

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6786731号  
(P6786731)

(45) 発行日 令和2年11月18日(2020.11.18)

(24) 登録日 令和2年10月30日(2020.10.30)

(51) Int. Cl.		F I			
<b>A 6 1 K</b>	<b>51/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>51/04</b>	<b>2 0 0</b>
<b>C 0 7 K</b>	<b>7/64</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b>	<b>7/64</b>	
<b>C 0 7 K</b>	<b>7/06</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b>	<b>7/06</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/64</b>	<b>(2017.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>47/64</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>9/08</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>9/08</b>	

請求項の数 9 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-560737 (P2019-560737)
(86) (22) 出願日	平成30年4月12日 (2018. 4. 12)
(65) 公表番号	特表2020-516676 (P2020-516676A)
(43) 公表日	令和2年6月11日 (2020. 6. 11)
(86) 国際出願番号	PCT/CN2018/082782
(87) 国際公開番号	W02018/192405
(87) 国際公開日	平成30年10月25日 (2018. 10. 25)
審査請求日	令和1年11月1日 (2019. 11. 1)
(31) 優先権主張番号	201710250652.4
(32) 優先日	平成29年4月17日 (2017. 4. 17)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)

早期審査対象出願

(73) 特許権者	519370647
	中国医学科学院北京协和医院
	PEKING UNION MEDICAL COLLEGE HOSPITAL, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
	中国北京市東城区東单三条5号
	No. 5, Lane three Dongdan, Dongcheng District Beijing 100005 China
(74) 代理人	110002262
	TRY国際特許業務法人
(72) 発明者	朱 朝暉
	中国北京市東城区東单三条5号
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重標的イメージング用分子プローブ及びその調製方法と応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TATE環状ペプチド構造、RGD環状ペプチド構造、及びNOTAキレート基を含む二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物であって、前記TATE環状ペプチド構造、前記RGD環状ペプチド構造、及び前記NOTAキレート基は、それぞれ重合度が1~5であるPEGセグメントを介して同一のグルタミン酸分子に結合し、前記ポリペプチド化合物の構造は、NOTA-PEG<sub>n</sub>-Glu{PEG<sub>m</sub>-TATE}-PEG<sub>p</sub>-RGDに簡略化して表示され、ここで、m、n、pはそれぞれ1~5の整数を取り、PEG<sub>n</sub>、PEG<sub>m</sub>、PEG<sub>p</sub>は、それぞれ-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-を1単位とする繰り返し単位数がm、n、pであることを表し、Glu(グルタミン酸分子)のアミノ基がPEG<sub>n</sub>とのアミド結合を構成し、Gluの一方のカルボキシル基がPEG<sub>m</sub>とのアミド結合を構成し、Gluの他方のカルボキシル基がPEG<sub>p</sub>とのアミド結合を構成する、ことを特徴とする二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物。

【請求項 2】

前記TATE環状ペプチド構造、前記NOTAキレート基及び前記RGD環状ペプチド構造は、それぞれ重合度が2~5のPEGセグメントを介して同一のグルタミン酸分子に結合する、ことを特徴とする請求項1に記載のポリペプチド化合物。

【請求項 3】

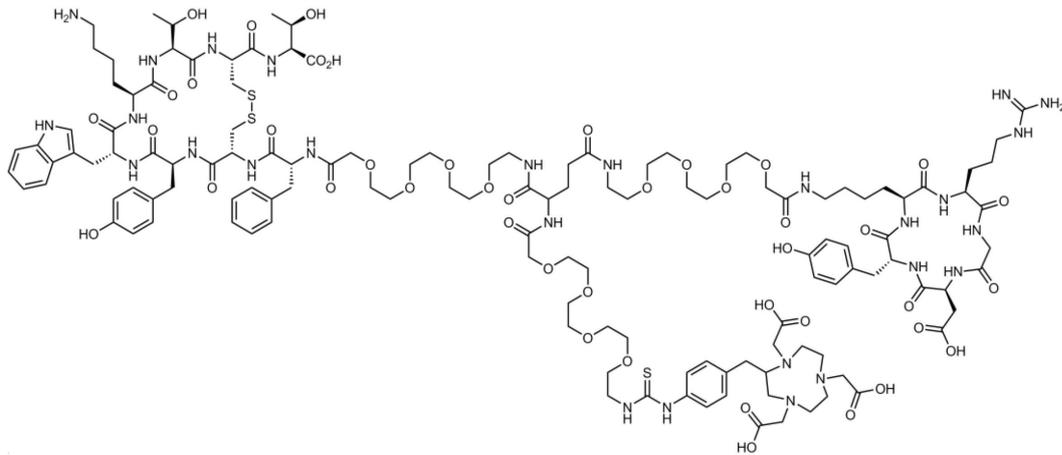
前記TATE環状ペプチド構造、前記NOTAキレート基及び前記RGD環状ペプチド構造は、それぞれPEG<sub>4</sub>セグメントを介して前記同一のグルタミン酸分子に結合する、ことを特徴とする請求項2に記載のポリペプチド化合物。

10

20

## 【請求項4】

前記TATE環状ペプチド構造及び前記RGD環状ペプチド構造は、安定なアミド結合を形成するために、それぞれPEG<sub>4</sub>分子セグメントを介して同一のグルタミン酸分子の2つのカルボキシ末端に結合し、前記NOTAキレート基は、PEG<sub>4</sub>分子セグメントを介して前記同一のグルタミン酸分子のアミノ末端に結合し、前記ポリペプチド化合物はNOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDと表され、その特定の構造は下式(1)に示される、ことを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド化合物。



10

20

## 【請求項5】

分子プローブが放射性核種標識ポリペプチド複合体であって、前記ポリペプチド複合体は、請求項1に記載の二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物を含む、ことを特徴とするTATE-RGD二重標的放射性分子プローブ。

## 【請求項6】

前記放射性核種は、<sup>68</sup>Ga、<sup>64</sup>Cu、<sup>18</sup>F、<sup>89</sup>Zr又は<sup>177</sup>Luのいずれか、さらに好ましくは<sup>68</sup>Ga、<sup>64</sup>Cu又は<sup>18</sup>Fから選択される、ことを特徴とする請求項5に記載のTATE-RGD二重標的放射性分子プローブ。

## 【請求項7】

前記放射性核種標識ポリペプチド複合体が放射性核種<sup>68</sup>Ga標識ポリペプチド複合体であって、前記ポリペプチド複合体は、請求項4に記載の二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDを含み、前記二重標的放射性分子プローブは、<sup>68</sup>Ga-NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDに簡略化して表示される、ことを特徴とする請求項5に記載のTATE-RGD二重標的放射性分子プローブ。

## 【請求項8】

請求項4に記載のNOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDを脱イオン水に溶解して前駆体を調製し、5mLの0.1mol/L高純度塩酸溶液を用いてゲルマニウム/ガリウム(<sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga)ジェネレーターで溶離された溶離液をEPチューブに入れ、前記溶離液から放射能含有量が最高の1mLを収集し、収集された前記溶離液に93μLの1.25mol/L酢酸ナトリウムを添加して混合液のpHを4.0-4.5に調整し、20μgの前記前駆体を混合液に添加してよく混合し、100°Cまで加熱して10分間保持し、反応後、反応溶液を室温まで冷却し、前記反応溶液に4mLの注射用滅菌水を添加し、滅菌フィルター(0.22μm、13mm)を通して濾過して滅菌製品ボトルに入れる、ことを特徴とする請求項7に記載の二重標的放射性分子プローブを調製する方法。

## 【請求項9】

好ましくはTATE-RGD二重標的分子プローブを小細胞肺癌画像診断に用いる無色透明注射液に調製することである、SSTR2及び/又はインテグリン<sub>v<sub>3</sub></sub>陽性画像診断の放射性医薬品の調製のための、請求項1に記載の二重標的化ポリペプチド化合物および請求項5に記載のTATE-RGD二重標的放射性分子プローブからなる群から選択されるいずれかの化合物の使用。

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、疾患の診断及び治療のための放射性プローブの分野に関し、特にインテグリン $\alpha_v\beta_3$  (integrin  $\alpha_v\beta_3$ ) 及び/又はソマトスタチン受容体 (somatostatin receptor, SSTR) 陽性疾患を標的とするTATE-RGD二重標的放射性分子プローブ及びその調製方法、並びに診断及び治療の標的分子としての化合物の応用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

腫瘍の成長過程中的重要な部分は新しい血管の形成であり、腫瘍の新生の血管はさまざまなタンパク質分子によって調整されている。その中の重要なタンパク質の1つはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ である。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ は、細胞外マトリックス受容体であり、それはサブユニット $\alpha_v$ とサブユニット $\beta_3$ で構成されるヘテロダイマー膜貫通糖タンパク質である。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ は、腫瘍の重要な分子マーカーの1つとして、神経芽細胞腫、骨肉腫、神経膠芽腫、乳がん、前立腺がんなどの特定の腫瘍細胞の表面及び新生血管内皮細胞の表面に高発現するが、形成された血管及び正常組織では低発現であるか又は発現しない。それは、腫瘍成長及び転移過程で高発現するので、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ は診断及び治療の標的の1つになる。ソマトスタチン (somatostatin, SST) はソマトスタチン受容体 (somatostatin receptor, SSTR) を介して作用する。ソマトスタチン受容体はGタンパク質共役受容体のファミリーに属し、7つの膜貫通セグメントを有する糖タンパク質である。SSTR遺伝子には5つの異なる分子サブタイプ、即ちSSTR1~5がある。SSTRは広く分布しており、内分泌細胞やリンパ球を含む多くの正常細胞がSSTRを発現するが、消化管膵臓神経内分泌腫瘍 (ガストリノーマ、インスリノーマ、グルカゴノーマ)、カルチノイド、下垂体腺腫、褐色細胞腫、傍神経節腫、甲状腺髄様癌などの腫瘍では、正常組織よりも一般的に発現する。SSTRは、さまざまなヒト腫瘍の発生と発生に重要な役割を果たす。

## 【0003】

ソマトスタチン受容体は、消化管膵臓神経内分泌腫瘍 (ガストリノーマ、インスリノーマ、グルカゴノーマ)、カルチノイド、下垂体腺腫、褐色細胞腫、傍神経節腫、甲状腺髄様癌などのさまざまな神経内分泌腫瘍に見られる。 $^{99m}\text{Tc}$ や $^{111}\text{In}$ などの放射性核種の標識するソマトスタチン類似体、例えば、 $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-オクトレオチド及び $^{111}\text{In}$ -DTPA-オクトレオチドは、長い間臨床に應用され、NETの診断と治療に重要な役割を果たしてきた。同時に、オクトレオチドやTATEなどの新しいソマトスタチン誘導體も絶えず出現し又は改善されている。ここで、TATEはSSTR2との親和性が高く、大部分のNETもSSTR2をより多く発現する。国際的な分野では、 $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE関連の前臨床研究が完全に行われており、ドイツ主導のヨーロッパ及び世界の他の地域で臨床診療に適用されている。胃腸膵内分泌腫瘍、下垂体腺腫、褐色細胞腫、傍神経節腫、甲状腺髄様癌、小細胞肺癌などの神経内分泌腫瘍の診断及び治療において、その優位性が多数の研究で示されている。

## 【0004】

アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) のペプチド核トレーサーは1980年代に開発された。それは、血管新生内皮細胞の表面及び腫瘍細胞の表面で高発現するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ と結合することができる。したがって、腫瘍を示し、腫瘍血管新生の発現程度を示唆する役割を果たしている。 $^{99m}\text{Tc}$ 又は $^{18}\text{F}$ の標識するRGDペプチドを使用するSPECT (/CT) イメージング又はPET (/CT) イメージングは、ヨーロッパや米国などの西欧諸国の臨床に應用されている。中国の少数のユニットも予備的な臨床應用を行っており、高い安全性と有効性があり、乳がん、肝がん、神経膠腫などのさまざまな腫瘍の診断、ステージ分類、有効性評価に役立っている。

## 【0005】

ポジトロン放射性核種の標識するポリペプチド $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RGD及び $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATEは、それらの受容体に対してより高い感度と特異性を有するので、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 及びSSTR2受容体をそれぞれ大部分の悪性腫瘍及び良性神経内分泌腫瘍で大きく発現するため、P

10

20

30

40

50

ETイメージングに高解像度があり、腫瘍及び臓器の吸収を定量化でき、SPECTよりも優れた利点がある。同時に、ポジトロン放射性核種 $^{68}\text{Ga}^{3+}$ は、ジェネレーターによって生成され、簡単な製造プロセスと低コストの利点を備えるので、 $^{68}\text{Ga}$ 標識薬物を使用したPET/CTイメージングが必要であり、より高い臨床応用価値がある。腫瘍の検出率をさらに向上させることができ、腫瘍のステージ分類と予後評価、腫瘍を対象とした手術、治療評価において臨床的意義がより高くなる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、TATE-RGD二重標的放射性分子プローブ及びその調製方法を設計し合成することである。その分子プローブは、腫瘍細胞上の2つのターゲットを結合するため、TATE及びRGDの2つのポリペプチドを含み、その間にPEG (PEG = polyethyleneglycol) 分子の付着により、各官能基間の距離と生体内薬物動態特性を調節する役割を果たす。このプローブは、単一標的分子プローブと比較して、より高い腫瘍の取り込みを有するので、より良好な生体内イメージング効果を達成できる。その分子は、放射性核種を二官能性キレート剤NOTAで標識することにより、放射標識プローブを得る。その放射標識プローブは、生体内でTGF及び/又はRGDポリペプチド腫瘍細胞受容体ターゲティングにより病変に集中し、核医学ポジトロン放射断層撮影法を使用して、SSTR2及び/又はインテグリン  $\alpha_3\beta_1$  の高発現病変に対し画像診断と治療を行う。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の目的は、以下の技術的手段により達成される。

【0008】

まず、本発明は、二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物を提供する。その構造は、TATE環状ペプチド構造、RGD環状ペプチド構造、及びNOTAキレート基を含み、前記TATE環状ペプチド構造、前記RGD環状ペプチド構造、及び前記NOTAキレート基は、それぞれ重合度が1~5であるPEGセグメントを介して同一のグルタミン酸分子に結合又は直接結合する。前記ポリペプチド化合物の構造は、NOTA-PEG<sub>n</sub>-Glu{PEG<sub>m</sub>-TATE}-PEG<sub>p</sub>-RGDに簡略化して表示できる。ここで、m、n、pはそれぞれ0~5の整数を取る。

【0009】

本発明の好ましいポリペプチド化合物において、前記TATE環状ペプチド構造、前記NOTAキレート基及び前記RGD環状ペプチド構造は、それぞれ重合度が2~5のPEGセグメントを介して同一のグルタミン酸分子に結合する。

【0010】

更に、本発明のさらに好ましいポリペプチド化合物において、前記TATE環状ペプチド構造、前記NOTAキレート基及び前記RGD環状ペプチド構造は、それぞれPEG<sub>4</sub>セグメントを介して前記同一のグルタミン酸分子に結合する。

【0011】

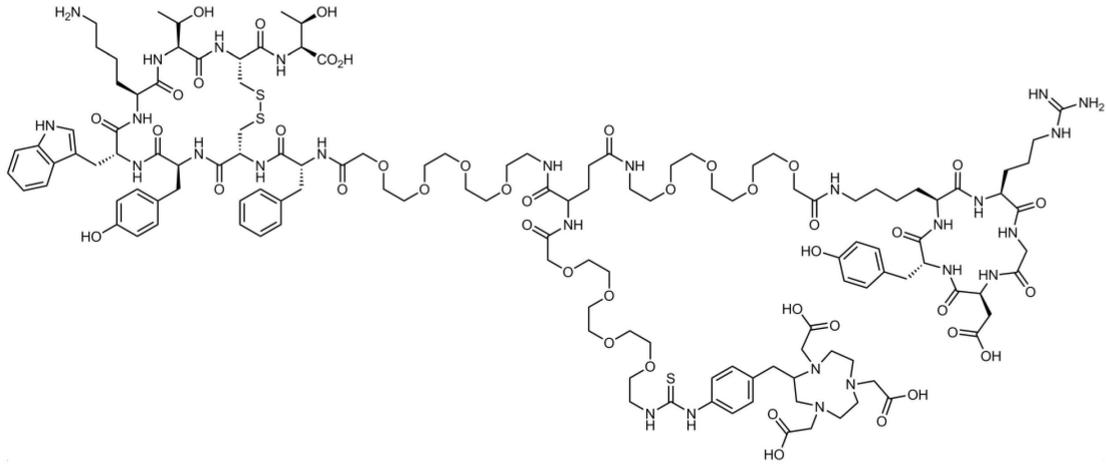
更に、本発明のさらに好ましいポリペプチド化合物において、前記TATE環状ペプチド構造及び前記RGD環状ペプチド構造は、安定なアミド結合を形成するために、それぞれPEG<sub>4</sub>分子セグメントを介して同一のグルタミン酸分子の2つのカルボキシ末端に結合する。前記NOTAキレート基は、PEG<sub>4</sub>分子セグメントを介して前記同一のグルタミン酸分子のアミノ末端に結合する。前記ポリペプチド化合物はNOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDと表され、その特定の構造は下式(1)のとおりである。

10

20

30

40



10

## 【0012】

更に、本発明はTATE-RGD二重標的放射性分子プローブを提供する。その分子プローブは、放射性核種標識ポリペプチド複合体である。前記ポリペプチド複合体は、本発明による二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物をリガンドとする。

## 【0013】

本発明の好ましいTATE-RGD二重標的放射性分子プローブにおいて、前記放射性核種は<sup>68</sup>Ga、<sup>64</sup>Cu、<sup>18</sup>F、<sup>89</sup>Zr又は<sup>177</sup>Luのいずれか、さらに好ましくは<sup>68</sup>Ga、<sup>64</sup>Cu又は<sup>18</sup>Fから選択される。

20

## 【0014】

本発明の好ましい実施形態において、前記TATE-RGD二重標的放射性分子プローブは<sup>68</sup>Ga標識ポリペプチド複合体である。前記ポリペプチド複合体は、本発明による二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物をリガンドとする。前記二重標的腫瘍標的化ポリペプチド化合物のTATE環状ペプチド構造、NOTAキレート基及びRGD環状ペプチド構造は、それぞれ重合度が2～5のPEGセグメントを介して同一のグルタミン酸分子に結合する。

## 【0015】

本発明の最も好ましい実施形態において、前記TATE-RGD二重標的放射性分子プローブは<sup>68</sup>Ga標識ポリペプチド複合体である。前記ポリペプチド複合体は、本発明による二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDをリガンドとする。前記二重標的放射性分子プローブは、<sup>68</sup>Ga-NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDに簡略化して表示される。

30

## 【0016】

更に、本発明の目的は、ポリペプチド化合物及び二重標的放射性分子プローブを調製する方法を提供する。この方法は使いやすく、より高い製品安定性を有する。

## 【0017】

本発明の前記目的は、以下の技術的手段により達成される。

1. 二重標的を有する前記腫瘍標的化ポリペプチド化合物の調製方法は、

40

保護されたグルタミン酸をポリペプチドPEG<sub>n</sub>-TATEとモル比1-10：1-10で混合し、DIPEA及びDECPの作用下でアミノ酸縮合反応によりTATEポリペプチドと保護されたグルタミン酸がPEG<sub>n</sub>セグメントを介して結合された第一生成物を取得するステップA（ここで、nは0～5の整数をとる）；

ステップAで得られた第一生成物からピペリジン条件下で保護基Fmocを脱離し、第二生成物を取得するステップB（ここで、第二生成物は単にGlu-PEG<sub>n</sub>-TATEと表され、nは0～5の整数を取る）；

ステップBで得られた第二生成物をDIPEA条件下でNOTA-PEG<sub>m</sub>-NHSと反応させ、Boc保護のグルタミン酸がそれぞれPEG<sub>m</sub>セグメントとPEG<sub>n</sub>セグメントを介してNOTA基とTATEペプチドに結合する第三生成物を取得するステップC（ここで、nとmはそれぞれ0～5の整数を取る

50

);

ステップCで得られた第三生成物は、TFA条件下で保護基Bocを脱離し、グルタミン酸がそれぞれPEG<sub>m</sub>セグメントとPEG<sub>n</sub>セグメントを介してNOTA基とTATEペプチドに結合する第四生成物を取得するステップD(ここで、第四生成物は単にNOTA-PEG<sub>m</sub>-Glu(PEG<sub>n</sub>-TATE)と表され、nとmは0~5の整数を取る);

ステップDで得られた第四生成物とポリペプチドPEG<sub>p</sub>-RGDをDIPEA条件下で反応させ(ここで、pは0~5の整数を取る)、最終的に、本発明による二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物NOTA-PEG<sub>n</sub>-Glu{PEG<sub>m</sub>-TATE}-PEG<sub>p</sub>-RGDを取得するステップE含む。

【0018】

2. TATE-RGD二重標的放射性分子プローブの調製方法は、<sup>68</sup>Ga-NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD放射性医薬品の調製を例とすると、以下のステップを含む:

NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDを脱イオン水に溶解し、5mLの0.1mol/L高純度塩酸溶液を用いてゲルマニウム/ガリウム(<sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga)ジェネレーター(Ecker & Ziegler)で溶離されたものをEPチューブ内に入れ、放射能含有量が最高の1mLを収集し、93 μLの1.25mol/L酢酸ナトリウムを添加して混合液のpHを4.0-4.5に調整し、20 μgの前駆体を混合液に添加してよく混合し、100 °Cまで加熱して10分間保持し、反応後、反応溶液を室温まで冷却し、4mLの注射用滅菌水を添加し、滅菌フィルター(0.22 μm、13mm)を通して濾過して滅菌製品ボトルに入れた。

【0019】

<sup>68</sup>Ga-NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD放射能測定方法は、以下を含む:

HPLC分析法は、高速液体クロマトグラフィー(米国のWaters社、515型ポンプ)、UV検出器(486型、UV吸収波長=254nm)、放射能検出器(米国のEG & GBERTHOLD社)、放射能計CRC-25PET(米国のCapintec社)、WatersカラムNova-PakC18(4.6 × 150mm、5 μm)を使用して実施した。

【0020】

更に、前のステップのHPLC分析法は、Waters C18分析カラム(4.6mm × 250mm)を備えるWaters HPLCシステムを使用して行った。HPLCグラジエント溶出条件は、0分間、アセトニトリル/水(5/95、v/v)、5分間、アセトニトリル/水(5/95、v/v)、10分間、アセトニトリル/水(80/20、v/v)、15分間、アセトニトリル/水(100/0、v/v)、18分間、アセトニトリル/水(100/0、v/v)、20分間、アセトニトリル/水(5/95、v/v)である。溶離液には、1mL/minの流量で0.1% TFAが含まれる。

【0021】

放射能HPLCプロファイルから、<sup>68</sup>Ga-NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDの保持時間(Retention Time)は11.6分であり、放射化学的純度は99%以上である。

【0022】

更に、本発明は、SSTR2及び/又はインテグリン  $\alpha_3 \beta_3$  陽性画像診断の放射性医薬品の調製において前記TATE - RGD二重標的分子プローブの応用を提供する。

【0023】

本発明の好ましい応用は、TATE-RGD二重標的分子プローブを小細胞肺癌画像診断に用いる無色透明注射液に調製することである。

【0024】

本発明による二重標的分子プローブの従来技術と比較した有益な効果には以下が含まれる:

1. 本発明のTATE-RGDは、二重標的ポリペプチド薬物であり、TATEとRGDが相互に連結されてソマトスタチン受容体及びインテグリン  $\alpha_3 \beta_3$  の同時結合を可能にし、結合親和性及び薬物の腫瘍取り込みを増加させ、より良好な腫瘍イメージング効果を達成する。

2. 本発明は、同一又は異なる重合度を有するPEG分子がTATEとRGDポリペプチドとの間に導入される場合、ポリペプチド薬物の薬物動態特性、特に非腫瘍組織クリアランス速度を改善することができる。

3. 本発明におけるキレート剤としてのNOTAの使用は、DOTAよりも優れた生体内及び生体

10

20

30

40

50

外の安定性を有する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）スペクトルである。

【図2】小細胞肺癌のヌードマウスH69モデルのmicro PETイメージング結果であり、左から右に、尾静脈イメージング $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD（Control）、 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD+RGD（Block+RGD）、 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD+TATE（Block+TATE）、 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD+RGD+TATE（Block+TATE+RGD）のイメージング結果を示す。

【図3】非小細胞肺癌のヌードマウスA549モデルのmicro PETイメージングの結果であり。左から右に、尾静脈イメージング $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD（Control）、 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD+RGD（Block+RGD）、 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD+TATE（Block+TATE）、 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD+RGD+TATE（Block+TATE+RGD）のイメージング結果を示す。

【図4】正常マウスに $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDを注射した後、さまざまな時点での各臓器の放射能取り込み% ID/gを示す。

【図5】非小細胞肺癌患者において本発明の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDと既存の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGDプローブのイメージング結果の比較である。ここで、左グループマップは発明された $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDのイメージング結果であり、右グループマップは既存の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGDのイメージング結果であり、矢印は病変を示す。

【図6】小細胞肺癌患者において $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDと既存の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGDプローブのイメージング結果の比較である。ここで、左グループマップは発明された $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDのイメージング結果であり、右グループマップは既存の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGDのイメージング結果であり、矢印は病変を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明の技術的手段をより明確に示すために、図面及び実施例を参照してさらに本発明を説明し図示するが、本発明の技術的手段は、以下に説明される特定の実施形態及び列挙される特定の実施例に限定されない。本発明の以下の実施例で使用される化学製品及び試薬は、すべて既存又は市販の製品である。

【0027】

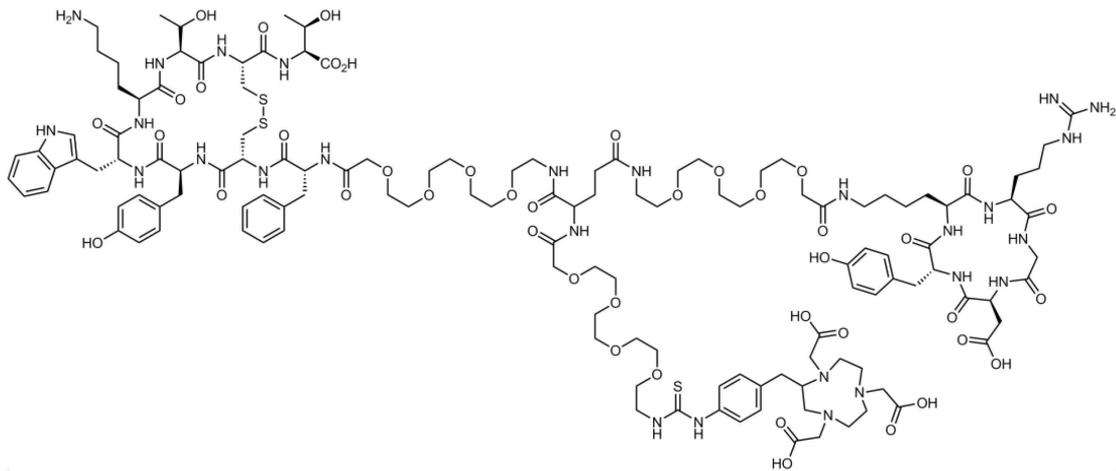
実施例1

二重標的を有する腫瘍標的化ポリペプチド化合物は、その構造にTATE環状ペプチド構造、RGD環状ペプチド構造、及びNOTAキレート基を含む。前記TATE環状ペプチド構造、前記RGD環状ペプチド構造、前記NOTAキレート基はそれぞれ同一のグルタミン酸分子に結合して形成される。前記TATE環状ペプチド構造と前記RGD環状ペプチド構造は、それぞれPEG<sub>4</sub>分子セグメントを介してグルタミン酸分子の2つのカルボキシ末端に結合して安定なアミド結合を形成する。前記NOTAキレート基は、PEG<sub>4</sub>分子セグメントを介して前記グルタミン酸分子のアミノ末端に結合する。得られたポリペプチド化合物はNOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDと表され、その特定の構造は下式(1)のとおりである：

10

20

30



10

## 【 0 0 2 8 】

NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDを調製する方法は、次の手順を含む：

1) 化合物Glu-PEG<sub>4</sub>-TATEの合成

9.5mgのFmoc-Glu(Boc)-OH (Fmoc及びBoc保護グルタミン酸)、25 μLのジイソプロピルエチルアミン (DIPEA)、5 μLの塩化ジエチルホスホニウム (DECP) の混合液を、27.5mgのPEG<sub>4</sub>-TATE (市販の腫瘍標的ポリペプチドを、2.6mLのジメチルホルムアミド (DMF) に溶解する) を含む20mLガラスバイアルに添加し、溶解した後、室温で2時間撹拌する。次に、液体クロマトグラフィー及び質量分析を行った。結果は、Fmoc及びBoc保護アミノ縮合ポリペプチド生成物が中間化合物Iであることを示す。中間化合物I溶液に0.6mLのピペリジンを添加し、室温で1時間撹拌した直後に、中間化合物IのFmoc保護基を除去して、生成物Glu-PEG<sub>4</sub>-TATEを得た。HPLCによる分離精製と凍結乾燥後、約17.5mgの純粋な化合物が収率68%で得られた。

20

## 【 0 0 2 9 】

2) 化合物NOTA-2PEG<sub>4</sub>-TATEの合成

ステップ1) で得られた化合物Glu-PEG<sub>4</sub>-TATE17.5mg、20 μLのDIPEA、24.0mgのNOTA-PEG<sub>4</sub>-NHS (1,4,7-トリアザシクロノナン-N,N',N'-トリアセテート活性化エステル、2倍当量) を2mLのジメチルスルホキシド (DMSO) に混合して溶解した。混合物を室温で20分間撹拌し、反応の進行をHPLCで監視した。前記化合物Glu-PEG<sub>4</sub>-TATEを消費した後、Boc保護NOTA-PEG<sub>4</sub>-TATEの生成をLC-MSにより検出した。次に、0.1mLのトリフルオロ酢酸 (TFA) を添加して保護基Bocを除去し、目的化合物は、グルタミン酸をそれぞれPEG<sub>4</sub>セグメントに結合することにより形成され、単にNOTA-2PEG<sub>4</sub>-TATEと表示される。凍結乾燥して溶媒DMSOを除去した後、混合物をHPLCで分離精製し、凍結乾燥して、約5.5mgの目的生成物が収率25.6%で得られた。

30

## 【 0 0 3 0 】

3) 化合物NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDの合成

ステップ2) で得られた6.5mgのNOTA-2PEG<sub>4</sub>-TATE (1mLのDMSOに溶解) を含む20mLのガラス反応バイアルに、6.0mgのPEG<sub>4</sub>-RGD (市販のArg-Gly-Asp環状ペプチド) と10 μLのDIPEAを添加し、混合して溶解した。混合物を室温で1時間撹拌し、HPLCで精製した。精製条件：4mLの水で希釈し、分取HPLCで (C18カラムを使用する) 2回に分けて注入し、以下の勾配で12mL/minの流量で精製した。溶離液の成分：Buffer A：0.1%TFA in H<sub>2</sub>O; Buffer B：0.1%TFA in CH<sub>3</sub>CN; 勾配溶出：0-20分間：20-50 Buffer B。凍結乾燥後、得られた生成物は、約1.5mgであり、収率は13.5%であり、純度は97%以上であった。LC-MSによる生成物の同定：[(MH<sup>+</sup>)/2]<sup>++</sup>=2930.14、計算値(m/z)：2930.92 (C<sub>131</sub>H<sub>193</sub>N<sub>27</sub>O<sub>43</sub>S<sub>3</sub>)。目的生成物NOTA-Bn-p-SCN-PEG<sub>4</sub>-Glu{PEG<sub>4</sub>-Cyclo[Arg-Gly-Asp-(D-Tyr)-Lys]}-PEG<sub>4</sub>-(D-Phe)-Cys-Tyr-(D-Trp)-Lys-Thr-Cys-Thrであることが決定された。

40

## 【 0 0 3 1 】

50

## 実施例2

TATE-RGD二重標的放射性分子プローブは、TATEポリペプチド、RGDポリペプチド及び放射性核種 $^{68}\text{Ga}$ を含み、前記TATEとRGDポリペプチド間は $\text{PEG}_4$ 分子を介して連結してTATE-3 $\text{PEG}_4$ -RGDポリペプチドと $^{68}\text{Ga}$ 用NOTA結合を形成する。前記TATE-RGD二重標的放射性分子プローブは $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3 $\text{PEG}_4$ -TATE-RGDである。

## 【0032】

$^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3 $\text{PEG}_4$ -TATE-RGD二重標的放射性分子プローブの調製方法は、次のステップを含む：

(1)  $^{68}\text{Ga}$ の溶離

5mLシリンジを使用して、5mLの0.1mol/L HClを抽出し、ガリウムジェネレーターにおいて溶離を行い、ゆっくり溶離し、同時に溶離液を1.5mL EPチューブに収集し、1チューブあたり1mL、合計5チューブとした。各EPチューブに対し放射能測定を行い、失活度が最大のチューブを標識用とする。

## 【0033】

(2)  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3 $\text{PEG}_4$ -TATE-RGDの標識

1.25mol/L酢酸ナトリウム溶液を1mLの $^{68}\text{Ga}$ 溶離液に添加し、pHを4.0-4.5に調整し、よく混合して、実施例1で調整した20 $\mu\text{g}$ のNOTA-3 $\text{PEG}_4$ -TATE-RGDを添加し、よく混合して100に加熱し、10分間保持した。反応が完了した後、反応溶液を室温まで冷却し、4mLの注射用滅菌水を添加し、滅菌フィルター(0.22 $\mu\text{m}$ 、13mm)を通して濾過して滅菌製品ボトルに入れた。

## 【0034】

## (3) 品質管理

HPLC分析条件：カラムはC18カラム(4.6mm $\times$ 250mm)であり、移動相Aは既に(0.1%トリフルオロ酢酸)であり、移動相Bは水(0.1%トリフルオロ酢酸)である。流量は1mL/minである：0から5分間、移動相A 5%;10分間、移動相A 80%;15分間、移動相A 100%;18分間、移動相A 100%;20分間、移動相A 5%。

## 【0035】

UV検出波長は210nmであり、カラム温度は20 $^{\circ}\text{C}$ である。放射能検出は、HPLC専用の放射能検出器を使用する。HPLC分析の結果、 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3 $\text{PEG}_4$ -TATE-RGDの保持時間は11.6分であり(図1)、さらに精製しない場合の放射化学的純度は、99%で以上であることが示された。

## 【0036】

## (4) 体外の安定性測定

$^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3 $\text{PEG}_4$ -TATE-RGDを標識した後、ウシ胎児血清を添加し、放射化学的純度をそれぞれ60分及び120分でHPLCにより測定した。放射化学的純度は、それぞれ98%及び97%であると測定された。

## 【0037】

前記TATE-RGD二重標的プローブ $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3 $\text{PEG}_4$ -TATE-RGDは、画像検査又は画像診断のために無色透明の注射液にさらに調製した。具体的な実験と効果は次のとおりである：

## 1) 小細胞肺癌H69担癌マウスのmicro PETイメージング

右前肢にH69腫瘍を有する担癌マウスを皮下接種し、実施例2の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3 $\text{PEG}_4$ -TATE-RGDを100-200 $\mu\text{Ci}$ 尾静脈に注射した。60分後、Siemens Inveon micro PETを使用して静止画像を10分間収集した(図2の矢印は腫瘍部位を示す)。結果は、実施例2のプローブを単独で注射した場合、腫瘍部位が明らかな放射能取り込みを有し、腫瘍がはっきりと見えることを示す。腫瘍取り込み値は $9.78 \pm 2.77$ であった。過剰な非標識前駆体RGD、TATE、及びRGD+TATEを同時に注入することにより、腫瘍取り込みはそれぞれ $8.23 \pm 1.08$ 、 $1.41 \pm 0.73$ 、 $1.05 \pm 0.13$ まで効果的に減少した。非標識前駆体RGD及びTATEを同時に注入した場合、腫瘍の放射能取り込みは、ほとんどバックグラウンドまで減少した。小細胞H69腫瘍は、ソマトスタチン受容体が主に発現し、腫瘍中の本発明の二重標的分子プローブの濃度は主に非標識TATEによって阻害される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 8 】

## 2) 非小細胞肺癌A549担癌マウスのmicro PETイメージング

右前肢にH549腫瘍を有する担癌マウスを皮下接種し、実施例2の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDを100-200  $\mu\text{Ci}$ 尾静脈に注射した。60分後、Siemens Inveon micro PETを使用して静止画像を10分間収集した(図3の矢印は腫瘍部位を示す)。その結果、実施例2のプロープを単独で注射した場合、腫瘍部位で明らかな放射能取り込みがあり、腫瘍ははっきりと見え、腫瘍取り込み値は $6.46 \pm 0.59$ であった。過剰な非標識前駆体RGD、TATE、及びRGD+TATEを同時に注入することにより、腫瘍取り込みはそれぞれ $1.75 \pm 0.53$ 、 $3.80 \pm 0.48$ 、 $1.35 \pm 0.26$ まで効果的に減少した。非標識前駆体RGD及びTATEを同時に注入した場合、腫瘍の放射能取り込みは、ほとんどバックグラウンドまで減少した。非小細胞H549腫瘍は、インテグリン受容体が主に高発現し、腫瘍中の本発明の二重標的分子プロープの濃度は主に非標識RGDによって阻害される。

10

## 【 0 0 3 9 】

4)  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDの健康なマウスの生体内分布

健康なBalb/cの分布を図4に示す。実施例2の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDは、血液、心臓、肝臓からより早く除去される。腎臓はより放射能が高く、分子プロープは主に腎臓から排出される。初期の心臓、肝臓、肺には少量の取り込みがあり、時間の経過とともに急速に減少する。造影剤は胃、腸、脾臓、膵臓に少量分布しており、脳組織の領域はほとんどなく、血液脳関門を通過できないことを示している。

## 【 0 0 4 0 】

5)  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDの小細胞肺癌患者におけるイメージング

## 【 0 0 4 1 】

臨床的に診断された小細胞肺癌患者の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGD PET/CT画像を図5に示す。本発明の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDを3.5 mCi静脈に注射する。30分後、Siemens Biograph64 PET/CTを使用してトランク部位の画像を3分間/ベッドで収集し、合計5ベッドを収集する。病変は明りょうであり、腫瘍は、最高の標準取り込み値(SUVmax)が18.2であった(図5左)。しかし、既存の単一標的造影剤 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGDは、腫瘍領域への取り込みの増加のみを示し、SUVmax値は4.7であった(図5右)。

20

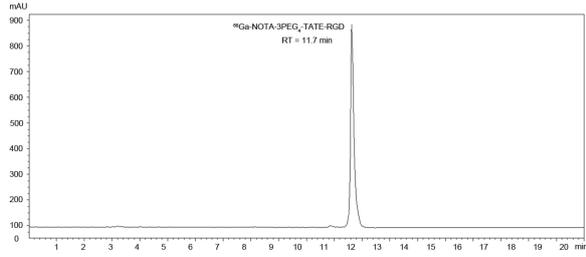
## 【 0 0 4 2 】

6)  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDの非小細胞肺癌患者におけるイメージング

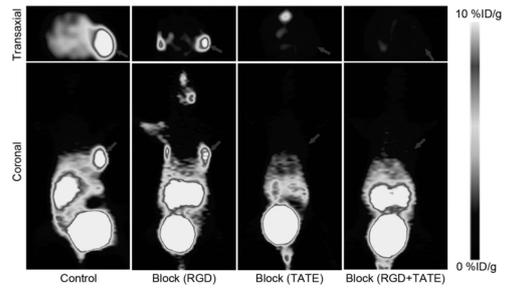
臨床的に診断された非小細胞肺癌患者の画像を図5に示す。本発明の $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-3PEG<sub>4</sub>-TATE-RGDを3.0 mCi静脈に注射する。30分後、Siemens Biograph64 PET/CTを使用して画像を3分間/ベッドで収集し、合計5ベッドを収集する。病変は明りょうであり、腫瘍は、最高の標準取り込み値(SUVmax)が3.4であった(図6左)。しかし、既存の単一標的造影剤 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGDは、腫瘍の取り込みが低く、SUVmax値は2.8であった(図6右)。

30

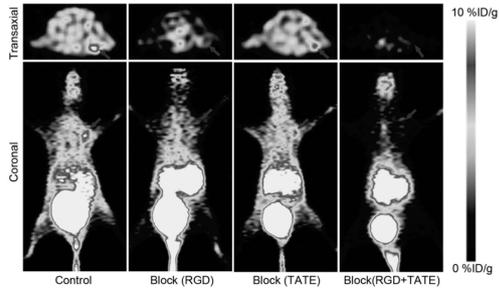
【 1 】



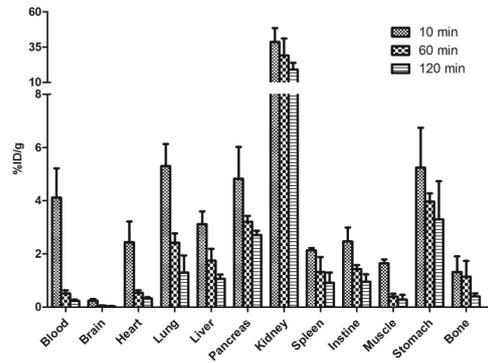
【 3 】



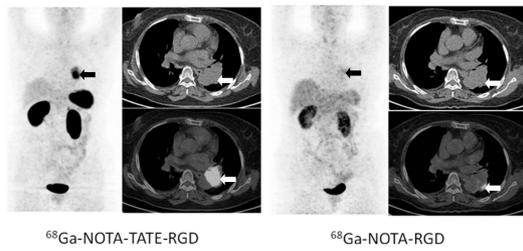
【 2 】



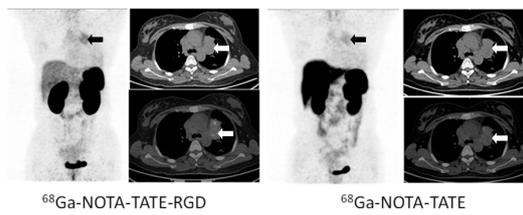
【 4 】



【 5 】



【 6 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 K 103/00 (2006.01) A 6 1 K 103:00

(72)発明者 要 少波  
中国北京市東城区東单三条5号

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特表2004-517034(JP,A)  
Nuclear Medicine and Biology, 2014年, 41, p.133-139  
European Journal of Pharmacology, 2008年, 601, p.23-29  
J Nucl Med., 2006年, 47, p.113-121

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 5 1 / 0 0  
A 6 1 K 4 7 / 0 0  
C 0 7 K 7 / 0 0  
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 / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )