

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3992923号

(P3992923)

(45) 発行日 平成19年10月17日(2007.10.17)

(24) 登録日 平成19年8月3日(2007.8.3)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 1/13 (2006.01)

C O 7 K 1/13

A 6 1 K 51/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/02

C

C O 7 B 39/00 (2006.01)

C O 7 B 39/00

B

C O 7 B 59/00 (2006.01)

C O 7 B 59/00

C O 7 K 7/06 (2006.01)

C O 7 K 7/06

Z N A

請求項の数 2 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2000-508634 (P2000-508634)  
 (86) (22) 出願日 平成10年9月3日(1998.9.3)  
 (65) 公表番号 特表2001-515843 (P2001-515843A)  
 (43) 公表日 平成13年9月25日(2001.9.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/018268  
 (87) 国際公開番号 W01999/011590  
 (87) 国際公開日 平成11年3月11日(1999.3.11)  
 審査請求日 平成15年8月27日(2003.8.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/057,485  
 (32) 優先日 平成9年9月3日(1997.9.3)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 599176263  
 イムノメディクス、 インコーポレイテッ  
 ド  
 アメリカ合衆国、07950 ニュー・ジ  
 ャージー、モリス・ブレインズ、アメリカ  
 ン・ロード 300  
 (74) 代理人 100099623  
 弁理士 奥山 尚一  
 (74) 代理人 100096769  
 弁理士 有原 幸一  
 (74) 代理人 100107319  
 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F-18陽電子放出トモグラフィ用タンパク質及びペプチドのフッ素化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

チオール含有ペプチドをフッ素-18(F-18)により放射標識する方法であって、  
 遊離チオール基を含んでなるペプチドと一般式



(式中、nは0、1または2であり、

mは0、1または2であり、

n+mは0、1または2であり、

Xはシアノ、ヨーダイド、ブロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレート、非置換マレイミド、一つまたは二つのアルキル基で置換さ

れたマレイミド、及びスルホネート基で置換されたマレイミドからなる群から選ばれ、

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、同一あるいは異なり、ヨーダイド、ブロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレート、水素、-CONH<sub>2</sub>、カルボキシ

ル、ヒドロキシル、スルホン酸、3級アミン、4級アンモニウム、非置換マレイミド、一つまたは二つのアルキル基で置換されたマレイミド、3-スルホ-マレイミド、非置換アル

キル、置換アルキル、-COOR'、-CONR'<sub>2</sub>、COR'からなる群から選ばれ、こ

こで、置換アルキルの置換基は、-CONH<sub>2</sub>、カルボキシル、ヒドロキシル、スルホン酸、3級アミン及び4級アンモニウムからなる群から選ばれ、R'はC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルまたはフェニルである)

を有する標識試剤とを、水性溶液中で反応させることを含んでなる方法。

10

20

## 【請求項 2】

別々の容器に収容した、

請求項 1 の方法により得られた F - 18 により標識されたペプチドまたはそれと共役したハプテンと、

患者の標的組織に特異的である少なくとも一つのアームと F - 18 により標識されたペプチドまたは F - 18 により標識されたペプチドに共役した低分子量のハプテンに特異的である少なくとももう一つのアームを含んでなる二特異的な抗体または抗体フラグメントとを含む患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

10

発明の背景発明の分野

本発明は、タン白及びペプチドをフッ素 - 18 ( F - 18 ) により放射標識する方法に関する。特に、タン白及びペプチド中に含有されるチオール基と、チオールと反応性のある基も有する F - 18 を結合したラベル化剤を反応させることによって、タン白及びペプチドが F - 18 により放射標識される。得られる F - 18 によりラベルされたタン白及びペプチドは、臨床の陽電子放出トモグラフィーにより標的組織をイメージングするのに有用である。

## 【0002】

関連技術の説明

20

陽電子放出トモグラフィー ( P E T ) は、人間の病気を視覚化するための高分解能、非侵襲的なイメージング手法である。P E T においては、陽電子消滅崩壊時に生成する 5 1 1 k e V のガンマ光子が検出される。臨床の現場においては、フッ素 - 18 ( F - 18 ) は、最も広く使用される陽電子放出核種の一つである。F - 18 は、1 1 0 分の半減期 (  $t_{1/2}$  ) を有し、6 3 5 k e V のエネルギーで  $^{+}$  粒子を放出する。その存在比は 9 7 % である。

## 【0003】

F - 18 の短い半減期により、抗体、抗体フラグメント、組換え抗体構成体及び長寿命の受容体標的ペプチド等の長寿命の特異的な標的ベクターと共に F - 18 を使用することは制約あるいは排除されてきた。加えて、このような有機の標的ベクターに無機フルオリド種を結合するには、複雑な化学が必要とされる。典型的な合成法としては、中間体が放射フッ素化され、F - 18 ラベルされた中間体がタン白のアミノ基に結合するのに精製される。例えば、Langら, Appl. Radiat. Isol., 45 ( 12 ) : 1 1 5 5 - 6 3 ( 1 9 9 4 )、Vaidyanathanら, Bioconj. Chem., 5 : 3 5 2 - 5 6 ( 1 9 9 4 ) を見られたい。

30

## 【0004】

これら方法は、実施するのが冗長で、特別な専門的な化学者の努力を必要とする。これらは、臨床の現場で使用するキット調合物に合わない。普通、中間体の多段の精製を必要とし、タン白のリジン残基への結合を含めて、最終ステップは、通常 3 0 - 6 0 % の収率の結果になり、患者への投与に先立ち更なる精製ステップが必要となる。加えて、これらの方法は、結果として、放射性金属に若干類似して、腎臓に蓄積するフルオリド標的種を生成する。

40

## 【0005】

$^{18}\text{F}$  - フルオロヨードメタン (  $^{18}\text{FCH}_2\text{I}$  ) は有機中間体のフッ素化用の有用な中間体であることが最近報告された。Zhengら, J. Nucl. Med., 38 : 1 7 7 頁 ( 要約 7 6 1 ) ( 1 9 9 7 )。この方法においては、ジヨードメタンがアセトニトリル溶媒中の室温反応により F - 18 イオンでフッ素化され、結果として 4 0 % 迄の収率をもたらす。次に、無水アセトニトリル中の種々の求核種を入れた反応バイアル中に  $^{18}\text{FCH}_2\text{I}$  を蒸留し、8 0 ° で 1 5 分間反応させる。カルボキシレート、チオレート、フェノレート、特にアミンによる求核的攻撃によって、1 0 から 3 5 % の総合収率で、 $^{18}\text{FCH}_2$

50

Iの残存ヨードが置換される。反応生成物は、逆相HPLCにより精製される。この方法により、フルオロメチルジエチルアミン、フルオロメチルベンゾエート、フルオロメチルベンジルチオエーテル及びフルオロメチル4-(2-ヒドロキシ-3-アミノプロポキシ)-カルバゾールが製造された。

#### 【0006】

上述のように、タン白をベースにした標的ベクターをF-18により標識するのに現在入手できる方法は適当でない。それゆえ、タン白、抗体、抗体フラグメント、及び受容体標的のペプチド等のペプチド含有標的ベクター中にF-18放射性核種を包含させ、日常使用する臨床の電子放出トモグラフィーにおいてこのような標的ベクターを使用できるようにする簡単で、効率的な方法に対するニーズが存在する。

10

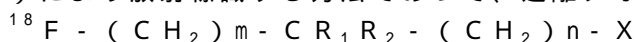
#### 【0007】

##### 発明の要約

本発明は、ペプチド含有標的ベクター中にF-18放射性核種を包含させる方法を提供する。

#### 【0008】

本発明の一つの実施の形態によれば、チオール含有ペプチドをフッ素-18(F-18)により放射標識する方法であって、遊離チオール基を含んでなるペプチドと一般式



を有する標識試剤とを反応させることを含んでなる方法が提供される。式中、

nは0、1または2であり、

20

mは0、1または2であり、

n+mは0、1または2であり、

Xは、ヨード、プロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレート、非置換マレイミド、一つまたは二つのアルキル基で置換されたマレイミド、及びスルホネート基で置換されたマレイミドからなる群から選ばれ、

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、同一あるいは異なり、ヨード、プロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレート、水素、-CONH<sub>2</sub>、カルボキシル、ヒドロキシル、スルホン酸、3級アミン、4級アンモニウム、非置換アルキル、置換アルキル、-COOR'、-CONR'<sub>2</sub>、COR'からなる群から選ばれ、ここで、置換アルキルの置換基は、-CONH<sub>2</sub>、カルボキシル、ヒドロキシル、スルホン酸、3級アミン及び4級アンモニウムからなる群から選ばれ、R'はC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルまたはフェニルである。

30

#### 【0009】

別な実施の形態によれば、チオール含有ペプチドをF-18により放射標識する方法であって、遊離チオール基を含んでなるペプチドとF-18フッ素化されたアルケンであって、2個の二重結合炭素原子の少なくとも一つが、ヨード、プロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート及びトリフレートからなる群から選ばれる少なくとも一つの脱離基を保持するアルケンを反応させることを含んでなる方法が提供される。

#### 【0010】

40

別な実施の形態によれば、標的組織に特異的である少なくとも一つのアームとF-18により標識されたペプチドまたはF-18により標識されたペプチドに共役した低分子量のハプテンに特異的である少なくとももう一つのアームを含有する二特異的抗体(b s M A b)または二特異的抗体フラグメント(b s F a b)を用いて、上述のようF-18により放射標識されたペプチドが標的組織に送達される。

#### 【0011】

この方法においては、b s M A b及びb s F a bが患者に投与され、標的組織に局在化される。すこし経った後(未結合のb s M A bまたはb s F a bを除去した後)、F-18により標識されたペプチドまたはそれに共役したハプテンが患者に投与される。b s M A bまたはb s F a bの少なくとも一つのアームは、F-18により放射標識されたペ

50

チドまたはそれに共役したハプテンに特異的であるので、F - 18により標識されたペプチドもまた標的に局在化される。未結合のF - 18により標識されたペプチドまたはそれに共役した未結合のハプテンを除去した後、標的を日常使用する臨床の陽電子放出トモグラフィにより可視化させる。

#### 【0012】

b s M A bまたはb s F a bは、理想的にはモノクローナルであり、ヒト化されている。好ましくは、F - 18により放射標識されたペプチドはチオール基を含有している。好適なペプチドの例は、X - G l y - D - T y r - D - T r p - G l y - D - L y s ( X ) - G l y - D - T y r - D - T r p - O H ( 式中、Xは遊離あるいは保護されたアミノ酸基である)、A c - C y s ( Y ) - D - T y r - D - T r p - G l y - D - C y s ( y ) - G l y - D - T y r - D - T r p - O H ( 式中、Yは遊離あるいは保護されたチオール基である)、及びA c - G l y - D - ヨード - T y r - D - T r p - G l y - D - L y s ( A c ) - G l y - D - ヨード - T y r - D - T r p - O Hである。ハプテンは、磁気共鳴イメージング(MRI)に有用な、例えば、マンガン、鉄、またはガドリニウムを含んでなる金属キレート錯体であってもよい。

10

#### 【0013】

b s M A b、b s F a b及び上述の関連の方法は、ここでは、引用として包含されている米国仮出願番号60/090,142(題名「二特異的抗体と共に使用する新規ペプチドをベースにした薬剤の製造と使用」、出願1998年6月22日)に記述されている。

#### 【0014】

この明細書に含まれる教示に鑑みれば、本発明のこれら及び他の目的及び側面は当業者には明白になるであろう。

20

#### 【0015】

##### 発明の詳細な説明

本発明は、タン白、抗体、抗体フラグメント、及び受容体標的のペプチド等のペプチド含有の標的ベクター中にF - 18放射性核種を包含させる、簡単で、効率的な方法を提供する。便宜上、「ペプチド」という語は、以下及びクレームにおいて、タン白、抗体、抗体フラグメント、及び受容体標的のペプチドを指すのに使用される。本発明の方法により、このような標的ベクターが日常使用する臨床の陽電子放出トモグラフィに使用可能となる。

30

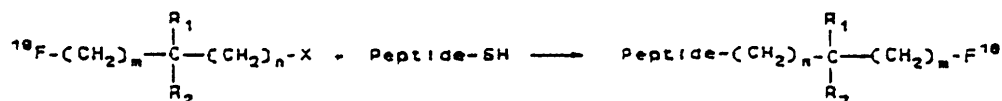
#### 【0016】

ペプチド上に存在するすべての求核試剤のうち、遊離チオール基のみが中性のpHと温和な温度で迅速にアルキル化される。本発明は、遊離チオール基のこの独特の性質を利用し、チオール含有ペプチドをF - 18により標識する方法を提供する。

#### 【0017】

一つの実施の形態によれば、本発明の方法は、次の反応

#### 【化1】



40

を含んでなる。式中、

nは0、1または2であり、

mは0、1または2であり、

n + mは0、1または2であり、

Xは、ヨード、プロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレート等の置換性脱離基である。あるいは、Xは、マレイミド、例えば、一つまたは二つのアルキル基またはスルホネート基で置換された置換マレイミドである。

好適な置換マレイミドの例には、3 - メチルマレイミド、3, 4 - ジメチルマレイミド及

50

び3 - スルホ - マレイミドが含まれる。 $R_1$ 及び $R_2$ は、同一あるいは異なり、以下に更に詳細に議論されるように、試剤にもたらされる望ましい物理的性質によって選ばれる。一般に、 $R_1$ 及び $R_2$ は、 $X$ と同じグループから選ぶことができ、 $X$ と同一あるいは異なってもよい。あるいは、 $R_1$ 及び $R_2$ は、各々独立に、水素、置換あるいは非置換アルキルまたは直鎖あるいは分岐アルキル、またはエステル、アミドまたはケトン、例えば、 $-COOR'$ 、 $-CONR'_2$ 、または $COR'$ （式中、 $R'$ は $C_1 - C_6$ アルキルまたはフェニルである）等のカルボニル性官能基であってもよい。好適な $R_1$ 及び $R_2$ またはそれに付いた置換基の例には、 $-CONH_2$ 、カルボキシル、ヒドロキシル、スルホン酸、3級アミン及び4級アンモニウム等の水溶性を付与する基が含まれる。

#### 【0018】

10

別な実施の形態によれば、ペプチドは、2個の二重結合炭素原子の少なくとも一つが、ヨウダイド、ブロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート及びトリフレートからなる群から選ばれる少なくとも一つの脱離基を保持するF - 18フッ素化されたアルケンにより標識される。好適なフッ素化されたアルケンの例には、 $^{18}F - CH = CI_2$ 、 $^{18}F - CI = CH_2$ 、または $^{18}F - CI = CI_2$ が含まれる。標識化反応は、上述のものに類似である。

#### 【0019】

本発明の方法は、いずれのチオール含有ペプチドでも標識するのに使用することができる。特に興味のあるのは、標的ベクターとして有用なペプチドである。このような標的ベクターの例には、抗体、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 $Fab'$ 及び $Fab$ フラグメント、 $sFvs$ 等の単一鎖のサブフラグメント、 $dsFvs$ 等の2価の構成体、及び一つまたはそれ以上の遊離チオール基を含有するポリペプチドが含まれる。*Choiら, Cancer Res.*, 55: 5323 - 29 (1995)を見られたい。更なる例には、 $IgG_3$ または $IgG_3 - F(ab')_2$ のフレームワークを含んでなる抗体等の抗体構成体が含まれる。 $IgG_3$ は、還元されて、多重の遊離チオール基を生成することができる、多重のヒンジ領域のダイサルファイド基を有する。

20

#### 【0020】

本発明によれば、最初に、ペプチドを変成し、当業者に公知の方法により遊離チオール基を付加することにより、元々、遊離チオール基を含まないペプチドを標識することができる。例えば、2 - イミノチオラン等の試剤により、ペプチドをチオール化することができる、あるいはシスチン残基等の固有結合を還元することができる。リジン残基をN - サクシンイミジル - 3 - (2ピリジルチオ)プロピオネート(SPD P)によりアシル化し、続いて付随されたダイサルファイド結合を制御して還元する等、双方の変成の組み合わせを行うこともできる。

30

#### 【0021】

本発明の一つの実施の形態として、ペプチドは $Fab$ または $Fab'$ フラグメントである。これらのペプチドは、抗原標的サイトに特異的で、遠いサイトのヒンジ領域に遊離チオール基を有する。

#### 【0022】

チオール基含有ポリペプチドとの反応を最適化するために、標識試剤は、好ましくは次の物理的及び化学的性質を有する。

40

(1) 試剤がF - 18から容易で迅速に合成される。

#### 【0023】

(2) 試剤が中性(4 - 8)のpH範囲で適当な水溶性を有する。「適当な水溶性」とは、この試剤が、使用されるチオール基含有ポリペプチドの化学量論的な量に匹敵する濃度迄容易に溶解するという意味である。例えば、抗体を標識するならば、通常の抗体濃度は、約 $3 \times 10^{-4} M$ のモル濃度に相当する約50 mg/mLである。この例においては、この試剤は約 $3 \times 10^{-4} M$ の濃度で溶解しなければならない。更に低分子量のペプチド種については、更に多くのペプチドが沈殿なしに溶解し、更に多くの試剤を使用することができる。F - 18はキャリアフリーなので、更に低濃度のフッ素化剤も効果的である。

50

## 【0024】

(3) この試剤の活性ハライドは、中性のpH(4-8)で水により直ちに加水分解されない。かくして、ハライドは、 $H_2O$ よりもSHまたは $S^-$ と更に容易に反応しなければならない。この試剤が水(あるいは中性の緩衝液)により直ちに加水分解されない限り、チオール基の選択性及び反応性によって、効率的なペプチドの標識反応が確保される。

## 【0025】

(4) 遊離チオール基によって、脱離基を迅速に、特異的に、ほぼ定量的に置換することができる。求核試剤により攻撃される炭素原子において炭素カチオン中心を発達させることができる。例えば、 $R_1$ 及び $R_2$ は電子吸引基とすることができる。 $-C-X$ 官能基にアルファ位の電子吸引基の存在により、また、X部分の迅速な置換が促進される。有用な電子吸引基の例には、 $COR'$ 、 $-CONR'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-COOH$ 、 $CONH_2$ 、及び $-SO_3H$ (式中、 $R'$ は $C_1-C_6$ アルキルまたはフェニルである)が含まれる。

10

## 【0026】

加えて、標識試剤中に一つ以上の脱離基が存在することは有利である。同一炭素原子に付いた、ヨード基等の多重の脱離基は立体ひずみを生じる。反応が単一の脱離基の脱離を含んでなる場合には、この立体ひずみが解除され、X基のチオールの置換の反応動力学が速められる。かくして、本発明の一つの実施の形態として、標識試剤は2つのヨード基等の少なくとも2つの脱離基を含んでなる。

## 【0027】

かくして、本発明の一つの実施の形態として、ペプチドは一般式

20



の標識試剤により標識される。式中、nは0、1または2であり、mは0、1または2であり、 $n+m$ は0、1または2であり、Xはヨード、プロミド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレート等の置換性脱離基である。あるいは、Xは、マレイミド、例えば、一つまたは二つのアルキル基で置換された置換マレイミドである。好適な置換マレイミドの例には、3-メチルマレイミド、3,4-ジメチルマレイミド及び3-スルホ-マレイミドが含まれる。 $R_1$ 及び $R_2$ は、同一あるいは異なり、以下に更に詳細に議論されるように、試剤にもたらされる望ましい物理的性質によって選ばれる。一般に、 $R_1$ 及び $R_2$ は、Xと同じグループから選ぶことができ、Xと同一あるいは異なってもよい。あるいは、 $R_1$ 及び $R_2$ は、各々独立に、水素、置換あるいは非置換アルキルまたは直鎖あるいは分岐アルキル基、またはエステル、アミドまたはケトン、例えば、 $-COOR'$ 、 $-CONR'_2$ 、または $COR'$ (式中、 $R'$ は $C_1-C_6$ アルキルまたはフェニルである)等のカルボニル性官能基であってもよい。好適な $R_1$ 及び $R_2$ またはそれに付いている置換基の例には、 $-CONH_2$ 、カルボキシル、ヒドロキシル、スルホン酸、3級アミン及び4級アンモニウム等の水溶性を付与する基が含まれる。

30

## 【0028】

好適な標識試剤の例には、 $^{18}F-CI_3$ 、 $^{18}F-CHI_2$ 、 $^{18}F-CI_2COOH$ 、 $^{18}F-CI_2COOCH_3$ 、 $^{18}F-CI_2CH_2OH$ 、 $^{18}F-CHICH_2OH$ 、 $^{18}F-CHICOOCH_3$ 、 $^{18}F-CI_2CH_2COOH$ 、 $^{18}F-CI_2CH_2N^+(CH_3)_3$ 、 $^{18}F-CI_2CH_2$ マレイミド、 $^{18}F-CI_2CONH_2$ 、 $^{18}F-CI_2CO_2CH_3$ 、 $^{18}F-CHBr_2$ 、 $^{18}F-CBr_2CH_2CH_2SO_3H$ 、 $^{18}F-CH_2CI_2COOH$ 、 $^{18}F-CH_2CI_2CONH_2$ 、 $^{18}F-CHICOOCH_3$ 、 $^{18}F-CI_2CONH_2$ 、 $^{18}F-CHICONH_2$ 、 $^{18}F-CBr_2CH_2OH$ 、 $CF_3COCI_2-^{18}F$ 、 $CH_3COCBr_2-^{18}F$ 、 $^{18}F-CHBrCN$ 、 $^{18}F-CI_2CHCN$ 、 $CBrF_2-^{18}F$ 、 $^{18}F-CBr(CONH_2)_2$ 及び $C_6H_5-COCBr_2-^{18}F$ が含まれる。他の好適な標識試剤は、当業者には明白である。

40

## 【0029】

標識試剤は、対応する化合物のF-18フッ素化により製造することができる。次は、フッ素化して、上述の標識試剤を製造することができる化合物の例である。 $CI_4$ 、 $CHI_3$ 、 $CHI_2COOCH_3$ 、 $CI_3COOH$ 、 $CI_3COOCH_3$ 、 $CI_3CH_2OH$ 、 $CHI_2CH_2OH$ 、 $CI_3CH_2COOH$ 、 $CI_3CH_2N^+(CH_3)_3$ 、 $CI_3CH_2$ -マレイミド

50

、 $\text{CI}_3\text{CONH}_2$ 、 $\text{CI}_3\text{COCH}_3$ 、 $\text{CHIBr}_2$ 、 $\text{CIBr}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{CH}_2\text{CI}_3\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_2\text{CI}_3\text{CONH}_2$ 、 $\text{CHI}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CI}_3\text{CONH}_2$ 、 $\text{CHI}_2\text{CONH}_2$ 、 $\text{CBr}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $\text{CF}_3\text{COCI}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{COCBr}_3$ 、 $\text{Br}_2\text{CHCN}$ 、 $\text{CI}_3\text{CHCN}$ 、 $\text{CBr}_2\text{F}_2$ 、 $\text{CBr}_2(\text{CONH}_2)_2$ 、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCBr}_3$ である。他の好適な化合物は、当業者には明白である。

#### 【0030】

別な実施の形態によれば、標識試剤は、2個の二重結合炭素原子の少なくとも一つが、ヨードイド、ブロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート及びトリフレートからなる群から選ばれる少なくとも一つの脱離基を保持するF - 18フッ素化されたアルケンである。好適なフッ素化されたアルケンの例には、 $^{18}\text{F} - \text{CH} = \text{CI}_2$ 、 $^{18}\text{F} - \text{CI} = \text{CH}_2$ 、及び $^{18}\text{F} - \text{CI} = \text{CI}_2$ が含まれる。これらの標識試剤は、 $\text{ICH} = \text{CI}_2$ 、 $\text{CI}_2 = \text{CH}_2$ 、 $\text{CI}_2 = \text{CI}_2$ 等の対応する化合物のF - 18フッ素化により製造することができる。本発明により有用な他のフッ素化されたアルケンは、当業者には明白である。

#### 【0031】

F - 18は、O - 18富化された水にプロトンを衝突させた後、サイクロンから得られる。 $\text{H} - ^{18}\text{F}$ を含有する富化された水を、カリウムまたは別の一価イオン等、いずれかのアルカリ金属(M)の対イオンを有する塩基で中和し、水を蒸発、除去すると、残渣M -  $^{18}\text{F}$ が得られ、更に使用するために有機溶媒に抽出される。一般に、対イオンは、フッ素イオンを有機相中でハロゲンと迅速に反応させるように選ばれる。カリウムが、セシウムよりも安価なために、一般に対イオンとして使用される。しかしながら、キャリアなしのF - 18については、わずかな量の対イオンを必要とし、対イオンのコストは大部分無視し得る。

#### 【0032】

本発明によれば、カリウムが対イオンとして有用であるが、セシウムは、大きなイオンであり、より拡散した電荷を持つために、カリウムよりも好ましい。従って、セシウムは、小さなフルオライド原子とより緩やかな相互作用を有し、それゆえ、フルオライドの求核的性質を妨害しない。類似の理由により、カリウムはナトリウムよりも好ましく、一般に、本発明によるI aイオンの対イオンとしての好適性は、周期律表を下降するにつれて増大する。銀等のI b族の試剤も、本発明による対イオンとして有用である。更に、テトラアルキルアンモニウム塩等の有機の相移動形のイオンも、対イオンとして使用される。

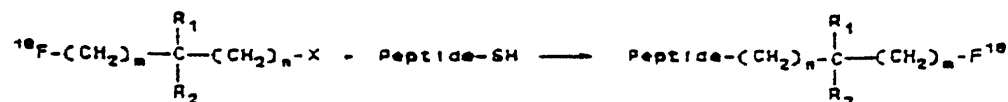
#### 【0033】

フルオライドは、最も電気陰性度の大きい元素であるために、水和し、求核性を失う傾向を有する。これを最小限にとどめるために、標識反応は、好ましくは無水の条件下で行われる。例えば、アセトニトリルまたはTHF等の有機溶媒中にフルオライド(フッ化カリウムとして、あるいは上述の他の対イオンのいずれかとの錯体として)を入れることができる。クリプトフィックス2, 2, 2(4, 7, 13, 16, 21, 24 - ヘキサオキサ - 1, 10 - ジアザピシクロ[8.8.8] - ヘキサコサン)等の対イオンに結合する試剤の助けを借りて、フッ素イオンはこれらの溶媒中で極めて求核的になる。

#### 【0034】

上述のように、F - 18と共にチオール含有ペプチドを含んでなる次の反応

#### 【化2】



により標的ベクターを標識するのに、標識試剤が使用される。あるいは、標識試剤は、2個の二重結合炭素原子の少なくとも一つが、ヨードイド、ブロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレートからなる群から選ばれる少な

10

20

30

40

50

くとも一つの脱離基を保持する F - 18 フッ素化されたアルケンである。この F - 18 フッ素化されたアルケンは、上述の反応に類似の方法で標的ベクターを標識する。

#### 【0035】

標的ベクター上の遊離チオール基にフッ素化標識試剤の反応を指向させると、短時間内に、標的ベクター中に F - 18 をほぼ定量的に包含させることが可能になる。一般に、反応は室温で数分以内に完結し、複雑な精製ステップは必要ない。F - 18 の半減期が極めて短いので、反応のスピードは極めて重要である。更に、遊離の F - 18 は、骨中のヒドロキシアパタイトのヒドロキシルイオンと容易に交換し、それゆえに、骨を求める試剤であるために、最終製品中に残存する遊離フルオライドの量の低減も、本発明の重要な利点である。

10

#### 【0036】

本発明の実施の形態は、本発明の側面を示す実施例により、更に例示される。これらの実施例は本発明の特定な要素を例示するものであり、その範囲を制約するものとは考えられないべきでない。

#### 【0037】

##### 実施例

##### フルオロジヨード酢酸 ( $^{18}\text{F} - \text{C I}_2\text{C O O H}$ )

クリプトフィックス 2.2, 2 (4, 7, 13, 16, 21, 24 - ヘキサオキサ - 1, 10 - ジアザビシクロ [8.8.8] - ヘキサコサン) を含有する乾燥テトラヒドロフラン中の 100 mCi の F - 18 フルオライド (O - 18 富化された水の衝突から得られる) と炭酸カリウムのスラリーをトリヨード酢酸により処理する。室温での 30 分間の反応の後、所望の標識試剤の  $^{18}\text{F} - \text{C I}_2\text{C O O H}$  を得、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。次に、多様なチオール含有標的ベクターを標識するのに、この標識試剤を使用、あるいは同一の使用のために臨床のサイトに出荷する。

20

#### 【0038】

##### F - 18 により標識された Fab' - SH フラグメント

親油化された Fab' - SH - NP<sub>4</sub> (抗発癌胚発生性抗原抗体フラグメント) の 1 mg のバイアルを、pH 6 で 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液中の  $^{18}\text{F} - \text{C I}_2\text{C O O H}$  の 1 mL の溶液により液とする。反応を室温で 30 分間進行させる。

サイズ排除サイズカラムを用いる HPLC 及びシリカゲル含浸ガラスファイバー片 (Gelman Sciences) を用いる ITLC (インスタント薄層クロマトグラフィー) により分析するために混合物の一部を取り出す。この分析により、抗体フラグメントのヒンジ領域のチオール基は  $^{18}\text{F} - \text{C I}_2\text{C O O H}$  の双方のヨード原子の求核的置換を起こさせ、この反応がほぼ定量的な収率で進行することが判明する。それゆえ、F - 18 により標識された Fab' フラグメントはすぐ注射できる。

30

#### 【0039】

##### フルオロジヨードメタン ( $^{18}\text{F} - \text{C H I}_2$ )

クリプトフィックス 222 を含有する乾燥アセトニトリル中の 100 mCi の F - 18 フルオライド (O - 18 富化された水の衝突から得られる) 試料と炭酸カリウムのスラリーをトリヨードメタンにより処理する。室温での 30 分間の反応の後、標識試剤の  $^{18}\text{F} - \text{C H I}_2$  を得、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。次に、多様なチオール含有標的ベクターを標識するのに、この標識試剤を使用し、あるいは同じ使用のために臨床のサイトに出荷する。

40

#### 【0040】

##### F - 18 により標識されたオクトレイド (octreotide)

親油化された、還元オクトレイド (D - Phe - Cys - Phe - D - Trp - Lys - Thr - Cys - Thr - オール) の 1 mg のバイアルを、pH 6 で、20% の DMSO を含有する 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液中の  $^{18}\text{F} - \text{C H I}_2$  の 1 mL の溶液により液とする。反応を室温で 30 分間進行させる。あるいは、高温で、非水溶媒、例えば DMSO 中に行い、その後、冷却して、及び/または注射のために希釈することができる。

50



サイズ排除サイズカラムを用いるHPLC及びシリカゲル含浸ガラスファイバー片(Gelman Sciences)を用いるITLC(インスタント薄層クロマトグラフィー)により分析するために標識混合物の一部を取り出す。この分析により、オクトレイドの2つのシステインのチオール基は、 $^{18}\text{F}-\text{CHI}_2$ の双方のヨード原子の求核的置換を起こさせ、この反応がほぼ定量的な収率で進行することが判明する。それゆえ、F-18標識され、再循環された(結合： $-\text{S}-\text{CH}-^{18}\text{F}-\text{S}-$ )オクトレイドのペプチドはすぐ注射できる。

#### 【0041】

##### フルオロヨードアセトアミド( $^{18}\text{F}-\text{CI}_2\text{CONH}_2$ )

クリプトフィックス2.2.2(4, 7, 13, 16, 21, 24-ヘキサオキサ-1, 10-ジアザビシクロ[8.8.8]-ヘキサコサン)を含有する乾燥テトラヒドロフラン中の100mCiのF-18フルオリド(O-18富化された水の衝突から得られる)と炭酸カリウムのスラリーをトリヨードアセトアミドにより処理する。室温での30分間の反応の後、所望の標識試剤の $^{18}\text{F}-\text{CI}_2\text{CONH}_2$ を得、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製する。次に、多様なチオール含有標的ベクターを標識するのに、この標識試剤を使用し、あるいは同一の使用のために臨床のサイトに出荷する。

#### 【0042】

##### F-18により標識されたCys-LHRH

親油化されたCys-LHRH(アミン末端が還元されたチオールの形の付随システインを保持するLHRH)の1mgのバイアルを、pH6で0.1M酢酸ナトリウム緩衝液中の $^{18}\text{F}-\text{CHI}_2\text{CONH}_2$ の1mLの溶液により液とする。

反応を50℃で2時間進行させる。抗体で変成されたペプチドのチオール基は $^{18}\text{F}-\text{CHI}_2\text{CONH}_2$ のヨード原子の求核的置換を起こさせ、この反応はほぼ定量的な収率で進行する。それゆえ、このF-18により標識されたペプチドはすぐ注射できる。

#### 【0043】

当業者には、本発明に対して種々の改変及びバリエーションを行うことができるのは明白である。かくして、本発明は、クレーム及びそれらの均等物の範囲内であれば、この発明の改変及びバリエーションを包含するように企図されている。

すなわち、本発明は以下の実施の形態を含むことを確認する。

#### 【0044】

実施の形態1：チオール含有ペプチドをフッ素-18(F-18)により放射標識する方法であって、遊離チオール基を含んでなるペプチドと一般式



(式中、nは0、1または2であり、

mは0、1または2であり、

n+mは0、1または2であり、

Xはシアノ、ヨード、プロミド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレート、非置換マレイミド、一つまたは二つのアルキル基で置換されたマレイミド、及びスルホネート基で置換されたマレイミドからなる群から選ばれ、

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、同一あるいは異なり、ヨード、プロミド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート、トリフレート、水素、 $-\text{CONH}_2$ 、カルボキシル、ヒドロキシル、スルホン酸、3級アミン、4級アンモニウム、非置換マレイミド、一つまたは二つのアルキル基で置換されたマレイミド、3-スルホ-マレイミド、非置換アルキル、置換アルキル、 $-\text{COOR}'$ 、 $-\text{CONR}'_2$ 、 $\text{COR}'$ からなる群から選ばれ、ここで、置換アルキルの置換基は、 $-\text{CONH}_2$ 、カルボキシル、ヒドロキシル、スルホン酸、3級アミン及び4級アンモニウムからなる群から選ばれ、R'はC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルまたはフェニルである)

を有する標識試剤とを反応させることを含んでなる方法。

#### 【0045】

実施の形態2：XがIであり、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の少なくとも一つがIである実施の形態1の

10

20

30

40

50

方法。

実施の形態 3：ポリペプチドが、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 $Fab'$  及び  $Fab$  抗体フラグメント、単一鎖の抗体サブフラグメント、2 価抗体フラグメント構成体 (constructs)、及び  $IgG_3$  または  $IgG_3 - F(ab')_2$  のフレームワークを含んでなる抗体等の抗体構成体からなる群から選ばれる実施の形態 1 の方法。

実施の形態 4：標識試剤が、 $^{18}F - CI_3$ 、 $^{18}F - CHI_2$ 、 $^{18}F - CHICOOCH_3$ 、 $^{18}F - CI_2COOH$ 、 $^{18}F - CI_2COOCH_3$ 、 $^{18}F - CI_2CH_2OH$ 、 $^{18}F - CHI_2CH_2OH$ 、 $^{18}F - CI_2CH_2COOH$ 、 $^{18}F - CI_2CH_2N^+(CH_3)_3$ 、 $^{18}F - CI_2CH_2$  マレイミド、 $^{18}F - CHICONH_2$ 、 $^{18}F - CI_2CONH_2$ 、 $^{18}F - CHICO_2CH_3$ 、 $^{18}F - CI_2CO_2CH_3$ 、 $^{18}F - CHBr_2$ 、 $^{18}F - CBr_2CH_2CH_2SO_3H$ 、 $^{18}F - CBr_2CH_2OH$ 、 $CF_3COCICl_2 - ^{18}F$ 、 $CH_3COCBr_2 - ^{18}F$ 、 $^{18}F - CHBrCN$ 、 $^{18}F - CI_2CHCN$ 、 $CBrF_2 - ^{18}F$ 、及び  $^{18}F - CBr(CONH_2)_2$  からなる群から選ばれる実施の形態 1 の方法。

実施の形態 5：標識試剤が  $^{18}F - CH_2CI_2COOH$  及び  $^{18}F - CH_2CI_2CONH_2$  からなる群から選ばれる実施の形態 1 の方法。

#### 【0046】

実施の形態 6：遊離チオール基を含んでなるペプチドと、2 個の二重結合炭素原子の少なくとも一つが、ヨウダイド、ブロマイド、クロライド、アザイド、トシレート、メシレート、ノシレート及びトリフレートからなる群から選ばれる少なくとも一つの脱離基を保持する  $F - 18$  フッ素化されたアルケンを反応させることからなるチオール含有ペプチドをフッ素 - 18 ( $F - 18$ ) により放射標識する方法。

実施の形態 7： $F - 18$  フッ素化されたアルケンが  $^{18}F - CH = CI_2$ 、 $^{18}F - CI = CH_2$ 、及び  $^{18}F - CI = CI_2$  からなる群から選ばれる実施の形態 6 の方法。

実施の形態 8：ポリペプチドが、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 $Fab'$  及び  $Fab$  抗体フラグメント、単一鎖の抗体サブフラグメント、二価の抗体フラグメント構成体、及び  $IgG_3$  または  $IgG_3 - F(ab')_2$  のフレームワークを含んでなる抗体等の抗体構成体からなる群から選ばれる実施の形態 6 の方法。

#### 【0047】

実施の形態 9：a) 患者の標的組織に特異的である少なくとも一つのアームと  $F - 18$  により標識されたペプチドまたは  $F - 18$  により標識されたペプチドに共役した低分子量のハプテンに特異的である少なくとももう一つのアームを含んでなる二特異的な抗体または抗体フラグメントを患者に投与し、二特異的な抗体または抗体フラグメントを標的組織に結合せしめ、非標的の二特異的な抗体または抗体フラグメントを除去し、

b)  $F - 18$  により標識されたペプチドまたはそれと共役したハプテンを患者に投与し、 $F - 18$  により標識されたペプチドまたはそれと共役したハプテンを二特異的な抗体または抗体フラグメントに結合せしめ、非結合の  $F - 18$  により標識されたペプチドまたはそれと共役したハプテンを除去し、

c)  $F - 18$  により標識されたペプチドを検出し、それによって標的組織を検出することを含んでなる組織を検出する方法。

#### 【0048】

実施の形態 10： $F - 18$  により標識されたペプチドがチオール基を含有する実施の形態 9 の方法。

実施の形態 11： $F - 18$  により標識されたペプチドが実施の形態 1 に記載の方法により標識される実施の形態 10 の方法。

実施の形態 12： $F - 18$  により標識されたペプチドが実施の形態 6 に記載の方法により標識される実施の形態 10 の方法。

実施の形態 13： $F - 18$  により標識されたペプチドが、 $X - Gly - D - Tyr - D - Trp - Gly - D - Lys(X) - Gly - D - Tyr - D - Trp - OH$  であり、 $X$  が遊離あるいは保護されたアミノ酸基を表す実施の形態 9 の方法。

実施の形態 14： $F - 18$  により標識されたペプチドが、 $Ac - Cys(Y) - D - T$

10

20

30

40

50

y r - D - T r p - G l y - D - C y s ( Y ) - G l y - D - T y r - D - T r p - O H  
であり、Y が遊離あるいは保護されたチオール基を表す実施の形態 9 の方法。

実施の形態 15 : F - 18 により標識されたペプチドが A c - G l y - D - ヨード - T y r - D - T r p - G l y - D - L y s ( A c ) - G l y - D - ヨード - T y r - D - T r p - O H である実施の形態 9 の方法。

実施の形態 16 : ハプテンが金属キレート錯体である実施の形態 9 の方法。

実施の形態 17 : 金属キレート錯体がマンガン、鉄、またはガドリニウムを含んでなる実施の形態 16 の方法。

実施の形態 18 : 二特異的な抗体または抗体フラグメントがモノクローナルである実施の形態 9 の方法。

実施の形態 19 : 抗体または抗体フラグメントがヒト化されている実施の形態 9 の方法。

実施の形態 20 : F - 18 により標識されたペプチドが陽電子放出トモグラフィーにより検出される実施の形態 9 の方法。

#### 【 0 0 4 9 】

実施の形態 21 : a ) 患者の標的組織に特異的である少なくとも一つのアームと F - 18 により標識されたペプチドまたは F - 18 により標識されたペプチドに共役した低分子量のハプテンに特異的である少なくとももう一つのアームを含んでなる二特異的な抗体または抗体フラグメントを投与し、二特異的な抗体または抗体フラグメントを標的組織に結合せしめ、非標的の二特異的な抗体または抗体フラグメントを除去し、

b ) F - 18 により標識されたペプチドまたはそれと共役したハプテンを患者に投与し、F - 18 により標識されたペプチドまたはそれと共役したハプテンを二特異的な抗体または抗体フラグメントに結合せしめ、非結合の F - 18 により標識されたペプチドまたはそれと共役したハプテンを除去し、

c ) F - 18 により標識されたペプチドを検出し、それによって標的組織を検出することを含んでなる患者の組織を検出する方法に使用される

F - 18 により標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン。

#### 【 0 0 5 0 】

実施の形態 22 : F - 18 により標識されたペプチドがチオール基を含有する実施の形態 21 に記載の F - 18 により標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン

実施の形態 23 : F - 18 により標識されたペプチドが実施の形態 1 に記載の方法により標識される実施の形態 22 に記載の F - 18 により標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン。

実施の形態 24 : F - 18 により標識されたペプチドが実施の形態 6 に記載の方法により標識される実施の形態 22 に記載の F - 18 により標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン。

実施の形態 25 : F - 18 により標識されたペプチドが、X - G l y - D - T y r - D - T r p - G l y - D - L y s ( X ) - G l y - D - T y r - D - T r p - O H であり、X が遊離あるいは保護されたアミノ酸基を表す実施の形態 21 に記載の F - 18 により標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン。

実施の形態 26 : F - 18 により標識されたペプチドが、A c - C y s ( Y ) - D - T y r - D - T r p - G l y - D - C y s ( Y ) - G l y - D - T y r - D - T r p - O H であり、Y が遊離あるいは保護されたチオール基を表す実施の形態 21 の F - 18 により標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン。

実施の形態 27 : F - 18 により標識されたペプチドが A c - G l y - D - ヨード - T y r - D - T r p - G l y - D - L y s ( A c ) - G l y - D - ヨード - T y r - D - T r p - O H である実施の形態 21 に記載の F - 18 により標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン。

実施の形態 28 : ハプテンが金属キレート錯体である実施の形態 21 に記載の F - 18 に

10

20

30

40

50

より標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン。

実施の形態 29：金属キレート錯体がマンガン、鉄、またはガドリニウムを含んでなる実施の形態 28 に記載の F - 18 により標識されたペプチドまたは該ペプチドに共役したハプテン。

【0051】

実施の形態 30：別々の容器に収容した、  
F - 18 により標識されたペプチドまたはそれと共役したハプテンと、  
患者の標的組織に特異的である少なくとも一つのアームと F - 18 により標識されたペプチドまたは F - 18 により標識されたペプチドに共役した低分子量のハプテンに特異的である少なくとももう一つのアームを含んでなる二特異的な抗体または抗体フラグメントとを含む患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

10

【0052】

実施の形態 31：F - 18 により標識されたペプチドがチオール基を含有する実施の形態 30 に記載の患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

実施の形態 32：F - 18 により標識されたペプチドが実施の形態 1 に記載の方法により標識される実施の形態 30 に記載の患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

実施の形態 33：F - 18 により標識されたペプチドが実施の形態 6 に記載の方法により標識される実施の形態 30 に記載の患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

実施の形態 34：F - 18 により標識されたペプチドが、X - Gly - D - Tyr - D - Trp - Gly - D - Lys (X) - Gly - D - Tyr - D - Trp - OH であり、X が遊離あるいは保護されたアミノ酸基を表す実施の形態 30 に記載の患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

20

実施の形態 35：F - 18 により標識されたペプチドが、Ac - Cys (Y) - D - Tyr - D - Trp - Gly - D - Cys (Y) - Gly - D - Tyr - D - Trp - OH であり、Y が遊離あるいは保護されたチオール基を表す実施の形態 30 に記載の患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

実施の形態 36：F - 18 により標識されたペプチドが Ac - Gly - D - ヨード - Tyr - D - Trp - Gly - D - Lys (Ac) - Gly - D - ヨード - Tyr - D - Trp - OH である実施の形態 30 に記載の患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

30

実施の形態 37：ハプテンが金属キレート錯体である実施の形態 30 に記載の患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

実施の形態 38：金属キレート錯体がマンガン、鉄、またはガドリニウムを含んでなる実施の形態 37 に記載の患者の組織を検出する方法に使用されるキット。

---

フロントページの続き

(72)発明者 グリフィス, ゲイリー・エル  
アメリカ合衆国、07960 ニュー・ジャージー、モリスタウン、エッジヒル・アヴェニュー  
36

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特開平08-319312(JP, A)  
J. Nucl. Med., 米国, 1997年 5月, Vol.38, No.5 Suppl, 177

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07K 1/13  
A61K 51/00  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)