、62.5 mmol)を添加した。混合物を15分間氷中で撹拌し、その後50℃に1時間加熱した。混合物を氷冷して、5 mLのTHF中に溶解された4-フルオロベンゾイルクロリド(1.72 g、10.84 mmol)を、5分間にわたり添加した。混合物を2日間25℃で撹拌し(サンプルのNMRは多くの生成物を示したが、また4-フルオロ安息香酸のTCOエステルの存在も示した)、その後3時間50℃で撹拌した。混合物を水で冷却し、10 mLの水をゆっくりと添加し、次に2 gの水酸化ナトリウム及び5 mLの水を添加した。ロータリーエバポレーターで溶媒をほとんど除去し、THF及び2 gの水酸化ナトリウムを添加し、混合物を50℃で4時間暖めた。ロータリーエバポレーターでほとんどの溶媒を除去し、メタノールを残渣ペースト状物に添加した。混合物を50℃で2時間温め、次にロータリーエバポレーターで55℃で暖めた。残渣懸濁物を50 mLの水で希釈した。MTBE(100 mL)を添加し、前記層を分離して有機層を水25 mLで洗浄した。有機層は、a.o.トランスシクロ

10

20

30

40

50

オクテノールを含有する。氷冷した水性層を集めて、20 g のクエン酸で処理し、生成物を2 × 75 mL のMTBEで抽出した。乾燥してロータリーエバポレーターで溶媒を除去して得られた固体残渣は、生成物と4 - フルオロ安息香酸を含んでいた。前記固体を40 mL のメタノールで暖めた。水(15 ~ 20 mL)をゆっくりと前記暖かい溶液に、濁りが生じるまで添加した。濾過及び濾液を冷却することで生成物を沈殿させた。これを濾過し、1 / 1 のメタノール / 水で洗浄し、真空乾燥して、望ましい生成物51aを0.827 g 得た(3.36 mmol, 4 - フルオロベンゾイルクロリドから計算して収率30%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ = 1.5 - 2.5 (m, 10H)、4.0 - 4.1 (m, 1H)、5.45 - 5.75 (m, 2H)、6.8 (d, 2H)、8.05 (d, 2H)。

10

メジャートランス酸51a(1.14 g, 4.63 mmol)及びN - ヒドロキシスクシンイミド(725 mg, 6.30 mmol)の50 mL ジクロロメタン中の氷冷混合物を、DCC(1.46 g, 7.08 mmol)で処理した。混合物を1時間氷中で攪拌し、次に室温で3時間攪拌した。濾過、回転式蒸発、及び40 g のシリカゲル上でヘプタン / 酢酸エチル勾配を用いるクロマトグラフィにより、シス異性体で汚染された52aの画分を得た。次の生成物画分と合せ、ヘプタンと酢酸エチル混合物と共に60 に暖めた。懸濁液を室温へ冷却し、次に濾過した。これにより生成物52aを0.973 g 得た(2.83 mmol, 61%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ = 1.6 - 2.5 (m, 10H)、2.85 (s, 4H)、4.0 - 4.1 (m, 1H)、5.45 - 5.75 (m, 2H)、6.8 (d, 2H)、8.05 (d, 2H)。

20

(E - マイナー) - 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 4 - (シクロオク - 4 - テ - 1 - ニルオキシ)ベンゾエート(52b)

THF(40 mL)中の10b(2.82 g, 22.38 mmol)の氷冷溶液にオイル中水素化ナトリウム(60%, 2.0 g, 50 mmol)を添加した。混合物を氷中で15分間、室温で30分間攪拌し、その後50 に1時間加熱した。混合物を氷冷して、8 mL THF中に溶解された4 - フルオロベンゾイルクロリド(1.72 g, 10.84 mmol)を、15分間で添加した。混合物を18時間室温で攪拌し(サンプルのNMRは多くのトランスシクロオクテノールの存在を示した)、その後50 6時間、25 で3日間、及び50 でさらに1時間攪拌した。水5 mL中の2.0 gの水酸化ナトリウム溶液をゆっくりと添加し、次に5 mLの水を添加した。回転式蒸発によりTHFをほとんど除去し、40 mLのメタノールを得られるペーストに添加した。混合物を50 で3時間温め、20 mLのTHFを添加し、加熱を4時間続けた。混合物を一晩25 で攪拌し(NMRは、なお少量のエステルの存在を示した)、次に4時間50 に加熱し、続いてロータリーエバポレーター蒸発させた。残留懸濁物を50 mLの水で希釈した。MTBE(100 mL)を添加し、層を分離し、有機層を25 mLの水で洗浄した。有機層は、a.o.トランスシクロオクテノールを含む。合せて氷冷した水性層を15 gのクエン酸で処理し、生成物を2 × 75 mLのMTBEで抽出した。乾燥及びロータリーエバポレーター蒸発させて得られた固体残渣は生成物と4 - フルオロ安息香酸との混合物からなっていた。固体を40 mLのメタノールで暖めた。水(25 mL)を、前記暖めた溶液中にゆっくりと添加し、続いて室温へ冷却し、次いで一晩攪拌した。濾過し、1 / 1のメタノール / 水で洗浄し、真空乾燥して、望む生成物51bを0.76 g 得た(3.09 mmol, 4 - フルオロベンゾイルクロリドに基づき28%)。

30

40

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ = 1.3 - 2.6 (m, 10H)、4.55 - 4.65 (m, 1H)、5.55 - 5.85 (m, 2H)、6.9 (d, 2H)、8.05 (d, 2H)。

前記マイナートランス酸51b(0.66 g, 2.68 mmol)及びN - ヒドロキシスクシンイミド(460 mg, 4.0 mmol)の50 mL ジクロロメタン中氷冷混合物を、DCC(460 mg, 4.61 mmol)で処理した。混合物を氷中で1時間攪拌し

50

、次に室温で16時間撹拌した。濾過、回転式蒸発、及びジクロロメタンを溶出溶媒として用いる30gのシリカゲル上でクロマトグラフィ。生成物を5mLの酢酸エチルに溶解した。ヘプタンを添加し、溶液を沈殿が現れるまで部分的に60で回転式蒸発した。ヘプタンを加えて混合物を5分間60で撹拌し、次に室温へ冷却した。濾過して、生成物52bを0.437g得た(1.27mmol、47%)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ = 1.4 - 2.6 (m, 10H)、2.9 (s, 4H)、4.55 - 4.65 (m, 1H)、5.55 - 5.8 (m, 2H)、6.9 (d, 2H)、8.05 (d, 2H)。

(E-メジャー、マイナー) 2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル 2-メチルシクロオク-4-テン-1-イル) アセテート (58)

過酸化水素(25mL、300mmol)の35%溶液を、酢酸パラジウム(45% Engelhard、1.0g、2mmol)、ベンゾキノン(432mg、4mmol)及び1, 5-シクロオクタジエン(27mL、200mmol)の混合物へ添加した。混合物を30で5日間、NMR分析が出発物質の95%変換を示すまで撹拌した。混合物を Et_2O (1L)中へ注ぎ、水を添加した(1L)。混合物を、氷冷しながら、33%のNaOH溶液でゆっくりと塩基性とした。層を分離し、水性層を Et_2O で抽出した(2x)。有機層を合せて、1NのNaOHで2回洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を注意して蒸発させて、粗生成物53を黄色オイル状物として得た(16.1g、130mmol、収率65%)。

【0161】

ヘキサン中のn-ブチルリチウム1.6M溶液(45mL、72mmol)を、-80に冷却したジイソプロピルアミン(14mL、100mmol)のTHF(250mL)中溶液に添加した。混合物を徐々に0に温めて次に-80に冷却した。THF(100mL)中のトリエチルホスホノアセテート(15mL、75mmol)溶液を添加し、混合物を45分間-70で撹拌した。その後、THF(50mL)中の53(6.21g、50mmol)の溶液を添加し、混合物をゆっくりと室温に暖めた。16時間後混合物をさらに加熱し、NMR分析により完全に変換したことを示すまで8時間還流した。混合物を水(250mL)に注ぎ、MTBEで抽出した(3x)。有機層を合せて塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒をロータリーエバポレーターで除き、カラムクロマトグラフィ(SiO_2 、ヘプタン/酢酸エチル5%)で精製して54を無色オイル状物として得た(4.74g、24mmol、49%収率)。

【0162】

メチルリチウム(59mL、94mmol)の1.6M溶液を、 Et_2O (21mL)中ヨウ化銅(I)(9.53g、50mmol)の懸濁物を氷冷して添加した。灰色溶液を真空で0で濃縮し、 CH_2Cl_2 で2回逆抽出した(stripped)。残渣を冷 CH_2Cl_2 (100mL)中で懸濁させ、-80に冷却して後、TMSCl(4.0mL、46.5mmol)をゆっくりと添加した。その後、 CH_2Cl_2 (60mL)中の54(4.74g、24mmol)の溶液を滴下し、混合物を室温で2時間以上暖めた。混合物をさらに16時間室温で撹拌し、その後飽和水溶性 NH_4Cl (150mL)で失活させた。混合物を室温で撹拌し、アンモニア(50mL)を添加した。混合物を濾過し、濾液を CH_2Cl_2 で抽出した(3x75mL)。有機層を合せて水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒をロータリーエバポレーター蒸発させ、カラムクロマトグラフィ(SiO_2 、ヘプタン/酢酸エチル3%)で精製して、55を無色オイル状物として得た(4.47g、21mmol、89%収率)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ = 0.8 - 1.9 (m)、1.05 (s) 及び 1.25 (t) (16H)、2.15 - 2.3 (m, 2H)、4.0 - 4.2 (q, 2H)、5.4 - 5.55 (m, 1H)、5.65 - 5.75 (m, 1H)。

水銀ランプを備え、及びポンプと、10%硝酸銀(I)含浸シリカゲル(36g、底部にはいくらかの通常グレードのシリカゲルを含む)を充填したカラムに接続されたフラスコに、ヘプタン/ Et_2O (3:1体積/体積)(約500mL)を充填した。55(4

10

20

30

40

50

、47 g、21.3 mmol) 及びメチルベンゾエート(2.7 mL、21.3 mmol) の少量の Et_2O 中の溶液を添加した後、水銀ランプのスイッチを入れた。前記カラムを通じる照射溶液の連続流に20時間照射した後、反応器の内容についてNMR分析で出発物質がもはや観測されなくなり、カラムをヘプタン中30%のMTBEで洗浄した。前記カラム内容物をアンモニアで処理し、 CH_2Cl_2 で抽出した(3x)、有機層を合せて Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を蒸発させた後、カラムクロマトグラフィ(SiO_2 、ヘプタン/酢酸エチル3%~4%勾配)で精製して、無色オイルとして化合物56を得た(1.41 g、6.7 mmol、収率31%)。前記メジャー及びマイナー異性体は分離されず、従って、これらの異性体は混合物としてさらに使用した。

^1H -NMR(CDCl_3): δ = 0.8 - 1.9 (m)、1.0 (s) 及び 1.25 (t) (16H)、2.1 - 2.4 (m、2H)、4.0 - 4.2 (q、2H)、5.5 - 5.65 (m、2H)。

水(1 mL) 及び EtOH (1 mL) 中の水酸化リチウム1水和物(84 mg、2.0 mmol) を56(210 mg、1.0 mmol) に添加した。前記化合物をより溶解させるために、THF(1 mL) 及び MeOH (2 mL) を添加した。室温で16時間撹拌後、変換はなお完了しなかった。追加の水酸化リチウム(85 mg) を添加して、混合物を45 °C に4時間加熱し、30 °C で16時間及び50 °C で4時間、変換が完了するまで加熱した。混合物を真空中で濃縮し、クエン酸溶液で中和した。MTBEで抽出(3x)し、 Na_2SO_4 で乾燥し、ロータリーエバポレーターで溶媒を蒸発させて、57を黄色オイル状物として得た(150 mg、0.82 mmol、収率82%)。

^1H -NMR(CDCl_3): δ = 1.0 (2s、3H)、1.3 - 2.0 (m、10H)、2.1 - 2.45 (m、2H)、5.5 - 5.65 (m、2H)。

57(150 mg、0.82 mmol) 及びN-ヒドロキシスクシンイミド(113 mg、0.98 mmol) の氷冷THF(5 mL) 中溶液に、DCC(170 mg、0.82 mmol) のTHF(1 mL) 溶液を添加した。混合物を室温で16時間撹拌し、その後MTBEで希釈した。沈殿を濾過して除去し、溶媒を蒸発させた後、カラムクロマトグラフィ(SiO_2 、ヘプタン/酢酸エチル10%~30%勾配)で精製し、無色オイル状物として化合物58を得た(197 mg、0.71 mmol、86%収率)。

^1H -NMR(CDCl_3): δ = 1.05 and 1.1 (2s、3H)、1.35 - 2.35 (m、10H)、2.4 (s、1H)、2.5 - 2.75 (AB、1H)、2.85 (s、4H)、5.5 - 5.65 (m、2H)。

実施例 13

新規なTCOの反応速度論

新規に合成したTCO構成物がそれぞれのテトラジン28に対する反応性について評価された。手順は実施例5に記載されている。

【0163】

【表 7】

表 7 : C C 4 9 - T C O 構成物と ^{177}Lu - 2 8 との間の二次反応速度定数。

TCO	$[\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
44a	20640 ± 485
44b	134800 ± 997
46a	28630 ± 1590
46b	163200 ± 2871
49a	25080 ± 3865
49b	148500 ± 12040
52a	20930 ± 3735
52b	333300 ± 625
58	323500 ± 43320

10

20

全ての T C O について、前記メジャー（エカトリアル）及びマイナー（アキシャル）異性体の間に重要 (profound) 且つ一貫した一定の反応性の違いがあり、マイナー異性体がメジャー異性体よりもずっと反応性が高い。さらに、T C O 5 8 の高い反応性は、抗体へのリンカーなしでもアキシャル位置での置換はなお、トランスシクロオクテン環の増加した反応性を与えること、を支持する。

【 0 1 6 4 】

実施例 1 4

新規モデルテトラジンプローブの安定性と反応性

30

他のテトラジン部分を含むいくつかのテトラジンモデルプローブが、水中でのそれらの反応性及び安定性につき評価された。

テトラジンの加水分解安定性試験

D M S O 中の特定のテトラジンの溶液 (2 5 m M) 1 0 μ L を P B S 緩衝液 (3 m L) で希釈し、この溶液を濾過した。

U V スペクトル分析を用いて、5 2 5 n m の吸収バンドの減少をモニタし、このデータから加水分解速度及び半減期を決定した。

テトラジンの、トランス - シクロオク - 4 - テン - 1 - オール (マイナー異性体、1 0 b) に対する反応性

競争実験を、特定テトラジン及び 3 - (5 - アセタミド - 2 - ピリジル) - 6 - (2 - ピリジル) - 1 , 2 , 4 , 5 - テトラジン (これは標準テトラジンとして選択された) との反応性の比率を、トランス - シクロオク - 4 - テン - 1 - オール (マイナー異性体、1 0 b) との逆 - 電子要求ディールスアルダー反応において、決定するために実施した。

40

【 0 1 6 5 】

アセトニトル (0 . 1 0 0 m L) に、D M S O 中の特定のテトラジン溶液 (2 5 m M) 5 μ L 及び D M S O 中参照テトラジンの溶液 (2 5 m M) 5 μ L を添加した。この混合物を水 (0 . 9 m L) で希釈し、両方のテトラジンの絶対量を L C - M S / P D A 分析で決定した。続いて、D M S O のトランス - シクロオク - 4 - テン - 1 - オール (マイナー異性体、1 0 b) (2 5 μ L 、 2 . 5 m M) を添加し、混合物を 5 分攪拌した。再び、両方のテトラジンの絶対量を L C - M S / P D A 分析で決定し、両方のテトラジンの変換を計

50

算した。これらの変換から、両方のテトラジンの反応性比率を決定した。

【 0 1 6 6 】

【表 8】

表 8：モデルテトラジンプローブの反応性及び安定性

テトラジン	$k_2/k_{2\text{ref}}$	$t_{1/2}$ (時間)	溶媒
35	1.84	35	ACN/PBS
38	0.95	117	PBS
40	0.25	230	PBS
42	0.83	2.4	PBS

10

表 8 から、テトラジンの置換基は、安定性及び反応性に対して一定の効果を持ち、特定の応用に合わせたプローブの設計において使用することができる、ということを明らかにする。

【 0 1 6 7 】

20

実施例 1 5

メジャー対マイナー T C O、2 0 a 対 2 0 b のテトラジンプローブ 2 8 との、インビトロ反応性の違い

この実験は、より高い T C O 反応性は、放射性ラベル化テトラジンと、両方の試薬が低濃度でより高い反応収率を与える、ということを示すために実施された。この目的で、我々は、C C 4 9 (メジャー及びマイナーそれぞれの分子当たり 6 . 1 及び 6 . 6 T C O) と共役した T C O メジャー 2 0 a ($k_2 = 19600 \pm 1400 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 及び T C O マイナー 2 0 b ($k_2 = 136700 \pm 2300 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) を用いた。T C O 濃度 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ から $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の範囲を得るため、2 つの m A b 溶液を P B S で希釈し、、支持体付加 ^{125}I - テトラジン (m A b に対して 1 当量) と 3 7 ° C で 1 分間反応させた。その後過剰のテトラジン 6 で失活させた前記反応混合物の一部 (2 0 μL) に、非還元性サンプル緩衝液を加え S D S - P A G E で分析した。シクロ付加反応は、前記 m A b に対応するバンドの放射能から決定し、計数 (カウント) を A I D A I m a g e A n a l y z e r ソフトウェアで定量化した。実験は 3 回繰り返した。生体分子反応について予期されるように、溶液中での 2 つの反応種の濃度における減少は、1 分のインキュベート後ではより低い反応収率となる (図 1 8)。しかし、アキシャル T C O 2 0 b を用いる場合には、反応収率は、エカトリアル T C O 2 0 a でマイクロモル濃度以下で得られるよりもずっと高く、これはテトラジンとのより速い反応速度によるものである。

30

【 0 1 6 8 】

実施例 1 6

40

T C O 2 0 b のインビボ安定性

この実験は、実施例 6 で説明した一連のインビボ T C O 安定性測定を拡張するために実施された。この一連において、P E G スペーサーで C C 4 9 と結合された T C O メジャー及びマイナー (2 3 a 及び 2 7 b) はインビボでは不安定であることが示され、一方 P E G スペーサーのない T C O メジャー (2 0 a) は、少なくとも 4 日間インビボで安定であることが見出された (図 1 3)。新たな実験では、同じ手順に従って、我々は、P E G スペーサーなしで C C 4 9 - 結合 T C O マイナーのインビボ安定性を試験した (2 0 b、6 . 9 当量結合)。m A b クリアランスで補正されたインビボ安定性データは、図 1 9 に示される。前記 C C 4 9 - 結合 T C O 2 0 b は、インビボではもっぱらゆっくりと分解されることが見出され、さらに、抗体との短いリンカーを持つ T C O はインビボでは、より長いら

50

ンカーで共役されたTCOよりもより安定であることが見出された。

【0169】

実施例17

TCO20b部分の範囲で官能化されたCC49抗体の血中動態及び生体内分布

一連の研究が、CC49分子当たりのTCO(20b)の数の、血液循環及び腫瘍ターゲットに対する影響の評価するために実施された。予想されることは、多すぎるTCO部分で抗体を修飾することは血液循環半減期を下げることとなり、CC49-TCO構成物の腫瘍取り込みに影響を与えるであろう、ということである。

CC49-TCO構成物の血中動態(図20及び21参照)

ヌードメスBalb/Cマウス(20~25g体重、Charles River Laboratories、n=3)に、mAb(マウス当たり100µg/100µL、約0.5MBq)当たり0、4.9、9.3または15.8TCO(20b)を担持する¹²⁵I-CC49を注射した。選択された時間(5分、3時間、6時間、1日、2日、3日)で、血液サンプルを伏在静脈から取り出し、秤量して1mLPBSで希釈した。mAb注射後4日で、動物は麻酔され頸椎脱臼で屠殺し、血液を心臓穿刺で集め、興味対象である器官及び組織を取り出し、乾燥プロットし、秤量し1mLPBSを添加した。全てのサンプルの放射能がガンマカウンター(Wizard II、Perkin Elmer)で、1グラムの組織当たりの注入された投与量(%ID/g)を決定するための標準品とともに測定した。血液中のCC49-TCO構成物の半減期は、GraphPad Prism(version 5.01)を用いて、血液曲線を2相減衰にフィッティングさせて決定した。

【0170】

【表9】

表9: CC49-TCO(20b)の血液反応速度パラメータ

TCO #	T _{1/2,α} (%)	T _{1/2,β}	R ²
0	2.6 時間 (58)	64.4 時間	0.970
4.9	2.4 時間 (50)	74.5 時間	0.983
9.3	2.0 時間 (61)	23.5 時間	0.972
15.8	1.1 時間 (79)	10.5 時間	0.996

CC49-TCO(20b)構成物の腫瘍ターゲット

腫瘍保持マウス(方法を参照; 100mm³腫瘍サイズ)に、mAb(マウス当たり100µg/100µL、約0.2~0.4MBq、n=4)当たり、0、8.5、12.7又は18.7TCO20bグループで官能基化された¹²⁵I-CC49を注射した。¹²⁵I-CC49を受けたマウスをmAb注射後4日で屠殺した。¹²⁵I-CC49-TCO20bを受けたマウスは、mAb注射後28及び72時間後に¹¹¹In-DOTA-テトラジン28(mAbに関し25当量、約0.8MBq)を注射し、テトラジン注射から3時間後屠殺された。屠殺の時点で、血液を心臓穿刺で集め、興味対象である器官及び組織を集め、プロット乾燥し、秤量し、1mLのPBSを加えた。全てのサンプルの放射能をガンマ計数器(Wizard 3、Perkin Elmer)で、二重同位体手順(エネルギー窓は、¹²⁵I、¹¹¹Inのそれぞれで、10~80keV及び100から510keVで設定)により、1グラム組織当たりのパーセント注入投与量(%ID/g)を決定するための標準と共に測定した。

【 0 1 7 1 】

【 表 1 0 】

表 1 0 : m A b 注射後 3 日の、腫瘍保持マウス内の¹²⁵I-CC49-TCO20b の生体内分布 (*を除く)。データは平均%ID/g ± SD (n = 4) で表される。

器官	CC49*	CC49-TCO(8.5)	CC49-TCO(12.7)	CC49-TCO(18.2)**
血液	6.80 ± 3.84	1.53 ± 0.55	0.89 ± 0.79	0.13 ± 0.08
腫瘍	73.82 ± 21.37	19.63 ± 4.92	10.58 ± 5.62	2.58 ± 0.61
心臓	1.83 ± 0.55	0.53 ± 0.18	0.28 ± 0.14	0.07 ± 0.02
肺	4.18 ± 1.53	1.06 ± 0.28	0.70 ± 0.29	0.21 ± 0.05
肝臓	3.61 ± 1.05	3.44 ± 0.47	1.18 ± 0.18	0.64 ± 0.15
脾臓	1.95 ± 0.78	1.07 ± 0.19	0.59 ± 0.14	0.34 ± 0.04
腎臓	2.22 ± 0.99	0.66 ± 0.21	0.45 ± 0.25	0.13 ± 0.03
筋	1.11 ± 0.26	0.35 ± 0.23	0.09 ± 0.03	0.03 ± 0.01
骨	0.90 ± 0.30	0.25 ± 0.07	0.16 ± 0.07	0.06 ± 0.02
脳	0.30 ± 0.22	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01

*マウスは、m A b 注射後 4 日で屠殺

**低免疫反応性

【 0 1 7 2 】

【 表 1 1 】

表 1 1 : CC49-TCO20b で前処理されたマウス内に¹¹¹In-テトラジン 28 の生体内分布 (注射後 3 時間)。データは、平均%ID/g ± SD (n = 4) で表される。

器官	CC49-TCO(8.5)	CC49-TCO(12.7)	CC49-TCO(18.2)
血液	0.45 ± 0.14	0.37 ± 0.28	0.12 ± 0.03
腫瘍	3.72 ± 1.45	3.36 ± 1.69	1.21 ± 0.22
心臓	0.16 ± 0.03	0.13 ± 0.05	0.09 ± 0.03
肺	0.42 ± 0.06	0.34 ± 0.10	0.29 ± 0.01
肝臓	0.44 ± 0.12	0.29 ± 0.12	0.26 ± 0.05
脾臓	0.25 ± 0.05	0.20 ± 0.06	0.20 ± 0.02
腎臓	1.64 ± 0.28	1.25 ± 0.24	2.15 ± 0.17
筋	0.11 ± 0.05	0.05 ± 0.00	0.29 ± 0.43
骨	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.10 ± 0.02
脳	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.05

表 9 から表 1 1 のデータから、TCO変性比率は 9 を超えるべきではないことが明らか

となる。

【0173】

実施例18

CC49 - TCO44bの血中動態及びインビボ安定性

血中動態

無腫瘍マウス（群ごとに $n = 3$ ）に、 7.5 TCO44bグループ（マウス当たり $100 \mu\text{g}$ 、 $0.2 \sim 0.4 \text{ MBq}$ ）で修飾されたCC49の ^{125}I -ラベル化CC49を注射した。選択された時点（1、3、6、24、48及び72時間）で、伏在静脈から血液サンプルを取り出し、ヘパリン含有バイアルに集めた。mAb注射後4日で、マウスを麻酔して脊椎脱臼で屠殺した。血液を心臓穿刺で集め、興味対象器官と組織を取り出し、

10

プロット乾燥し、秤量して 1 mL のPBSを添加して、器官当たりのパーセント注射投与量（%ID）を決定するために標準と共に、ガンマ計数器（Wizard 3、Perkin Elmer）で計数した。

【0174】

この研究で、TCO修飾CC49は、修飾していないCC49と比較してやや速いクリアランスを示した（図22）曲線下領域から計算された血液中の半減期（ $T_{1/2} = \ln 2 \times \text{AUC} / C_0$ ）は、CC49 - TCO及びCC49でそれぞれ、 22.2 及び 26.3 時間であった。我々はこれは、mAbのLys残基の官能化によると考える。短い血液循環の結果として、 ^{125}I -CC49 - TCOの低含有量がまた、計数の前に灌流されなかったほとんどの器官で実験の終了時に観察されたで、（図23）。

20

インビボ安定性

無腫瘍マウスの別の群（ $n = 3$ ）に、 ^{125}I -ラベル化CC49 - TCO44b（マウス当たり $220 \mu\text{g}$ 、 0.4 MBq ）を注射した。選択された時間（1、3、6、24、48及び72時間）で、血液サンプルを伏在静脈から取り出し、ヘパリン含有バイアルに集めた。mAb注射後4日でマウスを麻酔し、脊椎脱臼で屠殺した。血液を心臓穿刺で取り出し、胃と甲状腺を除去し、プロット乾燥し、器官当たりにパーセント注射投与量（%ID）を決定するため標準と共にガンマ計数器で計数した。これらの器官の低い ^{125}I の取り込み（胃で $0.17 \pm 0.03 \% \text{ ID}$ 及び甲状腺で $0.88 \pm 0.33 \% \text{ ID}$ ）は、前記放射線ラベル化mAbが4日の評価の間、インビボで前記ラベルを維持することを確認する。

30

【0175】

血液サンプルを秤量し、PBSで $100 \mu\text{L}$ に希釈し、 $0.1 \text{ MBq} / \mu\text{g}$ の比放射能で放射性ラベル化過剰の担持体付加 ^{177}Lu -テトラジン28を添加した。この混合物を、 20 分 37°C でインキュベートし、 $400 \times \text{g}$ で5分間遠心分離して血液細胞を分離した。その後、 $30 \mu\text{L}$ の上澄みをZeba脱塩スピナラム（ 0.5 mL 、 40 kDa MW カットオフ、Pierce）へ適用した。遠心分離後、高分子量ディールスアルダー反応生成物をカートリッジから溶出し、一方で過剰のテトラジンを保持させた。溶出液に含まれる放射能を、二重同位体手順（ ^{125}I 及び ^{177}Lu に対してそれぞれ、 $10 \sim 80 \text{ keV}$ 、 $155 \sim 380 \text{ keV}$ の窓を設定）でガンマ計数器で測定した。 ^{177}Lu のみを含む血清サンプルが前記カートリッジから漏れる ^{177}Lu を補正するために使用された。前記 ^{125}I 計数は、放射性崩壊を補正し、 $^{177}\text{Lu} / ^{125}\text{I}$ 比率が計算された。 $^{177}\text{Lu} / ^{125}\text{I}$ 比率の減少は、マウス血液サンプル中に存在する過剰の ^{177}Lu -テトラジンと ^{125}I -CC49 - TCOとのより低い反応収率を意味し、従ってインビボでの前記TCO基の不活性化を意味する。図24は、時間と共に $^{177}\text{Lu} / ^{125}\text{I}$ 比率の変化を、%当初（インタクト）TCO（ $t = 0$ で 100% に正規化されている）で示す。注目すべきことに、TCO44b基はmAb注射後48時間までインビボで完全に安定して見える（インタクトTCOの $97.8 \pm 1.6\%$ ）が、一方後の時点でいくらかの分解が見られた（mAb注射後4日でインタクトTCOの $80.4 \pm 1.8\%$ ）。

40

実施例19

50

CC49 - TCO44bでプレターゲットされた腫瘍保持マウスでの¹⁷⁷Lu - テトラジン28の生体内分布

腫瘍保持マウス（方法を参照；100mm³腫瘍サイズ；n = 4）に、7.544b基で官能基化された¹²⁵I - CC49（マウス当たり、100μg、約0.2MBq）を注射した。mAb注射後30及び48時間後、前記マウスは1投与の洗浄試薬（ガラクトース - MSA - テトラジン、1投与当たり160μg）を投与され、続いて2時間後¹⁷⁷Lu - テトラジン28を投与された（mAbに対して10当量、約0.5MBq）。テトラジン注射後3時間、マウスは麻酔され脊椎脱臼で屠殺され、血液を心臓穿刺で取り出し、興味対象の器官と組織を取り出しプロット乾燥した。集めたサンプル全てを秤量し、1mLPBSを添加した。サンプルの放射能を、二重同位体手順（¹²⁵Iについて10~80keV及び¹⁷⁷Luについて、155~380keVの窓を設定）で、1グラム当たりの組織のパーセント投与量（%ID/g）を決定するために標準と共にガンマ計数器で計数した。

10

【0176】

生体内分布データは、¹²⁵I - CC49 - TCO44bの高い腫瘍取り込みを示す。前記腫瘍取り込みは、他のTCO構成物で得られるよりも高く（下記参照）、これは7.5TCO - 44b基で官能化されたCC49のより長い血液内循環によると考えられる。対照的に、全ての他の器官でのmAbの保持は、2つの洗浄試薬を投与することで低くなるが、これらは前記循環CC49 - TCOを補足し、肝臓へ輸送し、そこで迅速に分解させるからである。腫瘍での高いmAbの取り込みの結果として、また、¹⁷⁷Lu - テトラジン取り込みも以前の実験で得られた結果よりもずっと高くなった（下記参照）。また、テトラジン投与の前の段階で非腫瘍結合性のCC49 - TCOが除去されるために、全ての他の器官への¹⁷⁷Lu取り込みは無視出来る程度となる。腎臓のみがむしろ高い¹⁷⁷Luの保持を示すが、これはテトラジンの尿内排泄の結果である。これにより、腎臓以外の全ての器官において、高いターゲット対非ターゲット比率が得られる。注目すべきことに、腫瘍及び血液に存在するTCOの34 ± 4%および10 ± 1%がそれぞれテトラジンと反応した。

20

【0177】

表12：¹⁷⁷Lu - テトラジン28の注射（マウス当たり8.5μg / 80μL、約0.5MBq）3時間後、¹²⁵I - CC49 - TCO - 44bの注射（マウス当たり100μg / 80μL、約0.2MBq）50時間後の二重同位体生体内分布データ。データは、%ID / グラム ± SD又は腫瘍 / 器官比率 ± SD（n = 4）として表される。

30

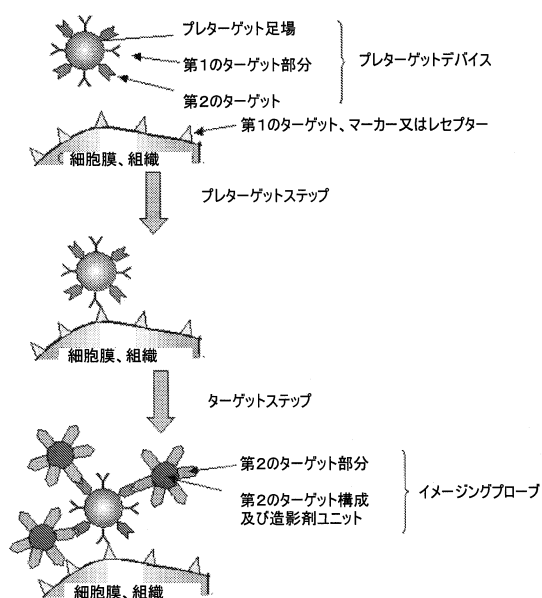
【表 1 2】

	¹²⁵ I-CC49-TCO	¹⁷⁷ Lu-テトラジン	¹²⁵ I-CC49-TCO	¹⁷⁷ Lu-テトラジン
	%ID/器官		腫瘍／器官	
腫瘍	32.88 ± 4.35	9.25 ± 2.16		
血液	0.31 ± 0.13	0.03 ± 0.00	129 ± 74	304 ± 80
心臓	0.62 ± 0.22	0.05 ± 0.01	60 ± 26	187 ± 20
肺	0.99 ± 0.24	0.24 ± 0.02	35 ± 8	39 ± 8
肝臓	2.35 ± 0.82	0.19 ± 0.02	16 ± 6	50 ± 10
脾臓	0.67 ± 0.07	0.09 ± 0.01	49 ± 5	108 ± 22
腎臓	0.47 ± 0.10	1.50 ± 0.24	72 ± 14	6 ± 2
筋	0.22 ± 0.08	0.03 ± 0.00	162 ± 62	328 ± 96
骨	0.29 ± 0.08	0.08 ± 0.04	119 ± 33	142 ± 59
脳	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2304 ± 668±	1674 ± 243

10

20

【図 1】



【図 2】

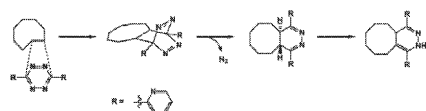
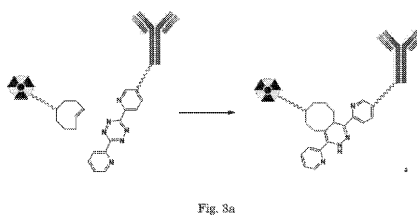
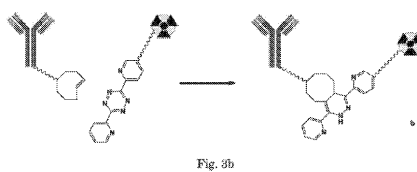


Fig. 2

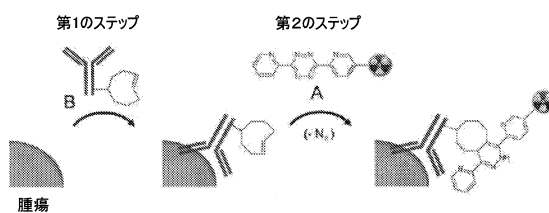
【図 3 a】



【図 3 b】



【図 4】



【図 5】

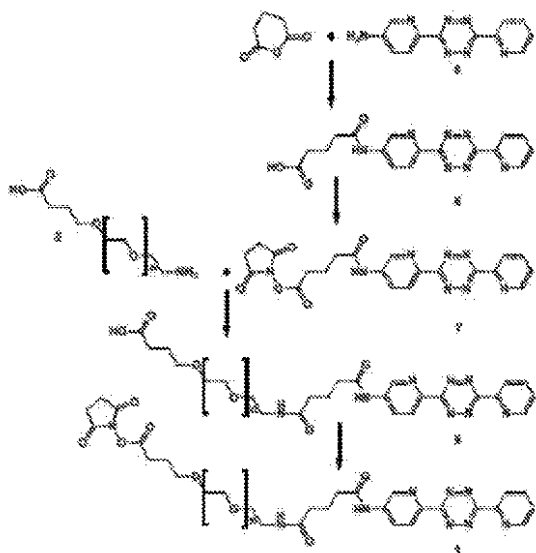


Fig. 5

【図 6】

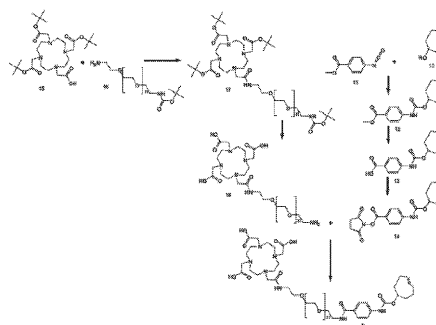


Fig. 6

【図 7】

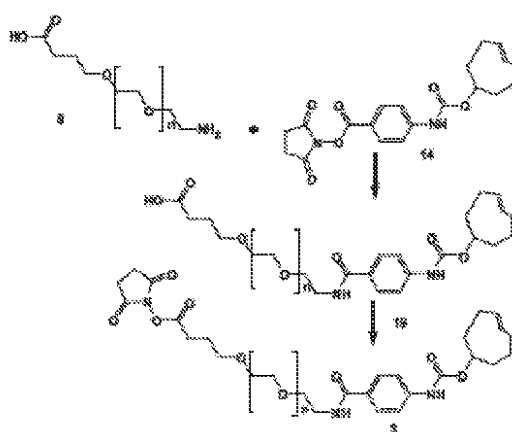


Fig. 7

【図 9】

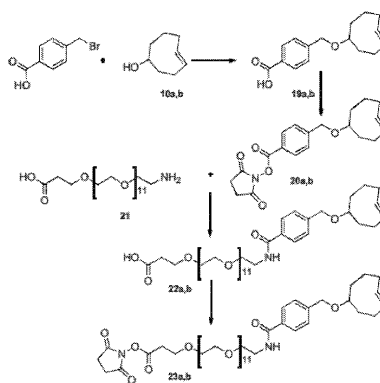


Fig. 9

【図 8】

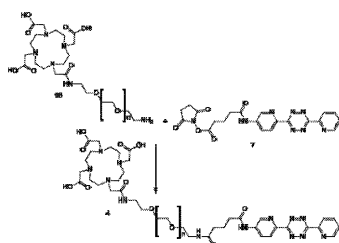


Fig. 8

【図 10】

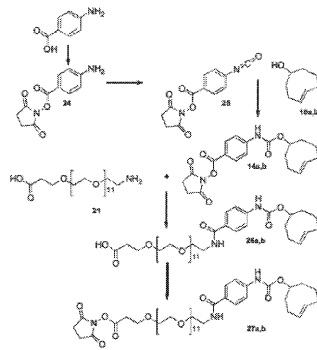
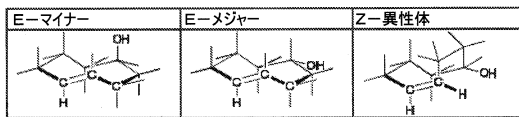


Fig. 10

【図 11】



【図 12】

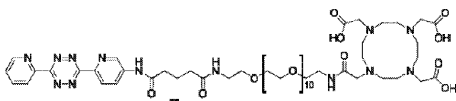


Fig. 12

【図 14】

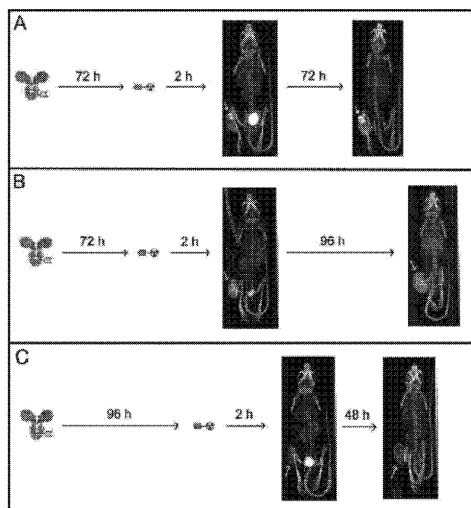
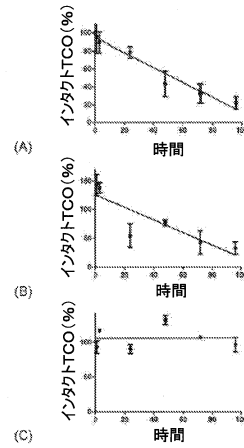
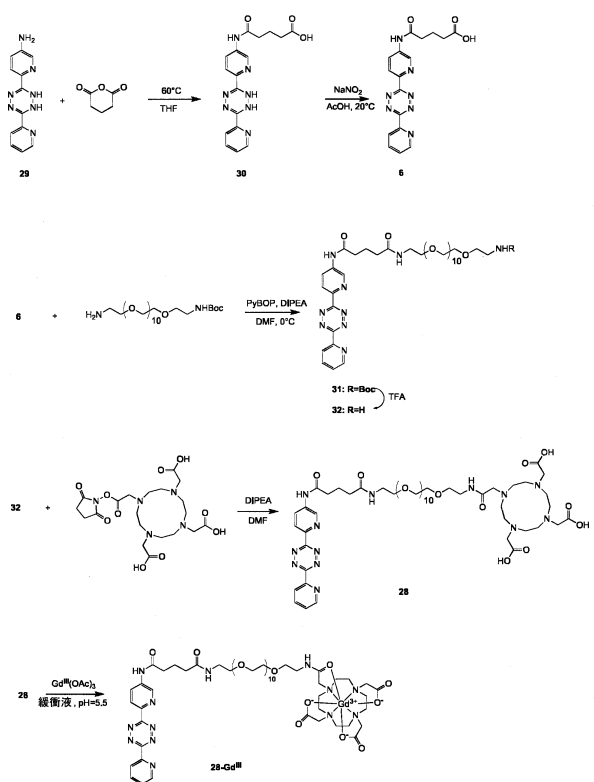


Fig. 14

【図 13】



【図 15】



Scheme 1 illustrates the synthesis of 1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-ylidene derivatives. The scheme shows three reaction sequences:

- Sequence 1:** 2,6-difluoropyrimidine reacts with $N\text{-}t\text{-Bu}\text{-NH}_2$ in EtOH at 80°C to form intermediate **33**. Intermediate **33** then reacts with $N\text{-}t\text{-Bu}\text{-maleimide}$ to form **34**. Finally, **34** is treated with $\text{NaNO}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ in THF to yield **35**.
- Sequence 2:** 2,6-difluoropyrimidine reacts with $N\text{-}t\text{-Bu}\text{-NH}_2$ in EtOH at 80°C to form intermediate **36**. Intermediate **36** then reacts with $N\text{-}t\text{-Bu}\text{-maleimide}$ to form **37**. Finally, **37** is treated with $\text{NaNO}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ in THF to yield **38**.
- Sequence 3:** 2,6-difluoropyrimidine reacts with $N\text{-}t\text{-Bu}\text{-NH}_2$ in EtOH at 80°C to form intermediate **39**. Intermediate **39** then reacts with $N\text{-}t\text{-Bu}\text{-maleimide}$ to form **40**. Finally, **40** is treated with $\text{NaNO}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ in THF to yield **41**. Additionally, **41** is converted to **42** using DDQ in DMSO.

TCO及びテトラリン濃度 (M)	CC49-TCO(20a) 反応収率 (%)	CC49-TCO(20b) 反応収率 (%)
1×10^5	~100	~100
1×10^6	~65	~85
1×10^7	~15	~45
1×10^8	~2	~5

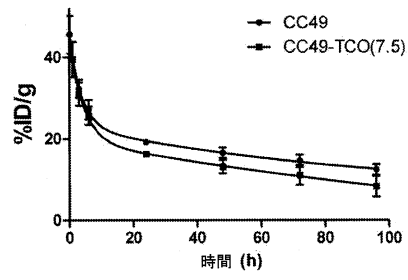
時間 (h)	インダクトTCO (%)
0	100
25	85
50	85
75	60
100	60

時間 (h)	0 TCOs/mab (% ID/g)	4.9 TCOs/mab (% ID/g)	9.3 TCOs/mab (% ID/g)	15.8 TCOs/mab (% ID/g)
0	50	45	40	35
5	35	25	20	15
10	28	20	15	10
25	20	15	10	5
50	18	12	8	3
75	15	10	6	2
100	12	8	5	1

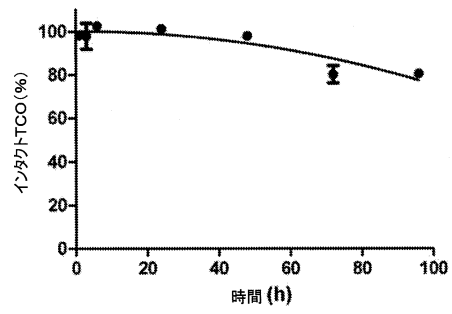
Figure 1 is a bar chart showing the concentration of TCOs (Total Cholesterol Oxidation Products) in various tissues (blood, heart, lung, liver, spleen, kidney, muscle, bone, brain) for four different TCO concentrations (0, 4.9, 9.3, and 15.8 TCOs/mab). The y-axis represents concentration in TCOs/mab, ranging from 0.0 to 16.0. The x-axis lists the tissues. The legend indicates: 0 TCOs/mab (black bar), 4.9 TCOs/mab (dark gray bar), 9.3 TCOs/mab (diagonal lines), and 15.8 TCOs/mab (checkered pattern). Error bars are shown for each data point.

Tissue	0 TCOs/mab	4.9 TCOs/mab	9.3 TCOs/mab	15.8 TCOs/mab
血液	12.5	8.5	5.5	1.0
心臟	4.0	2.5	1.5	0.5
肺	5.5	4.5	2.0	0.5
肝臟	3.5	2.5	1.5	0.5
脾臟	2.5	2.0	1.0	0.5
腎臟	4.0	3.0	2.0	1.0
筋	1.5	1.0	0.5	0.2
骨	1.0	0.8	0.5	0.2
腦	0.5	0.4	0.3	0.1

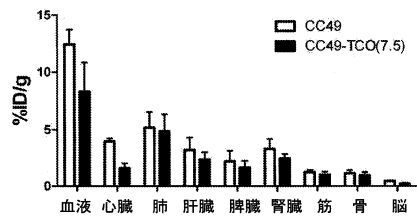
【図 2 2】



【図 2 4】



【図 2 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/00

(74)代理人 100091214

弁理士 大貫 進介

(72)発明者 リュブ, ヨハン

オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング
4 4

(72)発明者 テン フーフエ, ウォルテル

オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング
4 4

(72)発明者 ロッシン, ラファエラ

オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング
4 4

(72)発明者 ファン デン ボス, サンドラ マルティナ

オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング
4 4

(72)発明者 ロビラルト, マルク ステファン

オランダ国, 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン, ハイ・テク・キャンパス・ビルディング
4 4

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 0 / 0 5 1 5 3 0 (WO, A 1)

J. Am. Chem. Soc., 2 0 0 8 年, Vol.130, p.3760-3761

Helvetica Chimica Acta, 1 9 7 2 年, Vol.55, No.8, p.2731-2743

Angewandte Chemie, International Edition, 2 0 1 0 年 4 月, Vol.49, No.19, p.3375-3378

Rossin, Raffaella et al., A new tumor pretargeting approach based on a bio-orthogonal
chemical reaction., Nuclear Medicine and Biology, 2 0 1 0 年 8 月, Vol.37, No.6, p.71
9-720

Chemical Communications, 2 0 1 0 年 9 月 2 2 日, Vol.46, No.42, p.8043-8045

Journal of the American Chemical Society, 2 0 0 8 年, Vol.130, No.41, p.13518-13519

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 5 1 / 0 0 - 1 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)