

(論文要約)

前立腺がんの核医学画像診断を目的とした  
放射性分子イメージングプローブの開発に関する研究

原田 直弥

## 第一章

### 前立腺がん核医学分子イメージングを目的とした

### PSMA 結合性単光子放出断層撮影用プローブとしての放射性ヨウ素標識

### 非対称ウレア型化合物に関する基礎的検討

#### 背景

前立腺がんにおいて発現が上昇する抗原として、prostate-specific membrane antigen (PSMA) が報告されている。PSMA は悪性度の高い前立腺がんにおいて高発現する一方で前立腺肥大症など他の前立腺疾患では発現が上昇しないこと、膜抗原であり血液中に存在しないことから、前立腺がんの診断および治療標的分子として盛んに研究が行われている。

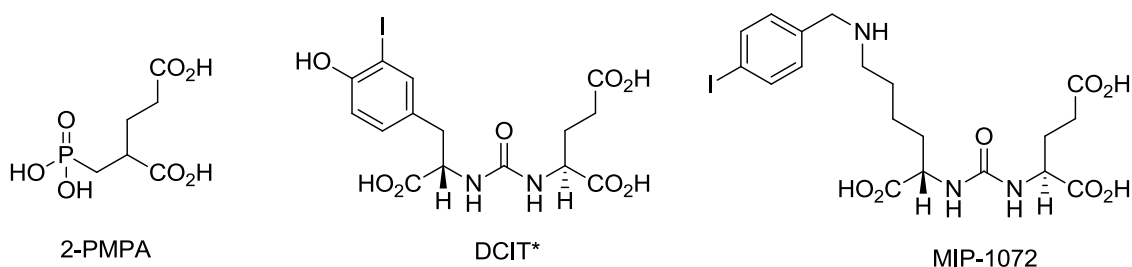
ところで、生体内で特定の分子の発現量を非侵襲的に評価できる診断方法として核医学診断法がある。核医学診断法は標的分子と特異的に結合する化合物を $\gamma$ 線放出核種で標識した放射性分子イメージングプローブを使用する画像診断法であり、前立腺がんにおいてはこれまでに、In-111 標識抗 PSMA モノクローナル抗体 ( $^{111}\text{In}$ ]7E11, ProstaScint®) が PSMA を標的とした単光子断層撮像法 (SPECT) 用のプローブとしてアメリカ食品医薬品局 (FDA) の承認を得ている。しかしながら、 $^{111}\text{In}$ ]7E11 は PSMA の細胞質ドメインを標的とした抗体であるため、生きた腫瘍を認識できない欠点がある。また近年、PSMA の膜外ドメインを認識する抗体 $^{111}\text{In}$ ]J591 が報告されているが、高分子である抗体は骨転移した固形腫瘍に対して浸潤性が低いため、骨転移を生じやすい前立腺がんのプローブとしては低分子プローブがより好ましいと考えられる。そこで、本研究では PSMA を標的とした低分子放射性プローブの開発を計画した。

核医学イメージングに有効な放射性プローブの開発には、プローブが標的分子への高い親和性を有し、なおかつ血中で安定に存在して標的組織まで送達されて非特異的組織からは速やかに消失する効率的な薬物動態の実現が不可欠である。そのため、放射性プローブの開発を効率的に進めるには、標的分子に対する高い親和性が期待できる候補化合物を設計して、それらの安定性や動態特性

からプローブを選別する必要がある。

PSMA を標的とした SPECT 用低分子放射性分子イメージングプローブとして、(S)-2-[3-[(S)-1-carboxy-5-[4-<sup>123</sup>I]iodobenzylamino]pentyl]ureido]pentanedioic acid ([<sup>123</sup>I]MIP-1072) が報告されている。この化合物は、PSMA がグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ-II (GCP-II) 活性を有する膜抗原であり、2-(phosphonomethyl)pentanedioic acid (2-PMPA) が GCP-II の阻害薬となること、そしてその誘導体としてグルタミン酸を含む非対称ウレア型化合物に GCP-II 阻害活性があることを基に設計されたものである (Fig. 1-1)。 [<sup>123</sup>I]MIP-1072 は、PSMA に対する高い親和性と前立腺がんにおける PSMA 特異的な集積性が認められているが、その構造の特徴からヨードベンジル基以外の構造修飾が困難であり、誘導化によってさらに有効なプローブを探索することは難しいと考えた。そこで本研究では、合成が簡便で、さらに構造修飾による誘導化が可能なプローブの設計ストラテジーを確立することを計画した。

プローブの設計において、室温で簡便に進行するマレイミドとチオールの共役求核付加反応に着目した。本反応を利用した放射性標識試薬として *N*-(*m*-iodophenyl)maleimide (IPM) や *m*-iodohippuryl *N*<sup>ε</sup>-maleoyl-L-Lys (HML) が報告されており、これらのマレイミド型標識試薬を用いて PSMA プローブを設計し、それらを誘導化することができれば、有効な PSMA プローブの探索につながると考えた。そこで、非対称性ウレア化合物 (S)-2-(3-((R)-1-carboxy-2-mercaptoethyl)ureido)pentanedioic acid (Cys-C(O)-Glu) を [<sup>123/125</sup>I]IPM および [<sup>123/125</sup>I]HML で標識して新規プローブ [<sup>123/125</sup>I]IPMCE と [<sup>123/125</sup>I]IGLCE を設計・合成し、インビトロにおける基礎的評価として安定性評価と PSMA に対する親和性評価を行った。



**Fig. 1-1** Structures of GCP-II inhibitors, 2-PMPA and asymmetric urea compounds.

\* DCIT: *N*-[*N*-[(S)-1,3-dicarboxypropyl]carbamoyl]-*S*-3-iodo-L-Tyr

## 実験方法

### 試薬・機器

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は LC-20AD (株式会社島津製作所) を使用し、検出器として紫外吸収スペクトル検出器 SPD-20A (株式会社島津製作所) とサーベイメーター NDW-351D (日立アロカメディカル株式会社) を使用した。移動相は 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を含むメタノールと超純水を使用した。超純水は MQ Integral15 (日本ミリポア株式会社) を用いて調製した。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は LCMS-2010 EV (株式会社島津製作所)、高速原子衝突質量分析 (FAB-MS) は JMS-SX 102A QQ (日本電子株式会社) にて測定した。核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは LNM-AL500 (日本電子株式会社) にて測定し、内部標準としてテトラメチルシランを含んだ重溶媒 (Euriso-Top) を使用した。Na[<sup>125</sup>I]I は株式会社エムピーバイオより購入したものを使用した。2-PMPA は Tocris Bioscience 社より購入したものを使用した。その他の試薬はナカライテスク株式会社、和光純薬株式会社、東京化成工業株式会社、渡辺化学工業株式会社、キシダ化学株式会社から購入した。

### 合成

IPM(23)と HML(12)およびその放射性ヨウ素標識体、化合物 **1-3**, **6a**, **7a**, **10**, **18**, Cys-C(O)-Glu は既報の合成方法に従い合成した。Cys-C(O)-Glu は一部、神戸天然物化学株式会社に合成を依頼したものをを使用した。

### **(2S)-2-(3-((1R)-1-carboxy-2-((1-(3-iodophenyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)ethyl)ureido)pentanedioic acid (IPMCE)**

Cys-C(O)-Glu (6.2 mg, 0.021 mmol) の水溶液 (0.5 mL) と IPM (6.4 mg, 0.021 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.6 mL) を混合し、2N NaOH 水溶液で中和した。混合溶液を室温で 1 時間反応させ、HPLC で精製した。カラムは COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II 10 × 250 mm (ナカライテスク株式会社) を使用し、メタノール濃度 30% よりクロマトを開始して、勾配はクロマト開始後 10 分から 20 分にかけて 30% から 60% とし、流速 2 mL/min で行った。凍結乾燥を行い、IPMCE (2.4 mg、収率 18%) を

得た。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ; 7.78 (d, *J* = 8.59 Hz, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.25 (dt, *J* = 1.15, 8.02 Hz, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.33 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.07-3.59 (m, 4H), 2.67 (m, 1H), 2.42 (m, 2H), 2.16 (m, 1H), and 1.90 (m, 1H). ESI-MS; 594 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>SI, 594.0046 [M+H]<sup>+</sup>; found 594.0043.

***(2S)-2-(3-((1R)-1-carboxy-2-((1-((R)-5-carboxy-5-(2-(3-iodobenzamido)acetamido)pentyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)ethyl)ureido)pentanedioic acid (IGLCE)***

Cys-C(O)-Glu (6.8 mg, 0.023 mmol) の水溶液 (0.2 mL) と HML (11.9 mg, 0.023 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.15 mL) を混合し、2N NaOH 水溶液で中和した。混合溶液を室温で 2 時間反応させ、HPLC で精製した。HPLC の条件は **IPMCE** と同一とした。凍結乾燥を行い、**IGLCE** (3.8 mg, 収率 21%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ; 8.10 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.02 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.45 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 7.45, 8.02 Hz, 1H), 4.39 (t, *J* = 5.73 Hz, 1H), 4.28 (broad s, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.99-4.07 (m, 2H), 3.93 (m, 1H), 2.95-3.35 (m, 3H) 3.39 (t, *J* = 6.87 Hz, 2H), 2.56 (m, 1H), 2.38 (dt, *J* = 2.86, 7.45 Hz, 2H), 2.05 (m, 1H), 1.83 (m, 2H), 1.65 (m, 1H), 1.48 (m, 2H), and 1.21 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H). ESI-MS; 808 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>SI, 808.0994 [M+H]<sup>+</sup>; found 808.0997.

***4-Methoxybenzyl 2-(3-iodobenzamido)acetate (4a)***

3-ヨード安息香酸の DMF 溶液 (2.8 g, 11 mmol/25 mL) に H-Gly-OPMB·HCl (2.6 g, 11 mmol)、water soluble carbodiimide hydrochloride (WSCl·HCl) (2.1 g, 11 mmol)、トリエチルアミン (1.1 mL) を加えて、室温で 6 時間攪拌した。酢酸エチルで抽出して有機相を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、シリカゲルカラムクロマト (ヘキサン/酢酸エチル=2/1) にて **4a** を精製した (3.0 g, 収率 64%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 9.06 (m, 1H), 8.20 (m, 1H), 7.92 (m, 1H), 7.87 (m, 1H) 7.31 (m, 2H), 6.93 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.03 (d, *J* = 5.73 Hz, 2H), and 3.75 (s, 3H). EI-MS *m/z*: 425 [M]<sup>+</sup>, 231 (4.7), 121 (100).

***4-Methoxybenzyl 2-benzamidoacetate (4b)***

安息香酸の DMF 溶液 (1.6 g, 13 mmol/15 mL) に H-Gly-OPMB·HCl (3.0 g, 13 mmol)、WSCl·HCl (2.5 g, 13 mmol)、トリエチルアミン (1.8 mL) を加えて、室温で一晩攪拌した。酢酸エチルで抽出して有機相を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、シリカゲルカラムクロマト (ヘキサン/酢酸エチル=2/1) にて **4b** を精製した (2.2 g, 収率 57%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7.81 (d, *J* = 7.45 Hz, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.45 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H), 7.32 (m, 2H), 6.90 (m, 2H), 6.63 (s, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.26 (d, *J* = 4.58 Hz, 2H), and 3.82 (s, 3H). EI-MS *m/z*: 299 [M]<sup>+</sup>, 162 (2.0), 137 (4.7), 134 (15.9), 121 (100), 77 (34.7).

### **2-(3-Iodobenzamido)acetic acid (5a)**

化合物 **4a** のジクロロメタン溶液 (3.0 g, 7.1 mmol/24 mL) に TFA (5.3 mL) を加えて、室温で 15 分攪拌した。減圧下溶媒を除去しクロロホルム中で再結晶を行い、**5a** を得た (2.1 g, 収率 97%)。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.95 (m, 1H), 8.22 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.92 (m, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.30 (t, *J* = 8.02 Hz, 1H), and 3.92 (d, *J* = 5.73 Hz, 2H). ESI-MS *m/z*: 304 [M]<sup>+</sup>.

### **2-Benzamidoacetic acid (5b)**

化合物 **4b** のジクロロメタン溶液 (2.2 g, 7.3 mmol/25 mL) に TFA (5.5 mL) を加えて、室温で 15 分攪拌した。減圧下溶媒を除去しクロロホルム中で再結晶を行い、**5b** を得た (1.2 g, 収率 94%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.81 (t, *J* = 5.73 Hz, 1H), 7.87 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H), and 3.93 (d, *J* = 5.73 Hz, 2H). EI-MS *m/z*: 179 [M]<sup>+</sup>, 134 (20), 105 (100), 77 (69).

### **2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-benzamidoacetate (6b)**

化合物 **5b** の DMF 溶液 (1.2 g, 6.7 mmol/10 mL) に *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (0.78 g, 6.8 mmol) と *N,N*-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) (0.86 g, 6.8 mmol) を加えて室温で 14 時間攪拌した。酢酸エチルで抽出して有機相を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、生じた沈殿をクロロホルムで洗浄して **6b** を得た (1.8 g, 収率 95%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.16 (t, *J* = 5.73 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.45 Hz, 2H), 7.58 (t, *J* = 6.87 Hz, 1H), 7.50 (t, *J* = 7.73

Hz, 2H), 4.43 (d,  $J = 5.73$  Hz, 2H), 2.82 (s, 4H).

***(S)*-2-(2-Benzamidoacetamido)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoic acid (7a)**

化合物 **6b** のアセトニトリル溶液 (0.1 g, 0.36 mmol/3 mL) に **3a** (95 mg, 0.36 mmol) と *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (0.13 mL) を加えて室温で 3 時間攪拌した。酢酸エチルで抽出して有機相を飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、PTLC (クロロホルム/メタノール=9/1) で簡易精製し、更に HPLC で精製して **7a** を得た (保持時間 44 分, 6.3 mg, 収率 4.5%)。カラムは YMC-Pack ODS-AQ 20 × 250 mm (株式会社 YMC) を使用し、メタノール濃度 30% よりクロマトを開始して、勾配はクロマト開始後 60 分の時点でメタノール濃度 80% となるように設定し、流速 5 mL/min で行った。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.87 (m, 2H), 7.55 (t,  $J = 7.45$  Hz, 1H), 7.47 (t,  $J = 7.73$  Hz, 2H), 6.77 (s, 2H), 4.42 (m, 1H), 4.10 (m, 2H), 3.49 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 1.90 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.60 (m, 2H), and 1.38 (m, 2H). ESI-MS  $m/z$ : 388 [M + H]<sup>+</sup>.

***N*-[2-[[5-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)pentyl]amino]-2-oxoethyl]-3-iodobenzamide (7b)**

化合物 **6a** のアセトニトリル溶液 (96 mg, 0.24 mmol/3 mL) に **3b** (52mg, 0.24 mmol) と DIPEA (41 μL) を加えて室温で 1 時間攪拌した。酢酸エチルで抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、シリカゲルカラムクロマト (クロロホルム/メタノール=10/1) にて **7b** を精製した (51 mg, 収率 46%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.18 (t,  $J = 1.72$  Hz, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.78 (dd,  $J = 1.15$ , 7.45 Hz, 1H), 7.19 (t,  $J = 7.73$  Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.69 (s, 2H), 6.13 (s, 1H), 4.10 (d,  $J = 5.16$  Hz, 2H), 3.52 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 3.43 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), and 1.32 (m, 2H). ESI-MS  $m/z$ : 470 [M + H]<sup>+</sup>.

***(2S)*-2-[3-[(1R)-2-[[1-[(S)-5-(2-Benzamidoacetamido)-5-carboxypentyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]thio]-1-carboxyethyl]ureido]pentanedioic acid (8)**

Cys-C(O)-Glu の水溶液 (4.8 mg, 0.016 mmol/0.4 mL) に **7a** のアセトニトリル溶液 (6.3 mg, 0.013 mmol/0.6 mL) を加えた。2N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7–8 に調製して室温で 1 時間攪拌した。HPLC で精製し、**8a** を得た (保持時間 37 分, 5.9 mg, 収率 54%)。HPLC の条件は **7a** と

同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.88 (m, 2H), 7.55 (t, *J* = 7.73 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H), 4.61 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.11 (m, 2H), 4.01 (m, 1H), 3.50 (m, 2H), 3.19 (m, 2H), 2.48 (m, 1H), 2.40 (m, 2H), 2.14 (m, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.73 (m, 1H), 1.61 (m, 2H), and 1.39 (m, 2H). FAB-MS *m/z*: 682 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>S, 682.2037 [M + H]<sup>+</sup>; found 682.2030.

***(2S)-2-[3-[(1R)-1-Carboxy-2-[[1-[5-[2-(3-iodobenzamido)acetamido]pentyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]thio]ethyl]ureido]pentanedioic acid (9)***

Cys-C(O)-Glu の水溶液 (14 mg, 0.048 mmol/0.3 mL) に **7b** のアセトニトリル溶液 (23 mg, 0.059 mmol/0.3 mL) を加えた。2N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7–8 に調製して室温で 1 時間攪拌した。HPLC で精製し、**9** を得た (保持時間 42 分、16 mg, 収率 43%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.26 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.25 (t, *J* = 8.02 Hz, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 3.98 (m, 3H), 3.48 (m, 3H), 3.20 (m, 4H), 2.50 (m, 1H), 2.42 (m, 2H), 2.14 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.56 (m, 4H), and 1.32 (m, 2H). FAB-MS *m/z*: 764 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>SI, 764.1093 [M + H]<sup>+</sup>; found 764.1099.

***3-(3-Iodobenzamido)propanoic acid (11a)***

化合物 **10** のアセトニトリル溶液 (600 mg, 1.74 mmol/6 mL) に 3-アミノプロパン酸 (170 mg, 1.91 mmol) と DIPEA (0.33 mL) を加えて、室温で 11 時間攪拌した。反応後、溶液に 1N 塩酸を加えて酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、生じた沈殿をクロロホルムで洗浄して **11a** を得た (214 mg, 収率 39%)。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.16 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 6.87 Hz, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.23 (t, *J* = 8.02 Hz, 1H), 3.61 (t, *J* = 6.87 Hz, 2H), and 2.62 (t, *J* = 6.87 Hz, 2H). EI-MS *m/z*: 319 [M]<sup>+</sup>, 231 (36), 203 (12), 76 (36).

***4-(3-Iodobenzamido)butanoic acid (11b)***

化合物 **10** のアセトニトリル溶液 (500 mg, 1.45 mmol/4 mL) に 4-アミノブタン酸 (164 mg, 1.59 mmol) と DIPEA (0.27 mL) を加えて、室温で一晩攪拌した。反応後、溶液に 1N 塩酸を加えて酢酸エチル



と飽和塩化アンモニウム水溶液で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、生じた沈殿をクロロホルムで洗浄して **11b** を得た (316 mg, 収率 65%)。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.17 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.88 (dt, *J* = 1.72, 8.02 Hz, 1H), 7.80 (dt, *J* = 1.72, 8.02 Hz, 1H), 7.23 (t, *J* = 8.02 Hz, 1H), 3.41 (t, *J* = 7.16 Hz, 2H), 2.38 (t, *J* = 7.16 Hz, 2H), and 1.90 (tt, *J* = 7.16, 7.16 Hz, 2H). EI-MS *m/z*: 333 [M]<sup>+</sup>, 274 (19), 231 (36), 102 (50), 76 (51).

### **5-(3-Iodobenzamido)pentanoic acid (**11c**)**

化合物 **10** のアセトニトリル溶液 (500 mg, 1.45 mmol/6 mL) に 4-アミノペンタン酸 (188 mg, 1.60 mmol) と DIPEA (0.27 mL) を加えて、室温で 7 時間攪拌した。反応後、溶液に 1N 塩酸を加えて酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、生じた沈殿をクロロホルムで洗浄して **11c** を得た (252 mg, 収率 50%)。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.17 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.87 (dt, *J* = 1.72, 8.02 Hz, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.23 (t, *J* = 8.02 Hz, 1H), 3.38 (t, *J* = 6.87 Hz, 2H), 2.35 (t, *J* = 6.87 Hz, 2H), and 1.66 (m, 4H). EI-MS *m/z*: 347 [M]<sup>+</sup>, 288 (27), 260 (12), 231 (100), 203 (23), 116 (18), 104 (14), 76 (36).

### **2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(3-iodobenzamido)propanoate (**12a**)**

化合物 **11a** の DMF 溶液 (200 mg, 0.63 mmol/4 mL) に NHS (72 mg, 0.63 mmol) と WSCI·HCl (120 mg, 0.63 mmol) を加えて室温で 7 時間攪拌した。酢酸エチルと飽和重曹水で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、シリカゲルカラムクロマト (クロロホルム/メタノール=10/1) で **12a** を精製した (93 mg, 収率 36%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 8.18 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.02 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.02 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 8.02 Hz, 1H), 6.95 (broad s, 1H), 3.88 (m, 2H), 2.94 (t, *J* = 6.30 Hz, 2H), and 2.88 (s, 4H). EI-MS *m/z*: 416 [M]<sup>+</sup>, 301 (41), 260 (13), 231 (100), 203 (24), 104 (12), 76 (40).

### **2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(3-iodobenzamido)butanoate (**12b**)**

化合物 **11b** の DMF 溶液 (250 mg, 0.75 mmol/5 mL) に NHS (86 mg, 0.75 mmol) と WSCI·HCl (144

mg, 0.75 mmol) を加えて室温で一晩攪拌した。酢酸エチルと飽和重曹水で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、シリカゲルカラムクロマト (クロロホルム/メタノール=10/1) で **12b** を精製した (195 mg, 収率 60%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 8.10 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 7.45 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 7.45 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 7.45 Hz, 1H), 6.51 (broad s, 1H), 3.56 (m, 2H), 2.86 (s, 4H), 2.73 (t, *J* = 6.87 Hz, 2H), and 2.12 (tt, *J* = 6.87 Hz, 6.87 Hz, 2H). EI-MS *m/z*: 430 [M]<sup>+</sup>, 315 (36), 274 (8), 231 (100), 203 (25), 104 (13), 84 (26), 76 (42).

### **2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 5-(3-iodobenzamido)pentanoate (**12c**)**

化合物 **11c** の DMF 溶液 (133 mg, 0.38 mmol/4 mL) に NHS (44 mg, 0.38 mmol) と WSCI·HCl (73 mg, 0.38 mmol) を加えて室温で一晩攪拌した。酢酸エチルと飽和重曹水で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、シリカゲルカラムクロマト (クロロホルム/メタノール=20/1) で **12c** を精製した (83 mg, 収率 49%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 8.10 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.02 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.02 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 8.02 Hz, 1H), 6.36 (broad s, 1H), 3.50 (m, 2H), 2.86 (s, 4H), 2.69 (t, *J* = 6.87 Hz, 2H), 1.88 (m, 2H), and 1.76 (m, 2H). EI-MS *m/z*: 444 [M]<sup>+</sup>, 330 (7), 288 (18), 231 (100), 203 (20), 104 (14), 98 (16), 76 (32).

### **(S)-6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2-(3-(3-iodobenzamido)propanamido)hexanoic acid (**13a**)**

化合物 **12a** のアセトニトリル溶液 (110 mg, 0.26 mmol/3 mL) に **3a** (69 mg, 0.26 mmol) と DIPEA (91 μL) を加えて、室温で 4 時間攪拌した。酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、PTLC (クロロホルム/メタノール=10/1) で簡易精製し、更に HPLC で精製して **13a** を得た (保持時間 60 分、19 mg, 収率 14%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) δ: 8.17 (t, *J* = 1.72 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.02 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.02 Hz, 1H), 7.22 (t, *J* = 8.02 Hz, 1H), 6.78 (s, 2H), 4.36 (m, 1H), 3.64 (m, 2H), 3.44 (t, *J* = 7.16 Hz, 2H), 2.56 (m, 2H), 1.66–1.89 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), and 1.35 (m, 2H). ESI-MS *m/z*: 528 [M + H]<sup>+</sup>.

***(S)*-6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2-(4-(3-iodobenzamido)butanamido)hexanoic acid (13b)**

化合物 **12b** のアセトニトリル溶液 (58 mg, 0.13 mmol/2 mL) に **3a** (35 mg, 0.13 mmol) と DIPEA (46  $\mu$ L) を加えて、室温で 4 時間攪拌した。酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、PTLC (クロロホルム/メタノール = 10/1) で簡易精製し、更に HPLC で精製して **13b** を得た (保持時間 62 分、12 mg, 収率 17%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$ : 8.18 (t,  $J = 1.72$  Hz, 1H), 7.88 (d,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.82 (d,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.24 (t,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 6.78 (s, 2H), 4.34 (m, 1H), 3.49 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 3.41 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 2.33 (t,  $J = 7.45$  Hz, 2H), 1.92 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 1.67–1.91 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), and 1.36 (m, 2H). ESI-MS  $m/z$ : 542 [M + H]<sup>+</sup>.

***(S)*-6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2-(5-(3-iodobenzamido)pentanamido)hexanoic acid (13c)**

化合物 **12c** のアセトニトリル溶液 (100 mg, 0.23 mmol/2 mL) に **3a** (60 mg, 0.23 mmol) と DIPEA (77  $\mu$ L) を加えて、室温で 2 時間攪拌した。酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、PTLC (クロロホルム/メタノール = 10/1) で簡易精製し、更に HPLC で精製して **13c** を得た (保持時間 63 分、30 mg, 収率 24%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$ : 8.17 (t,  $J = 1.72$  Hz, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.23 (t,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 6.78 (s, 2H), 4.35 (m, 1H), 3.48 (t,  $J = 7.16$  Hz, 2H), 3.39 (m, 2H), 2.30 (t,  $J = 7.16$  Hz, 2H), 1.55–1.86 (m, 8H), and 1.36 (m, 2H). ESI-MS  $m/z$ : 556 [M + H]<sup>+</sup>.

***(2S)*-2-(3-(1R)-1-Carboxy-2-((1-(S)-5-carboxy-5-(3-(3-iodobenzamido)propanamido)pentyl-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)ethyl)ureido)pentanedioic acid (14a)**

Cys-C(O)-Glu の水溶液 (6.1 mg, 0.021 mmol/0.6 mL) に **13a** のアセトニトリル溶液 (11 mg, 0.021 mmol/0.4 mL) を加えた。2N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7–8 に調製して室温で 2 時間攪拌した。HPLC で精製し、**14a** を得た (保持時間 52 分、10 mg, 収率 58%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$ : 8.18 (t,  $J = 1.72$  Hz, 1H), 7.87 (t,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.23 (t,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 4.53 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.65 (m, 2H), 3.39 (m,

2H), 3.22 (m, 2H), 2.58 (m, 2H), 2.41 (m, 2H), 2.15 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.56 (m, 2H), and 1.35 (m, 2H). FAB-MS  $m/z$ : 822 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>SI, 822.1159 [M + H]<sup>+</sup>; found 822.1153.

***(2S)-2-(3-(1R)-1-Carboxy-2-((1-(S)-5-carboxy-5-(4-(3-iodobenzamido)butanamido)pentyl-2,5-dioxopyrroli din-3-yl)thio)ethyl)ureido)pentanedioic acid (14b)***

Cys-C(O)-Glu の水溶液 (6.0 mg, 0.020 mmol/0.9 mL) に **13b** のアセトニトリル溶液 (11 mg, 0.020 mmol/0.9 mL) を加えた。2N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7–8 に調製して室温で 1 時間攪拌した。HPLC で精製し、**14b** を得た (保持時間 53 分、12 mg, 収率 73%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) δ: 8.19 (t,  $J = 1.72$  Hz, 1H), 7.88 (t,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.82 (d,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.24 (t,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.33 (m, 2H), 4.00 (m, 1H), 3.49 (m, 2H), 3.42 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 3.35 (s, 1H), 3.19 (m, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.34 (t,  $J = 7.45$  Hz, 2H), 2.15 (m, 1H), 1.90 (m, 4H), 1.69 (m, 2H), and 1.49 (m, 2H). FAB-MS  $m/z$ : 836 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>SI, 836.1310 [M + H]<sup>+</sup>; found 836.1315.

***(2S)-2-(3-(1R)-1-Carboxy-2-((1-(S)-5-carboxy-5-(5-(3-iodobenzamido)pentanamido)pentyl-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)ethyl)ureido)pentanedioic acid (14c)***

Cys-C(O)-Glu の水溶液 (9.0 mg, 0.031 mmol/0.6 mL) に **13c** のアセトニトリル溶液 (17 mg, 0.031 mmol/1 mL) を加えた。2N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7–8 に調製して室温で 2 時間攪拌した。HPLC で精製し、**14c** を得た (保持時間 55 分、6 mg, 収率 23%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) δ: 8.17 (t,  $J = 1.72$  Hz, 1H), 7.87 (t,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 7.23 (t,  $J = 8.02$  Hz, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.33 (m, 2H), 4.00 (m, 1H), 3.47 (m, 2H), 3.39 (m, 2H), 3.19 (m, 2H), 2.47 (m, 1H), 2.40 (m, 2H), 2.31 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 2.16 (m, 1H), 1.88 (m, 2H), 1.64–1.73 (m, 5H), 1.60 (m, 2H), and 1.38 (m, 2H). FAB-MS  $m/z$ : 850 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>SI, 850.1461 [M + H]<sup>+</sup>; found 850.1466.

***(S)*-6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2-(3-iodobenzamido)hexanoic acid (15)**

化合物 **10** のアセトニトリル溶液 (80 mg, 0.23 mmol/1.8 mL) に **3a** (61 mg, 0.23 mmol) と DIPEA (80  $\mu$ L) を加えて室温で 5 時間攪拌した。酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、PTLC (クロロホルム/メタノール=9/1) で **15** を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 8.17 (s, 1H), 7.82 (t,  $J$  = 8.02 Hz, 1H), 7.79 (d,  $J$  = 8.02 Hz, 1H), 7.16 (t,  $J$  = 7.73 Hz, 1H), 6.96 (broad s, 1H), 6.69 (s, 2H), 4.64 (s, 1H), 3.53 (t,  $J$  = 6.87 Hz, 2H), 1.87–2.03 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), and 1.33–1.42 (m, 2H). ESI-MS  $m/z$ : 457 [M + H]<sup>+</sup>.

***(2S)*-2-(3-((1R)-1-Carboxy-2-((1-((S)-5-carboxy-5-(3-iodobenzamido)pentyl-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)ethyl)ureido)pentanedioic acid (16)**

Cys-C(O)-Glu の水溶液 (10 mg, 0.034 mmol/0.7 mL) に **15** のアセトニトリル溶液 (15.5 mg, 0.034 mmol/0.2 mL) を加えた。2N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7–8 に調製して室温で 2 時間攪拌した。HPLC で精製し、**16** を得た (保持時間 53 分、11 mg, 収率 43%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta$ : 8.06 (s, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 8.02 Hz, 1H), 7.69 (d,  $J$  = 8.02 Hz, 1H), 7.21 (t,  $J$  = 8.02 Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.88 (m, 1H), 3.45 (t,  $J$  = 6.30 Hz, 2H), 2.76–3.18 (m, 3H), 2.40 (m, 2H), 2.07 (m, 1H), 1.73–1.96 (m, 3H), 1.56 (m, 2H), and 1.29 (m, 2H). FAB-MS  $m/z$ : 751 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>SI, 751.0786 [M + H]<sup>+</sup>; found 751.0782.

***(2S)*-2-[3-[(1R)-1-Carboxy-2-[(1-methyl-2,5-dioxopyrrolidine-3-yl)thio]ethyl]ureido]pentanedioic acid (17)**

Cys-C(O)-Glu の水溶液 (10.6 mg, 0.036 mmol/0.5 mL) に *N*-メチルマレイミドのアセトニトリル溶液 (4.0 mg, 0.036 mmol/0.2 mL) を加えた。2N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7–8 に調製して室温で 2 時間攪拌した。HPLC で精製し、**17** を得た (保持時間 21 分、6.5 mg, 収率 45%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta$ : 4.44 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.18 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.85 (s, 3H), 2.59 (m, 1H), 2.41 (t,  $J$  = 7.45 Hz, 2H), 2.08 (m, 1H), and 1.87 (m, 1H). FAB-MS  $m/z$ : 406 [M + H]<sup>+</sup>. HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S, 406.0924 [M + H]<sup>+</sup>; found 406.0920.

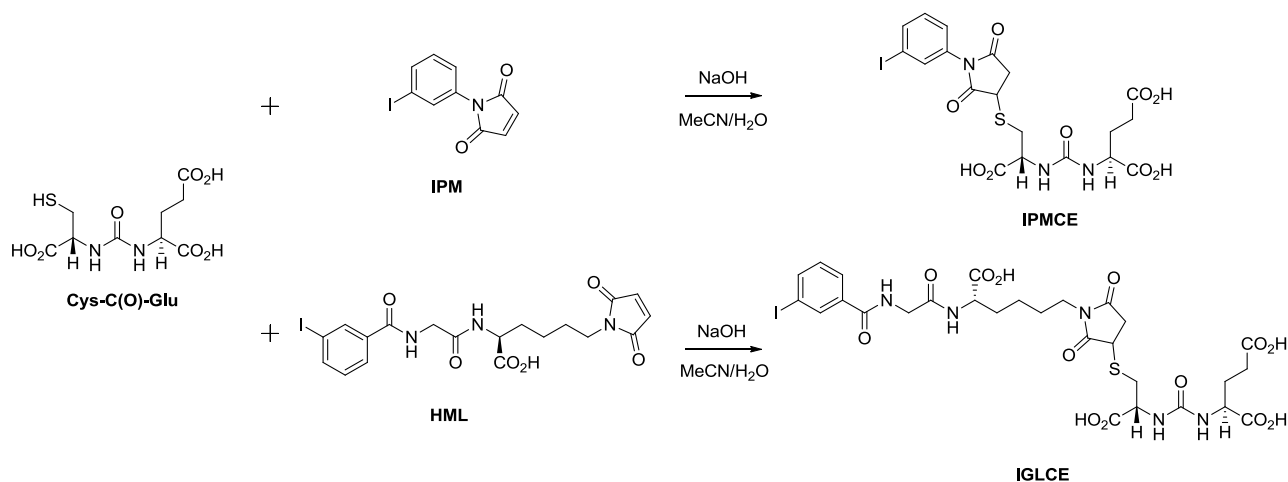
***(S)*-2-((1-Carboxy-5-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)pentyl)amino-N-methyl-2-oxoethaniminium chloride (**19**)**

化合物 **18** のアセトニトリル溶液 (290 mg, 1.01 mmol/4 mL) に **3a** (277mg, 1.05 mmol) と DIPEA (0.23 mL) を加えて室温で 2 時間攪拌した。酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液で抽出後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下溶媒を除去し、PTLC (クロロホルム/メタノール = 9/1) で簡易精製した。ESI-MS  $m/z$ : 420  $[M + Na]^+$ .

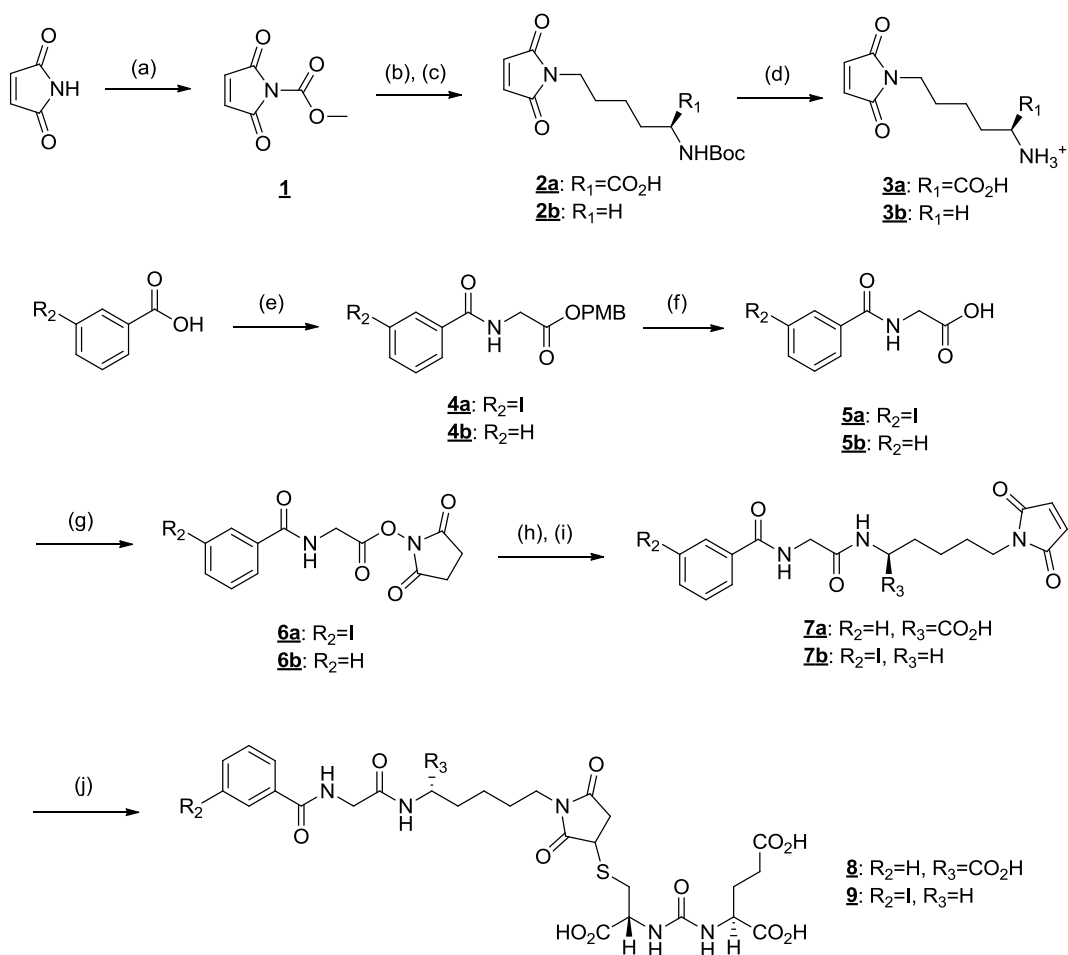
簡易精製した生成物に 4N 塩酸/酢酸エチルを加えて *tert*-ブトキシカルボニル基を除去し、生じた沈殿を酢酸エチルで洗浄、HPLC で精製して **19** を得た (保持時間 22 分, 15 mg, 2 段階総収率 4%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta$ : 6.80 (s, 2H), 4.43 (m, 1H), 3.83 (broad s, 2H), 3.50 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 2.73 (s, 3H), 1.92 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.61 (m, 2H), and 1.38 (m, 2H). ESI-MS  $m/z$ : 298  $[M + H]^+$ .

***(2S)*-2-(3-((1R)-1-Carboxy-2-((1-((S)-5-carboxy-5-(2-(methylamino)acetamido)pentyl-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)ethyl)ureido)pentanedioic acid (**20**)**

Cys-C(O)-Glu の水溶液 (6.8 mg, 0.023 mmol/0.3 mL) に **19** (6.9 mg, 0.021 mmol) を加えた。2N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 7–8 に調製して室温で 2 時間攪拌した。HPLC で精製し、**20** を得た (保持時間 20 分, 7 mg, 収率 52%)。HPLC の条件は **7a** と同一とした。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta$ : 4.43 (m, 1H), 4.28 (dd,  $J = 5.16$  Hz, 8.59 Hz, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.82 (s, 2H), 3.40 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2H), 2.95–3.26 (m, 4H), 2.66 (s, 3H), 2.59 (m, 1H), 2.40 (t,  $J = 7.14$  Hz, 2H), 2.08 (m, 1H), 1.83 (m, 2H), 1.65 (m, 1H), 1.48 (m, 2H), and 1.23 (m, 2H). FAB-MS  $m/z$ : 592  $[M + H]^+$ . HRFAB<sup>+</sup>-MS: calcd for C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>S, 592.1929  $[M + H]^+$ ; found 592.1925.

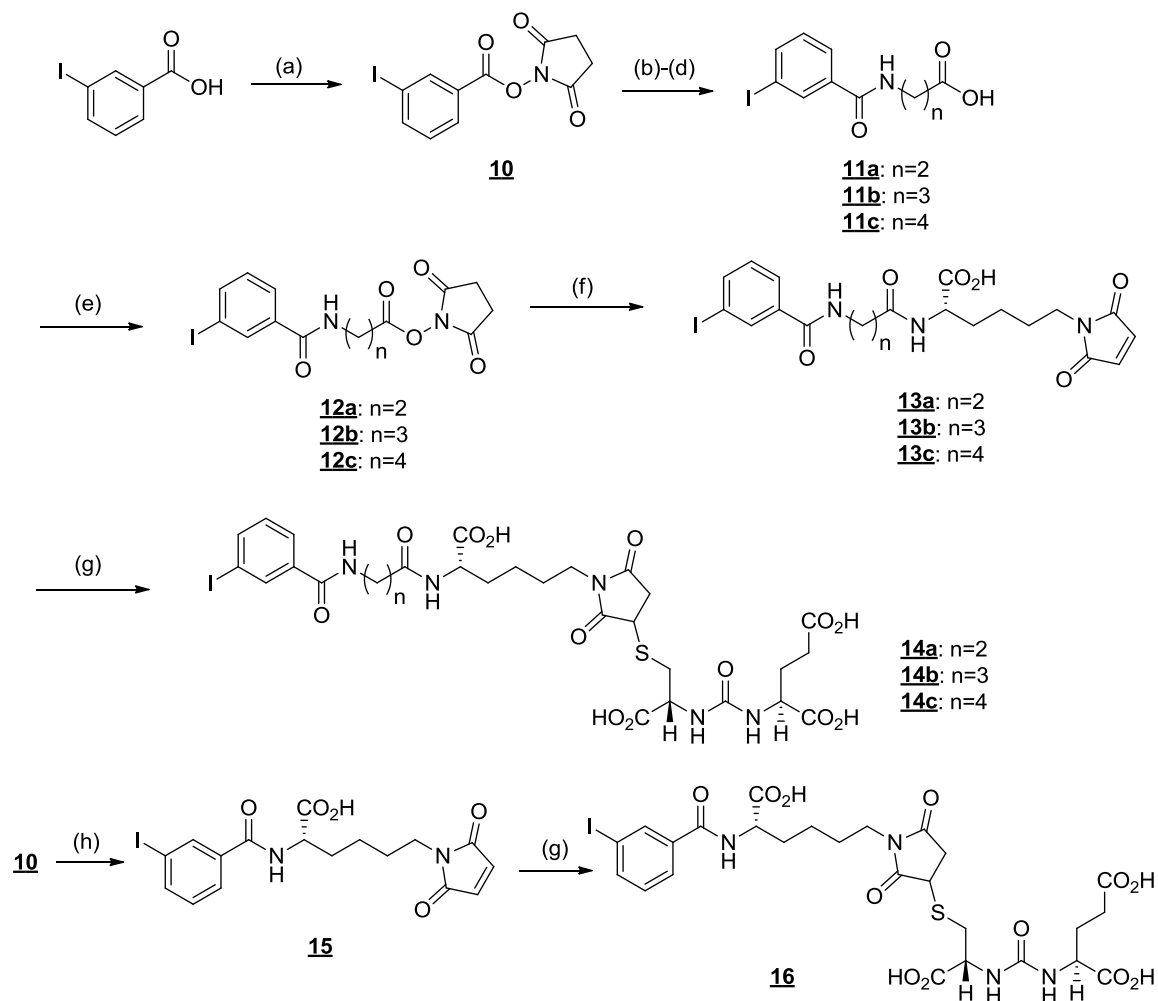


**Scheme 1-1** Synthesis of **IPMCE** and **IGLCE**.



(a) *N*-Methylmorpholine, ClCOOCH<sub>3</sub>, ethyl acetate, 88%; (b) Boc-Lys-OH, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 76%; (c) BocHNC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NH<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 1,4-dioxane, 97%; (d) HCl, ethyl acetate, 66% (**3a**), 75% (**3b**); (e) H-Gly-OPMB, WSCI, Et<sub>3</sub>N, DMF, 64% (**4a**), 57% (**4b**); (f) TFA, DCM, 97% (**5a**), 94% (**5b**); (g) *N*-hydroxysuccinimide, DIC, DMF, 62% (**6a**), 95% (**6b**); (h) **3a**, **6b**, DIPEA, CH<sub>3</sub>CN, 32%; (i) **3b**, **6a**, DIPEA, CH<sub>3</sub>CN, 46%; (j) Cys-C(O)-Glu, NaOH, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, 54% (**8**), 43% (**9**).

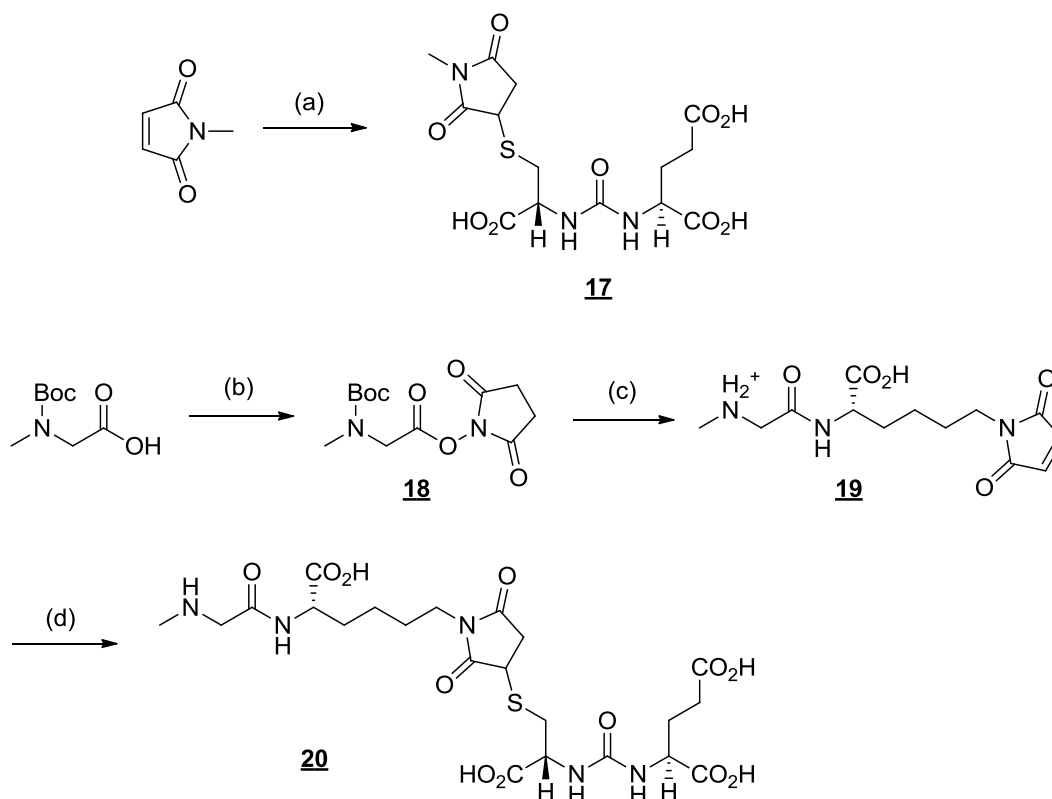
**Scheme 1-2** Synthesis of type 1 and 2 derivatives.



(a) DCC, *N*-hydroxysuccinimide, 1,4-dioxane, 98%; (b)  $\text{H}_2\text{NC}_3\text{H}_6\text{COOH}$ , DIPEA,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 39%; (c)  $\text{H}_2\text{NC}_4\text{H}_8\text{COOH}$ , DIPEA,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 65%; (d)  $\text{H}_2\text{NC}_5\text{H}_{10}\text{COOH}$ , DIPEA,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 50%; (e) *N*-hydroxysuccinimide, WSCI, DMF, 36% (**12a**), 60% (**12b**), 49% (**12c**); (f) **3a**, DIPEA,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 14% (**13a**), 17% (**13b**), 24% (**13c**); (g) Cys-C(O)-Glu, NaOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 58% (**14a**), 73% (**14b**), 23% (**14c**), 43% (**16**); (h) **3a**, DIPEA,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 26%.

**Scheme 1-3** Synthesis of type 3 derivatives.





(a) Cys-C(O)-Glu, NaOH, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, 45%; (b) *N*-hydroxysuccinimide, WSCI, DMF, 63%; (c) (i) **3a**, DIPEA, CH<sub>3</sub>CN, (ii) HCl, ethyl acetate, 4% (2 steps); (d) Cys-C(O)-Glu, NaOH, H<sub>2</sub>O, 52%.

**Scheme 1-4** Synthesis of type 4 derivatives.

### 放射化学合成

既報の合成方法に従い、スズヨウ素交換反応にて [<sup>125</sup>I]IPM および [<sup>123/125</sup>I]HML を調製した。 [<sup>125</sup>I]IPM および [<sup>123/125</sup>I]HML のアセトニトリル溶液と Cys-C(O)-Glu (0.1 mg) の水溶液 (0.05 mL) を混合し、2N NaOH を加え pH 8 に調製し、室温で 15 分反応させた。反応後に HPLC で目的の標識体を精製した。調製した放射性ヨウ素標識体は、それぞれ非放射性化合物と同時に HPLC で分析し、保持時間の一致を確認した。HPLC 精製及び分析は COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II 4.6 × 150 mm (ナカライテスク株式会社) カラムを使用し、メタノール濃度 30% よりクロマトを開始して、勾配はクロマト開始後 10 分から 20 分にかけて 30% から 60% とし、流速 1mL/min で行った。

### 細胞培養

2 種類のヒト前立腺がん細胞、PC-3 (PSMA 陰性) と LNCaP (PSMA 陽性) を DS PHARMA

BIOMEDICAL 社より購入した。両細胞はグルタミン、抗生物質（ペニシリン・ストレプトマイシン）とウシ胎児血清 10%を含む Roswell Park Memorial Institute 1640（RPMI 1640）培地中で培養した(17)。

#### 血漿中安定性評価

C.B-17/Icr +/+マウスは日本クレア社より購入した。動物実験は京都大学動物実験委員会の指針を遵守して行った。

C.B-17/Icr +/+マウス（体重 20–22 g）をイソフルランで麻酔して心臓採血を行った。回収した血液は 1,500 × g で遠心分画し、上清を回収した。回収した上清は使用するまで -80°C で保存した。調製した [<sup>125</sup>I]IPMCE 及び [<sup>125</sup>I]IGLCE を 20 μL の生理食塩水に溶解させてマウス血漿サンプル 100 μL と混合した。37°C で 1–18 時間インキュベートし、150 μL のメタノールを加えてから 5,000 × g で遠心分画した。上清を回収して Cosmonice Filter (S) (0.45 μm, 4 mm)（ナカライテスク株式会社）で処理してから HPLC で分析した。

#### 結合飽和実験

[<sup>125</sup>I]IGLCE の PSMA に対する親和性を *in vitro* 結合飽和実験にて求めた。既報の手法を一部変更して行った。LNCaP (4 × 10<sup>5</sup> cells/well) を 12 ウェルプレートに播種して CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 48 時間培養した。培地を除去後、各ウェルを 500 μL のアッセイ用培地（0.5% ウシ血清アルブミン含有 RPMI 培地）で 2 回洗浄した。各ウェルに [<sup>125</sup>I]IGLCE（比放射能 81.4 kBq/nmol）を加えて CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 1 時間インキュベートした。非特異的結合は 100 μM の非放射性 IGLCE を加えて評価した。各ウェルを 500 μL のアッセイ用培地で 2 回洗浄し、0.2N NaOH で細胞を溶解させた。細胞に結合した放射能をガンマカウンターで計測し、結合解離定数 ( $K_d$  値) をスキッチャード解析により求めた。

対照化合物として、*N*-[*N*-[(*S*)-1,3-dicarboxypropyl]carbonyl]-*S*-3-[<sup>125</sup>I]iodo-*L*-Tyr（[<sup>125</sup>I]DCIT）と [<sup>125</sup>I]MIP-1072 を既報の合成方法に従って合成したものを使用して、[<sup>125</sup>I]IGLCE と同様の条件で親和性を評価した。

## 結合阻害実験

**8, 9, 14a–14c, 16, 17, 20**, および **IGLCE** の PSMA に対する親和性を、LNCaP 細胞を用いた結合阻害実験にて評価した。対照化合物として Cys-C(O)-Glu と 2-PMPA の親和性も同様の手法にて評価した。放射性リガンドとして [<sup>125</sup>I]DCIT を使用した。

12 ウェルプレートにて LNCaP ( $4 \times 10^5$  cells/well) を 48 時間培養した。培地を除去後、各ウェルを 500  $\mu$ L のアッセイ用培地 (0.5% ウシ血清アルブミン含有 RPMI 培地) で 2 回洗浄した。各ウェルに 500  $\mu$ L の [<sup>125</sup>I]DCIT (29.6 kBq/mL) と 100  $\mu$ L の評価化合物を加えて CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 1 時間インキュベートした。非特異的結合は 0.5 mM の 2-PMPA を加えて評価した。各ウェルを 500  $\mu$ L のアッセイ用培地で 2 回洗浄し、0.2N NaOH で細胞を溶解させた。細胞に結合した放射能をガンマカウンターで計測し、IC<sub>50</sub> 値を GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) で求め、結合阻害定数 ( $K_i$  値) を Cheng-Prusoff 式より算出した。

## ドッキングシミュレーション

ドッキングシミュレーションは Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) を使用して行った。ヒトリコンビナント PSMA タンパク質と PSMA 阻害薬 GPI-18431 ((S)-2-(4-iodobenzylphosphonomethyl)-pentanedioic acid) の共結晶構造データ (PDB code: 2c6c) を鋳型としてシミュレーションを行った。まず、MOE を用いて PSMA の結晶構造中にプロトン原子を付与してモデル構造の最適化を行った (Protonate 3D)。その後、**IGLCE** のコンフォメーション計算を行い、**IGLCE** の安定なコンフォメーションと PSMA タンパク質の結合におけるエネルギーを比較して、最適な結合様式を決定した。

## 統計解析

統計解析には Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc.) を使用した。Tukey–Kramer 検定にて  $P < 0.05$  の場合に有意差ありとした。

## 結果と考察

### 放射化学合成

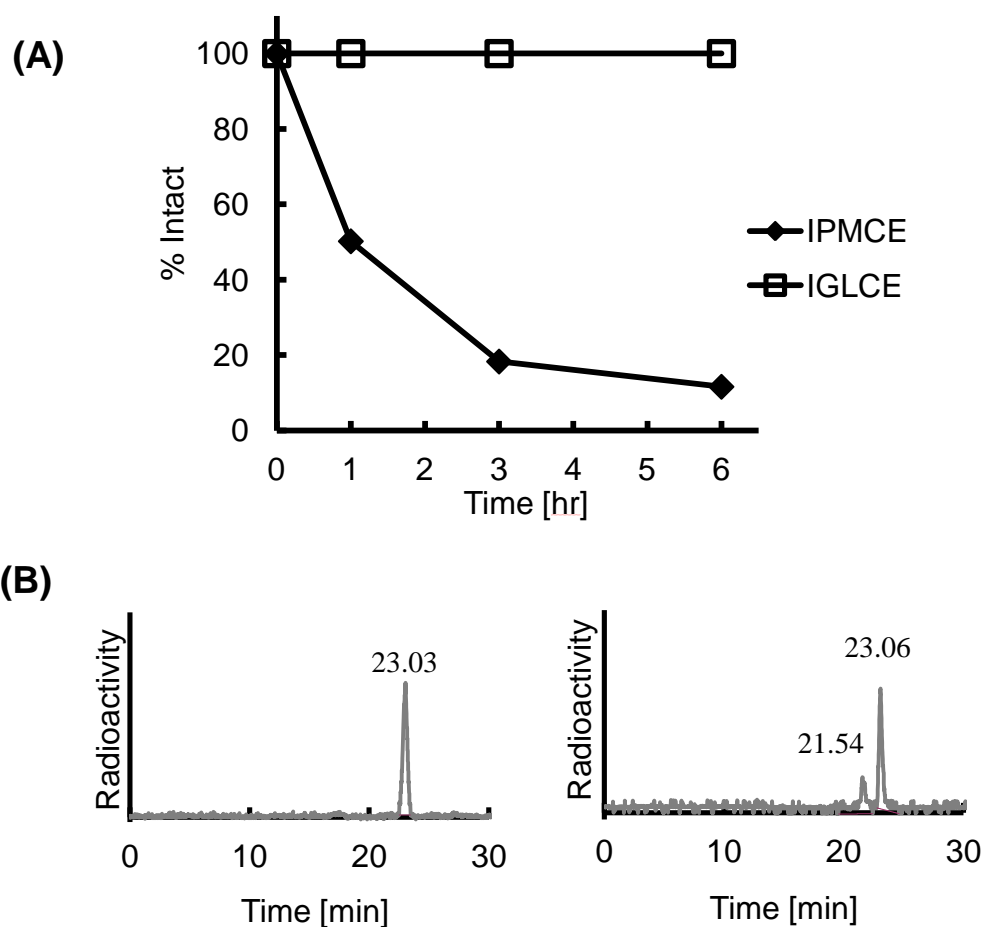
スズ放射性ヨウ素交換反応にて合成した $[^{125}\text{I}]\text{IPM}$  および $[^{123/125}\text{I}]\text{HML}$  を Cys-C(O)-Glu と反応させて $[^{125}\text{I}]\text{IPMCE}$  (放射化学的収率 37%) と $[^{123/125}\text{I}]\text{IGLCE}$  (放射化学的収率 63%) を合成した。両化合物は HPLC にて非放射性化合物と同時分析を行った結果、 $[^{125}\text{I}]\text{IPMCE}$  の保持時間は 22.9 分 (非標識体 22.8 分)、 $[^{123/125}\text{I}]\text{IGLCE}$  の保持時間は 23.1 分 (非標識体 23.0 分) であった。放射化学的純度は共に 95%以上であった。

### 血漿中安定性評価

マウス血漿中における $[^{125}\text{I}]\text{IPMCE}$  と $[^{125}\text{I}]\text{IGLCE}$  の安定性を評価した。 $[^{125}\text{I}]\text{IPMCE}$  は経時的に分解を認め、マウス血漿中 1 時間インキュベートした時点で 50%、6 時間の時点では 89%が分解した (Fig. 1-2A)。一方で $[^{125}\text{I}]\text{IGLCE}$  はマウス血漿中 6 時間インキュベートした時点では分解産物を認めず、安定に存在した (Fig. 1-2A)。その後、18 時間までインキュベートを続けると *m*- $[^{125}\text{I}]\text{ヨード馬尿酸}$  (保持時間 21.5 分) と見られる分解産物をわずかに認めた (Fig. 1-2B)。これらの結果より、 $[^{125}\text{I}]\text{IGLCE}$  がイメージングプローブとして十分な安定性を有しているのに対し、 $[^{125}\text{I}]\text{IPMCE}$  は安定性が低くイメージングプローブとして有効でないと評価した。したがって、以後の検討では $[^{123/125}\text{I}]\text{IGLCE}$  のみを評価対象とした。

### 結合飽和実験

低分子化合物である Cys-C(O)-Glu に HML を導入した IGLCE は、Cys-C(O)-Glu よりも嵩高い構造を持つことから、PSMA との親和性が低下することが懸念された。そこで、PSMA に対する $[^{125}\text{I}]\text{IGLCE}$  の親和性を、ヒト前立腺がん細胞 LNCaP を用いた結合飽和実験にて評価したところ、Table 1-1 に示すように、 $[^{125}\text{I}]\text{IGLCE}$  ( $K_d$ :  $7.8 \pm 1.4$  nM) は既報のプローブ $[^{125}\text{I}]\text{DCIT}$  ( $K_d$ :  $143 \pm 2$  nM) および $[^{125}\text{I}]\text{MIP-1072}$  ( $K_d$ :  $20.4 \pm 0.6$  nM) よりも高い親和性を有していた。よって、 $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  は SPECT 用放射性分子イメージングプローブとしての基礎的性質を有すると考えられた。



**Fig. 1-2** (A) Time dependent degradation of [<sup>125</sup>I]IPMCE and [<sup>125</sup>I]IGLCE in mouse plasma. (B) Radio-HPLC charts of [<sup>125</sup>I]IGLCE after 6 h and 18 h incubations. The intact compound peaks elute at 23.03 min. The subpeak at 21.5 min is likely 3-[<sup>125</sup>I]iodohuppric acid.

**Table 1-1** Comparison of Affinities between [<sup>125</sup>I]IGLCE and previously reported probes

	$K_d$ [nM]
[ <sup>125</sup> I]IGLCE	$7.8 \pm 1.4^{*\dagger}$
[ <sup>125</sup> I]DCIT	$143 \pm 2$
[ <sup>125</sup> I]MIP-1072	$20.4 \pm 0.6^*$

Data are expressed as means  $\pm$  standard deviation. The affinity of [<sup>125</sup>I]IGLCE was significantly higher than that of [<sup>125</sup>I]DCIT (\*P < 0.05) and [<sup>125</sup>I]MIP-1072 ( $\dagger$ P < 0.05).

## 結合阻害実験

これまでの検討で、**IGLCE** が **PSMA** に対して高い親和性を有することを確認した。**IGLCE** の構造と **PSMA** に対する親和性との関係を調べ、高親和性の実現に必要な構造上の特徴を明らかにすることは、今後の更なるプローブ設計・開発において有益な情報を提供すると考え、**IGLCE** と **PSMA** 分子との親和性に関する構造活性相関を評価することとした。

**IGLCE** 中の非対称ウレア骨格は **PSMA** の活性中心との結合に必須である。このことから、**IGLCE** が既報のプローブよりも高い親和性を示した要因は、**IGLCE** 分子中の **HML** に由来する骨格中にあると仮定した (**Fig. 1-3**)。

そこで、**IGLCE** の **HML** に由来する骨格中に以下の構造修飾を加えた種々の誘導体を合成して、その親和性を評価した (**Scheme 1-2-1-4**)。構造修飾としては (1) ヨウ素を水素に置換、(2) カルボン酸を水素に置換、(3) グリシンのアルキル鎖を延長およびグリシンの除去、(4) 芳香環の除去 (スクシンイミド基も併せて評価)、の 4 通りを検討した (**Fig. 1-3**)。

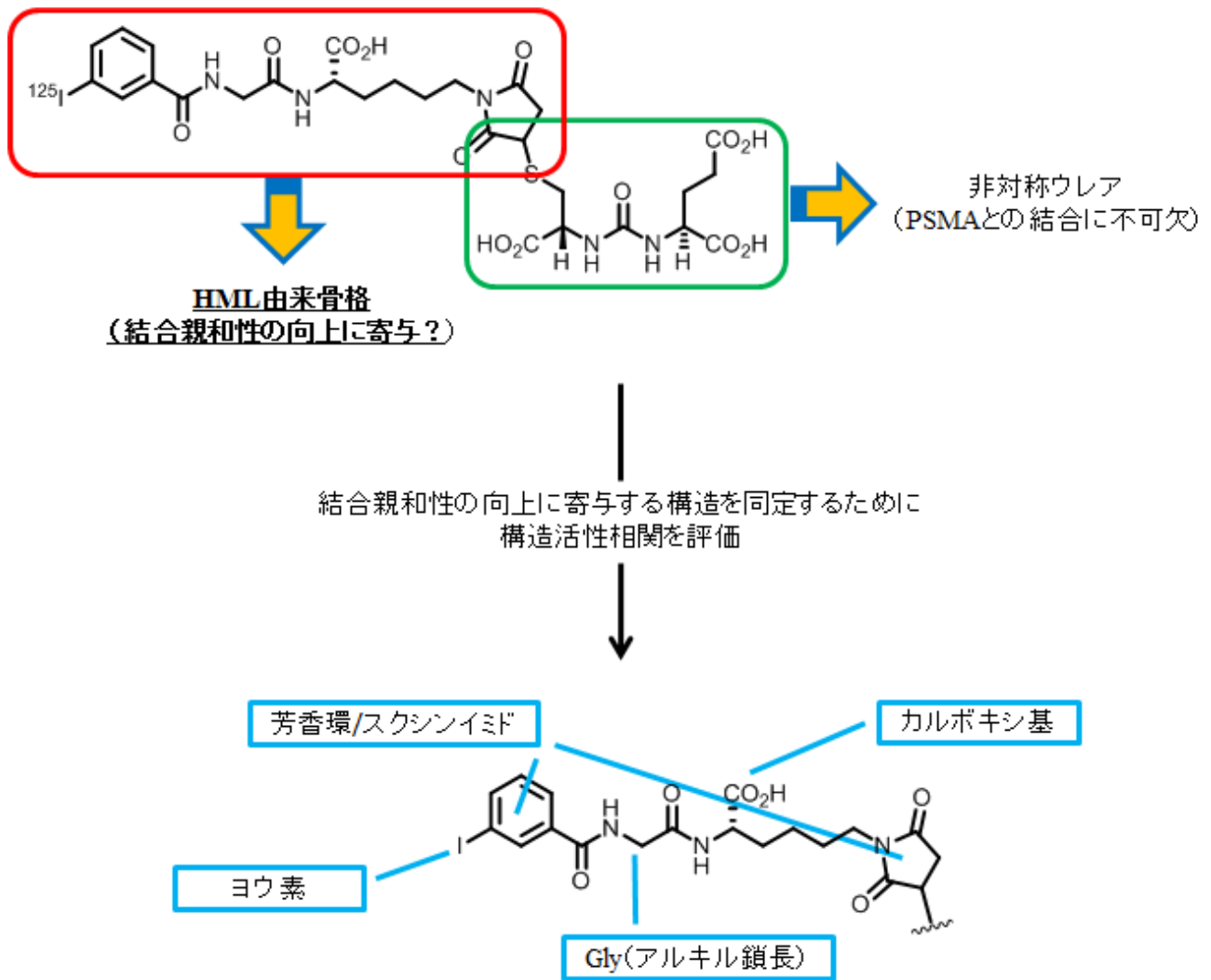


Fig. 1-3 Strategy for the design and derivatization of [<sup>125</sup>I]IGLCE.

IGLCE の HML 由来骨格に含まれるヨウ素とカルボン酸の親和性への寄与を評価するために、それぞれプロトンに置換した化合物 **8**, **9** を合成し、親和性を比較した (Table 1-2)。**8**, **9** はいずれも IGLCE と同等の親和性を示し、その親和性は 2-PMPA より高かった。この結果から、IGLCE の親和性向上に対するヨウ素とカルボン酸の寄与は小さいことが示された。

**Table 1-2** Effect on affinity of the iodine and the carboxy group

Compound	R <sub>2</sub> <sup>*</sup>	R <sub>3</sub> <sup>*</sup>	K <sub>i</sub> [nM]
2-PMPA	-	-	31.2 ± 7.09
<b>IGLCE</b>	I	CO <sub>2</sub> H	4.97 ± 2.66
<b>8</b>	H	CO <sub>2</sub> H	8.06 ± 3.07
<b>9</b>	I	H	7.91 ± 2.67

Data are expressed as means ± standard deviation. \*: Corresponding to **Scheme 2**.

次に、IGLCE の HML 由来骨格に含まれるグリシンのアルキル鎖長を延長して (**14a**, **14b**, **14c**)、親和性に影響を生じるか評価した (Table 1-3)。また、グリシンを除去した化合物 **16** も合成して評価を行った (Table 1-3)。これら 4 つの誘導体はいずれも IGLCE と同等の親和性を示し、その親和性は 2-PMPA より高かった。この結果から、IGLCE の親和性向上に対するグリシンの寄与は小さく、骨格の長さを変更しても高親和性を維持できることが示された。

**Table 1-3** Effect on affinity of the length of the HML-derived moiety

Compound	n <sup>*</sup>	K <sub>i</sub> [nM]
2-PMPA	-	31.2 ± 7.09
<b>IGLCE</b>	1	4.97 ± 2.66
<b>14a</b>	2	6.26 ± 4.87
<b>14b</b>	3	2.95 ± 0.29
<b>14c</b>	4	2.14 ± 0.77
<b>16</b>	(Gly なし)	2.79 ± 1.06

Data are expressed as means ± standard deviation. \*: Corresponding to **Scheme 3**.



また、HML 由来骨格中の芳香環を除去した化合物として **17** と **20** を合成した。**17** は *N*-メチルスクシンイミドのみを残し、**20** は **IGLCE** のヨードベンゾイル基をメチル基に置換した。芳香環を持たない両化合物の親和性は **IGLCE** より低く、また 2-PMPA よりも低いことが分かった (**Table 1-4**)。この結果より、**IGLCE** の高親和性に芳香環が寄与していると考えられる。また、Cys-C(O)-Glu に *N*-メチルスクシンイミドを導入した **17** が Cys-C(O)-Glu よりも高い親和性を示したことから、スクシンイミジル基も **IGLCE** の高親和性に寄与していると考えられる。

**Table 1-4** Effect on affinity of the aromatic ring and the succinimidyl group

Compound	$K_i$ [nM]
2-PMPA	$31.2 \pm 7.09$
<b>IGLCE</b>	$4.97 \pm 2.66$
Cys-C(O)-Glu	$376 \pm 195$
<b>17</b>	$62.1 \pm 10.7$
<b>20</b>	$94.8 \pm 1.50$

Data are expressed as means  $\pm$  standard deviation.

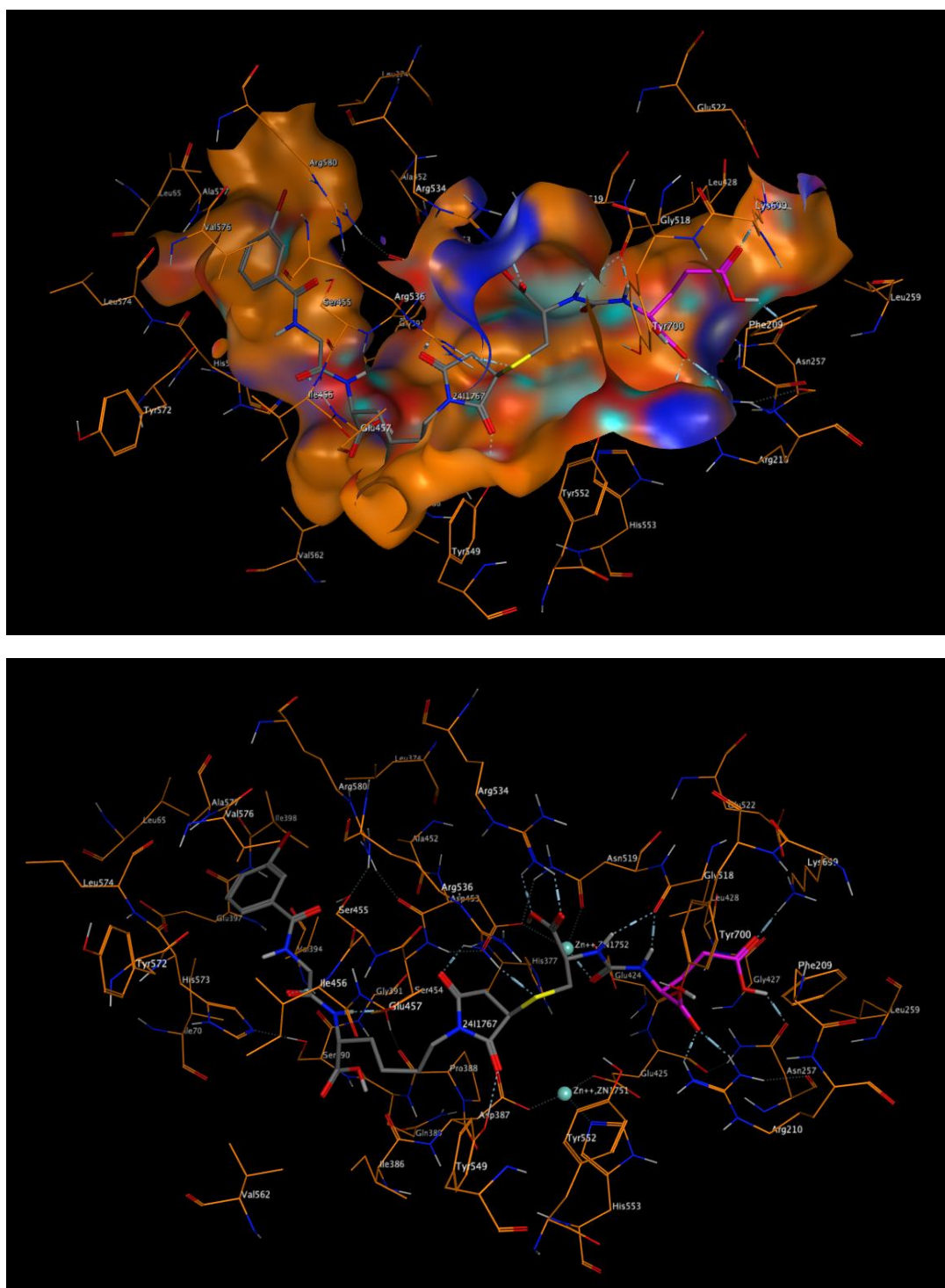
## ドッキングシミュレーション

以上の結果より、**IGLCE** の高親和性には **HML** 由来骨格中の芳香環とスクシンイミジル基が寄与しているのに対し、芳香環とスクシンイミド基の間の距離を変えても親和性が維持されることが示された。これらの結果について、既報の X 線結晶構造解析のデータを参考に **IGLCE** と **PSMA** の分子間相互作用を考察した。

非対称ウレア化合物はグルタミン酸骨格が **PSMA** の活性部位 (**S1'**ポケット) と結合する。**PSMA** タンパク表面から **S1'**ポケットの間には約 20 Å の長さの煙突状の空洞 (**S1** ポケット) が広がっていて、非対称ウレア化合物のグルタミン酸以外の骨格はこの **S1** ポケットと相互作用する。この **S1** ポケットは疎水性βシートから構成されている。また、過去にはこの疎水性ポケットに着目して疎水性の <sup>68</sup>Ga 錯体 (<sup>68</sup>Ga-HBED-CC) を導入したプローブが報告されている。この結合様式を **IGLCE** に当てはめると、**IGLCE** 分子中の **HML** 由来骨格は **S1** ポケットと相互作用していて、**HML** 由来骨格の芳香環が疎水性βシートと相互作用していると考えられる。

そこで、**MOE** を用いてドッキングシミュレーションを行い、**IGLCE** と **PSMA** の結合様式を計算科学的に評価した (**Fig. 1-4**)。その結果、**IGLCE** 分子中の非対称ウレア骨格は **S1'**ポケットに配向し、**HML** 由来骨格は **S1** ポケットに配向していることが示された。また、スクシンイミジル基と **Arg536** や **Tyr549** との相互作用が予測された。従って、**HML** 由来骨格に含まれる芳香環は **S1** ポケットを構成する疎水性のβシートと相互作用して、スクシンイミジル基は **PSMA** タンパクとの水素結合によって結合を安定化させていると考えられる。また、**S1** ポケットは縦に伸びた空洞状の構造をしていることから、芳香環とスクシンイミジル基の間の距離を変えても芳香環と **S1** ポケットの相互作用が維持され、高親和性が保たれたと考えられる。

このように、ドッキングシミュレーションによって、構造活性相関研究で得られた知見を支持する結果が得られた。



**Fig. 1-4** Contour map model of the active site of PSMA and binding mode of **IGLCE** (upper). The asymmetric urea moiety of **IGLCE** was oriented to the S1' pocket, and the HML derived moiety was oriented to the S1 pocket. Calculated docking model of **IGLCE** to PSMA (lower). Hydrogen bonds between **IGLCE** and PSMA are shown by light blue dashed lines. Two zinc ions in the pharmacophore are shown as emerald green balls.

## 小括

マレイミドとチオール共役求核付加反応を利用して新規 PSMA 標的放射性分子イメージングプローブ<sup>[123I]IPMCE</sup>と<sup>[123I]IGLCE</sup>を設計した。その中でも<sup>[123I]IGLCE</sup>は *in vitro* の検討において十分な安定性と、PSMA に対する高い親和性を示した。結合阻害実験による構造活性相関研究の結果、**IGLCE** 分子中の芳香環とスクシンイミジル基が親和性に寄与していることが示唆された。また、構造活性相関研究で得られた知見はドッキングシミュレーションによって支持された。本知見より、Cys-C(O)-Glu とマレイミド共役求核付加反応を用いた PSMA プローブ設計が高親和性のプローブ設計につながると考えられる。また、芳香環とスクシンイミド基の間の距離は自由度が高く多様なプローブ設計が可能であり、マレイミドとチオール共役求核付加反応を利用した本設計戦略は、優れた PSMA プローブの開発において有効と考えられる。

## 第二章

### PSMA を標的とした単光子放出断層撮像用

#### 前立腺がん核医学分子イメージングプローブとしての

#### <sup>123</sup>I 標識非対称ウレア型化合物の開発

##### 背景

第一章で HML 誘導体と Cys-C(O)-Glu を用いた PSMA 標的放射性分子イメージングプローブ設計が高い親和性を有するプローブ設計につながることを示した。標的分子との高い親和性は良好な画像診断に必要な性質であり、PSMA に対する高い親和性を示した<sup>[123]I</sup>IGLCE やその誘導体は PSMA を標的とした SPECT 用プローブとしての基礎的性質を有すると考えられる。

一方、良好な標的組織/非標的組織比 (S/N 比) を得るには、標的分子との親和性だけでなく、*in vivo* における標的分子との特異的結合性や血液や非標的組織中からの良好なクリアランスが求められる。そこで、第一章で設計合成した<sup>[123]I</sup>IGLCE やその誘導体が、PSMA を標的とした SPECT 用前立腺がん核医学分子イメージングプローブとして有効であるか、ヒト前立腺がん細胞を移植した担がんマウスを用いた *in vivo* 評価を行うこととした。

そこでまず、第一章にて放射性ヨウ素標識を行いマウス血漿中での安定性を確認した<sup>[123]I</sup>IGLCE について評価を行うこととした。また、血液や非標的組織中からのクリアランスには、疎水性（親水性）などプローブの物理化学的性質が影響する可能性が考えられることから、<sup>[123]I</sup>IGLCE の誘導体で、カルボキシ基が 1 つ少なく<sup>[123]I</sup>IGLCE よりも疎水性が高い（水溶性が低い）と考えられる<sup>[123]I</sup>9 の有効性を評価することとした。さらにポジティブコントロールとして、臨床試験が行われている<sup>[123]I</sup>MIP-1072 を選択し、<sup>[123]I</sup>IGLCE や<sup>[123]I</sup>9 の生体内分布と比較検討することを計画した。

また、それらの検討結果に基づき、<sup>[123]I</sup>IGLCE が SPECT 用プローブとして適した性質を有すると考えて、SPECT/CT 撮像を行い、その有効性を評価した。

## 実験方法

### 試薬・機器

HPLC は LC-20AD (株式会社島津製作所) を使用し、検出器として紫外吸収スペクトル検出器 SPD-20A (株式会社島津製作所) とサーベイメーターNDW-351D (日立アロカメディカル株式会社) を使用した。移動相は 0.1% TFA を含むメタノールと超純水を使用した。超純水は MQ Integral15 (日本ミリポア株式会社) を用いて調製した。Preparative thin layer chromatography (PTLC) には Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.5 mm (メルク社) を使用した。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は LCMS-2010 EV (株式会社島津製作所)、電子イオン化質量分析 (EI-MS) は GCMS-QP 2010 Plus (株式会社島津製作所)、高速原子衝突質量分析 (FAB-MS) は JMS-SX 102A QQ (日本電子株式会社) にて測定した。NMR スペクトルは LNM-AL500 (日本電子株式会社) にて測定し、内部標準としてテトラメチルシランを含んだ重溶媒 (Euriso-Top) を使用した。Na[<sup>125</sup>I]I は株式会社エムピーバイオ、Na[<sup>123</sup>I]I は富士フィルム RI ファーマ株式会社よりそれぞれ購入したものを使用した。2-PMPA は Tocris Bioscience 社より購入したものを使用した。その他の試薬はナカライテスク株式会社、和光純薬株式会社、東京化成工業株式会社、渡辺化学工業株式会社、キシダ化学株式会社から購入した。

### 細胞培養・モデルマウス

2 種類のヒト前立腺がん細胞、PC-3 (PSMA 陰性) と LNCaP (PSMA 陽性) を DS PHARMA BIOMEDICAL 社より購入した。両細胞はグルタミン、抗生物質 (ペニシリン・ストレプトマイシン) とウシ胎児血清 10% を含む Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) 培地中で培養した。

C.B-17/Icr +/+ および C.B-17/Icr *scid/scid* マウスは日本クレア社より購入した。動物実験は京都大学動物実験委員会の指針を遵守して行った。

培養した細胞は 2.5 g/L トリプシン・1 mM エチレンジアミン四酢酸で処理してリン酸緩衝食塩水 (PBS(-)) で再懸濁し、細胞数を計数した。PBS(-) : BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (1 : 1) で細胞懸濁液を調製し、マウスの肩に細胞を移植した (1–5 × 10<sup>6</sup> cells/mouse)。担がんマウスは腫瘍径が 5–10 mm まで成長した時点で実験に使用した。

## 放射化学合成

[<sup>125</sup>I]MIP-1072 は既存のスキームに従って合成を行った。

[<sup>125</sup>I]**9**の合成には、既存のスキームに従って合成した *N*-(5-Maleimidopentyl) 3-[<sup>125</sup>I]iodohippuric acid amide ([<sup>125</sup>I]MPH) を使用した。合成した [<sup>125</sup>I]MPH のアセトニトリル溶液に Cys-C(O)-Glu (0.5 mg) の水溶液を加えて 2N NaOH で中和した。室温で 30 分反応させ、逆相 HPLC で精製し、放射化学的収率 54.5%、放射化学的純度 98% 以上で [<sup>125</sup>I]**9** を得た。HPLC 精製及び分析は COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II 4.6 × 150 mm (ナカライテスク株式会社) カラムを使用し、メタノール濃度 30% よりクロマトを開始して、勾配はクロマト開始後 10 分から 20 分にかけて 30% から 60% とし、流速 1 mL/min で行った。

## 体内分布実験

[<sup>125</sup>I]IGLCE を生理食塩水に溶解させて、担がんマウスに 100 μL ずつ尾静脈投与した。マウスは所定のタイムポイント（投与後 2 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間）において断頭屠殺した。血液を回収および組織を摘出して質量と集積した放射能を測定し、組織への集積を評価した。

生体内における PSMA 特異性を評価するために、*in vivo* 阻害実験を行った。[<sup>125</sup>I]IGLCE と GCP-II 阻害薬 2-(phosphonomethyl)pentanedioic acid (2-PMPA) (50 mg/kg weight) を同時投与して、投与後 30 分における [<sup>125</sup>I]IGLCE の体内分布を評価した。

## 小動物 SPECT/CT

FX3300 (FX3300 imager; SII NanoTechnology Inc., Northridge, CA, USA) にて SPECT/CT 撮像を行った。LNCaP と PC-3 を移植した担がんマウスをイソフルランで麻酔し、生理食塩水に溶解させた [<sup>123</sup>I]IGLCE (25.9 MBq/100 μL) を尾静脈投与した。阻害群には 2-PMPA (50 mg/kg weight) を同時投与した。

投与後 30–64 分間に SPECT 撮像を行った。SPECT 撮像には直径 1.0 mm、焦点距離 9.0 mm のシングルピンホールコリメーターを使用し、エネルギー幅は <sup>123</sup>I の 159 keV を中心に 20% に設定、回転半径 35 mm、回転角度 360°、投影時間 60 秒、投影回数 32 回にて行った。SPECT 撮像後に CT

撮像（空間分解能 50  $\mu\text{m}$ 、管電圧 60 kV、管電流 310  $\mu\text{A}$ ）を行った。SPECT の投影データは 3 次元 ordered-subset expectation maximization (OSEM) 法による画像再構成を行い、CT の投影データはボクセルサイズ 0.177  $\times$  0.177  $\times$  0.177 mm での 512  $\times$  512  $\times$  512 の画像行列として Feldkamp の再構成法による画像再構成を行った。3 次元データ解析視覚化用ソフトウェア AMIRA バージョン 5.1 (FEI Company) にて SPECT/CT の画像解析を行った。

### 統計解析

統計解析には Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc.) を使用した。Bonfferoni correction にて  $P < 0.05$  の場合に有意差ありとした。



## 結果と考察

### 体内分布評価

[<sup>125</sup>I]IGLCE の体内分布を LNCaP および PC-3 を移植した担がんマウスを用いて評価した。各タイムポイントにおける組織ごとの [<sup>125</sup>I]IGLCE の放射能分布、腫瘍血液比、腫瘍筋肉比を **Table 2-1** にまとめた。脱ヨードの指標となる甲状腺への放射能集積は認められなかったことから、生体内での脱ヨードは生じていないと考えられる。また、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は投与後 30 分の時点で 9.5 %ID/g と LNCaP に高い集積を示し、この集積は投与後 6 時間まで保持された。一方、PC-3 においては放射能の滞留は認められず、投与後 30 分の時点で 0.94 %ID/g と低かった。このことから、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は生体内において PSMA を認識して腫瘍に集積することが示唆された。また、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は血中からの速やかな消失を示し、血中の放射能量は投与後 2 分の 8.9 %ID/g から投与後 30 分の時点で 1.5 %ID/g まで減少した。その結果、 [<sup>125</sup>I]IGLCE の腫瘍 (LNCaP) 血液比と腫瘍 (LNCaP) 筋肉比は、投与後わずか 30 分の時点で 5.3, 11.1 と良好な値を示した。

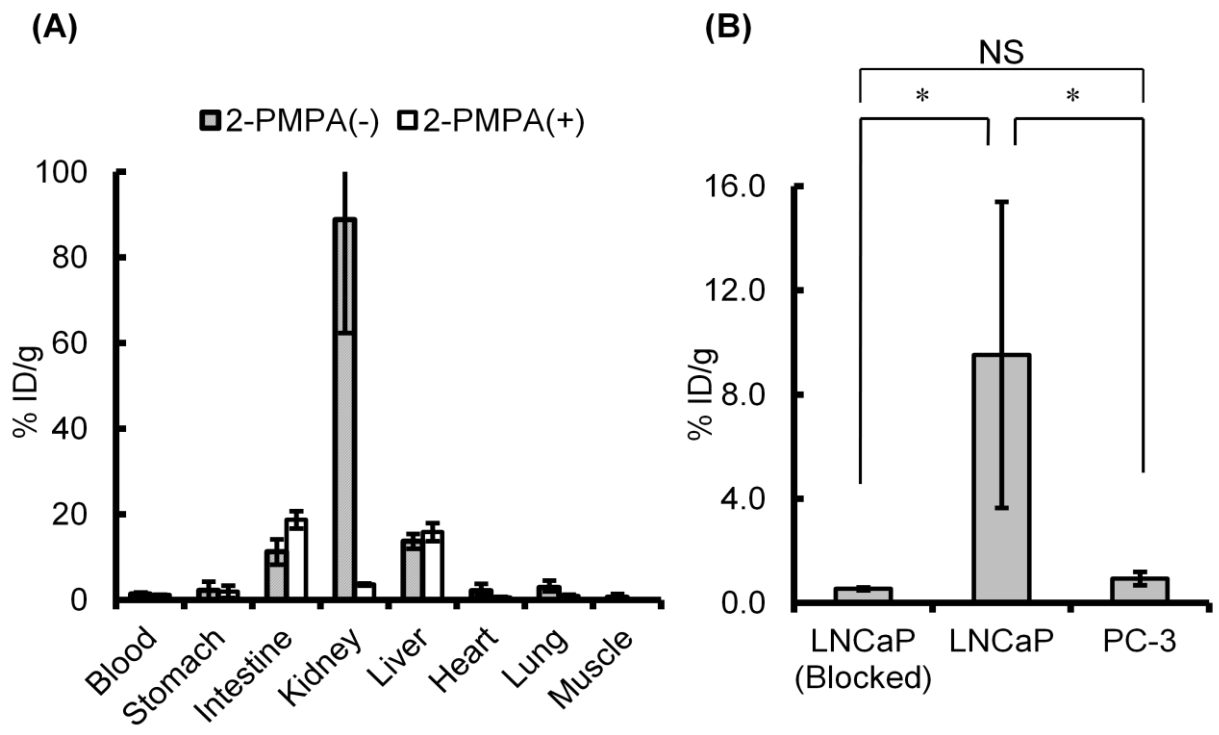
この腫瘍集積が PSMA に対する特異的な集積であることを検証するために、 [<sup>125</sup>I]IGLCE と 2-PMPA (50 mg/kg body weight) を同時投与した場合に、LNCaP における放射能集積が PC-3 と同等になるかを評価した。その結果、投与後 30 分の時点で LNCaP における放射能集積は 0.55 %ID/g まで低下し、 [<sup>125</sup>I]IGLCE の腫瘍集積が PSMA 特異的であることが示された (**Fig. 2-1B**)。

正常組織では、腎臓に高い放射能集積を認めた (投与後 30 分で 89 %ID/g)。この放射能集積は 2-PMPA を同時投与した場合、3.6 %ID/g にまで減少した (**Fig. 2-1A**)。このことから、腎臓における放射能の集積と滞留は PSMA 特異的であることが示唆された。マウス腎臓における GCP-II の発現が報告されていることから、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は腎臓に発現している GCP-II に結合したと考えられる。

**Table 2-1** *In vivo* biodistribution of [<sup>125</sup>I]IGLCE

Tissues	2 min	30 min	1 h	3 h	6 h
Blood	7.4 ± 2.5	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2
Stomach	0.7 ± 0.3	2.2 ± 2.1	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.9	0.7 ± 0.6
Intestine	3.6 ± 0.8	11.2 ± 3.0	16.5 ± 4.0	5.8 ± 3.1	5.3 ± 1.8
Kidney	68.1 ± 20.1	88.8 ± 26.5	92.8 ± 13.7	110 ± 44.6	97.1 ± 30.6
Liver	22.5 ± 4.7	13.7 ± 1.7	13.9 ± 3.1	9.0 ± 2.3	4.5 ± 1.3
Heart	5.4 ± 1.3	2.1 ± 0.9	1.3 ± 0.5	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.3
Lung	6.8 ± 1.8	2.9 ± 0.8	2.5 ± 0.5	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.3
Muscle	1.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0
LNCaP	4.2 ± 1.2	9.5 ± 5.9	7.0 ± 2.4	9.5 ± 3.1	6.7 ± 1.3
PC-3	2.7 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0
Thyroid	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.00
LNCaP/PC-3	1.5	10.1	9.6	33.9	36.8
LNCaP/Blood	0.6	7.2	6.9	13.8	13.3
PC-3/Blood	0.4	0.7	0.7	0.4	0.4
LNCaP/Muscle	2.9	16.5	15.5	49.4	76.7
PC-3/Muscle	1.9	1.6	1.6	1.5	2.1

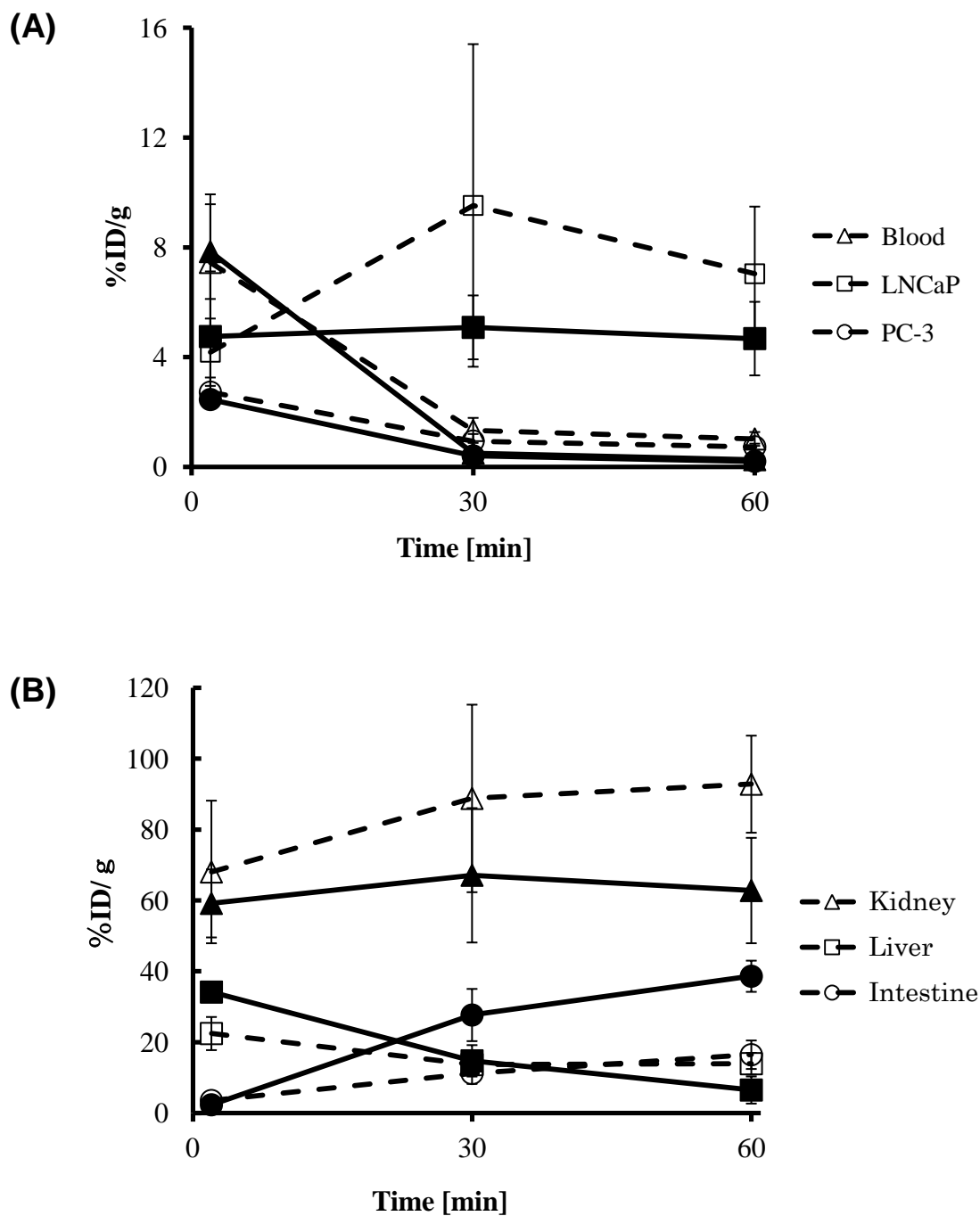
Accumulation in each tissue (except for stomach and thyroid, where it was evaluated as %ID) was evaluated as %ID/g. Values are expressed as means ± standard deviation. The ratios are based on the %ID/g.



**Fig. 2-1** In the blocking study, all mice were sacrificed 30 min after injection. Data for the stomach are expressed as %ID. (A) In normal tissues, significant inhibition by 2-PMPA was observed in kidney and spleen. (B) Accumulation in LNCaP tumors was significantly inhibited by 2-PMPA. The difference between the accumulations in PC-3 tumors and blocked LNCaP tumors was not significant. (\*P < 0.05, NS; not significant)

これらの結果より、 $^{125}\text{I}$ IGLCE が *in vivo* において PSMA 特異的に集積し、非特異的な組織からは速やかに消失することが示された。そこで、 $^{125}\text{I}$ 9 およびポジティブコントロールとして選択した  $^{125}\text{I}$ MIP-1072 の体内分布を評価して比較検討を行った。

$^{125}\text{I}$ 9 は  $^{125}\text{I}$ IGLCE よりも速やかに血液中から消失し、投与後 1 時間の時点では  $^{125}\text{I}$ IGLCE とほぼ同等かやや低い LNCaP への集積を示した。しかし、 $^{125}\text{I}$ 9 は  $^{125}\text{I}$ IGLCE よりも高い肝臓や腸管への集積を認めた。前立腺がんは骨やリンパ節へ転移しやすく、体幹や腹腔内への放射能集積は転移巣の画像診断を妨げる恐れがあるとされている。従って、肝臓や腸管への集積は、転移巣のより正確な質的診断を可能とするためにも低減させることが望ましいと考えられる。よって、 $^{123}\text{I}$ IGLCE の方が  $^{123}\text{I}$ 9 よりも PSMA を標的とした放射性分子イメージングプローブとして適すと考え、また  $^{125}\text{I}$ 9 の肝臓への取り込みが高まった原因の 1 つとして親水性の低下を考えた。実際、逆相 HPLC の保持時間を比較すると、 $^{125}\text{I}$ 9 は  $^{125}\text{I}$ IGLCE よりも保持時間が長く、親水性が低いと考えられる。また、第一章で IGLCE と同等の親和性を示した誘導体 (**14a–14c, 16**) も逆相 HPLC の保持時間を比較すると (Table 2-2)、IGLCE よりも親水性が低いと考えられ、これらの誘導体の中では  $^{123}\text{I}$ IGLCE が PSMA を標的とした SPECT 用プローブとして最も優れていると考えた。



**Fig. 2-2** (A) Accumulation of [ $^{125}\text{I}$ ]**9** in blood and prostate cancer tissues. (B) Accumulation of [ $^{125}\text{I}$ ]**9** in kidney, liver, and intestine. The data for [ $^{125}\text{I}$ ]**9** are indicated with closed markers and solid lines. The data for [ $^{125}\text{I}$ ]**IGLCE** are indicated with open markers and dashed lines. The data shown are an average of 3–4 mice, and error bars indicate the standard deviation.

**Table 2-2** Summary of reverse phase HPLC retention times of selected compounds

化合物	$t_R$ [min]
<b>IGLCE</b>	23.0
<b>9</b>	24.0
<b>14a</b>	25.1
<b>14b</b>	25.6
<b>14c</b>	25.9
<b>16</b>	25.2

Retention times were determined using a COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II 4.6 × 150 mm column eluted with 0.1% TFA in water (solvent A) and 0.1% TFA in methanol (solvent B). An HPLC gradient with a flow rate of 1 mL/min was initiated from an isocratic system (30% solvent B) over 10 min and adjusted to 30–60% solvent B over 10 min followed by 60% solvent B.

[<sup>123</sup>I]IGLCE の体内分布を既報の SPECT プローブ [<sup>123</sup>I]MIP-1072 と比較検討した。なお、この評価には <sup>123</sup>I の代わりに半減期が長く取扱いが容易な <sup>125</sup>I で標識した [<sup>125</sup>I]MIP-1072 を使用した。 [<sup>125</sup>I]MIP-1072 は LNCaP に高い集積を認めたが、PC-3 への集積は低かった。また、LNCaP への集積は [<sup>125</sup>I]IGLCE よりも高かった。この結果より、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は、 [<sup>125</sup>I]MIP-1072 よりも PSMA に対する高い親和性を有するにも関わらず、LNCaP への集積は [<sup>125</sup>I]MIP-1072 よりも低いことが示唆された。この原因の 1 つとして、 [<sup>125</sup>I]IGLCE と [<sup>125</sup>I]MIP-1072 のクリアランスの差が考えられた。 [<sup>125</sup>I]IGLCE は [<sup>125</sup>I]MIP-1072 よりも投与後の血液中放射能が低い傾向を示した。また、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は投与後肝臓に取り込まれたのに対し、 [<sup>125</sup>I]MIP-1072 は肝臓への取り込みが低かった。従って、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は投与後に肝臓に取り込まれることで血液中の放射能が速やかに低下して、腫瘍への移行量が低下したと考えられた。 [<sup>125</sup>I]9 が [<sup>125</sup>I]IGLCE よりも高い肝臓への集積を示したのと同様、 [<sup>125</sup>I]IGLCE が [<sup>125</sup>I]MIP-1072 よりも高い肝臓への集積を示したのは [<sup>125</sup>I]IGLCE が [<sup>125</sup>I]MIP-1072 よりも親水性が低いからではないかと考え、両プローブの分配係数 (log D, pH 7.4) を求めたところ、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は [<sup>125</sup>I]MIP-1072 よりも親水性が低いことが分かった。従って、 [<sup>125</sup>I]IGLCE の親水性を改善し、肝臓への取り込みを低減させることができれば、LNCaP への移行性も改善できると考えられた。

以上の結果より、 [<sup>125</sup>I]IGLCE は [<sup>125</sup>I]MIP-1072 よりも腫瘍集積が低かったものの、腫瘍への PSMA 特異的な集積と非特異的組織からの速やかなクリアランスを示したことから、PSMA の *in vivo* イメージングに必要な性質を有していると考え、SPECT 撮像を計画した。

**Table 2-3** *In vivo* biodistribution data of [<sup>125</sup>I]MIP-1072

Tissues	2 min	30 min	1 h	3 h
Blood	11.4 ± 1.3	2.0 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.3 ± 0.1
Stomach	2.6 ± 0.8	3.3 ± 2.2	3.2 ± 2.5	1.8 ± 1.2
Intestine	2.7 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.9 ± 1.8
Kidney	81.8 ± 15.9	193 ± 44.9	242 ± 40.8	226 ± 38.0
Liver	4.7 ± 1.0	4.1 ± 0.3	4.2 ± 1.0	3.8 ± 0.7
Spleen	16.8 ± 6.2	43.3 ± 21.9	27.7 ± 19.7	8.4 ± 5.6
Heart	5.7 ± 1.0	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.3 ± 0.1
Lung	9.7 ± 1.0	3.4 ± 0.6	1.9 ± 0.5	0.6 ± 0.1
Muscle	2.1 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.2 ± 0.1
LNCaP	7.3 ± 2.9	10.3 ± 1.3	12.6 ± 2.3	14.5 ± 3.5
PC-3	4.1 ± 0.8	1.8 ± 0.3	1.0 ± 0.5	0.3 ± 0.0
Thyroid	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02
LNCaP/PC-3	1.7	5.7	12.5	45.7
LNCaP/Blood	0.6	5.0	10.5	46.1
PC-3/Blood	0.4	0.9	0.8	1.0
LNCaP/Muscle	3.4	16.3	25.4	87.7
PC-3/Muscle	2.0	3.0	2.0	1.5

Accumulation in each tissue (except for stomach and thyroid, where it was evaluated as %ID) was evaluated as %ID/g. Values are expressed as means ± standard deviation. The ratios are based on the %ID/g.

**Table 2-4** Distribution coefficient and HPLC retention time of [<sup>125</sup>I]IGLCE and [<sup>125</sup>I]MIP-1072

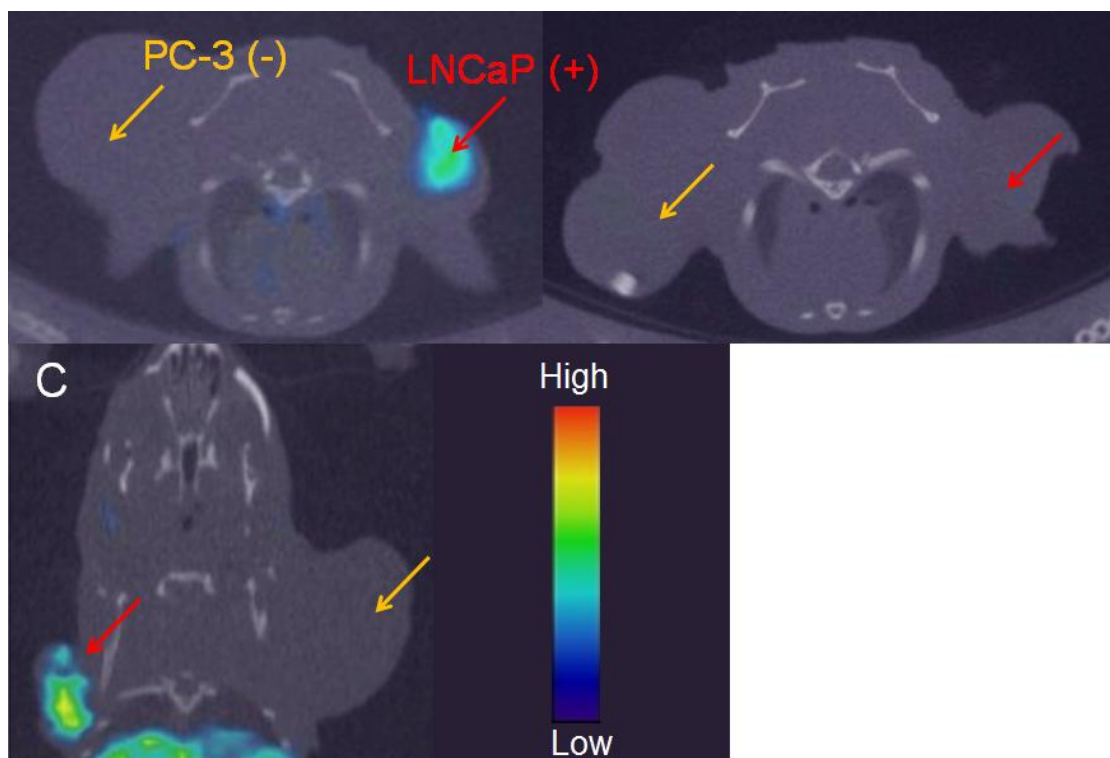
化合物	log D*	t <sub>R</sub> [min]
[ <sup>125</sup> I]IGLCE	-1.97	23.2
[ <sup>125</sup> I]MIP-1072	-2.91	16.1

Retention times were determined using a COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II 4.6 × 150 mm column eluted with 0.1% TFA in water (solvent A) and 0.1% TFA in methanol (solvent B). An HPLC gradient with a flow rate of 1 mL/min was initiated from an isocratic system (30% solvent B) over 10 min and adjusted to 30–60% solvent B over 10 min followed by 60% solvent B. \*: Distribution coefficient (log D) values were determined using 1-octanol and 0.1 M PBS (pH 7.4).



## 小動物 SPECT/CT

$[^{125}\text{I}]\text{IGLCE}$  は速やかな腫瘍への集積と血中からの消失を示したことから、SPECT の撮像は投与 30 分後からとした。その結果、 $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  が LNCaP を明瞭に描出し、PC-3 との弁別に成功した (Figs. 4A, 4C)。また、2-PMPA を同時投与した場合、 $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  の集積は画像から消失した (Fig. 4B)。このように、SPECT/CT 撮像の結果は体内分布評価の結果を反映していた。従って、 $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  は PSMA を標的とした放射性プローブとして有効であると考えられる。しかし同時に、体内分布実験と同様、 $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  は SPECT 画像において肝臓への集積を認めた。 $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  の PSMA を標的とした前立腺がん核医学診断用放射性分子イメージングプローブとしての有効性をさらに高めるには、肝臓への取り込みを低減させる必要性が示された。



**Fig. 2-3** (A and B) Transaxial SPECT/CT images obtained with  $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$ . Mice were injected with  $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  without (A) or with (B) 2-PMPA (50 mg/kg weight).  $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  clearly illuminated LNCaP tumors (A), and 2-PMPA prevented this reaction (B).  $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$  did not accumulate in PC-3 tumors. (C) Coronal SPECT/CT images were obtained with  $[^{123}\text{I}]\text{IGLCE}$ .

## 小括

[<sup>123</sup>I]IGLCE は *in vivo* において PSMA 特異的な腫瘍集積を認め、SPECT/CT 撮像では LNCaP を明瞭に描出した。一方、[<sup>123</sup>I]IGLCE の有効性を高めるには肝臓への取り込みの低減が必要と考えられ、親水性を改善することでさらに優れた前立腺がん核医学分子イメージングプローブの開発に繋がることが示唆された。これらの結果より、肝臓への取り込みを改善する余地があるものの、[<sup>123</sup>I]IGLCE が PSMA を標的とした SPECT 用前立腺がん核医学分子イメージングプローブとして有効であることが示された。

### 第三章

## PSMA を標的としたポジトロン断層撮像法用

## 前立腺がん核医学分子イメージングプローブとしての

## $^{18}\text{F}$ 標識非対称ウレア型化合物の開発

ポジトロン断層撮像法 (PET) は高い空間分解能と時間分解能を有する核医学画像診断法であり、悪性腫瘍の核医学診断に用いられる代表的な放射性医薬品として 2-デオキシ-2- $^{18}\text{F}$ フルオロ-D-グルコース ( $^{18}\text{F}$ FDG) がある。しかし、 $^{18}\text{F}$ FDG は前立腺がんへの集積が低く、その集積量と前立腺がんの悪性度は相関しないことが報告されている。そのため、前立腺がんの悪性度と関係する生体内分子を標的とした PET 用分子イメージングプローブの開発は、前立腺がんの質的診断法の確立に有益と考えられる。

第一章では $^{123}\text{I}$ IGLCE を設計し、マレイミド誘導体と非対称ウレア化合物 (Cys-C(O)-Glu) の共役求核付加反応を利用したプローブ設計が、PSMA に対して高い親和性を持つプローブの設計につながることを明らかにした。また第二章では、 $^{123}\text{I}$ IGLCE の SPECT 用核医学分子イメージングプローブとしての有効性を確認すると同時に、親水性を改善することでさらに優れた分子イメージングプローブとなりうることを見出した。そこで、これらの知見に基づき、 $^{123}\text{I}$ IGLCE よりも有効な PSMA 標的核医学分子イメージングプローブの開発を計画した。

ところで、 $^{18}\text{F}$  は適度な半減期 (109 分) を持つ陽電子放出核種であり、病院内の小型サイクロトロンで調製可能であることから、PET 用核種として汎用されている。また、フッ素原子はヨウ素原子よりも極性が高く、ヨウ素原子の代わりにフッ素原子を導入することで、親水性の高い化合物を合成することが可能と考えられる。そこで、本章では $^{123}\text{I}$ IGLCE の誘導体として、 $^{18}\text{F}$  を導入したプローブを数種類設計・合成し、それらの核医学分子イメージングプローブとしての有効性を評価した。

その結果、設計した  $^{18}\text{F}$  標識プローブは *in vitro* 評価において PSMA に対する高い親和性と、

[<sup>123</sup>I]IGLCE よりも高い親水性を示した。さらに、これらの <sup>18</sup>F 標識プローブは *in vivo* 評価において LNCaP への高い集積を認め、その集積は PSMA 阻害薬 2-PMPA を同時投与することで有意に阻害された。また、これらの <sup>18</sup>F 標識プローブの肝臓集積を比較すると、プローブの親水性が高いほど肝臓集積が少なくなる傾向を認め、[<sup>123</sup>I]IGLCE よりも肝臓集積が低いプローブの開発に成功した。さらに、体内分布評価にて特に高い LNCaP への集積を認めたプローブについて、PET/CT 撮像を行ったところ、LNCaP を選択的に描出した。

これらの結果は、親和性と親水性に着目した PSMA 標的分子イメージングプローブ設計の有効性を示すと同時に、設計した <sup>18</sup>F 標識プローブが新規 PET 用 PSMA 標的核医学分子イメージングプローブとなり得ることを示すものと考えられる。