

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5122962号
(P5122962)

(45) 発行日 平成25年1月16日(2013.1.16)

(24) 登録日 平成24年11月2日(2012.11.2)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 Z N A C
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	A 6 1 B 5/05 3 8 3
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02 C
A 6 1 K 49/04 (2006.01)	A 6 1 K 49/04 A
G O 1 T 1/161 (2006.01)	G O 1 T 1/161 D

請求項の数 4 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-533418 (P2007-533418)
 (86) (22) 出願日 平成17年9月28日 (2005.9.28)
 (65) 公表番号 特表2008-514588 (P2008-514588A)
 (43) 公表日 平成20年5月8日 (2008.5.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/N02005/000362
 (87) 国際公開番号 W02006/036071
 (87) 国際公開日 平成18年4月6日 (2006.4.6)
 審査請求日 平成20年9月17日 (2008.9.17)
 (31) 優先権主張番号 20044139
 (32) 優先日 平成16年9月29日 (2004.9.29)
 (33) 優先権主張国 ノルウェー (NO)

(73) 特許権者 396019387
 ジーイー・ヘルスケア・アクスイエ・セル
 スカブ
 ノルウェー国 0401・オスロ ニイダ
 レン ビーオーボックス・4220 ニイ
 コベイエン 2
 (74) 代理人 100137545
 弁理士 荒川 聡志
 (74) 代理人 100105588
 弁理士 小倉 博
 (74) 代理人 100129779
 弁理士 黒川 俊久

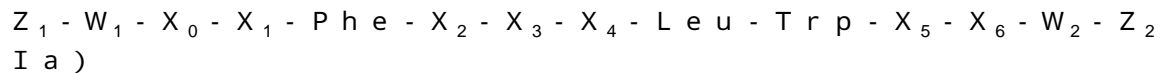
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 u P A R ターゲティング造影剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

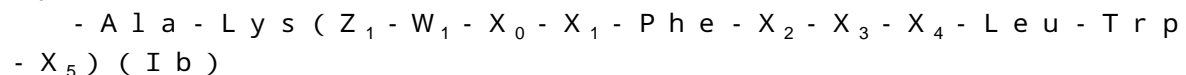
次の式 I a の u P A R ターゲティング造影剤。



式中、

X₀ は 1 ~ 5 個のアミノ酸を表し、
 X₁、X₂、X₃、X₄ 及び X₅ は独立に 1 つのアミノ酸を表し、
 P h e はフェニルアラニンを表し、
 L e u はロイシンを表し、
 T r p はトリプトファンを表し、

X₆ は 0 ~ 5 個のアミノ酸を表すか又は次の式 (I b) であり、



式中、記号は式 I a で定義した通りであり、

- A l a は アラニンを表し、
 L y s はリシンを表し、

式 I b の - A l a は式 I a の X₅ に結合しており、

W₁ 及び W₂ は同一又は異なる部分であって、W₁ 又は W₂ がバイオモディファイヤーである場合には 1 ~ 10 単位の単分散 P E G 構成単位を表すことを条件として、各々バイオモ

イファイヤーであるか或いは存在せず、 Z_1 又は Z_2 の少なくとも一方が存在していて画像診断法で直接又は間接的に検出できる造影性部分を表す。

【請求項2】

前記式(Ia)がペプチド配列 $Z_1 - W_1 - X_0 - C h a - P h e - S e r - A r g - T y r - L e u - T r p - S e r - X_6 - W_2 - Z_2$ である、請求項1記載の造影剤。

式中、*Cha*はシクロヘキシルアラニンを表し、*Ser*はセリンを表し、*Arg*はアルギニンを表し、*Tyr*はチロシンを表し、他のすべての記号は既に定義した通りである。

【請求項3】

Z_1 及び Z_2 の少なくとも一方が放射線、SPECT、PET、X線、MR、超音波又は光学イメージングで検出できる部分を含むインビボ診断用の造影性部分を表す、請求項1又は請求項2記載の造影剤。

10

【請求項4】

請求項1乃至請求項3のいずれか1項記載の造影剤を、薬学的に許容される1種以上の補助剤、賦形剤又は希釈剤と共に含んでなる医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)検出用の造影剤に関する。さらに具体的には、本発明は、造影性部分で標識された、uPARに結合するペプチドベクターを含む造影剤に関する。造影剤は、この受容体に関連した疾患を診断するためuPARが発現される部位の識別に使用できる。

20

【背景技術】

【0002】

ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)と細胞表面との相互作用はもっぱら糖脂質アンカー受容体(uPAR)によって媒介され、この受容体にはuPAが高い親和性で結合する。

【0003】

uPARはグリコシルホスファチジルイノシトール結合(GPIアンカー)を介して細胞膜の外層に局在化している。これは3つの相同ドメインからなる高度にシステインリッチグリコシル化されたタンパク質である。uPAは触媒活性をもつC末端セリンプロテアーゼドメインと、増殖因子様ドメイン(GFD、aa 1-49)及びクリングルドメイン(aa 50-135)を含むモジュラーN末端部とからなる。uPAとuPARとの相互作用は主にuPAのGFDの19~31残基によって媒介される。

30

【0004】

細胞外マトリックスのタンパク質分解は腫瘍の浸潤及び転移に役割を果たすことが認められており、uPARは診断用造影剤の潜在的ターゲットとなる。uPARは、現在まで研究されたほとんどのヒト癌腫、特に腫瘍細胞自体、血管新生を起こした腫瘍関連内皮細胞及びマクロファージにおいて、インビボで上方制御されるらしい。癌患者のuPAR過剰発現は、進行疾患に存在し、多数のヒト癌腫の予後診断の悪さと相関している。uPAR発現が細胞外マトリックスリモデリング及び癌のような細胞運動を伴う病理的状态においてのみ上方制御されるという事実から、診断の魅力的なマーカーとなる。

40

【0005】

国際公開第01/25410号では、診断又は治療用の標識PARターゲティングタンパク質及びペプチドについて説明している。ペプチド又はタンパク質は、uPAのuPAR結合部位の残基13~30を含む、38個以上のアミノ酸残基を含む。

【0006】

米国特許第6277818号では、診断標識と結合できるuPARターゲティング環状ペプチド化合物について説明している。ペプチドは、uPAのアミノ酸残基20~30に基づく。

【0007】

50

米国特許第6514710号は、さらに、uPARに対する親和性を有する環状ペプチドも対象とする。ペプチドは、検出可能な標識を担持することができる。ペプチドは、結合単位で結合した11個のアミノ酸を含む。

【0008】

Ploug et al. in Biochemistry 2001, 40, 12457-12168では、uPARターゲティングペプチドを説明しているが、本明細書に記載のアミノ酸配列を含めて、イメージングに関連しては説明していない。

【0009】

uPARの効率的なターゲティング化及びイメージングには、化学的に強固で安定している選択的高親和性ベクターが必要である。これらの厳しい条件は、本発明の造影剤によって満たされる。

【特許文献1】国際公開第01/25410号パンフレット

【特許文献2】米国特許第6277818号明細書

【特許文献3】米国特許第6514710号明細書

【非特許文献1】Ploug et al. in Biochemistry 2001, 40, 12457-12168

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

技術的必要性に鑑みて、本発明は、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体 (uPAR) の検出用の造影剤を実現する。さらに具体的には、本発明は、造影性部分で標識された、高親和性でuPARに結合するペプチド配列を含む造影剤に関する。Plougは、例えば、アミノ酸に対する標準的省略記号が使用され、Xは25個のアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸を表す、配列X-Phe-X-X-Tyr-Leu-Trp-Serを持つuPARターゲティングペプチドを開示している。

【課題を解決するための手段】

【0011】

第1の態様では、本発明は、次の式IaのuPARターゲティング造影剤を提供する。
 $Z_1 - W_1 - X_0 - X_1 - \text{Phe} - X_2 - X_3 - X_4 - \text{Leu} - \text{Trp} - X_5 - X_6 - W_2 - Z_2$ (Ia)

式中、

X₀ は1～5個のアミノ酸を表し、

X₁、X₂、X₃、X₄及びX₅は独立に1つのアミノ酸を表し、

Pheはフェニルアラニンを表し、

Leuはロイシンを表し、

Trpはトリプトファンを表し、

X₆は0～5個のアミノ酸を表すか又は次の式(Ib)であり、

-Ala-Lys(Z₁-W₁-X₀-X₁-Phe-X₂-X₃-X₄-Leu-Trp-X₅)(Ib)

式中、記号は式Iaで定義した通りであり、

-Alaは、アラニンを表し、

Lysはリシンを表し、

W₁及びW₂は、同一又は異なる部分であって、各々スペーサー、バイオモディファイヤーであるか或いは存在せず、Z₁又はZ₂の少なくとも一方が存在していて画像診断法で直接又は間接的に検出できる造影性部分を表す。

【0012】

アミノ酸X₀、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅及びX₆は、すべて、天然若しくは非天然アミノ酸であり、好ましくは、非天然であるのが好ましいX₁を除き天然である。すべてのアミノ酸は、D型であるか又はL型であり、以下に示すような優先傾向がある。

【0013】

式I aの薬剤の $X_0 - X_1 - \text{Phe} - X_2 - X_3 - X_4 - \text{Leu} - \text{Trp} - X_5 - X_6$ 成分は、uPARに対する親和性を有し、これ以降ペプチドベクターと称する。造影剤のペプチドベクターは、uPAの増殖因子ドメインと相同性を有するが、ヒトuPAに見られるアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含まないという点で従来技術のuPARターゲティングベクターと異なる。

【0014】

X_0 は、1～5個のD又はLアミノ酸を表す。好ましくは、 X_0 は、アラニン(Ala)、スレオニン(Thr)、グリシン(Gly)、アスパラギン酸(Asp)及びグルタミン酸(Glu)からなる群から選択されるアミノ酸を含む。アミノ酸は、好ましくは、D型であるのが好ましいスレオニンを除き、L型である。最も好ましくは、 X_0 は、L-Asp、D-Thr又はGly-Gly-Aspを表す。

10

【0015】

X_1 は、好ましくは、 α -シクロアルキルアラニンを表し、さらに好ましくは β -シクロペンチルアラニン、 γ -シクロヘキシルアラニン(Cha)又は δ -シクロヘプチルアラニンであり、最も好ましくは γ -シクロヘキシルアラニンである。

X_2 は、好ましくは、セリン(Ser)又はアラニン(Ala)、さらに好ましくはセリン、最も好ましくはD-セリンを表す。

【0016】

X_3 は、好ましくは、アルギニン(Arg)又はN-メチルアルギニン(mArg)、チロシン(Tyr)又はアラニンのようなアルギニン模倣体、さらに好ましくはD-アルギニンを表す。

20

【0017】

X_4 は、好ましくは、チロシン、アラニン、ロイシン又はシクロヘキシルアラニン、さらに好ましくはチロシン、最も好ましくはL-チロシンを表す。

【0018】

X_5 は、好ましくは、セリン、ヒスチジン(His)、アラニン、チロシン又はロイシン、さらに好ましくはL-セリン又はD-ヒスチジンを表す。

【0019】

X_6 は、好ましくは0～5個のD又はLアミノ酸を表す。好ましくは、 X_6 は、グリシン、アスパラギン酸、リシン、フェニルアラニン又は β -アラニン(β -Ala)からなる群から選択されるアミノ酸を含む。或いは、 X_6 は、式(I b)の基を含む。

30

β -Ala-Lys($Z_1 - W_1 - X_0 - X_1 - \text{Phe} - X_2 - X_3 - X_4 - \text{Leu} - \text{Trp} - X_5$)(I b)

式中、すべての記号は、既に定義した通りであり、また、式I bの β -Alaは、式I aの X_5 に結合されている。括弧内のペプチド鎖は、 X_5 を介してリシンの ϵ -アミノ基に結合される。この別の実施形態では、造影剤は、 β -アラニンで予め誘導体化された ϵ -アミノ基を有し、それにより、リシンの ϵ -炭素原子に関して擬対称的二量体を形成する、修飾リシン骨格上で合成された二量体を含む。この別の実施形態では、二量体は、好ましくは、ホモ二量体であり、そこでは2つの単量体中のペプチド配列は同じである。最も好ましくは、 X_6 は存在しない。

40

【0020】

驚いたことに、Plugがチロシン及びセリンをそれぞれ使用しているペプチドベクターの X_4 及び X_5 位置は、上で概要を述べたように、他のアミノ酸で置換できることがわかった。

【0021】

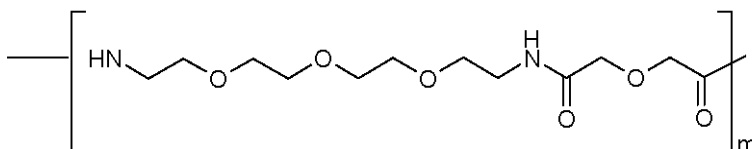
W_1 及び W_2 は、個々に、スペーサーとして作用する部分、バイオモディファイヤー部分又はその両方を表すか、或いは存在せず、好ましくは単分散ポリエチレングリコール(PEG)構成単位に基づき、前記構成単位の1～10単位を含む。 W_1 又は W_2 は、さらに、好ましくはグリシン、リシン、アスパラギン酸、セリン又はアミノヘキサン酸を含む

50

1 ~ 10 個のアミノ酸残基を表すことができる。さらに好ましくは、 W_1 又は W_2 は、PEG に基づく構造と組み合わせた 1 ~ 10 個のアミノ酸残基など、アミノ酸残基と PEG に基づく構造の両方を含む。好ましくは、 W_1 又は W_2 のいずれかは、バイオモディファイヤーを表し、好ましい一実施形態では、 W_1 又は W_2 の少なくとも一方が、単分散の PEG に基づく構造、式 (II) の 17 - アミノ - 5 - オキソ - 6 - アザ - 3, 9, 12, 15 - テトラオキサヘプタデカン酸からなる単位を表す。

【0022】

【化1】



10

(II)

式中、 m は、1 ~ 10 までの整数に等しく、C 末端側終端は、アミド又は酸部分である。バイオモディファイヤーとして、 W_1 又は W_2 は、化合物の薬物動態及び血中クリアランス速度を変更する機能を有する。バイオモディファイヤーを使用すると、組織、つまり、筋肉、肝臓などへの化合物の摂取が少なくなり、それにより、バックグラウンド干渉が少ないためより良好な診断画像が得られる。分泌は、主に、腎臓を通して行われ、これはバイオモディファイヤーの他の利点である。

20

【0023】

バイオモディファイヤー部分 W_1 又は W_2 は、好ましくは、グルタル酸及びノ又はコハク酸及びノ又は PEG に基づくユニット、例えば式 II の部分を含むものから誘導される。 W_1 又は W_2 は、さらに、造影性部分 Z_1 又は Z_2 をペプチドベクターに結合する、バイオモディファイヤーの性質を持つ、スペーサーとして作用することができる。他の代表的なスペーサー要素は、構造型多糖類、貯蔵型多糖類、ポリアミノ酸及びそのメチル及びエチルエステル及びポリペプチド、オリゴ糖及びオリゴヌクレオチドを含み、酵素切断部位を含む場合も、含まない場合もある。スペーサー部分としては、 W_1 又は W_2 の役割の 1 つは、比較的かさばる造影性部分をペプチドベクターの受容体結合ドメインから遠ざけることである。或いは、最も単純な形態では、 W_1 又は W_2 は、官能的な結合であるか又は造影性部分をペプチドベクターに容易に結合できる官能基を含み、そのような基は、 $-NR^a-$ 、 $-CO_2-$ 、 $-N(C=S)-$ 、 $-N(CO)-$ 、 $-S-$ 、 $-O-$ 、 $-O-NH_2$ 及び $-CHO$ を含み、 R^a 基は独立に H、 C_{1-10} アルキル、 C_{3-10} アルキルアリール、 C_{2-10} アルコキシアルキル、 C_{1-10} ヒドロキシアルキル、 C_{1-10} ハロアルキル及び $-$ ハロアセチルである。

30

【0024】

Z_1 が存在せず、 W_1 が存在する場合、 W_1 は、好ましくは、遊離アミノ基又は代謝阻害基を含むアミノ基を持つ N 末端を有する。代謝阻害基という用語で、アミノ末端のペプチド又はアミノ酸のインビボ代謝作用を阻害又は抑制する生体適合基を意味する。このような基は、当業者に周知であり、アセチル、Boc、(tert-ブチルオキシカルボニル)、Fmoc (フルオレニルメトキシカルボニル)、ベンジルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル及びアリルオキシカルボニルの群から適切に選択される。好ましい代謝阻害基は、アセチル及びベンジルオキシカルボニルである。 Z_2 及び W_2 が存在しない場合、ペプチドベクターの C 末端は、好ましくは、アミド又はカルボン酸基であり、好ましくはアミド基である。また、 Z_2 が存在せず、アミノ酸を含む W_2 が存在する場合、 W_2 は、好ましくは、アミド又はカルボン酸基で終端し、さらに好ましくはアミド基で終端する。

40

50

【0025】

本発明の造影剤は、好ましくは、直鎖ペプチドを含む、つまり、アミノ酸同士又はアミノ酸と環状構造を生成する薬剤の他の構成成分との間に架橋がないということである。したがって、好ましくは、硫化物、チオエーテル架橋又は環状ペプチド構造を形成する他の架橋がない。造影剤は、好ましくは、最大20個のアミノ酸を含む。

【0026】

好ましい一実施形態では、式I aの

$X_0 - X_1 - \text{Phe} - X_2 - X_3 - X_4 - \text{Leu} - \text{Trp} - X_5 - X_6$ で表されるペプチドベクターは、配列

$X_0 - \text{Cha} - \text{Phe} - \text{Ser} - \text{Arg} - \text{Tyr} - \text{Leu} - \text{Trp} - \text{Ser}$ を含み、造影剤は、式

$Z_1 - W_1 - X_0 - \text{Cha} - \text{Phe} - \text{Ser} - \text{Arg} - \text{Tyr} - \text{Leu} - \text{Trp} - \text{Ser} - X_6 - W_2 - Z_2$ を有し、式中、記号は既に定義した通りである。

【0027】

さらに好ましくは、ペプチドベクターは、配列

$\text{Asp} - \text{Cha} - \text{Phe} - \text{Ser} - \text{Arg} - \text{Tyr} - \text{Leu} - \text{Trp} - \text{Ser}$ 又は

$\text{Thr} - \text{Cha} - \text{Phe} - \text{Ser} - \text{Arg} - \text{Tyr} - \text{Leu} - \text{Trp} - \text{Ser}$ を含み、

式中、斜体は、Dアミノ酸を表し、 X_6 は、存在しない。

【0028】

本発明の造影剤の一例は、

$Z_1 - W_1 - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Asp} - \text{Cha} - \text{Phe} - \text{Ser} - \text{Arg} - \text{Tyr} - \text{Leu} - \text{Trp} - \text{Ser} - \text{NH}_2$ であり、

式中、 Z_1 及び W_1 は、既に定義した通りであり、 X_6 、 W_2 及び Z_2 は、存在せず、C末端は、アミド基である。

【0029】

Z_1 及び Z_2 の一方又は両方が存在し、造影性部分を表す。 Z は、これ以降、 Z_1 又は Z_2 のいずれかを表すために使用される。 Z は、任意の造影性部分とすることができる。 Z の性質は、診断で使用されるイメージングモダリティに依存する。インビボイメージングでの検出に適している様々な構成成分が、例えば、国際公開第98/47541号から知られ、その開示内容は援用によって本明細書の内容の一部をなす。

【0030】

Z は、放射線又はSPECT、PET、MR、X線、超音波又は光学イメージングのような、インビボ画像診断法において直接的に又は間接的に検出することができる部分である。 Z は、例えば、検出可能な放射線を放出するか又は放出させることができる部分（例えば、放射性崩壊、蛍光励起、スピン共鳴励起などによる）、局所電磁場に影響を及ぼす部分（例えば、常磁性、超常磁性、フェリ磁性又は強磁性種）、放射線エネルギーを吸収、放出又は散乱する部分（例えば、発色団、粒子（ベシクルを含む気体又は液体を含む）、重元素及びその化合物など）及び検出可能な物質を生成する部分（例えば、気体超微粒気泡発生体）を含む。

【0031】

造影性部分 Z は、実体 M 及び部分 Y_1 で表すことができ、 M は、金属イオン、常磁性金属、金属放射性核種、重金属及び重金属酸化物を表す。部分 Y_1 は、1つ以上の部分 M を担持することができなければならない。担持とは、化学結合、例えば、共有結合又はイオン結合 (electrovalent or ionic bonds) など部分 Y_1 と M との会合の何らかの形態又は吸収若しくは他の何らかの種類の会合によるものことで、好ましくは、 M は、キレート部分 Y_1 でキレート化される。

【0032】

イメージングモダリティ及び造影性部分 Z は、以下でさらに詳しく説明される。

【0033】

この態様の第1の実施形態では、 Z は、適宜部分 Y_1 で担持される放射性金属イオン又

10

20

30

40

50

はガンマ線放出放射性ハロゲンのような放射線及びSPECTイメージングモダリティで使用される1つ以上の部分Mを含む。好ましくは、Mは、放射線及び放射線が少ないか又は全くない、また1時間を超える半減期を有する、放出体である。好ましい基Mは、放射性核種 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 ^{99}Mo 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{201}Tl 及び ^{133}Xe である。最も好ましいのは、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ である。

【0034】

Mは、さらに、同位元素又は同位元素の対、 $^{47}\text{Sc}_{21}$ 、 $^{141}\text{Ce}_{58}$ 、 $^{188}\text{Re}_{75}$ 、 $^{177}\text{Lu}_{71}$ 、 $^{199}\text{Au}_{79}$ 、 $^{47}\text{Sc}_{21}$ 、 $^{131}\text{I}_{53}$ 、 $^{67}\text{Cu}_{29}$ 、 $^{131}\text{I}_{53}$ と $^{123}\text{I}_{53}$ 、 $^{188}\text{Re}_{75}$ と $^{99\text{m}}\text{Tc}_{43}$ 、 $^{90}\text{Y}_{39}$ と $^{87}\text{Y}_{39}$ 、 $^{47}\text{Sc}_{21}$ と $^{44}\text{Sc}_{21}$ 、 $^{90}\text{Y}_{39}$ と $^{123}\text{I}_{53}$ 、 $^{146}\text{Sm}_{62}$ と $^{153}\text{Sm}_{62}$ 及び $^{90}\text{Y}_{39}$ と $^{111}\text{In}_{49}$ で代表させることができる。

10

【0035】

Mが放射線又はSPECTイメージング用の金属放射性核種を表す場合、 Y_1 は、好ましくは、Mと安定したキレートを形成するのに好適なキレート剤を表す。このようなキレート剤は、当技術分野で周知であり、そのようなキレート剤の典型的な例は、国際公開第01/77145号の表Iで説明されている。

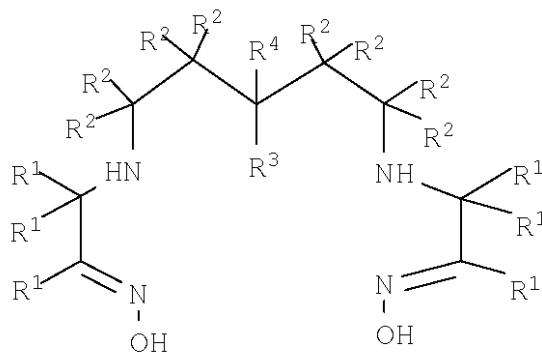
【0036】

特に好ましいのは、式(III)のキレート剤 Y_1 である。

【0037】

20

【化2】



30

(III)

式中、

それぞれの R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は独立にH又は C_{1-10} アルキルであり、 C_{3-10} アルキルアリール、 C_{2-10} アルコキシアリール、 C_{1-10} ヒドロキシアリール、 C_{1-10} アルキルアミン、 C_{1-10} フルオロアルキル又は2つ以上のR基は、これらの結合先の原子とともに、炭素環式、複素環式、飽和又は不飽和環を形成する。

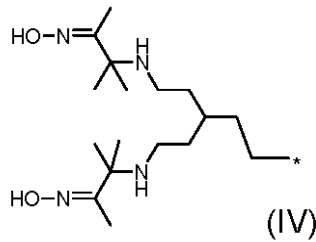
40

【0038】

より特に好ましいのは、式(III)のキレート剤 Y_1 であり、式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、水素又はメチル基であり、 R^4 は、アルキル又はアルキルアミン基である。さらに好ましくは、 Y_1 は、ここではcPN216と表される式(IV)のキレートであり、最も好ましくは、イメージング部分Mは、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ である。*は、可能な結合部位を示している。

【0039】

【化3】

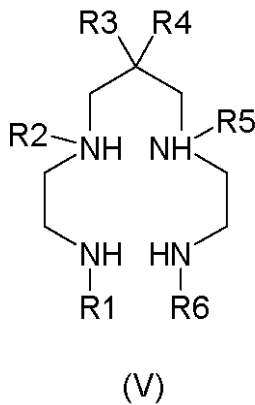


10

他の好ましいキレート剤は、式(V)で表されるものである。

【0040】

【化4】



20

式中、R₁ ~ R₆は独立にH、アルキル、アリール又はそれらの組み合わせを表し、R₁ ~ R₆基は、キレート剤を式(I a)のW₁又はW₂に結合できるように1つ以上の官能部分を含む。好適な官能部分は、例えば、アルキルアミン、アルキルスルフィド、アルコキシアルキルカルボン酸塩、アリールアミン、アリールスルフィド又はアルファ-ハロアセチルである。

30

【0041】

Zが、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I及び⁷⁷Brのようなガンマ線放出放射性ハロゲンであり、¹²⁵Iが好ましい場合、これは、当技術分野で周知の置換反応又は付加反応でW₁又はW₂に共有結合できるか又はW₁若しくはW₂が存在しない場合にX₀又はX₆に代わりに共有結合できるか又はX₆が存在しない場合に直接X₅に共有結合できる。

【0042】

第2の実施形態では、式(I a)の化合物は、PETイメージングモダリティで使用できる部分Zを含む。次いで、Zは、陽電子放射性をもつ放射線放出体、好ましくは陽電子放出放射性非金属を含む。好ましい基Zは、陽電子放出体¹¹C、¹⁸F、¹³N、¹⁵O、⁷⁷F、⁷⁵Br、⁷⁶Br及び¹²⁴Iのいずれかを含む。¹⁸Fが特に好ましい。好適な金属陽電子放出体は、⁶⁴Cu、⁴⁸V、⁵²Fe、⁵⁵Co、^{94m}Tc、⁶⁸Ga又は⁸²Rbであり、⁶⁸Gaが好ましく、キレート剤Y₁でキレート化することができる。

40

【0043】

¹⁸Fを含むもののような非金属放射性核種は、当技術分野で周知の置換又は付加反応で、存在する場合に部分W₁又はW₂に又は或いはX₀、X₅又はX₆に共有結合するこ

50

とができる。

【0044】

Zが ^{18}F 標識されたアルデヒド、チオール又はアミノオキシ基である場合、 W_1 又は W_2 は、好ましくは、アルファ-ハロアセチル部分、アルデヒド又はアミノオキシ基を含む官能基を持つ。チオール結合化学作用並びにアルデヒド及びアミノオキシ結合化学作用、 ^{18}F -シントン及びこの化学作用を使用して調製された標識ペプチドは、国際公開第03/080544号及び国際公開第04/080492号で説明されており、その開示内容は援用によって本明細書の内容の一部をなす。或いは、 ^{18}F は、例えば ^{18}F -フルオロベンズアルデヒドのような ^{18}F を含む他の部分によって導入できる。次いで、結合部位 W_1 、 W_2 、 X_0 、 X_5 又は X_6 は、好ましくはアミノオキシ基を含む。

10

【0045】

MがPETイメージング用の金属陽電子放出体を表す場合、 Y_1 は、Mと安定したキレート形成するのに好適なキレート剤を表す。このようなキレート剤は、当技術分野で周知であり、そのようなキレート剤の典型的な例は、国際公開第01/77145号の表I及び放射線及びSPECTイメージングを対象とする前の実施形態で説明されている。

【0046】

好ましい一実施形態では、 Y_1 は、DOTAキレート剤であり、Mは、マイクロ波化学作用を使用してキレートに容易に導入できる ^{68}Ga である。

【0047】

第3の実施形態では、Zは、MRイメージングモダリティで使用される1つ以上の部分Mを担持する部分 Y_1 を含む。Mは、ここでは、常磁性金属を表し、このような好適な金属イオンとしては、 $\text{Gd}(\text{III})$ 、 $\text{Mn}(\text{II})$ 、 $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Cr}(\text{III})$ 、 $\text{Fe}(\text{III})$ 、 $\text{Co}(\text{II})$ 、 $\text{Er}(\text{II})$ 、 $\text{Ni}(\text{II})$ 、 $\text{Eu}(\text{III})$ 又は $\text{Dy}(\text{III})$ がある。 $\text{Gd}(\text{III})$ 、 $\text{Dy}(\text{III})$ 、 $\text{Fe}(\text{III})$ 及び $\text{Mn}(\text{II})$ は、特に好ましい。 Y_1 は、キレート剤、特に例えば米国特許第4647447号及び国際公開第86/02841号に記載の非環式又は環式ポリアミノカルボン酸塩(例えば、DTPA、DTPA-BMA、DOTA及びDO3A)のようなキレート剤を表す。Mは、さらに、例えば、 Y_1 が金属酸化物のコーティングとして機能するように Y_1 に吸着又は Y_1 に結合した超常磁性、フェリ磁性又は強磁性種のような金属酸化物を表すこともできる。MR造影剤として使用される金属酸化物は、例えば米国特許第6230777号で説明されており、その開示内容は援用によって本明細書の内容の一部をなす。

20

30

【0048】

第4の実施形態では、Zは、X線イメージングモダリティで使用される造影性部分を表す。Zは、ここでは、タングステン、金及びビスマスのような、好ましくは酸化物の形態の、重金属を含む。Zは、さらに、X線造影剤として周知のヨウ化アリアル誘導体、例えば、Iopamiron(商標)及びOmnipaque(商標)で表すこともできる。これらの薬剤は、その酸又はアミン機能を介して、式(Ia)のペプチドベクターに、適宜 W_1 又は W_2 を介して、結合することができる。

【0049】

他の実施形態では、式(Ia)の化合物は、ガス充填マイクロベシクルの形態のZを含む。このような超音波造影剤は、例えば、当技術分野で、例えば国際公開第98/18500号に記載されているように官能化してペプチドと結合すれば、受容体のイメージングに使用することができる。

40

【0050】

本発明の第6の、好ましい、実施形態では、式(Ia)の部分Zは、光学イメージング法で直接的に又は間接的に検出することができる部分とすることができる。検出可能部分は、光散乱体(例えば、着色又は無着色粒子)、光吸収体又は光放出体とすることができる。さらに好ましくは、Zは、発色団又は蛍光化合物のような色素で表される。部分Zは、波長が紫外線から近赤外線までの電磁スペクトルの光と相互作用する任意の色素とすることができる。好ましいバージョンでは、Zは蛍光特性を有する。

50

【 0 0 5 1 】

好ましい有機色素部分は、広範な非局在化電子系を有する基、例えば、シアニン、メロシアニン、インドシアニン、フタロシアニン、ナフタロシアニン、トリフェニルメチン、ポルフィリン、ピリリウム色素、チアピリリウム色素、スクアリリウム色素、クロコニウム色素、アズレニウム色素、インドアニリン、ベンゾフェノキサジニウム色素、ベンゾチアフェノチアジニウム色素、アントラキノン、ナフトキノン、インダスレン、フタロイルアクリドン、トリスフェノキノン、アゾ色素、分子内及び分子間電荷移動色素及び色素錯体、トロポン、テトラジン、ビス(ジチオレン)錯体、ビス(ベンゼン-ジチオレート)錯体、ヨードアニリン色素及びビス(S, O-ジチオレン)錯体を含む。蛍光色素からはシアニン色素の群が好ましい。さらに一段と好ましいのは、カルバシアニン、オキサシアニン、チアシアニン及びアザシアニンからなる群である。Cy 5 及び Cy 7 色素の群は、最も好ましい蛍光色素であり、これらは、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS-エステル)によってペプチドベクターに結合することができる。緑色蛍光タンパク質(GFP)及び異なる吸収/放出特性を有するGFPの修飾形態のような蛍光タンパク質も有用である。ある種の希土類金属(例えば、ユウロピウム、サマリウム、テルビウム又はジスプロシウム)の錯体は、蛍光ナノ結晶(量子ドット)のように、いくつかの状況で使用される。

10

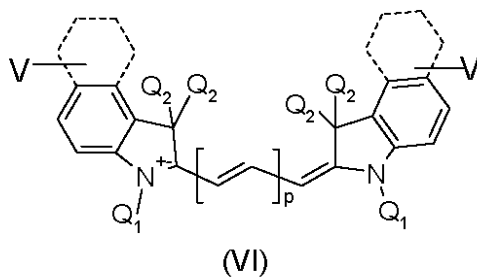
【 0 0 5 2 】

好ましい色素は、カルバシアニンの群から選択され、さらに一段と好ましいのは、インドール型のカルバシアニン色素である。この型の好ましい色素はの例として、次の式VIのものが挙げられる。

20

【 0 0 5 3 】

【 化 5 】



30

式中、 Q_1 基は、同一又は異なるものであり、置換又は非置換低アルキル基、例えば、適宜置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル基である。アルキル基は、例えば、複素環エステル基(例えば、NHS-エステル)のような、カルボキシ、スルホン酸、アミン、アンモニウム又はエステル基で置換される。 Q_2 基は、同一又は異なるものであり、例えば、カルボキシ又はスルホン酸基で適宜置換された、 $C_1 \sim C_6$ アルキルのような低アルキル基、好ましくはメチル基である。適宜選ばれる芳香族基は、点線で示され、縮合ベンゾ環及び縮合ナフト環を含む両方の構造を含む。いずれの環も、置換又は非置換である。環は、スルホン酸基、カルボン酸基、水酸基、アルキル(スルホアルキル)アミノ基、ビス(スルホアルキル)アミノ基、スルホアルコキシ基、スルホアルキルスルホニル基、アルキル又は置換アルキル又はスルホアルキルアミノ基から選択されるV基で置換することができる。pは、正整数1、2、3又は4である。好ましくは、シアニン色素は、それぞれ炭素原子数5及び7の炭素架橋を有するペンタメチン又はヘプタメチン色素である。

40

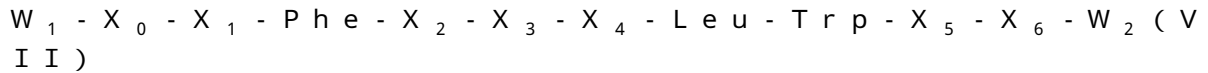
【 0 0 5 4 】

Q_1 、 Q_2 及びVは、適宜 W_1 及び/又は W_2 を介してペプチドベクターに色素を結合するための潜在的結合部位であり、 Q_1 及びV基は、好ましい結合部位である。好ましい一態様では、 Q_1 基は、ペプチドベクターに結合されるが、他の Q_1 基は、適宜置換低アルキル基である。

50

【 0 0 5 5 】

第2の態様では、本発明は、式(VII)



のuPARターゲティング化合物を提供し、

式中、記号は、式Iaについて定義されており、 W_1 及び W_2 の一方又はその両方は、存在し、説明されているとおり、バイオモディファイヤーを表す。式VIIの化合物は、第1の態様で説明されているように、造影性部分に結合することができるか又は治療のような他の用途もある。

【 0 0 5 6 】

本発明の化合物は、知られている化学合成法を使用して合成することができるが、特に有用なのは、自動ペプチドシンセサイザを採用したMerrifieldの固相法である(J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964))。典型的には、所望の配列は、固相ペプチド合成で構築される。本発明の実施例に使用されている合成戦略の標準的方法は、E. Atherton & R. C. Sheppard, "Solid phase peptide synthesis: a practical approach", 1989, IRL Press, Oxfordで説明されている。

【 0 0 5 7 】

例えば、C末端が酸、アミン又はアミドであるペプチドを産出する、様々な酸に不安定なリンカー基を有する樹脂が使用される。次いで、アミノ保護基が取り除かれ、好適な縮合試薬を使用して配列の第2のアミノ酸が結合される。官能基側鎖に半永久的アミノ保護基及び永久的保護基を持つアミノ酸が採用される。次いで、アミノ脱保護及び結合サイクルは、注目する配列が構築されるまで交互段階で繰り返される。

【 0 0 5 8 】

或いは、ペプチドは、包括的又は最小限の保護戦略を用いて、カルボキシ末端から1段階ずつ及び/又はセグメント縮合若しくはライゲーション法の適用により、当技術分野で知られている溶液ペプチド合成法で合成することができる。組み合わせ溶液固相セグメント縮合法も適用できる。

【 0 0 5 9 】

一般に、存在する反応側鎖基(例えば、アミノ基、水酸基、グアニジノ基及びカルボキシル基)は、上に示されているように合成全体において保護される。アミノ酸の保護基については様々な選択が知られている(例えば、Greene, T. W. & Wuts, P. G. M. (1991) Protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons, New Yorkを参照)。使用することができるアミノ保護基は、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)及びt-ブチルオキシカルボニル(Boc)を含む。使用することができる側鎖保護基は、t-ブチル(tBu)、トリチル(Trt)、Boc及び2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル(Pmc)を含む。他のこのような様々な基が当技術分野で知られていることは理解されるであろう。

【 0 0 6 0 】

最後に、永久的側鎖保護基は、取り除かれ、ペプチドは、樹脂から切断されるが、その際に、通常は、適当な酸性試薬、例えばトリフルオロ酢酸(TFA)で同時に処理する。

【 0 0 6 1 】

W_1 及び/又は W_2 は、知られている化学合成法を使用してペプチドベクターに結合させることができる。特に有用なのは、ペプチドベクターの調製の場合のように、アミド結合形成によって W_1 及び/又は W_2 をペプチドベクターに直接結合させることである。或いは、ペプチドN末端上の離脱基が W_1 及び/又は W_2 上の求核基で置換される求核試薬置換反応を使用することができる。このような離脱基は、アルファ位置でカルボニル基に結合された臭化物とすることができ、このような求核剤は、窒素とすることができる。

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

Zは、ペプチドベクターへの W_1 及び/又は W_2 の結合の場合と同じ方法を使用してペプチドに直接結合させることができる。Zが W_1 又は W_2 を介してペプチドに結合される場合、任意の化学合成法をZ及び W_1 又は W_2 の結合で使用することができる。特に有用なのは、例えばペプチドと造影性部分とのアミド結合をもたらすZの自動結合である。レポーター部分をペプチドに結合する方法は、当技術分野では周知であり、選択されるレポーター及びどのスペーサーが使用されるかに依存する。

【0063】

ペプチドベクター及び造影剤は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用して精製され、質量分析法及び分析HPLCで特徴付けられるようにできる。

【0064】

本発明の化合物がuPA/uPAR系の効率的な造影剤として機能する要件は、ペプチドベクターが受容体に対し高親和性を有していなければならない一方で、ベクターは必要なだけ長く受容体上に「留まる」べきであるというものである。そのため、造影剤/uPAR系は、遅い解離反応速度（いわゆる「オフレート」）を示すのが好ましく、これは、解離速度定数 K_{diss} として都合よく表すことができる。本発明の造影剤は、受容体結合反応速度を大幅に改善したことが判明している。これに基づき、特に好ましい本発明の造影剤は、好ましくは < 50 、さらに好ましくは < 20 、さらに一段と好ましくは < 10 、最も好ましくは < 1 のuPA（GFD）の増殖因子ドメインに関する解離速度定数（ K_{diss} ）を持つ。

【0065】

本発明の造影剤は、好ましくはuPAの細胞表面uPARへの結合を阻害することができる。本発明の造影剤は、好ましくはジイソプロピルフルオロホスフェート不活性uPAと等しい効力を有する。パラメータ IC_{50} は、uPAの50%が競合的に取り除かれる濃度を示す。本発明の好ましい造影剤は、 $IC_{50} < 50 \text{ nM}$ 、好ましくは $< 25 \text{ nM}$ 、さらに好ましくは $< 10 \text{ nM}$ 、さらに一段と好ましくは $< 3 \text{ nM}$ である。

【0066】

本発明による造影剤は、好ましくは受容体の上方制御に関連する疾患を診断するためにuPARが発現される部位の識別に使用される。受容体は、好ましくは、周辺組織よりも病変組織のほうに50%以上豊富に存在する。さらに好ましくは、受容体は、周辺組織よりも病変組織のほうに2倍以上豊富に存在する。さらに一段と好ましくは、受容体は、周辺組織よりも病変組織のほうに5倍以上豊富に存在する。

【0067】

他の態様では、本発明は、細胞の表面上、組織内、器官内又は病理的状态のせいでuPARの過剰発現が疑われる生体試料中のuPARの存在を検出する方法を提供する。この方法は、

- a) 細胞、組織、器官又は生体試料を本発明の造影剤に接触させる段階と
- b) 細胞、組織、器官又は試料に関連付けられている造影性部分の存在を検出する段階を含む。この方法では、接触と検出は両方とも、インビトロで実施することができるが、或いは、接触をインビボで、検出をインビトロで行うが、好ましくは接触と検出はインビボである。

【0068】

好ましい方法は、上述の造影剤をヒト又は動物の身体（例えば脈管系）に投与して、造影剤が分配された身体の少なくとも一部分の画像を生成させる診断法によってヒト又は動物の身体の画像を生成することを含む。

【0069】

さらに別の態様では、本発明は、上述の造影剤を含む造影剤組成物を予め投与しておいたヒト又は動物の身体の強調画像を生成させる方法であって、身体の少なくとも一部分の画像を生成させることを含む方法を提供する。

【0070】

本発明の新規造影剤は、選択される造影性部分に応じて、任意のイメージングモダリテ

10

20

30

40

50

ィにおいて造影剤として使用することができる。画像診断法での造影剤の使用は、したがって、本発明の一態様である。好ましい一態様は、様々な形態の癌及び転移、例えば、乳癌、皮膚癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌又は卵巣癌のイメージング及び診断で使用するための上述の造影剤である。或いは、造影剤は、アテローム性動脈硬化症の不安定プラークのような活性化されたマクロファージが存在する疾患の検出に使用することができる。

【0071】

本発明は、さらに、本発明の造影剤又はその塩の有効量、例えば、インビボイメージングにおける画像コントラストを高めるのに有効な量を、薬学的に許容される1種以上の補助剤、賦形剤又は希釈剤と共に含む医薬組成物を提供する。

10

【0072】

さらに別の態様では、本発明は、コントラスト増強剤をヒト又は動物の身体に投与して身体の少なくとも一部分の画像を生成させる診断法に用いられるコントラスト増強剤の製造における本発明の造影剤の使用を提供する。

【実施例】

【0073】

以下の非限定的な実施例によって本発明をさらに例示する、実施例では以下の略号を用いる。

B A E E G : ビス - (アミノエチル) エチレングリコール、

B o c : t - ブチルオキシカルボニル、

C y : シアニン、

D E G : ジエチレングリコール、

D M F : N , N - ジメチルホルムアミド、

F m o c : 9 - フルオレニルメトキシカルボニル、

H A T U : 2 - (7 - アザ - 1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、

H P L C : 高速液体クロマトグラフィー、

K r y t o f i x 2 2 2 : 4 , 7 , 1 3 , 1 6 , 2 1 , 2 4 - ヘキサオキサ - 1 , 1 0 - ジアザピシクロ - (8 , 8 , 8) ヘキサコサン、

L C : 液体クロマトグラフィー、

M S : 質量分析計、

N H S : N - ヒドロキシスクシンイミド、

N M M : N - メチルモルホリン、

P E G : ポリエチレングリコール、

P B S : リン酸緩衝液、

P m c : 2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホニル、

P y A O P : (7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシ) トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、

R i n k A m i d e M B H A 樹脂 : 4 - メチルベンズヒドリルアミンが結合したポリスチレンマトリックス、

R P - H P L C : 逆相 H P L C 、

R T : 室温、

S e p - P a k : C 1 8 樹脂を充填した分離カラム、

T F A : トリフルオロ酢酸、

T I S : トリイソプロピルシラン。

【0074】

実施例 1 :

C y 5 (ビス - S O ₃) - T h r - C h a - P h e - S e r - A r g - T y r - L e u - T r p - S e r - O H (2)

【0075】

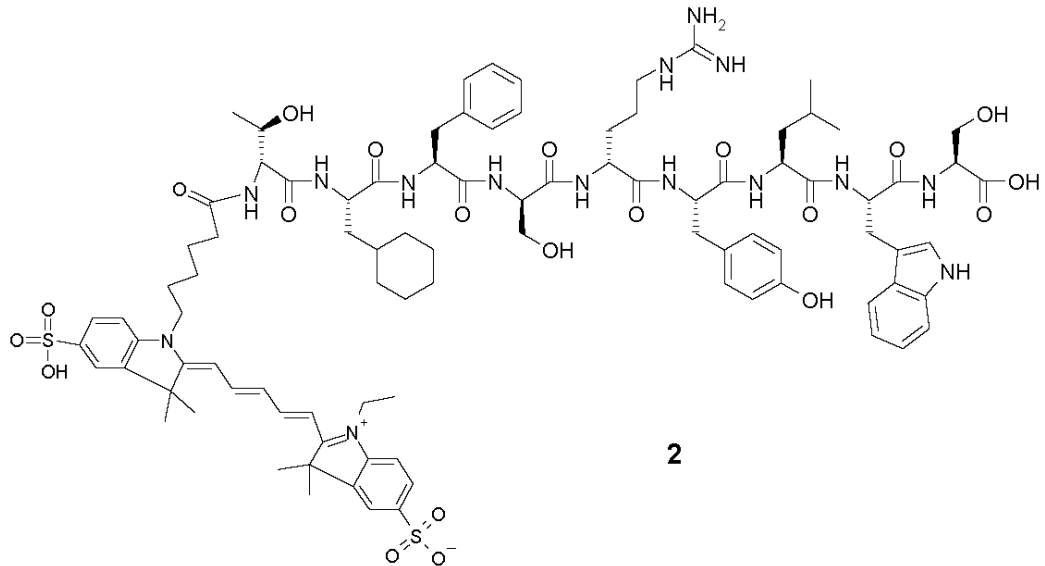
20

30

40

50

【化6】



10

H - Thr - Cha - Phe - Ser - Arg - Tyr - Leu - Trp - Ser - O
H (1) の合成

20

上記配列に対応するペプチドは、標準的な固相ペプチド化学反応で合成された。

【0076】

Cy5 (ビスSO₃)モノNHSエステルとペプチド(1)との結合

Cy5 (ビスSO₃)モノNHSエステル (1.18 mg、0.0017 mmol) を DMF 中に溶解させ、ペプチド(1) (2 mg、0.0015 mmol) を固形物として溶液に加え、次いで NMM (0.55 μl、0.005 mmol) を加えた。反応槽をホイルにくるみ、16 時間攪拌機上に置いた。エレクトロスプレーイオン化 MS で所望の生成物を確認した。生成物の [M+H]⁺ は、1850.85 m/z と予想され、実際には 1850.9 m/z であった。

【0077】

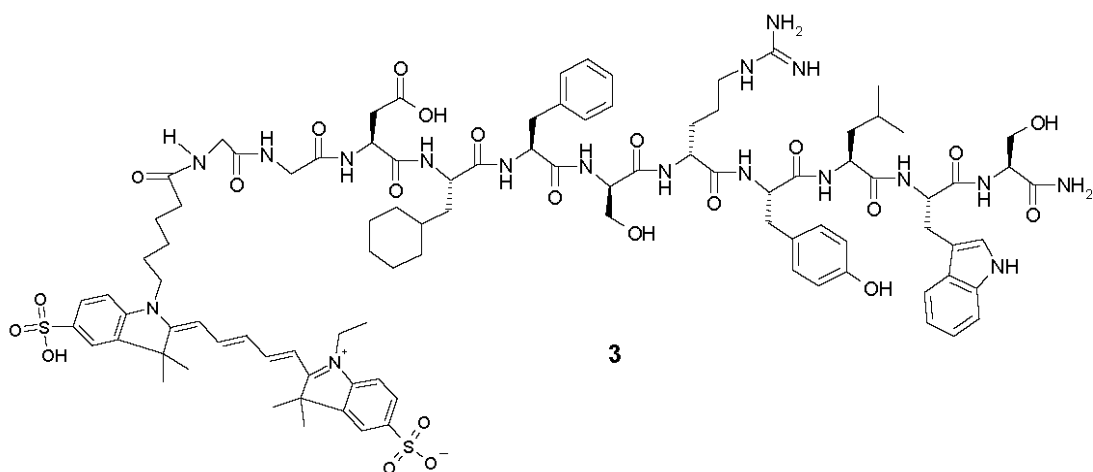
30

実施例 2 :

Cy5 (ビス-SO₃) - Gly - Gly - Asp - Cha - Phe - Ser - Arg
- Tyr - Leu - Trp - Ser - NH₂ (3)

【0078】

【化7】



40

50

Cy5 (ビス-SO₃) - Gly - Gly - Asp - Cha - Phe - Ser - Arg - Tyr - Leu - Trp - Ser - NH₂ (3) の合成

上記配列のアミノ酸は、標準的な固相ペプチド化学反応で構築した。次いで、Cy5 (ビスSO₃) モノNHSエステル (0.5 eq) をDMF中に溶解させ、H - Gly - Gly - Asp (OtBu) - Cha - Phe - Ser (tBu) - Arg (Pmc) - Tyr (tBu) - Leu - Trp (Boc) - Ser (tBu) - Rink Amide MBHA樹脂 (1 eq) に加え、その後、NMM (3 eq) を加えた。反応槽をホイルにくるみ、16時間攪拌機上に置いた。Cy5色素結合ペプチドを脱保護し、水2.5%及びTIS 2.5%を含有するTFAで1時間処理して樹脂から切断した。エレクトロスプレーイオン化MSで所望の生成物を確認した。生成物の[M+H]⁺は、1977.88 m/zと予想され、実際には1977.8 m/zであった。

10

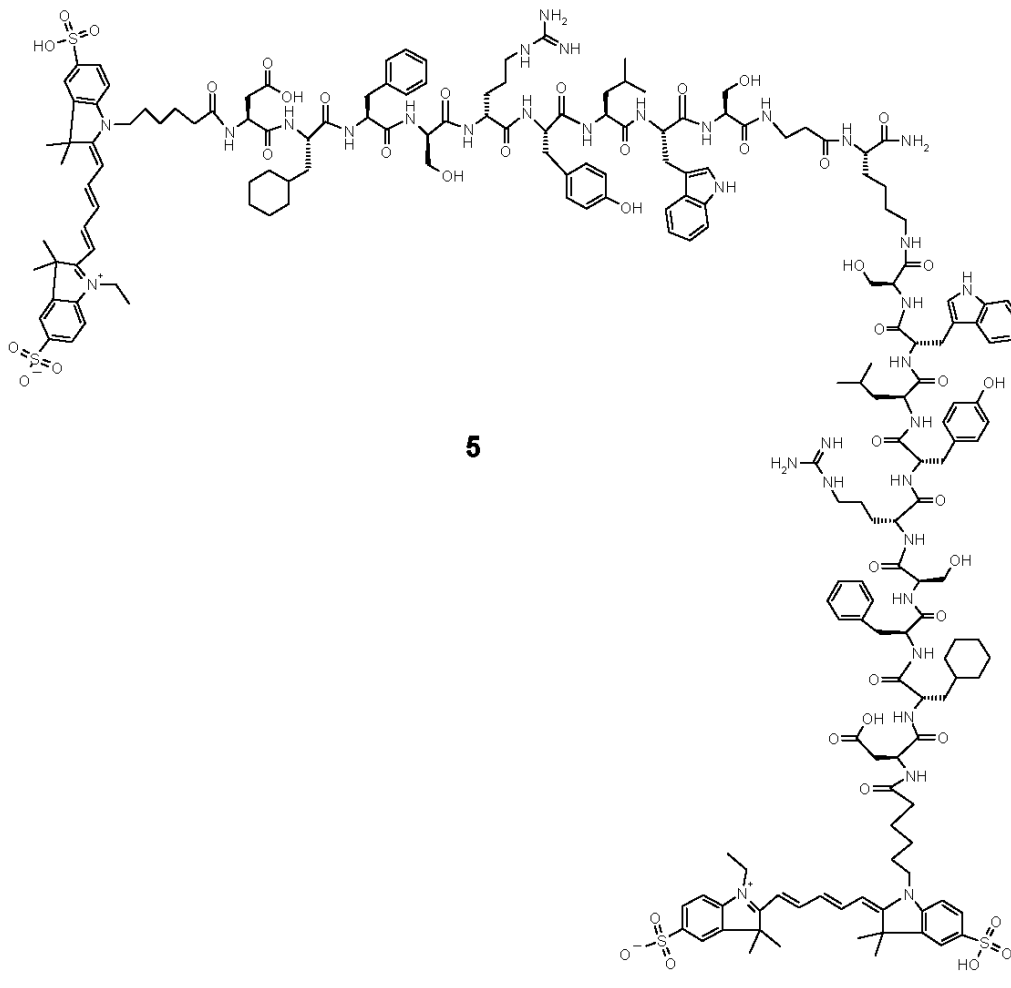
【0079】

実施例 3 :

Cy5 (ビス-SO₃) - Asp - Cha - Phe - Ser - Arg - Tyr - Leu - Trp - Ser - Ala - Lys (Cy5 (ビス-SO₃) - Asp - Cha - Phe - Ser - Arg - Tyr - Leu - Trp - Ser) - NH₂ (5)

【0080】

【化8】



20

30

40

H - Asp - Cha - Phe - Ser - Arg - Tyr - Leu - Trp - Ser - Ala - Lys (H - Asp - Cha - Phe - Ser - Arg - Tyr - Leu - Trp - Ser) - NH₂ (4) の合成

上記配列に対応するペプチドは、標準的な固相ペプチド化学反応で構築した。

50

【0081】

Cy5 (ビスSO₃)モノNHSエステルとペプチド(4)との結合

Cy5 (ビスSO₃)モノNHSエステル(2.2 eq)をDMF中に溶解させ、ペプチド(4)(1 eq)を固形物として溶液に加え、次いでNMM(3 eq)を加える。反応槽をホイルにくるみ、24時間攪拌機上に置き、所望のビス結合生成物を得る。生成物は、RP-HPLC及びエレクトロスプレイオン化MSで分析される。

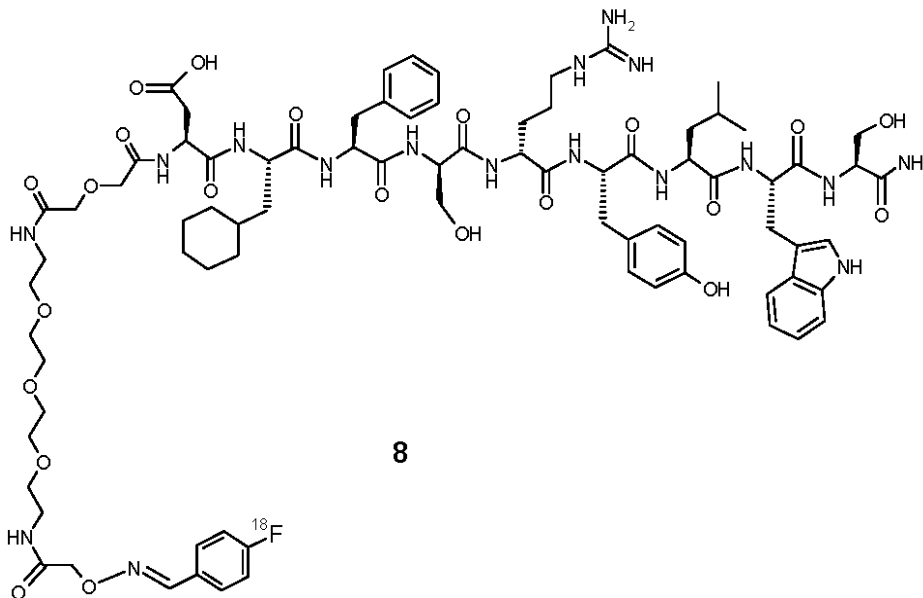
【0082】

実施例4:

N-(4-18F-フルオロベンジリデン)アミノオキシアセチル-PEG(4)-ジグリコイル-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-NH₂(8)

【0083】

【化9】



N-Boc-アミノオキシアセチル-PEG(4)-ジグリコイル-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-NH₂(7)の合成

Boc-アミノオキシアセチル-PEG(4)-ジグリコール酸は、Boc-アミノオキシ酢酸の活性エステルを使用し、対応するアミノ-PEG(4)-ジグリコール酸と反応させる方法で、当業者が調製しうる。得られた生成物Boc-アミノオキシアセチル-PEG(4)-ジグリコール酸(1.4 eq)とPyAOP(1.2 eq)をDMF中に溶解させる。NMM(2 eq、200 μL)を加えて、混合物を5分間攪拌する。ペプチド(6)(1 eq)とNMM(4 eq)のDMF溶液を加えて、反応混合物を30分間攪拌する。DMFを真空中で蒸発させ、分取用RP-HPLCを使用して生成物を精製する。凍結乾燥に先立って0.3%のアンモニア(NH₃)/水を使用して所望の生成物を含む分画をpH5に調整し、Boc保護基の脱落を防ぐ。生成物は、RP-HPLC及びエレクトロスプレイオン化MSで分析される。

【0084】

ペプチド(7)の18F標識

Kryptofix 222(0.5 ml ACN中に5 mg)及び炭酸カリウム(0.1 M溶液50 μl)の存在下で、20分間、窒素流の中で110 °Cに加熱して¹⁸F-フッ化物を共沸乾燥させる。このときに、3 × 0.5 mlのACNを加えて、取り除く。混合物を<40 °Cに冷やし、Haka et al in J. Labelled Compds. & Radiopharms 1989 27(7)823(0.4 mlジメチルスルホキシド中1 mg)で説明されている手順に従って合成されたトリメチルアンモニウ

10

20

30

40

50

ムベンズアルデヒドトリフレートを加えた。反応槽を封止し、15分間90 に加熱して、標識化を行わせる。次に4-18Fフルオロベンズアルデヒド原液を室温まで冷ます。その間、ペプチド(7)(6mg)をTFA 5%水溶液(200 μ l)で5分間、室温において処理し、Boc保護基を取り除く。溶媒を真空中で取り除く。Boc-脱保護ペプチドを、0.1Mの酢酸アンモニウム溶液(pH4、0.4ml)に再溶解させ、4-18F-フルオロベンズアルデヒド原液と反応槽内で組み合わせる。反応槽を封止し、15分間70 に加熱して、結合を行わせる。室温まで冷ました後、粗コンジュゲートを分取用HPLCで精製する。所望のコンジュゲートを含む分画を水10mlで希釈し、C18 Sep-Pak(エタノール10ml及び水20mlで順次洗浄して予め調製しておいたもの)にローディングする。Sep-Pakを水10mlですすぎ、次いで、エタノール2mlで溶出する。エタノールを真空中で取り除き、生成物(8)をPBS内で形成する。

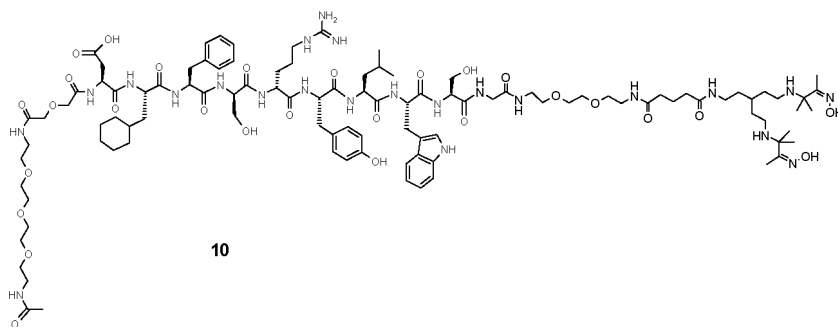
【0085】

実施例5:

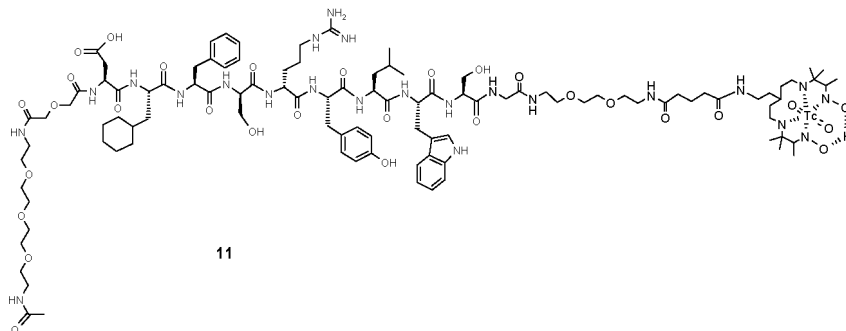
アセチル-PEG(4)-ジグリコイル-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-Gly-BAEEG-Glut-cPN216(10)

【0086】

【化10】



10



11

アセチル-PEG(4)-ジグリコイル-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-Gly-BAEEG-NH₂(9)の合成

上記配列に対応するペプチジル樹脂は、標準的な固相ペプチド化学反応で合成される。アセチル-PEG(4)-ジグリコイル酸(5eq)とPyAOP(4.5eq)をDMF中に溶解させる。NMM(10eq、200 μ L)を加えて、混合物を5分間攪拌する。次いで、混合物を、DMF中で事前膨張させたペプチド樹脂に加え、反応を一晩続ける。次いで、ペプチドを脱保護し、水2.5%及びTIS 2.5%を含有するTFAを1時間使用して樹脂から切断する。生成物は、RP-HPLC及びエレクトロスプレーイオン化MSで分析される。

【0087】

cPN216のペプチド(9)への結合

ペプチド(9)(1eq)をDMF中に溶解させ、cPN216-グルタリール-テトラフルオロチオフェニルエステル(2eq)を加え、続いて、NMM(3eq)を加える

10

20

30

40

50

。一晚攪拌した後、減圧下で溶媒を取り除いて反応混合物にさらに処理し、生成物(10)を分取用RP-HPLCで精製する。生成物は、RP-HPLC及びエレクトロスプレイオン化MSで分析される。

【0088】

ペプチド(10)の ^{99m}Tc -標識

ペプチド(10)(0.1mg)を塩水又はメタノール(0.1ml)で戻し、賦形剤の凍結乾燥ツールボックスキット内に移す。ツールボックスキットは、アミンに基づくキレート用の一般的放射性標識条件を与えるように設計されており、塩化第一スズ乾燥物(16 μg)、メチレンジホスホン酸(25 μg)、炭酸水素ナトリウム(4500 μg)、炭酸ナトリウム(600 μg)、パラミノ安息香酸ナトリウム(200 μg)を備え、キットpH=9.2であった。塩水(3ml)中のテクネチウム酸ナトリウム(^{99m}Tc)注射液(2.1GBq)を加え、キットを数回反転させて内容物を溶解し、15~20分間、室温で、インキュベートするのに任せた。HPLC及びITLCで直ちに試料を分析し、 ^{99m}Tc 標識ペプチド(11)を、キット再構成後、1~3時間被験者に投与する。

10

【0089】

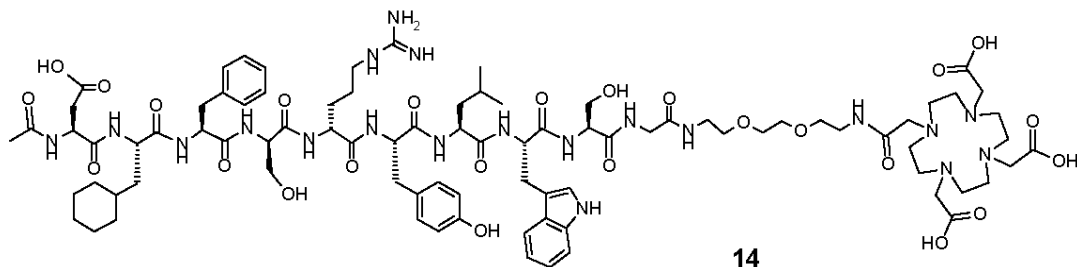
実施例6:

アセチル-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-Gly-BAEG-Glut-DOTA(15)のガドリニウム(III)錯体

【0090】

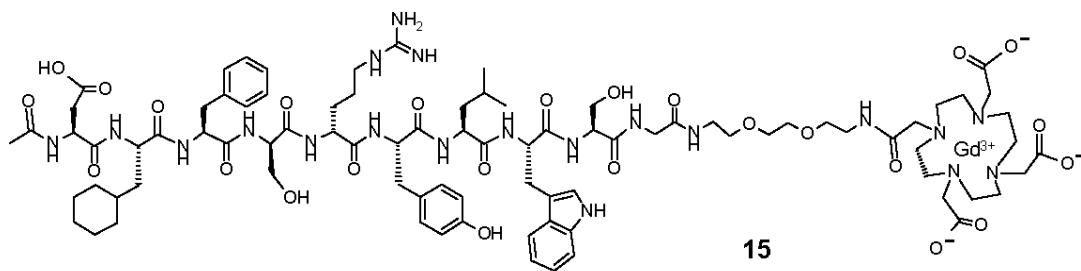
【化11】

20



14

30



15

アセチル-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-Gly-DEG-NH₂(12)の合成

上記配列に対応するペプチドを、標準的な固相ペプチド化学反応で合成する。

【0091】

トリ-tBu-DOTA(13)の合成

トリ-tBu-DO3A(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N''-三酢酸、トリ-tert-ブチルエステル、10mmol)及びプロモ酢酸(10mmol)をMeOH(50ml)中に溶解させた。水(50ml)中に溶解している K_2CO_3 (30mmol)を加え(MeOH/水混合物中でpH11)、反応物を24時間攪拌し、次いでさらに24時間、40 $^\circ\text{C}$ で加熱した。粗生成物を、RP-HPLCで精製した(Phenomenex Luna 5ミクロン、C18、250 \times 21.2mm、10ml/分で40分間にわたり勾配5~50%B)。エレクトロスプレイオン化MS

40

50

で所望の生成物を確認した。生成物の $[M + Na]^+$ は、 $595.4 m/z$ と予想されたが、 $[M + Na]^+$ は $595.3 m/z$ であり、 80° で ^1H-NMR を使用した。

【0092】

DOTA 結合ペプチド (14) の合成

トリ - tBu - DOTA (13) (1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - N, N', N'', N''' - 四酢酸、トリ - tert - ブチルエステル 1 eq) を NMM (3 eq) の存在下で 5 分間 DMF 中 HATU (1 eq) で活性化する。混合物を、ペプチド (12) に加え、反応を一晩続ける。溶媒を真空中で取り除き、生成物を水 5% を含む TFA 中で tBu 脱保護する。生成物は、RP - HPLC で精製され、RP - HPLC 及びエレクトロスプレイイオン化 MS で分析される。

10

【0093】

Gd (III) との錯形成

DOTA 結合ペプチド (14) (1 eq) を、RT で pH 6.5 の水溶液中で、GdCl₃ (1 eq) と反応させる。塩基性 pH の溶液の遠心分離で非錯化 Gd (III) を取り除く。生成物 (15) を凍結乾燥で単離する。

【配列表】

0005122962000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 B	8/00	(2006.01)	G 0 1 T	1/161	E
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	A 6 1 K	49/02	B
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	A 6 1 B	8/00	
			C 0 7 K	7/06	
			C 0 7 K	14/00	

(72)発明者 カスバートソン, アラン
ノルウェイ、エン - 0 4 0 1 ・ オスロ、ピーオーボックス・4 2 2 0 ・ ニイダレン、ニコヴェイ
エン・1 - 2、アマーシャム・ヘルス・アーエス

(72)発明者 アルボ, ベンテ・イー
ノルウェイ、エン - 0 4 0 1 ・ オスロ、ピーオーボックス・4 2 2 0 ・ ニイダレン、ニコヴェイ
エン・1 - 2、アマーシャム・ヘルス・アーエス

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特表2 0 0 3 - 5 2 8 0 3 5 (J P , A)
特表2 0 0 1 - 5 2 4 9 7 1 (J P , A)
国際公開第0 0 / 0 0 1 8 0 2 (W O , A 1)
Michael Ploug, et al., Peptide-Derived Antagonists of the Urokinase Receptor. Affinity
Maturation by Combinatorial Chemistry, Identification of Functional Epitopes, and Inh
ibitory Effect on Cancer Cell Intravasation, Biochemistry, 2 0 0 1 年, Vol. 40, No. 40
, 12157-12168

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A61K 49/00
A61B 5/055
A61K 49/04
A61K 51/00
G01T 1/161
A61B 8/00
C07K 7/06
C07K 14/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)