

がんのセラノスティクスに資する

3 官能性放射性薬剤の開発に関する研究

2023

中島 一磨

目 次

緒言	1	
第 1 章	アルブミン結合性を有する 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤の構築	4
第 1 節	前立腺特異的膜抗原を標的とした 3 官能性放射性薬剤の開発	5
1.1.1.	実験方法	8
1.1.2.	結果と考察	17
1.1.3.	小括	27
第 2 節	グルカゴン様ペプチド-1 受容体を標的とした 3 官能性放射性薬剤の開発	28
1.2.1.	実験方法	30
1.2.2.	結果と考察	33
1.2.3.	小括	39
第 2 章	腫瘍集積向上を目的とした 3 官能性放射性抗体薬剤の開発	40
2.1.	実験方法	43
2.2.	結果と考察	54
2.3.	小括	71
結語	72	
引用文献	74	
学術雑誌公表論文	81	
謝辞	82	

緒 言

近年のがん医療において、診断(Diagnostics)と治療(Therapeutics)を組み合わせたセラノスティクス(Theranostics)が高い関心を集めている。セラノスティクスは、患者個人の画像診断の結果に基づき最適な治療プロトコルを提供可能とするテイラーメイド型のがん治療法である。セラノスティクスの中で、放射性同位元素(RI)で標識された放射性薬剤を用いる手法は、ラジオセラノスティクスとして知られている。¹ ラジオセラノスティクスにおいて、生体透過性の高い γ 線を放出する RI で標識された放射性薬剤は、陽電子断層撮像 PET や単光子放出断層撮像 SPECT などの核医学診断法に用いられる。一方で、細胞殺傷性の高い α 線や β 線を放出する RI で標識された放射性薬剤は放射線内用療法を可能にする。導入する RI の変更により核医学診断法・放射線内用療法を使い分けることが可能なラジオセラノスティクス薬剤は、診断・治療において極めて類似した体内放射能分布を示すことが知られている。¹ そのため、高次のセラノスティクスの実現を目的として、ラジオセラノスティクス薬剤の開発が求められている。

生体分子に対して特異的な放射能集積を実現する放射性薬剤の開発を目的として、「標的認識ユニット」と「放射線放出ユニット」から構成される 2 官能性放射性薬剤が幅広く研究されてきた。特に金属配位子 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)は、幅広い金属 RI を配位可能であり、²⁶⁸Ga や ⁸⁹Zr を用いた PET, ¹¹¹In を用いた SPECT, ⁹⁰Y や ¹⁷⁷Lu を用いた β 線内用療法、および ²¹³Bi や ²²⁵Ac を用いた α 線内用療法が可能であることが知られている。³⁻⁶ 複数の金属 RI を用いるラジオセラノスティクス薬剤の開発を目的に、DOTA は放射線放出ユニットとして、低分子から高分子まで多様なモダリティの標的認識ユニットと組み合わせられてきた。⁷ しかし、2 官能性放射性薬剤の放射能動態は標的認識ユニットの特性に大きく依存するため、がん病巣である腫瘍における低い放射能集積や、腫瘍と正常組織における不十分な放射能濃度比により、診断・治療に有用な放射性薬剤の開発が制限されてきた。そこで近年、2 官能性放射性薬剤を「体内動態制御ユニット」の導入により機能化した、3 官能性放射性薬剤が注目されている。体内動態制御ユニットは、腫瘍における放射能集積の増加や正常組織における放射能集積の低減に寄与するため、^{8,9} 3 官能性放射性薬剤の開発により、高精度診断と高効率治療を組み合わせ高次のラジオセラノスティクスの実現が期待される。¹⁰ 本研究では、「標的認識ユニット」、「放射線放出ユニット」、および「体内動態制御ユニット」から成る 3 官能性放射性薬剤の設計概念を基盤とし、多様なモダリティに対する新規 DOTA 含有分子設計基盤の構築を計画した。

低分子リガンドは良好な標的親和性を有する化学構造の報告が多く、放射性薬剤の標的認識ユニットとして盛んに応用されてきた。しかしながら、速やかな全身クリアランスを示すため、低い腫瘍集積性が薬剤開発を制限してきた。近年、体内動態制御ユニットとして、血漿中のアルブミンと可逆的に相互作用するアルブミンバインダー(ALB)の利用が注目を集めている。^{9,11} ALB を有する放射性薬剤は血中滞留性の向上に伴い、腫瘍集積性の増加や腎臓集積性の減少が期待されるため、薬

剤の性能向上が見込まれる。¹²⁻¹³ 一方で、リガンドへの RI および ALB の導入は、従来の合成法では煩雑であり、薬剤開発を妨げる一因になると考えられる。そこで金属配位子 DOTA を基盤骨格に、クリック反応が進行する azadibenzocyclooctyne (ADIBO) 構造、および体内動態制御ユニットとして ALB を導入することで、金属 RI および ALB を簡便にリガンドに導入可能な新規 3 官能性キレート化合物 ADIBO-DOTADG-ALB (ADA) を設計した。金属 RI のモデルとして ¹¹¹In を、低分子アジドリガンドのモデルとして前立腺特異的膜抗原 (PSMA) 標的リガンドを選択し、ADA の低分子モダリティに対する有用性を評価した。ADA を用いた低分子リガンドの放射標識において、¹¹¹In および ALB を同時に高効率で導入することに成功した。また合成した薬剤は、PSMA が高発現した LNCaP 腫瘍を移植したモデルマウスにおいて、ALB の導入による腫瘍集積の向上が認められ、SPECT で腫瘍を明瞭に描出した。これらの結果より、低分子 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤としての ADA の有用性が示された。

また近年における化学合成の技術の進歩に伴い、新たなモダリティとして中分子ペプチドなどの中分子リガンドが注目されている。中分子リガンドは、高分子リガンドと同様の高い標的指向性と低分子リガンドと同様の速やかなクリアランスを特徴としており、¹⁴ その優れた特性を活かして、放射性薬剤における標的指向性ユニットとして利用されるようになった。¹⁵ しかしながら、中分子リガンドの低い熱安定性やペプチドの体内動態に由来する腎臓における高い放射能集積は、中分子放射性薬剤の開発を制限している。¹⁶⁻¹⁷ そこで、グルカゴン様ペプチド-1 受容体 (GLP-1R) を標的とする中分子ペプチドをモデルリガンドとして選択し、ADA について中分子リガンドへの応用性を検討した。ADA を用いた中分子リガンドの放射標識において、¹¹¹In および ALB を温和な条件下で迅速に導入することに成功した。また合成した薬剤は、GLP-1R が高発現した INS-1 腫瘍を移植したモデルマウスにおいて、高い腫瘍集積を示し、SPECT で腫瘍を明瞭に描出した。これらの結果より、ADA が低分子リガンドのみならず、中分子リガンドを用いた 3 官能性放射性薬剤の開発にも応用可能であることが示された。

モノクローナル抗体 (mAb) をはじめとする高分子リガンドは、低・中分子リガンドと比較して極めて高い標的特異性と安定性を特徴とする。そのため、mAb を RI のキャリアとする放射性抗体薬剤 (RIC) が開発されてきた。¹⁸ しかしながら mAb は血中滞留性を示すため、腫瘍と血液における放射能濃度比の改善が課題となっている。¹⁹ 低・中分子モダリティに対して有効性を示した ALB は、薬剤の分子量を増大させることにより体内動態を改善するため、高分子モダリティに対する有用性は期待されない。そこで、腫瘍細胞内における放射能滞留性の向上を目的として、DOTA を基盤骨格に、チオール基と反応するマレイミド基、および正電荷による細胞内滞留性の向上を期待した新規体内動態制御ユニットであるポリエチレンイミン (PEI) 構造を導入した、3 官能性キレート化合物 maleimide-DOTA-PEI (MDI) を設計した。ヒト上皮成長因子受容体 2 型 (HER2) / neu 標的のトラスツマブをモデル抗体として選択し、ジエチレントリアミン (PEI2) を導入した MDI2、およびテトラエチ

レンペンタミン(PEI4)を導入した MDI4 について、高分子モダリティに対する有用性を評価した。MDIは抗体の抗原認識能を維持した放射標識に成功した。MDIを用いて合成したRICは、HER2/*neu*が高発現した SK-OV-3 細胞に対して、PEI の導入により高い細胞内滞留性を示した。また SK-OV-3 腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験では、PEI の導入による腫瘍集積の増加傾向が認められた。特に MDI2 を用いて合成した RIC は良好な体内放射能分布を示し、SPECT で腫瘍を明瞭に描出した。これらの結果より、高分子 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤としての MDI2 の有用性が示された。

以上、本研究は低分子から高分子まで多様なモダリティを用いたセラノスティクスに対して有用な 3 官能性放射性薬剤の開発に成果を収めたものであり、これらの知見は今後のラジオセラノスティクス薬剤の開発研究の発展に貢献すると考えられる。

第 1 章

アルブミン結合性を有する 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤の構築

背景

腫瘍の画像診断および放射線内用療法を用途とする放射性薬剤において、腫瘍における放射能集積および腫瘍と正常組織における放射能濃度比は薬剤の有用性を決定する重要な指標である。特に金属配位子を有する放射性薬剤は、金属 RI と配位子が形成する水溶性の高い錯体構造により、主に腎排泄を受けるため、腎臓における非特異的放射能集積が課題となってきた。²⁰ そこで、腫瘍集積性の増加や腎臓集積性の低減を目的として、放射性薬剤の体内動態制御に関する研究が進められてきた。最も一般的な手法として知られる Lysine や Gelofusine などの薬剤を放射性薬剤と併用する戦略は、腎臓における放射性薬剤の再吸収を抑制することに成功しており、²¹⁻²² 臨床試験においてもその有効性が認められている。¹⁶ しかしこれらの手法においては、薬剤投与に伴う腎毒性が問題視されており、²³⁻²⁴ 放射性薬剤の分子設計による放射能分布の制御を目的とした、「体内動態制御ユニット」を用いる戦略が近年有望視されている。特に、血漿中のアルブミンと相互作用する低分子構造であるアルブミンバインダー(ALB)は、最も利用されている体内動態制御ユニットの一つである。^{9,25} ALB を有する放射性薬剤は、血漿中のアルブミンと可逆的に結合することで血中滞留性が向上し、その結果、腫瘍に送達される放射エネルギーが向上することが知られている。また見かけの分子量の増大により、腎臓における糸球体ろ過を回避することで、腎臓集積性の低減も期待される。以上の優れた特性から、アルブミンと分子量の大きく異なる低・中分子放射性薬剤において、ALB を有する 3 官能性放射性薬剤の開発が求められている。

一方、体内動態制御ユニットの導入による機能化は、放射性薬剤の化学合成を難化させるため、新薬開発を制限する要因となりうる。加えて、金属配位子を用いた放射標識は高温での加熱を要するため、熱に対して不安定なリガンドへの応用は困難である。これらの課題を解決するためには、リガンドの機能化と放射標識を簡便かつ温和な条件下において達成可能な、新規分子設計基盤の開発が重要であると考えられる。そこで、高い反応性により低温・中性環境下で迅速に反応が進行するクリック反応を用いることで、²⁶ 幅広いリガンドの化学修飾が可能になると考えた。以上を踏まえ、「クリック反応部位」、「金属配位子」、および「アルブミン結合部位」の 3 つの部位から構成される、新規 3 官能性キレート化合物の開発を計画した。低・中分子リガンドに対するキレート化合物の有用性評価を通して、3 官能性放射性薬剤の開発における分子設計基盤としての有用性を検証した。

第1節

前立腺特異的膜抗原を標的とした3官能性放射性薬剤の開発

前立腺がんは男性において極めて発症リスクの高いがんである。²⁷ 特に転移性去勢抵抗性前立腺がん(mCRPC)は、標準療法であるアンドロゲン遮断療法に対して抵抗性を示す悪性度の高いがんであり、²⁸ 新規治療法の確立が強く求められている。前立腺特異的膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)は、前立腺がんの悪性度に相関して発現が亢進することが知られるがんバイオマーカーである。²⁹⁻³⁰ PSMA 標的ラジオセラノスティクスは mCRPC の新規治療法として注目されており、それに資する放射性薬剤の開発が重要であると考えられる。Lys-Glu urea 構造は PSMA 結合性を有する低分子リガンドとして、³¹ 多くの放射性薬剤に応用されてきた。³²⁻³⁴ しかしながら、低分子モダリティに特有の速やかな全身クリアランスにより、腫瘍において低い放射能滞留性を示すため、その改善を目的とした放射性薬剤の開発が行われてきた。³⁵⁻³⁸ そこで Lys-Glu urea 構造を低分子モダリティのモデルリガンドとして選択し、ALB を有する分子設計基盤の有用性評価に用いることにした。

ALB に関して、芳香族ハロゲン化物、蛍光分子、脂肪酸など、様々な構造が研究されてきた。²⁵ その中で、lysine-*p*-(iodophenyl)butyric acid (Lys-IPBA)構造の ALB は良好なアルブミン結合性を示し、³⁹ 最も汎用されている。先行研究において、Lys-IPBA を導入した PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積性に顕著な向上が認められており、ALB の導入が PSMA 標的薬剤の動態改善に有用であることが示されている。⁴⁰⁻⁴¹ 加えて、葉酸受容体やインテグリン $\alpha_v\beta_6$ などの他のがんバイオマーカーを標的とするリガンドにおいても、IPBA 構造の有用性が報告されている。⁴²⁻⁴³ そこで、Lys-IPBA の汎用性を考慮して、分子設計基盤における ALB 構造として選択した。

また分子設計基盤におけるクリック反応部位として、アジド基とクリック反応が進行する azadibenzocyclooctyne (ADIBO)構造を選択した。ADIBO が有するひずみアルキン構造により進行するひずみ促進型アジド-アルキン環化付加反応は、温和な条件下において迅速に反応が進行する特徴を有する。⁴⁴ また、ひずみを有さないアルキン構造とアジド基との間で進行するヒュスゲン環化付加反応とは異なり、DOTA に配位してしまう銅触媒を必要としない点も特徴である。²⁶ これらの優れた特徴から、ADIBO は金属配位子を有する分子設計基盤に高い適合性を示すと考えられる。

分子設計基盤として ADIBO, DOTA, および Lys-IPBA を組み合わせた 3 官能性キレート化合物は、各部位が効果的に機能する化学構造でなければならない。さらに、リガンド導入後の化学構造においても、がんバイオマーカーと結合するリガンド、およびアルブミンと結合する Lys-IPBA の間に立体障害を生じない、適切な三次元的配置が求められる。そこで、金属配位子 DOTA が水平な化学構造であることに着目し、DOTA の対角に ADIBO および Lys-IPBA を導入することで、効率的に各部位が機能する薬剤設計が可能であると考えた。グルタミン酸による化学修飾部位を対角に有する DOTA 誘導体である DOTADG を用いて、⁴⁵ 3つのユニットを直線状に配置した 3 官能性キレート化合物 ADIBO-DOTADG-ALB (ADA)を設計した(**Figure 1-1a**)。ADA のクリック反応性を利用することで、pre-labeling 法と pre-click 法の 2 種の放射標識法が選択可能になる(**Figure 1-2**)。Pre-labeling 法

は、ADA の放射標識を行った後にリガンドとのクリック反応を行う 2 段階放射標識法であり、金属 RI を導入する際の高温条件をリガンドが回避できるため、温和な条件下でのリガンドの放射標識が可能である。一方、pre-click 法は、先にリガンドをクリック反応で導入した後に放射標識を行う手法であり、熱に安定なリガンドにおいて、1 段階の放射標識により簡便に目的標識体を得ることができる。2 種の放射標識法により、幅広いリガンドに対する ADA の有用性が期待される。

本節では、低分子モダリティに対する ADA の有用性を評価する目的で、低分子リガンドのモデルとして Lys-Glu urea 構造を基盤骨格とした PSMA 標的リガンド PSMA-ligand azide を、金属 RI のモデルとして ^{111}In を選択した。また目的標識体は PSMA ligand-triazole- ^{111}In In-DOTADG-ALB (^{111}In In-PtDA) と呼称した(**Figure 1-1b**)。加えて、ALB を有さないコントロール化合物として、PSMA ligand-triazole- ^{111}In In-DOTADG (^{111}In In-PtD) を設計した(**Figure 1-1c**)。ADA を用いた放射標識の検討および合成した 3 官能性放射性薬剤の有用性評価を通して、低分子 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤としての ADA の有用性を検証した。

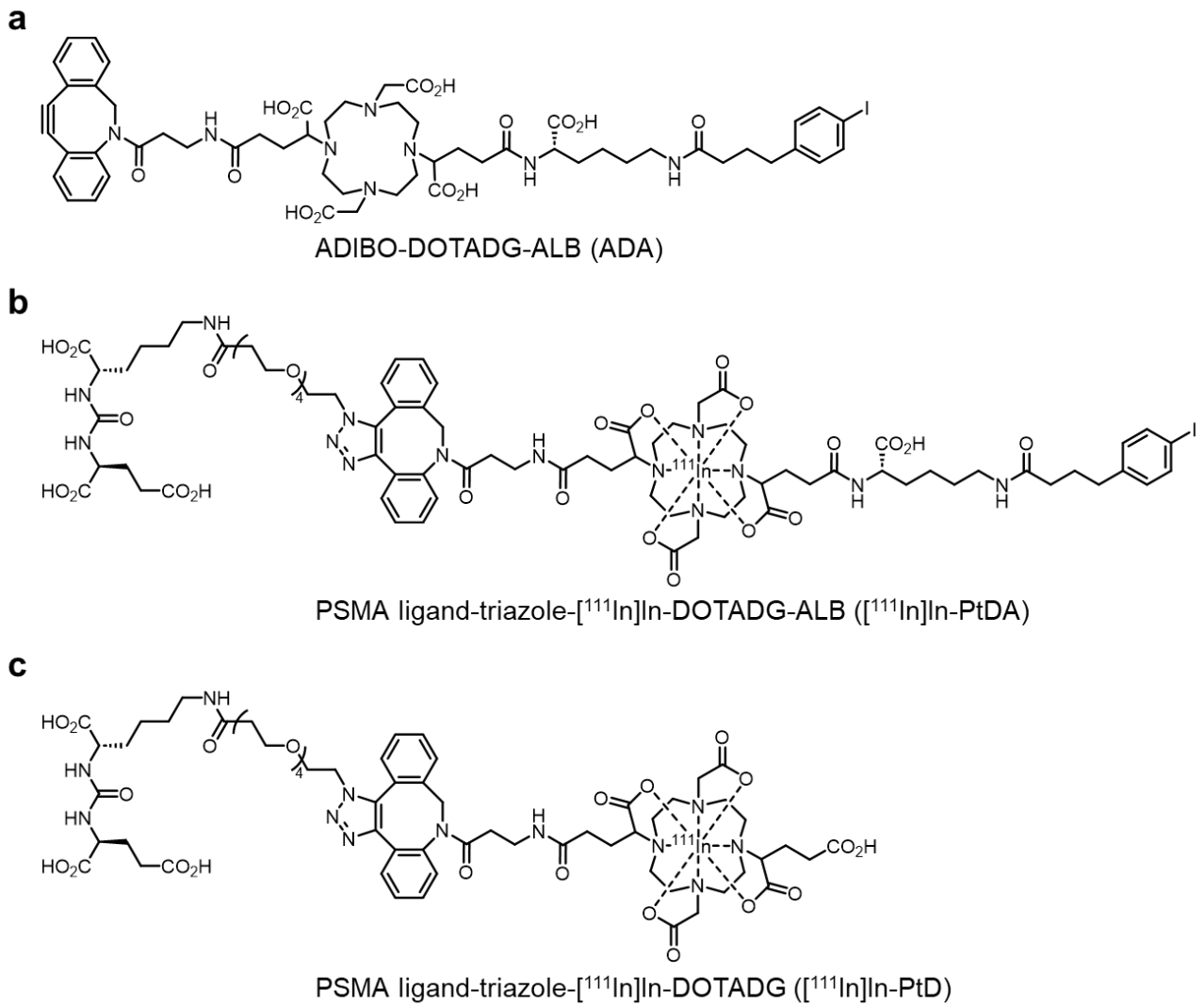


Figure 1-1. Chemical structures of ADA (a), [¹¹¹In]In-PtDA (b), and [¹¹¹In]In-PtD (c).

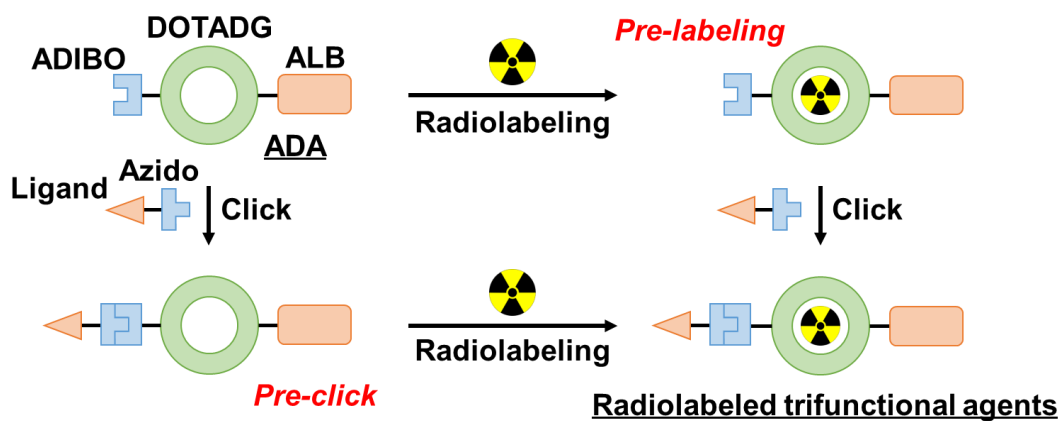


Figure 1-2. Two routes of radiolabeling using ADA.

1.1.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、大阪薬研株式会社、東京化成工業株式会社、ナカライテスク株式会社、富士フイルム和光純薬株式会社、渡辺化学工業株式会社、Angene International Limited 社、BLD Pharmatech 社、および Sigma-Aldrich 社から購入した。中圧分取液体クロマトグラフィーには、山善株式会社製自動設定中圧分取液体クロマトグラフシステム[EPCLC-W-Prep 2XY; 送液ポンプ(ミキサー内蔵): No. 580D, 検出器(波長固定型): prep UV-254W, フラクションコレクター: FR-260]を使用し、HI-FLASH COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 μm, カラムサイズ: L または 2L) および INJECT COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 μm, カラムサイズ: M または L) を装着した。核磁気共鳴分光法(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)には、日本電子株式会社製 JNM-ECS400 を用い、テトラメチルシランを内部標準物質として測定した。ピークのカップリングは一重線を s, 二重線を d, 三重線を t, 多重線を m と記載した。エレクトロスプレーイオン化質量分析(electrospray ionization mass spectrometry, MS [ESI])を行う場合は株式会社島津製作所の LCMS-2020 を、エレクトロスプレーイオン化高分解能質量分析(electrospray ionization high-resolution mass spectrometry, HRMS [ESI])には、株式会社島津製作所の LCMS-IT-TOF を用いた。高速液体クロマトグラフィー(high-performance liquid chromatography, HPLC)には、送液ポンプとして株式会社島津製作所製 LC-20AD または LC-20AT を使用し、検出器として株式会社島津製作所製紫外スペクトル検出器 SPD-20A と、日立アロカメディカル株式会社製シンチレーションサーベイメーター TCS-172 またはユニバーサル技研株式会社製 HPLC 用放射線検出器 US-3000T を使用した。逆相 HPLC 用カラムは、ナカライテスク株式会社製 Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm, 10 mm I.D. × 250 mm, または 20 mm I.D. × 250 mm) を使用した。 [¹¹¹In]InCl₃ は、日本メジフィジックス株式会社より購入した。放射能の測定には、パーキンエルマー株式会社製ガンマカウンター 2470 WIZARD², および ALOKA 社製キュリーメーター IGC-7 を用いた。

合成

tert-Butyl-*N*²-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*N*⁶-((4-methylphenyl)diphenylmethyl)-L-lysinate (**1**)

*N*²-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*N*⁶-((4-methylphenyl)diphenylmethyl)-L-lysine (2.0 g, 3.2 mmol, 1.0 equiv) の無水ジクロロメタン(20 mL)溶液に、*tert*-butyl-2,2,2-trichloroacetimidate (1.2 g, 5.5 mmol, 1.7 equiv) および BF₃·OEt₂ (50 μL) を加え、室温で 70 時間攪拌した。反応溶液をろ過した後、ろ液の溶媒を減圧留去した。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 3/1) で精製し、目的物 **1** を収量 1.2 g (55%) で得た。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 4H), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.27–7.19 (m, 6H), 7.16–7.10 (m, 2H), 7.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.36 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.28–4.22 (m, 1H), 4.18 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.19–2.07 (m, 2H), 1.82–1.73 (m, 1H), 1.64–1.56 (m, 1H), 1.53–1.34 (m, 13H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.6 (1C),

155.7 (1C), 146.3 (2C), 143.8 (1C), 143.7 (1C), 143.2 (1C), 141.1 (2C), 135.4 (1C), 128.4–128.3 (8C), 127.6–127.5 (6C), 126.9 (2C), 126.0 (2C), 125.0 (2C), 119.8 (2C), 81.7 (1C), 70.5 (1C), 66.7 (1C), 54.1 (1C), 47.1 (1C), 43.2 (1C), 32.7 (1C), 30.4 (1C), 27.8 (3C), 22.8 (1C), 22.5 (1C). HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{45}H_{49}N_2O_4^+$, 681.3687 [M + H]⁺; found, 681.3677

tert-Butyl-*N*²-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*L*-lysinate (**2**)

化合物 **1** (1.2 g, 1.8 mmol)のジクロロメタン(8.1 mL)溶液に, トリイソプロピルシラン(TIPS) (500 μ L)およびトリフルオロ酢酸(TFA) (400 μ L)を加え, 室温で終夜攪拌した. 溶媒を減圧留去した後, 残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 81/19)で精製し, 目的物 **2** を収量 744 mg (100%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.36 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.28 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 4.35–4.27 (m, 2H), 4.18 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.98 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.88–1.53 (m, 6H), 1.46–1.38 (m, 11H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171.5 (1C), 156.2 (1C), 143.6 (2C), 141.1 (2C), 127.6 (2C), 127.0 (2C), 125.0 (2C), 119.8 (2C), 82.3 (1C), 66.9 (1C), 54.1 (1C), 46.9 (1C), 39.5 (1C), 31.9 (1C), 27.7 (3C), 26.8 (1C), 22.1 (1C). HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{25}H_{33}N_2O_4^+$, 425.2435 [M + H]⁺; found, 425.2437

tert-Butyl-*N*²-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*N*⁶-(4-(4-iodophenyl)butanoyl)-*L*-lysinate (**3**)

4-(4-Iodophenyl)butanoic acid (754 mg, 2.6 mmol, 1.2 equiv)の無水 *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF) (10 mL)溶液に, 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (498 mg, 2.6 mmol, 1.2 equiv)および 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) (354 mg, 2.6 mmol, 1.2 equiv)を 0 °C で加え, 15 分間攪拌した. 反応溶液に化合物 **2** (934 mg, 2.2 mmol, 1.0 equiv)およびトリエチルアミン(263 mg, 2.6 mmol, 1.2 equiv)を 0 °C で加え, 室温で終夜攪拌した. 反応溶液に超純水を加え, 酢酸エチルで抽出した. 有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後, ろ過し, ろ液の溶媒を減圧留去した. 残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 3/7)で精製し, 目的物 **3** を収量 1.0 g (66%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.61–7.53 (m, 4H), 7.40 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.31 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.42–4.29 (m, 2H), 4.26–4.17 (m, 2H), 3.27–3.17 (m, 2H), 2.53 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.10 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.96–1.59 (m, 6H), 1.49–1.42 (m, 11H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.8 (1C), 171.5 (1C), 156.0 (1C), 143.6 (1C), 143.4 (1C), 141.0 (1C), 140.9 (2C), 137.1 (2C), 130.4 (2C), 127.5 (2C), 126.9 (2C), 124.9 (2C), 119.8 (2C), 90.8 (1C), 82.0 (1C), 66.8 (1C), 53.9 (1C), 46.9 (1C), 38.9 (1C), 35.4 (1C), 34.4 (1C), 32.1 (1C), 28.6 (1C), 27.8 (3C), 26.7 (1C), 22.2 (1C). HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{35}H_{42}IN_2O_5^+$, 697.2133 [M + H]⁺; found, 697.2130

tert-Butyl-N⁶-(4-(4-iodophenyl)butanoyl)-L-lysinate (4)

化合物 **3** (226 mg, 0.32 mmol)の無水 DMF (4 mL)溶液にピペリジン(1 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。反応溶液に超純水(100 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル (5/1, 100 mL × 2)で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、ろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去した。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=93/7)で精製し、目的物 **4** を収量 133 mg (87%)で得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.32–3.27 (m, 1H), 3.26–3.19 (m, 2H), 2.61–2.54 (m, 2H), 2.16–2.09 (m, 2H), 1.96–1.87 (m, 2H), 1.80–1.64 (m, 4H), 1.55–1.43 (m, 11H).
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.2 (1C), 172.3 (1C), 141.1 (1C), 137.3 (2C), 130.5 (2C), 90.9 (1C), 80.9 (1C), 54.7 (1C), 39.1 (1C), 35.6 (1C), 34.6 (1C), 34.3 (1C), 29.2 (1C), 28.0 (3C), 26.8 (1C), 22.9 (1C). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₃₂IN₂O₃⁺, 475.1453 [M + H]⁺; found, 475.1453

4,4'-(4,10-Bis(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)bis(5-(tert-butoxy)-5-oxopentanoic acid) (5)

化合物 **5** は、1,4,7,10-tetraazacyclododecane を出発原料に、既報に従って合成した。⁴⁵

4-(4,10-Bis(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-7-(1-(tert-butoxy)-5-(((S)-1-(tert-butoxy)-6-(4-(4-iodophenyl)butanamido)-1-oxohexan-2-yl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(tert-butoxy)-5-oxopentanoic acid (6)

化合物 **5** (317 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv)の無水 DMF (2 mL)溶液に、1-((1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylaminomorpholino)uronium hexafluorophosphate (COMU) (176 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv)を 0 °C で加え、15 分間攪拌した。反応溶液に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA) (53 mg, 0.41 mmol, 1.2 equiv)を 0 °C で加え、15 分間攪拌した。その後、反応溶液に化合物 **4** (163 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv)を 0 °C で加え、室温で終夜攪拌した。反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (20 mm I.D. × 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [70/30/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)], 流速 5.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、目的物 **6** を収量 229 mg (55%)で得た。HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₅₈H₉₈IN₆O₁₄⁺, 1229.6181 [M + H]⁺; found, 1229.6182

ADIBO-DOTADG-ALB (ADA) (7)

化合物 **6** (50 mg, 41 μmol, 1.0 equiv)の無水アセトニトリル(400 μL)溶液に、COMU (70 mg, 0.16 mmol, 4.0 equiv)を 0 °C で加え、15 分間攪拌した。反応溶液に DIPEA (27 mg, 0.21 mmol, 5.0 equiv)を 0 °C で加え、15 分間攪拌した。その後、反応溶液に *N*-hydroxysuccinimide (19 mg, 0.16 mmol, 4.0 equiv)を 0 °C で加え、室温で終夜攪拌した。反応溶液に氷冷した超純水(100 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル (5/1, 100 mL × 2)で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、ろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去した。残渣を TFA (1.9 mL), チオアニソール(60 μL), および TIPS (40 μL)の混合溶液に溶解させ、室温で6時間攪拌した後、TFA (1 mL)を添加し、さらに室温で11時間攪拌した。溶媒を留去し

た後、残渣の半量(21 μmol , 0.5 equiv)を無水 DMF (400 μL)およびトリエチルアミン(7.3 mg, 72 μmol , 1.8 equiv)の混合溶液に溶解させ、ADIBO-NH₂ (6.2 mg, 23 μmol , 0.55 equiv)を加えた。反応溶液を室温で 24 時間攪拌後、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、目的物 **7** を収量 6.7 mg (27%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₅₆H₇₂IN₈O₁₄⁺, 1207.4208 [M + H]⁺; found, 1207.4213

ADIBO-[^{nat}In]In-DOTADG-ALB ([^{nat}In]In-ADA) (**8**)

化合物 **7** (1.0 equiv)を酢酸緩衝液(1.0 M, pH 5.0, 100 μL)に溶解させ、塩化インジウム(III)無水和物 (10 equiv)を加えた。反応溶液を 90 °C で 5 分間加熱した後、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、目的物 **8** を得た。MS (ESI) m/z calcd for C₅₆H₆₉I¹¹⁵InN₈O₁₄⁺, 1319.3 [M + 2H]⁺; found, 1319.3

Tri-*tert*-butyl-(2*S*,25*S*)-1-azido-15,23-dioxo-3,6,9,12-tetraoxa-16,22,24-triazaheptacosane-21,25,27-tricarboxylate (**9**)

(*S*)-Di-*tert*-butyl 2-(3-((*S*)-6-amino-1-*tert*-butoxy-1-oxohexan-2-yl)ureido)pentanedioate (31 mg, 64 μmol , 1.0 equiv)の無水 DMF (500 μL)溶液に、azido-PEG₄-NHS ester (25 mg, 64 μmol , 1.0 equiv)を加えた。反応溶液を室温で 12 時間攪拌後、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [70/30/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (30 min)]), 流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、目的物 **9** を収量 35 mg (72%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.27–4.20 (m, 2H), 3.75 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.69–3.63 (m, 14H), 3.41 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.38–3.15 (m, 2H), 2.59 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.34 (doublet of triplets, J = 2.3, 7.5 Hz, 2H), 2.11–1.60 (m, 4H), 1.54 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.48–1.42 (m, 27H), 1.39–1.26 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.3 (2C), 172.8 (2C), 158.4 (1C), 82.7 (1C), 82.4 (1C), 81.2 (1C), 70.4 (2C), 70.3 (1C), 70.1 (1C), 70.0 (2C), 69.9 (1C), 66.8 (1C), 53.7 (1C), 53.3 (1C), 50.5 (1C), 39.2 (1C), 35.8 (1C), 31.5 (1C), 31.3 (1C), 28.2 (1C), 27.9 (3C), 27.8 (7C), 21.9 (1C). HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₅H₆₅N₆O₁₂⁺, 761.4655 [M + H]⁺; found, 761.4656

PSMA-ligand azide (**10**)

化合物 **9** (23 mg, 30 μmol)を TFA (950 μL)および TIPS (50 μL)の混合溶液に溶解させ、室温で 4 時間攪拌した。溶媒を留去した後、残渣を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 60/40/0.1 (30 min)]), 流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、目的物 **10** を収量 11 mg (63%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (s, 1H), 6.37 (s, 2H), 4.39 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 3.94–3.54 (m, 16H), 3.40 (s, 2H), 2.70–1.16 (m, 14H). HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₃H₄₁N₆O₁₂⁺, 593.2777 [M + H]⁺; found, 593.2779

Di-tert-butyl-2,2'-(4-(1-(tert-butoxy)-5-(((S)-1-(tert-butoxy)-6-(4-(4-iodophenyl)butanamido)-1-oxohexan-2-yl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-10-(1-tert-butoxy)-5-((3-(11,12-didehydridibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-3-oxopropyl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (**11**)

化合物 **6** (106 mg, 86 μmol , 1.0 equiv)の無水 DMF (600 μL)溶液に, COMU (147 mg, 0.34 mmol, 4.0 equiv)を 0 °C で加え, 15 分間攪拌した. 反応溶液に DIPEA (89 mg, 0.69 mmol, 8.0 equiv)を 0 °C で加え, 15 分間攪拌した. その後, 反応溶液に dibenzocyclooctyne-amine (ADIBO-NH₂) (59 mg, 0.22 mmol, 2.5 equiv)を 0 °C で加え, 室温で 12 時間攪拌した. 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (20 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [80/20/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (35 min)]), 流速 5.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 目的物 **11** を収量 51 mg (40%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₆H₁₁₂In₈O₁₄⁺, 1487.7338 [M + H]⁺; found, 1487.7351

PSMA ligand-triazole-DOTADG-ALB (PtDA) (**12**)

化合物 **11** (15 mg, 9.7 μmol , 1.0 equiv)の無水 DMF (200 μL)溶液に化合物 **9** (7.4 mg, 9.7 μmol , 1.0 equiv)を加え, 室温で 48 時間攪拌した. 溶媒を減圧留去した後, 残渣を TFA (950 μL), チオアニソール (30 μL), TIPS (10 μL), および超純水(10 μL)の混合溶液に溶解させ, 室温で終夜攪拌した. 溶媒を留去した後, 残渣を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [70/30/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]), 流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 目的物 **12** を収量 0.5 mg (2.9%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₉H₁₁₃In₁₄O₂₆²⁺, 900.3492 [M + 2H]²⁺; found, 900.3488

PSMA ligand-triazole-[^{nat}In]In-DOTADG-ALB ([^{nat}In]In-PtDA) (**13**)

化合物 **12** (0.5 mg, 0.28 μmol , 1.0 equiv)を H₂O/MeCN/TFA (50/50/0.1)の混合溶媒(300 μL)に溶解させた後, 塩化インジウム(III)無水和物(0.62 mg, 2.8 μmol , 10 equiv)を加えた. 反応溶液を室温で終夜攪拌した後, Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 目的物 **13** を収量 0.05 mg (9.4%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₉H₁₁₀I¹¹⁵InN₁₄O₂₆²⁺, 956.2894 [M + 3H]²⁺; found, 956.2893

4-(7-(5-((3-(1-((2*S*,2*S*)-21,25-Bis(tert-butoxycarbonyl)-30,30-dimethyl-15,23,28-trioxo-3,6,9,12,29-pentaoxa-16,22,24-triazahentriacontyl)-1,9-dihydro-8*H*-dibenzo[*b,f*]-1,2,3-triazolo[4,5-*d*]azocin-8-yl)-3-oxopropyl)amino)-1-(tert-butoxy)-1,5-dioxopentan-2-yl)-4,10-bis(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(tert-butoxy)-5-oxopentanoic acid (**14**)

化合物 **5** (80 mg, 0.10 mmol, 2.4 equiv)の無水 DMF (400 μL)溶液に, COMU (23 mg, 53 μmol , 1.2 equiv)を 0 °C で加え, 15 分間攪拌した. 反応溶液に DIPEA (6.8 mg, 53 μmol , 1.2 equiv)を 0 °C で加え, 15 分間攪拌した. その後, 反応溶液に ADIBO-NH₂ (12 mg, 43 μmol , 1.0 equiv)を 0 °C で加え, 室温で 10 時間攪拌した. 反応溶液に逆相 HPLC 精製前の化合物 **9** (ideally 43 μmol , 1.0 equiv)を加えた後, 室温

で 24 時間攪拌した。反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)および移動相 (H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 目的物 **14** を収量 7.8 mg (11%)で得た。HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₉₁H₁₄₈N₁₂O₂₄²⁺, 896.5359 [M + 2H]²⁺; found, 896.5318

PSMA-triazole-DOTADG (PtD) (15)

化合物 **14** (2.4 mg, 1.3 μmol)を TFA (1.9 mL), チオアニソール(60 μL), TIPS (20 μL), および超純水 (20 μL)の混合溶液に溶解させ, 室温で 13 時間攪拌した。溶媒を留去した後, 残渣を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 目的物 **15** を収量 0.46 mg (25%)で得た。HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₆₃H₉₂N₁₂O₂₄²⁺, 700.3168 [M + 2H]²⁺; found, 700.3143

PSMA-triazole-[^{nat}In]In-DOTADG ([^{nat}In]In-PtD) (16)

化合物 **15** (0.25 mg, 0.18 μmol, 1.0 equiv)を H₂O/MeCN/TFA (50/50/0.1)の混合溶媒(150 μL)に溶解させた後, 塩化インジウム(III)無水和物(0.40 mg, 1.8 μmol, 10 equiv)を加えた。反応溶液を室温で 72 時間攪拌した後, Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 目的物 **16** を収量 0.27 mg (100%)で得た。HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₆₃H₈₉I¹¹⁵InN₁₂O₂₄²⁺, 756.2570 [M + 3H]²⁺; found, 756.2541

¹¹¹In 標識反応

[¹¹¹In]In-ADA を介する Pre-labeling 法および介さない Pre-click 法の 2 種類の ¹¹¹In 標識法を実施した。

Pre-labeling 法

[¹¹¹In]In-ADA

2-(*N*-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES)緩衝液(0.1 M, pH 5.7, 100 μL)に化合物 **7** のジメチルスルホキシド(DMSO)溶液(0.55 mM, 7 μL)と [¹¹¹In]InCl₃ 溶液(9.2 MBq, 100 μL)を加え, 90 °C で 5 分間加熱した。その後, 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製した。

[¹¹¹In]In-PtDA

リン酸緩衝生理食塩水(PBS)/DMSO 混合液(9/1, 200 μL)または DMSO (200 μL)に [¹¹¹In]In-ADA (0.80 MBq)を加え, 化合物 **10** (0.20 mg)をさらに加えた。37 °C で 10 または 30 分間加熱した後, 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製した。

Pre-click 法

[¹¹¹In]In-PtDA

MES 緩衝液(0.1 M, pH 5.7, 150 μ L)に化合物 **12** の DMSO 溶液(0.56 mM, 2 μ L)と [¹¹¹In]InCl₃ 溶液(2.1 MBq, 100 μ L)を加え, 90 °C で 5 分間加熱した. その後, 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製した.

[¹¹¹In]In-PtD

MES 緩衝液(0.1 M, pH 5.7, 150 μ L)に化合物 **15** の DMSO 溶液(0.71 mM, 2 μ L)と [¹¹¹In]InCl₃ 溶液(3.8 MBq, 50 μ L)を加え, 90 °C で 10 分間加熱した. その後, 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製した.

LogP 値測定

1-オクタノール(3 mL)および PBS (pH 7.4, 3 mL)が入った遠沈管に [¹¹¹In]In-PtDA (111 kBq)を加え, 2 分間攪拌した後, 4,000 \times g で 5 分間遠心分離した. 各層から 1 mL ずつ溶液を回収した後, それぞれの放射能を測定した. さらに残りの PBS 層から 1 mL を別の遠沈管に移し, 1-オクタノール(3 mL)および PBS (2 mL)を加えた後, 攪拌, 遠心分離, および放射能測定の一連の操作を二度繰り返した. 分配係数は 1-オクタノールおよび PBS における放射エネルギーの比から算出した.

細胞培養

PSMA が高発現したヒト前立腺がん細胞である LNCaP 細胞および低発現の PC-3 細胞は, American Type Culture Collection 社および DS Pharma Biomedical 社より購入した. 細胞は抗生物質(ペニシリンおよびストレプトマイシン) 100 U/mL および非働化ウシ胎児血清(FBS) 10 v/v%を含むナカライテスク株式会社製 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)中, 37 °C, 5 v/v% CO₂ 下で培養した.

動物

動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を得, その指針を遵守して行った. ddY 系雄性マウスおよび雄性 CB17/IcrJcl-Prkdc^{scid} マウスは, それぞれ清水実験材料株式会社および日本クレア株式会社より購入した. 動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し, 飼料と水は自由に与えた.

体内放射能分布実験で使用するモデルマウスは, RPMI 1640 と Corning Life Sciences 社製 Matrigel の混合液(1:1, 150 μ L)に LNCaP 細胞(1×10^7 cells/mouse)を懸濁させ, イソフルラン(2 v/v%)麻酔下, CB17/IcrJcl-Prkdc^{scid} マウスの右肩に皮下移植することで作製した. また SPECT/CT 撮像で使用するモデルマウスは, RPMI 1640 と Matrigel の混合液(1:1, 150 μ L)に LNCaP 細胞(1×10^7 cells/mouse)また

は PC-3 細胞(1×10^7 cells/mouse)を懸濁させ、麻酔下、CB17/IcrJcl-Prkdc^{scid} マウスの右肩および左肩にそれぞれ皮下移植することで作製した。実験には腫瘍径が 0.8–1.2 cm に達したマウスを使用した。

マウス血漿を用いた安定性評価

ddY 系雄性マウスより採取した血液を日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製 BD バキュエイト採血管に回収し、 $1,200 \times g$ で 10 分間遠心分離した後、上清を回収することで血漿を得た。血漿 (200 μ L)に $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ (259 kBq)の生理食塩水溶液(20 μ L)を加え、37 °C で 24 時間振とうした(n = 3)。アセトニトリル(400 μ L)を加え、 $10,000 \times g$ で 5 分間遠心分離した後、上清をナカライテスク株式会社製コスモナイスフィルターS (0.45 μ m, 4 mm)でろ過した。ろ液の溶媒を窒素またはアルゴンガス気流下で留去した後、残存している放射性化合物を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm) および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で分析した。

細胞結合実験

LNCaP 細胞および PC-3 細胞をそれぞれ 4.0×10^5 cells/well にて 12 ウェルプレートに播種し、37 °C, 5 v/v% CO₂ 環境下で 48 時間培養した。培地を除去した後、各ウェルに $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ (37 kBq)を含むアッセイ用培地(0.5 v/v% FBS 含有 RPMI 1640)溶液(1 mL)を加えた。また非特異的結合を評価する目的で、終濃度 100 μ M の 2-(phosphonomethyl)pentanedioic acid (2-PMPA)を添加したウェルも別に用意した。その後、プレートを 37 °C, 5 v/v% CO₂ 環境下で 1 時間静置した。アッセイ用培地を除去後、各ウェルを ¹¹¹In 標識体および 2-PMPA 非含有のアッセイ用培地(1 mL)で洗浄し、1 N 水酸化ナトリウム水溶液(200 μ L \times 2)で細胞を溶解させた。¹¹¹In 標識体を含むアッセイ用培地(1 mL, 37 kBq)および細胞溶解液の各放射能をガンマカウンターで測定した後、細胞溶解液中の総タンパク質濃度を Thermo Fisher Scientific 社製 BCA Protein Assay Kit を用いて算出した。添加放射エネルギーに対するサンプルの放射能百分率(% initial activity)を総タンパク質量で除した値(% initial activity/mg protein)をウェルごとに算出した。

細胞結合飽和実験

LNCaP 細胞を 2.0×10^5 cells/well にて 12 ウェルプレートに播種し、37 °C, 5 v/v% CO₂ 環境下で 48 時間培養した。培地を除去した後、各ウェルに終濃度 100–0.79 nM の $[^{111}\text{natIn}]\text{In-PtDA}$ を含むアッセイ用培地溶液(1 mL)を加えた。また非特異的結合を評価する目的で、終濃度 100 μ M の 2-PMPA を添加したウェルも別に用意した。その後、プレートを 4 °C, 5 v/v% CO₂ 環境下で 2 時間静置した。アッセイ用培地を除去後、細胞結合実験と同様の操作を行い、サンプルの放射能を総タンパク質量で除した値(kDPM (disintegrations per minute)/mg protein)をウェルごとに算出した。GraphPad Software 社製 GraphPad Prism 6 を用いた解析により、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ の K_d 値を算出した。

アルブミン結合実験

[¹¹¹In]In-PtDA または [¹¹¹In]In-PtD の PBS 溶液(37 kBq, 50 μ L)を, ヒト血清アルブミン(HSA)含有(45 mg/mL)または非含有の PBS 溶液(200 μ L)に加え, 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした(n = 3). その後, 各溶液の一部(100 μ L)をスピнкаラム(サイティバ社製 Sephadex G-50)に添加し, 1,500 \times g で 2 分間遠心分離した. 遠心分離後, カラムと溶出液の放射能をそれぞれガンマカウンターで測定した. アルブミンに結合し複合体を形成した ¹¹¹In 標識体は, 分子サイズの増加によりカラムを通過する一方で, 未結合体はカラム内のゲルに保持されるため, 総放射能に対する溶出液の放射能百分率を % binding として算出した.

腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布評価

[¹¹¹In]In-PtDA および [¹¹¹In]In-PtD の生理食塩水溶液(241 kBq, 100 μ L)を LNCaP 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈から投与し, 1, 24, および 48 時間後に 1 群 3 匹のモデルマウスを屠殺した. 採血後, 脾臓, 膵臓, 胃, 腸, 腎臓, 肝臓, 心臓, 肺, 脳, 腫瘍, および筋肉を摘出し, 重量および放射能を測定した. 投与放射能(injected dose)に対する集積した放射能の百分率(% injected dose (ID))を血液重量または臓器重量(g)で除した値(% ID/g)を放射能分布を示す指標として算出した. 胃については % ID で示し, % ID/g または % ID の値が高いほど, 放射性化合物の集積が高いことを意味する.

SPECT/CT

[¹¹¹In]In-PtDA の生理食塩水溶液(2.7 MBq, 100 μ L)を LNCaP および PC-3 腫瘍両移植モデルマウスに尾静脈から投与した. 投与 48 時間後に, Gamma Medica-Ideas 社製 FX3300 pre-clinical imaging system にて SPECT/CT を行った. イソフルラン麻酔下, 回転半径 35 mm, 投影時間 70 秒, 投影回数 32 回にて直径 1.0 mm, 焦点距離 75 mm のピンホールコリメーターを用いて撮像した. SPECT 後, CT (管電圧: 60 kV, 管電流: 350 μ A)を行った. SPECT の投影データについて, 3 次元 ordered-subset expectation maximization 法(8 subsets, 5 iterations)による画像再構成を行った. 得られた SPECT/CT 画像は, PMOD Technologies 社製 PMOD ソフトウェア (Version 3.6)で解析した.

統計解析

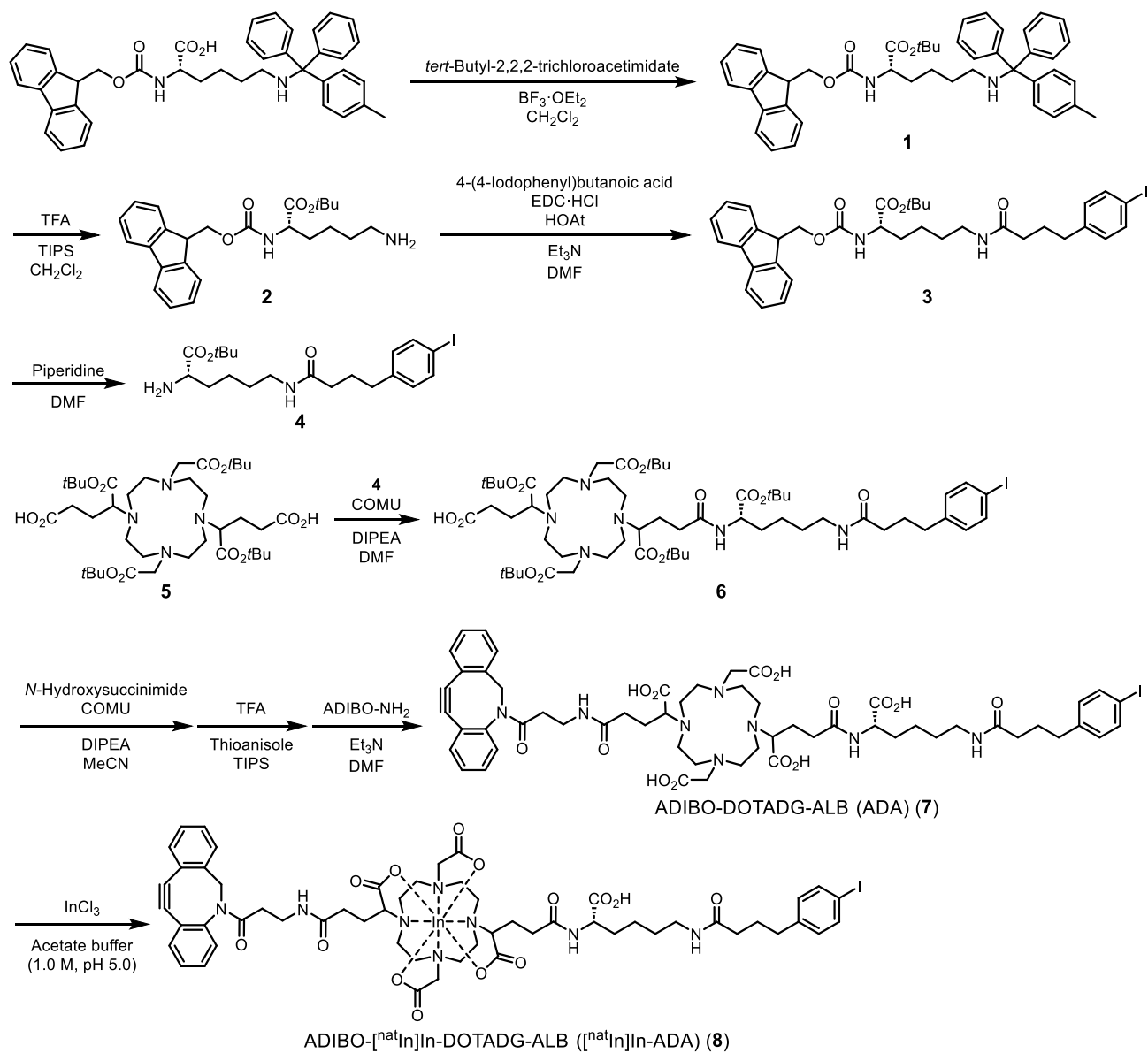
全てのデータは, GraphPad Prism 6 または Microsoft Excel を用いて解析した. 細胞結合実験およびアルブミン結合実験における有意差検定は, 一元配置分散分析およびボンフェローニの多重比較検定を組み合わせ, 信頼区間 95%で行った.

1.1.2. 結果と考察

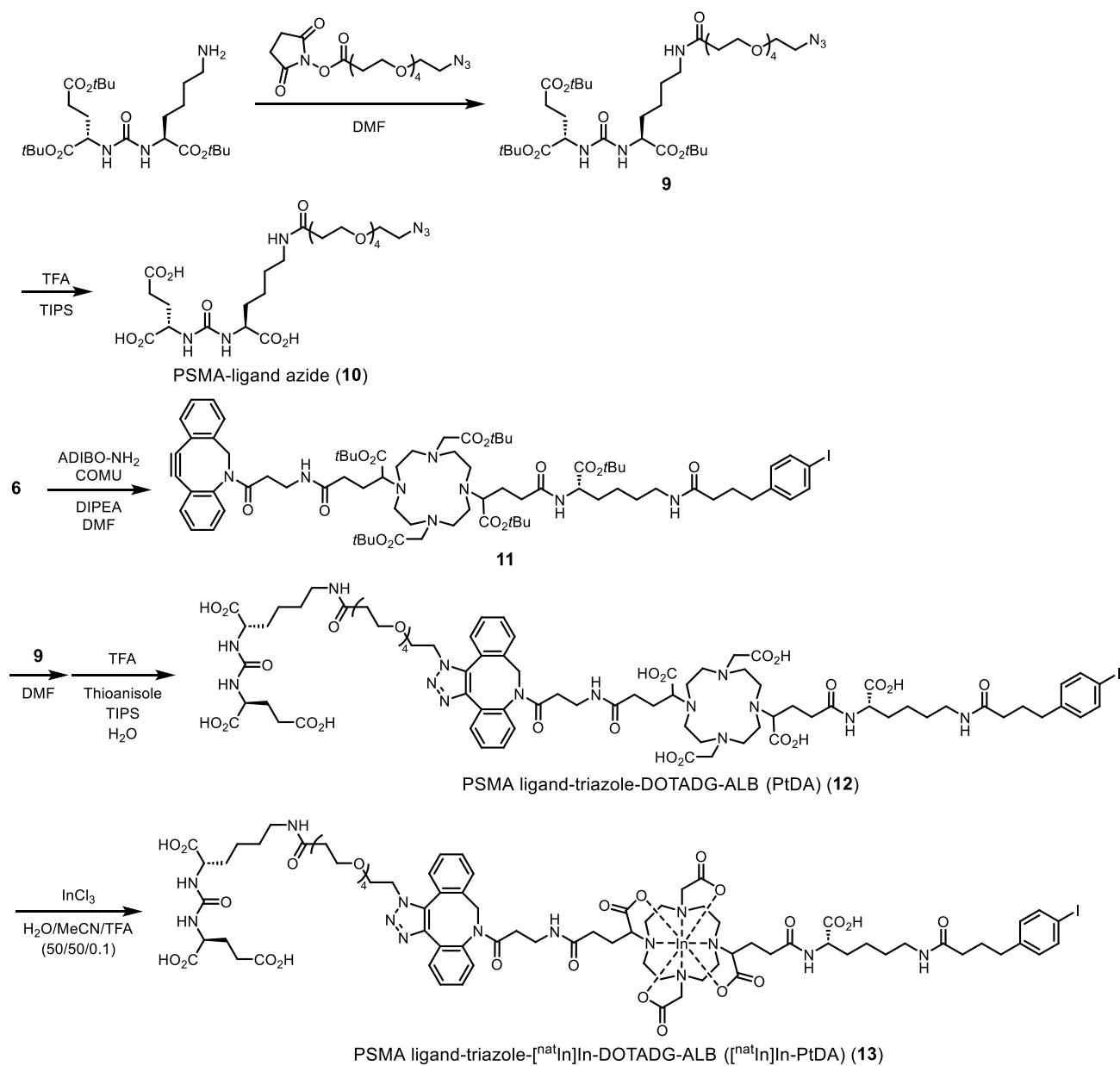
標識前駆体および非放射性 In 標識体の合成

Scheme 1-1 に ADA (化合物 **7**) の合成経路を示す。Lys-IPBA (化合物 **4**) は α 位のアミノ基が Fmoc 保護, ϵ 位のアミノ基が Mtt 保護されたリジンを出発原料に, 4 段階の反応により合成した。また DOTADG (化合物 **5**) は, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane を出発原料に, 既報の方法に従い合成した。⁴⁵ ADA は Lys-IPBA, DOTADG, および ADIBO-NH₂ を用いて, 縮合反応および脱保護反応により合成した。ADA の合成において, 10 v/v% 以上の TFA 含有溶液中で生じる ADIBO の構造変化を避けるため,⁴⁶ TFA による *tert*-ブチル保護カルボキシ基の脱保護反応の後に ADIBO 基を導入する合成経路を選択した。**Scheme 1-2** に PtDA (化合物 **12**) の合成経路を示す。金属配位に関与するカルボキシ基が *tert*-ブチル保護された ADA (化合物 **11**) および PSMA-ligand azide (化合物 **9**) を用いて, クリック反応の後に TFA による脱保護反応を行うことで PtDA を合成した。また ALB を有さないコントロール化合物である PtD (化合物 **15**) の合成経路を **Scheme 1-3** に示す。金属配位に関与するカルボキシ基が *tert*-ブチル保護された DOTADG (化合物 **5**) および PSMA-ligand azide を用いて, クリック反応および脱保護反応により PtD を合成した。さらに天然存在比のインジウム(III) (^{nat}In) を有する塩化インジウム(III) (^{nat}InCl₃) を使用して, PtDA および PtD に対応する非放射性 In 標識体である [^{nat}In]In-PtDA (化合物 **13**) および [^{nat}In]In-PtD (化合物 **16**) を合成した。

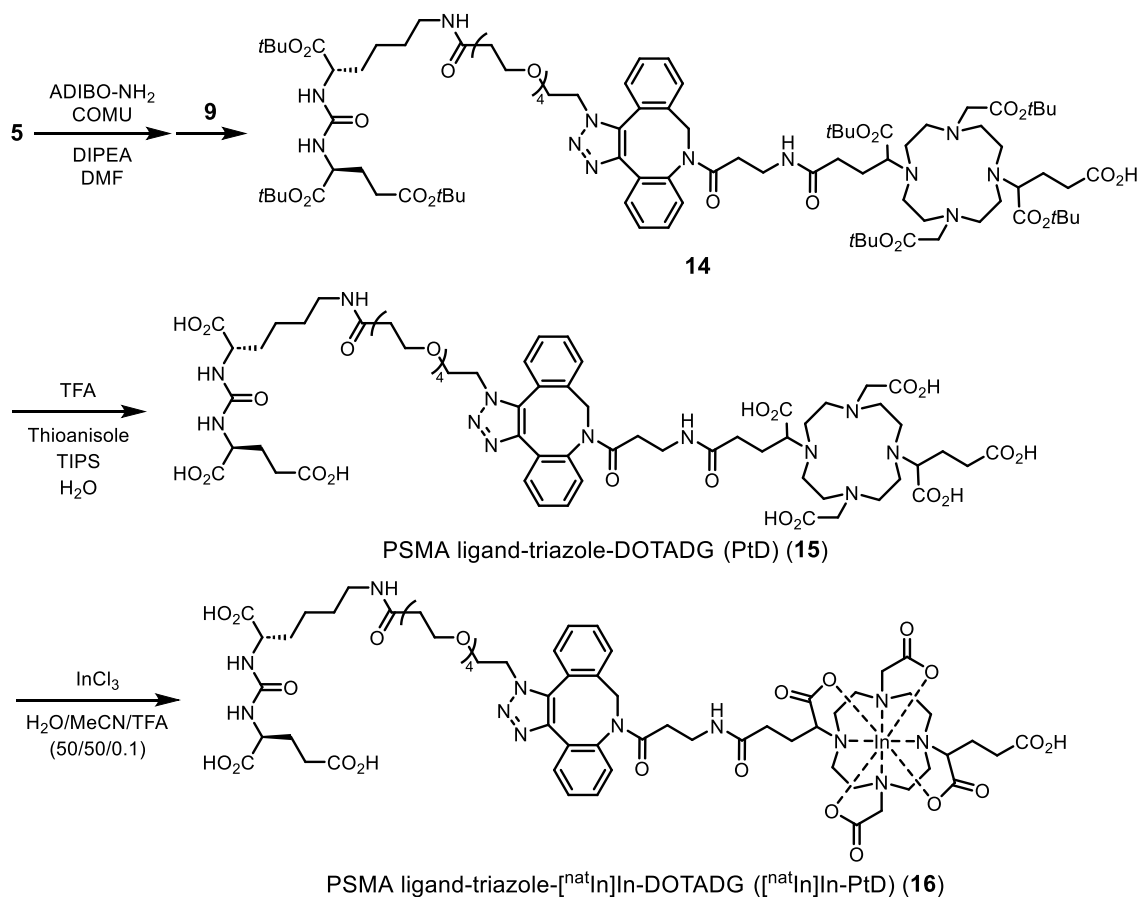
Scheme 1-1. Synthetic route for ADA and nonradioactive In-labeled ADA.



Scheme 1-2. Synthetic route for PtDA and nonradioactive In-labeled PtDA.



Scheme 1-3. Synthetic route for PtD and nonradioactive In-labeled PtD.



^{111}In 標識反応

Pre-labeling 法

Table 1-1 に ^{111}In 標識反応の結果を示す. 各標識反応について, 逆相 HPLC 精製時の RI クロマトグラムを解析することで, 元の放射性化学種が目的の放射性化学種に変換された割合を示す放射化学的変換率(radiochemical conversion, RCC)を算出した. また, 標識反応の最初に添加した放射エネルギーに対する精製後の ^{111}In 標識体の放射能百分率を, 放射化学的収率(radiochemical yield, RCY)として算出した. さらに, 精製した各 ^{111}In 標識体について, 対応する非放射性 In 標識体を標品として再度逆相 HPLC で分析することで, 放射化学的純度(radiochemical purity, RCP)の算出および放射化学的同定を行った(Figure 1-3). 本実験で得られた ^{111}In 標識体はいずれも 95%以上の RCP を示した.

ADA の ^{111}In 標識反応は, 5 分間の反応時間で 95%以上の RCC および 54.9%の RCY で進行し, ADA の高い金属配位能が示された. 次に, [^{111}In]In-ADA と PSMA-ligand azide (化合物 10)間のクリック反応性を評価した. 反応溶媒には幅広い化合物を溶解可能な有機溶媒である DMSO, および生体分子に対して高い適合性を有する水溶液である PBS を選択した. ただし PBS を用いた条件においては, 反応剤を完全に溶解させるために DMSO を終濃度 10 v/v%になるように添加した. DMSO 中, 37 °C で 10 分間静置した際のクリック反応の RCC は 64.3%であり, 完全には進行しなかった一方, 30 分間静置することで 95%以上の RCC で進行した. また PBS 中においては, 37 °C で 10 分間静置

することで 95%以上の RCC でクリック反応が進行し、DMSO と比較して高いクリック反応性が認められた。PBS 中で反応性が向上した理由は、溶媒中に存在する水との水素結合が強力になることで、ADIBO とアジド基間の 1,3-双極子付加環化反応が加速されたためであると考えられる。⁴⁷ 以上の pre-labeling 法の結果は、ADA が温和な条件下において低分子リガンドを迅速に放射標識可能であることを示している。

Pre-click 法

次に、クリック反応によりあらかじめ PSMA 標的リガンドを導入した標識前駆体である PtDA を用いて、¹¹¹In 標識反応を実施した。PtDA と ¹¹¹InCl₃ を MES 緩衝液(0.1 M, pH 5.7)中において 90 °C で 5 分間加熱することで、95%以上の RCC および 47.4%の RCY で [¹¹¹In]In-PtDA が得られた(**Table 1-1**)。加熱が必要であった一方で、短時間で定量的に放射標識が進行したため、熱に安定なリガンドに対して簡便な放射標識法であることが示された。また標識前駆体である PtD についても同様の条件で放射標識を行い、95%以上の RCC および 46.0%の RCY で [¹¹¹In]In-PtD が得られた。

以上の結果より、pre-labeling 法では温和な条件下で、pre-click 法では簡便にリガンドの放射標識が可能であることが示され、ADA が幅広いリガンドの放射標識に有用な特性を有することが明らかとなった。以降の評価では、放射標識が簡便な pre-click 法により ¹¹¹In 標識体を合成した。

Table 1-1. Radiosynthesis of [¹¹¹In]In-PtDA through the pre-labeling or pre-click methods.

	Compound	Solvent	Conditions	RCC (%)	RCY (%)
Pre-labeling	[¹¹¹ In]In-ADA	MES buffer	90 °C, 5 min	>95	54.9 ± 9.3
		PBS	37 °C, 10 min	>95	55.3 ± 1.6
	[¹¹¹ In]In-PtDA	DMSO	37 °C, 10 min	64.3 ± 4.9	45.4 ± 7.0
		DMSO	37 °C, 30 min	>95	66.7 ± 7.2
Pre-click	[¹¹¹ In]In-PtDA	MES buffer	90 °C, 5 min	>95	47.4 ± 14.7

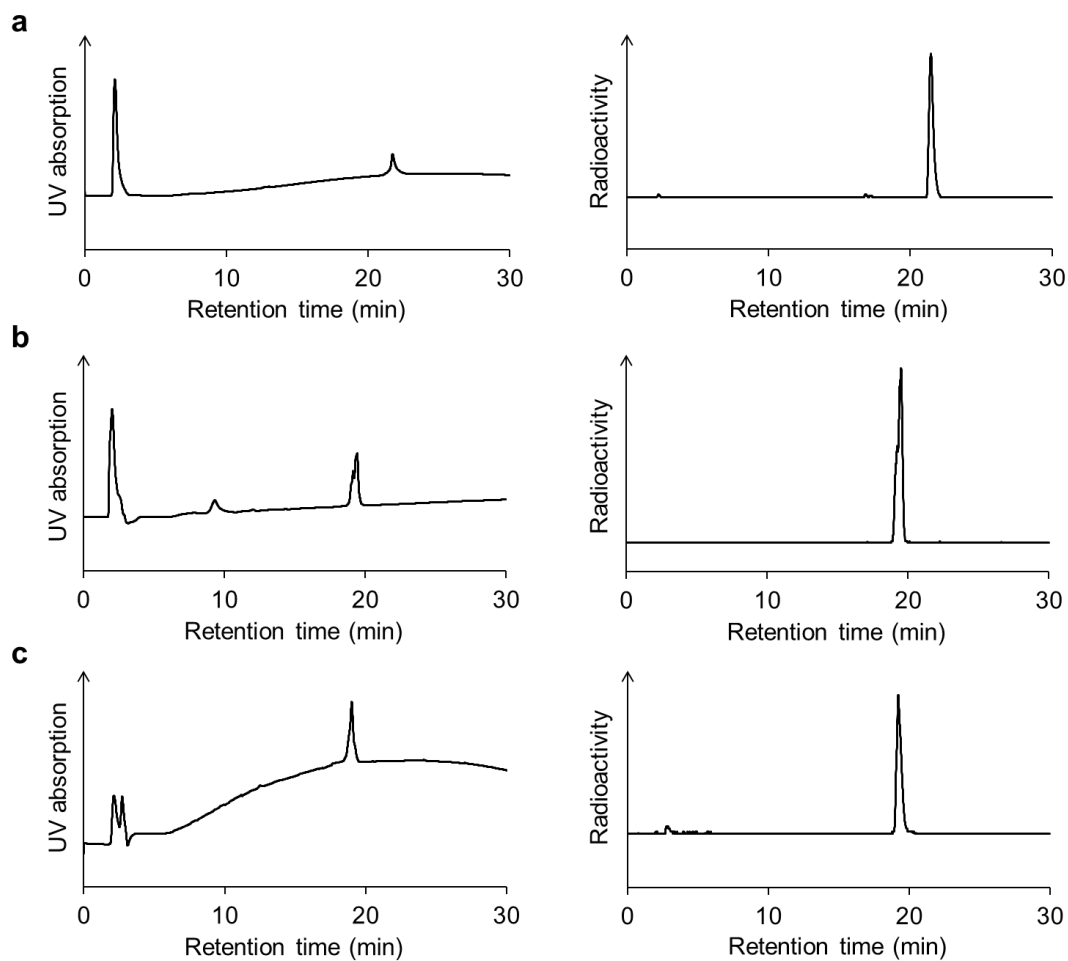


Figure 1-3. HPLC chromatograms of UV absorption at 254 nm and radioactivity for a mixture of [^{nat}In]In-ADA and [^{111}In]In-ADA (a), and [^{nat}In]In-PtDA and [^{111}In]In-PtDA prepared by the pre-labeling (b) or pre-click methods (c).

基礎的物性の評価

ADA を用いて合成した低分子 3 官能性放射性薬剤の基礎的物性を評価する目的で， [^{111}In]In-PtDA の $\text{Log}P$ 値の測定および血漿中における安定性の評価を実施した． [^{111}In]In-PtDA の $\text{Log}P$ 値は-3.08 であった． また [^{111}In]In-PtDA はマウス血漿中， 37 °C で 24 時間経過後も， 95%以上の RCP を維持していた(**Figure 1-4**)． この結果より， ADA を用いて金属 RI 標識された低分子 3 官能性放射性薬剤が高い安定性を有することが示された．

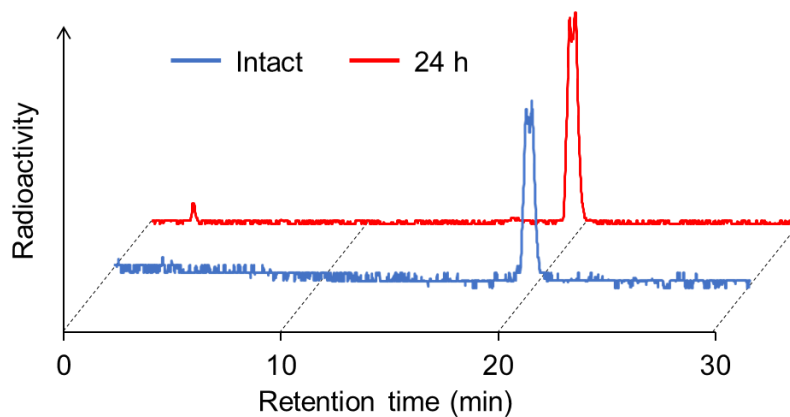


Figure 1-4. *In vitro* stability of [¹¹¹In]In-PtDA before and after it was incubated in murine plasma at 37 °C for 24 h. The RCP was analyzed by reversed-phase HPLC.

細胞実験

PSMA が高発現した LNCaP 細胞と低発現の PC-3 細胞を用いて, [¹¹¹In]In-PtDA の PSMA に対する結合性を評価した(**Figure 1-5a**). [¹¹¹In]In-PtDA は PC-3 細胞と比較して(0.15% initial activity/mg protein), LNCaP 細胞に対する高い結合性を示した(14.9% initial activity/mg protein). またその結合量は PSMA 阻害剤である 2-PMPA を過剰量添加することで有意に低減した(0.36% initial activity/mg protein). これらの結果から, [¹¹¹In]In-PtDA が PSMA 特異的な結合性を有することが示された.

次に LNCaP 細胞を用いて[¹¹¹In]In-PtDA の細胞結合飽和実験を行った. [¹¹¹In]In-PtDA の LNCaP 細胞に対する K_d 値は, 結合飽和曲線から 15.4 nM と算出された(**Figure 1-5b**). この値は, 同様の PSMA リガンド構造を有する既報の薬剤と同程度であり,⁴⁸ ADA を用いた放射標識法がリガンドの標的結合性を損なわないことが示唆された.

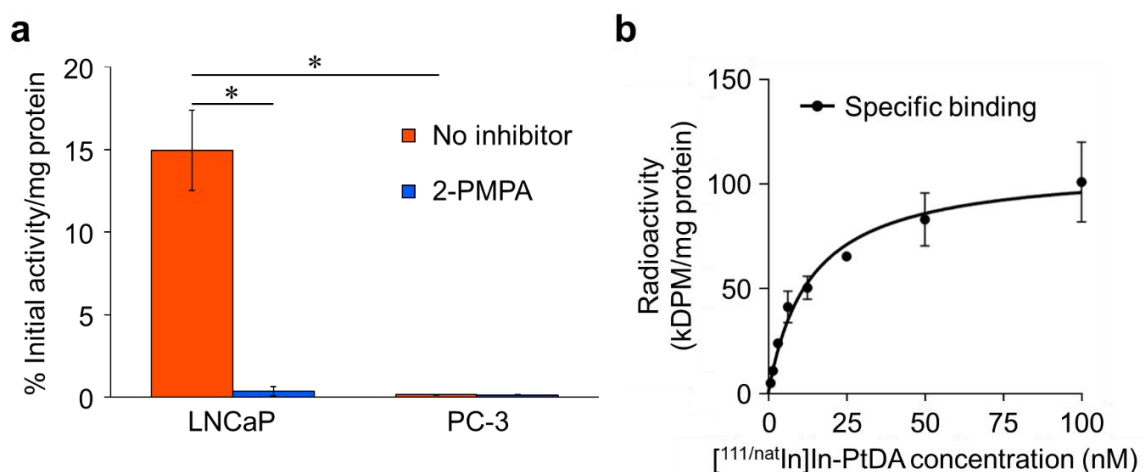


Figure 1-5. (a) Binding of [¹¹¹In]In-PtDA to LNCaP and PC-3 cells. Values are expressed as the mean \pm standard deviation of six independent experiments. * P < 0.05 (one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Bonferroni's test) (b) Specific binding of [¹¹¹In]In-PtDA to LNCaP cells in cell saturation binding assay. Values are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

アルブミン結合実験

ALBの導入がアルブミン結合性に与える影響を評価する目的で、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$ のアルブミン結合実験を行った(**Figure 1-6**). $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$ をアルブミン非含有の PBS 溶液中でインキュベートした後に、ゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、高分子量の化合物が含まれる溶出液における放射エネルギーはどちらも低値であった(それぞれ 6.9 および 11.6% binding). アルブミン含有溶液中でインキュベートした後においては、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$ は 10.9% binding の低値を示した一方で、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ は 92.4% binding の有意に高い値を示し、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ が ALB の導入によりアルブミン結合性を有することが示された. 以上の細胞結合実験およびアルブミン結合実験の結果より、ADA を用いて放射標識した低分子リガンドが 3 官能性放射性薬剤として機能することが示された.

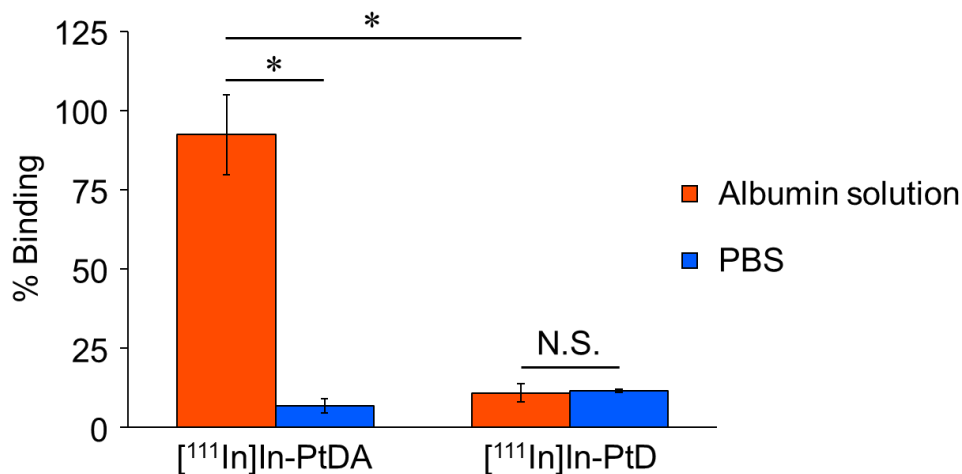


Figure 1-6. Albumin binding of $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ and $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$ in PBS with or without HSA. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA with post hoc Bonferroni's test). N.S. means no significant difference.

腫瘍移植モデルマウスにおける体内放射能分布評価

ADA を用いて合成した低分子 3 官能性放射性薬剤のインビボにおける特性を評価する目的で、LNCaP 腫瘍移植モデルマウスを用いて $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$ の体内放射能分布実験を行った. $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ は投与 24 および 48 時間後において LNCaP 腫瘍への高い集積を示し(それぞれ 16.0 および 18.7% ID/g), その集積量は $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$ と比較して顕著に高かった(それぞれ 1.0 および 1.0% ID/g) (**Figure 1-7a**, **Table 1-2**). また投与 1, 24, および 48 時間後において, $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ の血中放射エネルギーはそれぞれ 19.9, 12.5, および 6.3% ID/g と高く, $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$ と比較して血中滞留性の向上が認められた(それぞれ 0.50, 0.10, および 0.04% ID/g) (**Figure 1-7b**). これらの腫瘍および血液における放射能分布は, $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ が ALB の導入により血中のアルブミンと相互作用し, 薬剤の腫瘍集積性が向上したことを示している. 以上の体内放射能分布実験の結果より, ADA を用いて合成した低分子放射性化合物が, インビボにおいて 3 官能性放射性薬剤として機能することが示された.

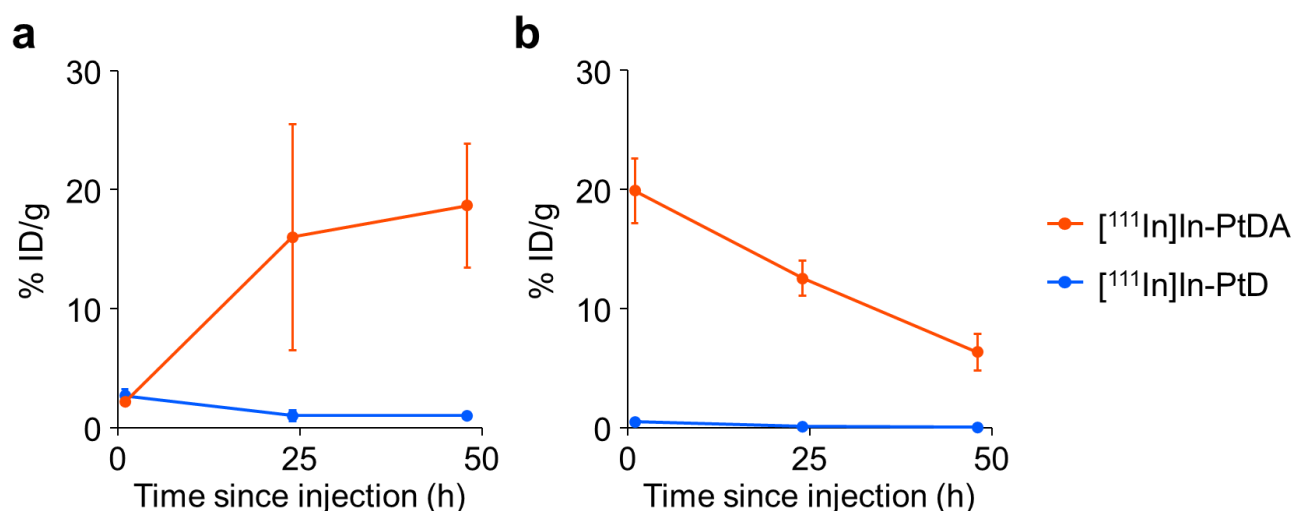


Figure 1-7. Comparison of the tumor radioactivity (a) and blood radioactivity (b) between $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ and $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$.

Table 1-2. Biodistribution of radioactivity among organs and tissues after the intravenous injection of $[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$ or $[^{111}\text{In}]\text{In-PtD}$ into LNCaP tumor-bearing mice.

Organs and tissues	Time since injection (h)			
	1	24	48	
	$[^{111}\text{In}]\text{In-PtDA}$			
Blood	19.88 ± 2.74	12.52 ± 1.47	6.33 ± 1.53	
Spleen	15.28 ± 4.89	9.69 ± 0.92	10.49 ± 5.62	
Pancreas	2.31 ± 0.14	2.03 ± 0.48	1.12 ± 0.39	
Stomach*	0.79 ± 0.19	0.46 ± 0.23	0.29 ± 0.20	
Intestine	2.66 ± 0.28	1.52 ± 0.41	0.74 ± 0.28	
Kidney	37.18 ± 6.85	67.98 ± 2.82	55.89 ± 6.39	
Liver	3.51 ± 0.38	3.36 ± 0.77	2.28 ± 0.75	
Heart	5.49 ± 0.77	3.95 ± 0.87	1.98 ± 0.41	
Lung	11.87 ± 1.57	8.63 ± 1.31	6.16 ± 1.56	
Brain	0.36 ± 0.05	0.30 ± 0.05	0.20 ± 0.07	
Tumor	2.18 ± 0.17	16.03 ± 9.49	18.68 ± 5.21	
Muscle	1.95 ± 0.30	1.28 ± 0.34	0.81 ± 0.40	
Ratio	Tumor/Blood	0.11 ± 0.02	1.35 ± 0.86	2.93 ± 0.18
	Tumor/Muscle	1.13 ± 0.13	13.52 ± 11.42	24.48 ± 4.76

		[¹¹¹ In]In-PtD		
% ID/g	Blood	0.50 ± 0.12	0.10 ± 0.01	0.04 ± 0.00
	Spleen	7.92 ± 3.47	0.64 ± 0.22	0.69 ± 0.31
	Pancreas	0.27 ± 0.10	0.19 ± 0.06	0.15 ± 0.09
	Stomach*	0.06 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01
	Intestine	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.20 ± 0.07
	Kidney	106.13 ± 43.24	5.21 ± 6.22	2.35 ± 0.91
	Liver	0.21 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.38 ± 0.11
	Heart	0.27 ± 0.12	0.12 ± 0.07	0.09 ± 0.03
	Lung	0.63 ± 0.18	0.23 ± 0.11	0.16 ± 0.07
	Brain	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02
	Tumor	2.71 ± 0.51	1.04 ± 0.45	1.04 ± 0.03
	Muscle	0.24 ± 0.16	0.08 ± 0.09	0.07 ± 0.05
	Ratio	Tumor/Blood	5.52 ± 0.39	10.55 ± 3.42
Tumor/Muscle		20.99 ± 23.12	9.47 ± 12.58	25.38 ± 22.56

Each value represents the mean ± standard deviation of three mice. *Data are expressed as % ID values.

SPECT/CT

ADA を用いて合成した低分子 3 官能性放射性薬剤のインビボにおける有用性を評価する目的で、LNCaP および PC-3 腫瘍の両移植モデルマウスを用いて、[¹¹¹In]In-PtDA の SPECT/CT 撮像を行った (Figure 1-8)。[¹¹¹In]In-PtDA の投与 48 時間後において、LNCaP 腫瘍に高い放射能集積が認められた一方で、PC-3 腫瘍には放射能集積は認められなかった。この結果より、[¹¹¹In]In-PtDA が PSMA 高発現腫瘍を明瞭に描出可能であることが示され、ADA を用いた低分子放射性薬剤のインビボにおける有用性が示された。

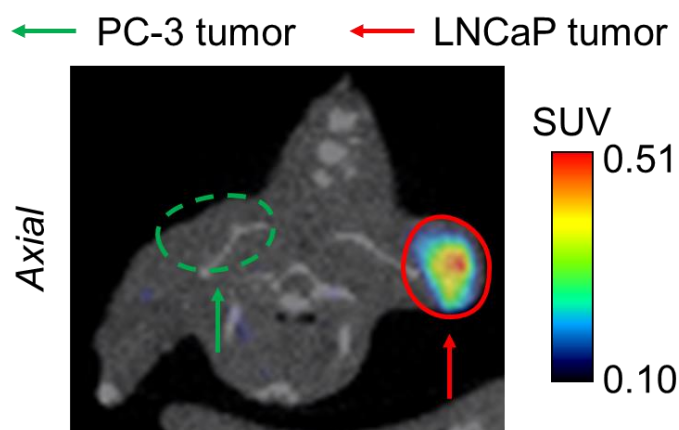


Figure 1-8. An axial SPECT/CT image of the LNCaP and PC-3 tumor-bearing mouse at 48-h postinjection of [¹¹¹In]In-PtDA. The standard uptake value (SUV) shows the ratio of the radioactivity concentration in the region to the whole-body concentration of the injected radioactivity.

1.1.3. 小括

本節において、低分子モダリティのラジオセラノスティクス薬剤の開発に資する分子設計基盤の構築を目的として、「クリック反応部位」、「金属配位子」、および「アルブミン結合部位」から成る 3 官能性キレート化合物 ADA を設計・合成した。低分子リガンドのモデルとして PSMA 標的リガンドを、金属 RI のモデルとして ^{111}In を選択し、ADA を用いた放射標識の検討および合成した 3 官能性放射性薬剤 [^{111}In]In-PtDA の有用性評価を通して、以下に述べる結果を得た。

- (1) ADA は高いクリック反応性を示し、温和な条件下においてリガンドの迅速な放射標識が可能であった。また高い金属配位能を示し、短時間で簡便に金属 RI との標識反応が高効率で進行することが示された。
- (2) [^{111}In]In-PtDA はマウス血漿中において高い安定性を示した。
- (3) [^{111}In]In-PtDA はインビトロおよびインビボにおいて、PSMA およびアルブミンに対する結合性を示し、良好な腫瘍集積を示した。
- (4) [^{111}In]In-PtDA を用いた SPECT/CT において、PSMA 高発現腫瘍が明瞭に描出され、低発現腫瘍は描出されなかった。

以上の結果より、放射標識における ADA の優れた特性、および ADA を用いた低分子 3 官能性放射性薬剤の有用性が示され、低分子 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤としての ADA の有用性が示された。

第2節

グルカゴン様ペプチド-1受容体を標的とした3官能性放射性薬剤の開発

近年の化学合成技術の進歩に伴い、分子標的薬剤の新たなモダリティとして、ペプチドや核酸などの中分子化合物の有用性が報告されている。¹⁴ 中分子リガンドは、高分子リガンドと同様の高い標的親和性、および低分子リガンドと同様の速やかなクリアランスを特徴とするため、生体分子特異的に診断または治療用分子を送達するためのキャリアとしても高い関心を集めている。⁴⁹ 臨床核医学診断・治療の分野では、peptide-receptor radionuclide therapy (PRRT)や peptide-receptor scintigraphy (PRS)などを目的に、ペプチドを放射標識した放射性薬剤が開発されている。¹⁵ 特にソマトスタチン受容体、ガストリン放出ペプチド受容体、グルカゴン様ペプチド-1受容体(GLP-1R)を標的としたPRRTおよびPRSを組み合わせたセラノスティクスは、前臨床および臨床研究において有望な結果を示してきた。⁵⁰⁻⁵² しかしながら、ペプチドの速やかな全身クリアランスに起因する低い腫瘍滞留性や高い腎臓集積性は、PRRTに有用な放射性薬剤の開発を制限している。⁵³ 加えて、分子量の大きいペプチドは熱に不安定な傾向を示すため、加熱を要する金属RI標識法はペプチドの標的結合性を低下させる可能性が高い。そのため、温和な条件下で中分子リガンドの金属RI標識反応が進行し、かつ生体内における放射能動態を制御可能な放射標識法の開発は、ラジオセラノスティクスの発展に貢献すると考えられる。

そこで本節では、前節で有望な結果を示したADIBO-DOTADG-ALB(ADA)について、中分子モダリティへの応用可能性を評価することにした。中分子リガンドのモデルとして、GLP-1R標的ペプチドであるexendin-4(分子量: 4.2 kDa)を選択した。⁵⁴ GLP-1Rは、生体で分泌されるインクレチンホルモンの一種として知られるグルカゴン様ペプチドに対する受容体である。膵内分泌腫瘍の一種であるインスリノーマにおいてGLP-1R発現が亢進するため、その診断および治療における有望な標的分子としてGLP-1Rが注目されている。Exendin-4は39残基のアミノ酸から成る中分子ペプチドであり、高いGLP-1R結合性を活かして、GLP-1R標的放射性薬剤として応用されてきた。⁵⁵⁻⁵⁶ 一方、exendin-4を基盤とする放射性薬剤は、exendin-4の極めて高い腎臓集積性により、腫瘍と腎臓における放射能濃度比である腫瘍/腎臓比が低いことが課題であった。⁵⁵⁻⁵⁶ これはペプチドを用いた中分子放射性薬剤に共通の課題であり、⁵⁷ exendin-4は中分子リガンドのモデルとして機能すると考えられる。中分子リガンドのモデルとしてexendin-4-Cys⁴⁰にアジド基を導入したexendin-4-Cys⁴⁰ azideを、金属RIのモデルとして¹¹¹Inを選択し、目的標識体はexendin-4-Cys⁴⁰-triazole-[¹¹¹In]In-DOTADG-ALB([¹¹¹In]In-EtDA)と呼称した(Figure 1-9)。ADAを用いた放射標識の検討および合成した3官能性放射性薬剤の有用性評価を通して、中分子3官能性放射性薬剤の分子設計基盤としてのADAの有用性を検証した。

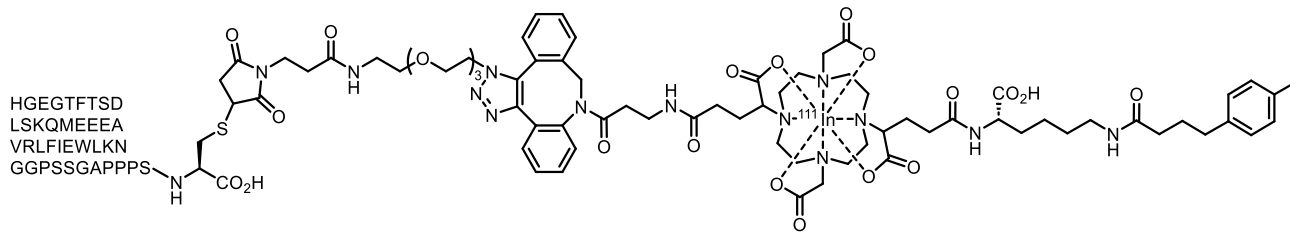


Figure 1-9. Chemical structure of [¹¹¹In]In-EtDA.

1.2.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、第 1 章第 1 節と同じ会社および株式会社スクラムから購入した。また第 1 章第 1 節と同じ機器を使用した。

合成

ADA (1)

化合物 **1** は第 1 章第 1 節に従って合成した。

Azido-PEG3-maleimide (2)

3-(Maleimido)propionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (100 mg, 0.38 mmol, 1.0 equiv)を無水 DMF (1 mL)およびトリエチルアミン(41 mg, 0.41 mmol, 1.1 equiv)の混合溶液に溶解させ、11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (90 mg, 0.41 mmol, 1.1 equiv)を加えた。反応溶液を室温で 18 時間攪拌後、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. × 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 50/50/0.1 (20 min)]、流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、目的物 **2** を収量 22.2 mg (16%)で得た。得られた化合物 **2** は安定性が低いため、速やかに次の反応に使用した。HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₅H₂₄N₅O₆⁺, 370.1721 [M + H]⁺; found, 370.1715

Exendin-4-Cys⁴⁰ azide (3)

Exendin-4-Cys⁴⁰ (10 mg, 2.3 μmol, 1.0 equiv)を化合物 **2** (22.2 mg, 60 μmol, 26 equiv)の PBS (pH 7.4, 600 μL)溶液に加え、室温で 12 時間攪拌した。反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. × 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 50/50/0.1 (20 min)]、流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、目的物 **3** を収量 7.4 mg (69%)で得た。HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀₂H₃₁₂N₅₆O₆₇S₂³⁺, 1553.4074 [M + 3H]³⁺; found, 1553.4147

Exendin-4-Cys⁴⁰-triazole-[^{nat}In]In-DOTADG-ALB ([^{nat}In]In-EtDA) (4)

化合物 **1** (0.20 mg, 0.16 μmol, 1.0 equiv)の DMSO (75 μL)溶液に、塩化インジウム(III)無水和物(1.8 mg, 8.0 μmol, 50 equiv)の酢酸緩衝液(1.0 M, pH 5.1, 75 μL)溶液を加え、90 °C で 4 分間加熱した。反応溶液を氷上で室温まで冷やした後に、化合物 **3** (0.77 mg, 0.16 μmol, 1.0 equiv)の DMSO 溶液(100 μL)を加えた。反応溶液を室温で 30 分間攪拌後、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)、流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、目的物 **4** を収量 0.31 mg (31%)で得た。HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₅₈H₃₈₁I¹¹⁵InN₆₄O₈₁S₂⁴⁺, 1494.8808 [M + 5H]⁴⁺; found, 1494.8820

¹¹¹In 標識反応

酢酸緩衝液(0.1 M, pH 5.1, 100 μ L)に化合物 **1** の DMSO 溶液(0.83 mM, 1 μ L)および [¹¹¹In]InCl₃ 溶液 (7.4 MBq, 100 μ L)を加え, 90 °C で 5 分間加熱した. その後, 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)], 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製した. 目的の化合物を含む分画の溶液を日本ウォーターズ株式会社製の Sep-Pak Light C18 Cartridge を用いてエタノールに溶媒置換し, 窒素ガス気流下で溶媒を留去した. 残渣である [¹¹¹In]In-ADA (2.5 MBq)を PBS (180 μ L)および DMSO (20 μ L)の混合溶液に溶解させ, 化合物 **3** (1–5 nmol)を加えた. 37 °C で 10 分間加熱した後, 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)], 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製した.

細胞培養

ラットインスリノーマ細胞である INS-1 細胞は, 既報の条件に従って培養した.⁵⁸ 細胞は抗生物質 (ペニシリンおよびストレプトマイシン) 100 U/mL, 非働化ウシ胎児血清 10 v/v%, および 2-メルカプトエタノール 0.1 v/v%を含むナカライテスク株式会社製 RPMI 1640 中, 37 °C, 5 v/v% CO₂ 下で培養した.

動物

動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を得, その指針を遵守して行った. ddY 系雄性マウスおよび雄性 BALB/c-*nu/nu* ノードマウスは, 清水実験材料株式会社より購入した. 動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し, 飼料と水は自由に与えた.

体内放射能分布実験で使用するモデルマウスは, RPMI 1640 と Corning Life Sciences 社製 Matrigel の混合液(1:1, 150 μ L)に INS-1 細胞(5×10^6 cells/mouse)を懸濁させ, イソフルラン(2 v/v%)麻酔下, BALB/c-*nu/nu* ノードマウスの右肩に皮下移植することで作製した. 実験には腫瘍径が 1.0–1.5 cm に達したマウスを使用した.

マウス血漿を用いた安定性評価

第 1 章第 1 節と同様の方法で得た ddY 系雄性マウス由来の血漿(200 μ L)に, [¹¹¹In]In-EtDA (370 kBq)の生理食塩水溶液(50 μ L)を加えた. 以降の実験操作は第 1 章第 1 節と同様の方法で行った.

細胞結合実験

INS-1 細胞を 4.0×10^5 cells/well にて 12 ウェルプレートに播種し, 37 °C, 5 v/v% CO₂ 環境下で 48 時間培養した. 培地を除去した後, 各ウェルに [¹¹¹In]In-EtDA または [¹¹¹In]In-ADA (9.3 kBq)を含む RPMI 1640 溶液(1 mL)を加えた. また非特異的結合を評価する目的で, 終濃度 10 μ M の exendin-4-Cys⁴⁰ を添加したウェルも別に用意した. その後, プレートを 37 °C, 5 v/v% CO₂ 環境下で 2 時間静置した.

培地を除去後、各ウェルを PBS (1 mL)で洗浄し、1 N 水酸化ナトリウム水溶液(200 μ L \times 2)で細胞を溶解させた。 ^{111}In 標識体を含む RPMI 1640 溶液(1 mL, 9.3 kBq)および細胞溶解液の各放射能をガンマカウンターで測定し、細胞溶解液中の総タンパク質濃度を Thermo Fisher Scientific 社製 BCA Protein Assay Kit を用いて算出した。添加放射能に対するサンプルの放射能百分率(% initial activity)を総タンパク質量で除した値(% initial activity/mg protein)をウェルごとに算出した。

アルブミン結合実験

^{111}In]In-EtDA の PBS 溶液(22 kBq, 50 μ L)を、HSA 含有(45 mg/mL)または非含有の PBS 溶液(200 μ L)に加えた。以降の実験操作は第 1 章第 1 節と同様の方法で行った。

腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布評価

^{111}In]In-EtDA の生理食塩水溶液(185 kBq, 100 μ L)を INS-1 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈から投与し、1, 24, および 48 時間後に 1 群 4 匹のモデルマウスを屠殺した。以降の実験操作は第 1 章第 1 節と同様の方法で行った。

腫瘍移植モデルマウスを用いたインビボブロッキング実験

^{111}In]In-EtDA (74 kBq)および exendin-4-Cys⁴⁰ (20 μ g)を含む生理食塩水溶液(100 μ L)を 3 匹の INS-1 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈から投与し、1 時間後に屠殺した。以降の実験操作は、第 1 章第 1 節における「腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布評価」と同様の方法で行った。

SPECT/CT

^{111}In]In-EtDA の生理食塩水溶液(1.1 MBq, 150 μ L)を INS-1 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈から投与した。以降の実験操作は第 1 章第 1 節と同様の方法で行った。

統計解析

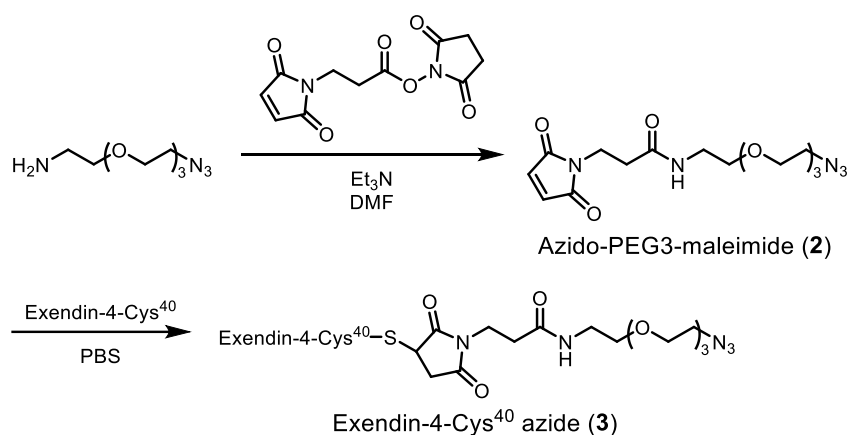
全てのデータは、GraphPad Prism 6 または Microsoft Excel を用いて解析した。細胞結合実験における有意差検定は、一元配置分散分析およびボンフェローニの多重比較検定を組み合わせ、アルブミン結合実験およびインビボブロッキング実験における有意差検定は、スチューデントの t 検定を用いて、信頼区間 95%で行った。

1.2.2. 結果と考察

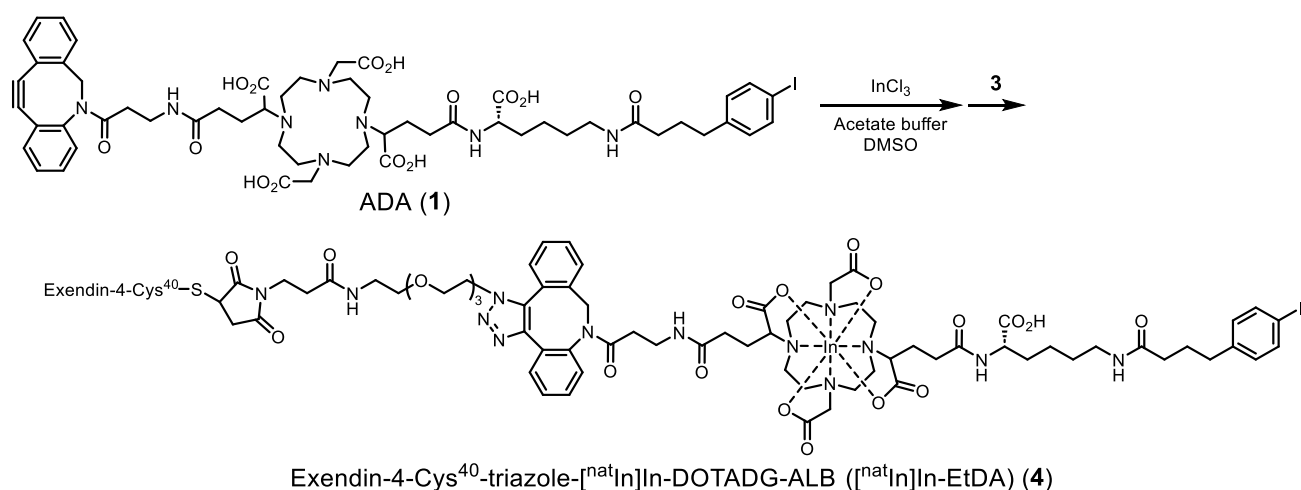
標識前駆体および非放射性 In 標識体の合成

ADA (化合物 **1**) は、第 1 章第 1 節と同様の方法で合成した。Scheme 1-4 に exendin-4-Cys⁴⁰ azide (化合物 **3**) の合成経路を示す。Exendin-4 の C 末端に Cys 残基を導入した exendin-4-Cys⁴⁰ を出発原料に、Cys 残基のチオール基と azido-PEG3-maleimide (化合物 **2**) のマレイミド基を反応させることで、部位特異的にアジド基を導入した exendin-4-Cys⁴⁰ azide を合成した。また Scheme 1-5 に従い、^{[nat]In}In-ADA と exendin-4-Cys⁴⁰ azide をクリック反応により結合させることで、非放射性 In 標識体である exendin-4-Cys⁴⁰-triazole-^{[nat]In}In-DOTADG-ALB (^{[nat]In}In-EtDA) (化合物 **4**) を合成した。

Scheme 1-4. Synthetic route for exendin-4-Cys⁴⁰ azide.



Scheme 1-5. Synthetic route for nonradioactive In-labeled EtDA.



¹¹¹In 標識反応

Table 1-3 に [¹¹¹In]In-ADA を介した 2 段階標識反応の結果を示す。 [¹¹¹In]In-ADA は第 1 章第 1 節と同様の方法で合成し、2 段階目のクリック反応は、第 1 章第 1 節で良好な結果を示した PBS 中 37 °C 下で 10 分間静置する温和な条件を選択した。また ¹¹¹In 標識体の放射化学的同一性は、対応する非放射性 In 標識体を標品として、逆相 HPLC 分析により行った (Figure 1-10)。終濃度が 5 μM の exendin-4-Cys⁴⁰ azide を用いたクリック反応の RCC は 72.9% であり、完全には反応が進行しなかった。一方、15 または 25 μM の exendin-4-Cys⁴⁰ azide を用いた際は、95% 以上の RCC でクリック反応が定量的に進行し、それぞれの RCY は 59.8 および 52.2% であった。ADIBO とアジド基間のクリック反応を pre-labeling に利用した既報の研究においては、非放射性化合物が 1–3 mM の濃度下においてクリック反応が実施されていた。^{40,59} 本研究ではアジドリガンドの終濃度が 15 μM の環境下において、クリック反応が定量的に進行したため、既報と比較して 100 倍近く希薄な条件下でのリガンド導入が可能であることが示された。この結果は、ADA が分子サイズの大きい中分子リガンドに対しても、低分子リガンドと同様に高いクリック反応性を示すことを明らかとしている。また、低温かつ中性の条件下で [¹¹¹In]In-ADA を介した 2 段階標識反応が迅速に進行し、温和な条件下で中分子リガンドを放射標識可能であることが示された。以上の結果より、ADA が中分子リガンドの放射標識に有用な特性を有することが示された。

Table 1-3. Radiosynthesis of [¹¹¹In]In-EtDA.

Amount of azide (μM)	Conditions	RCC (%)	RCY (%)
5		72.9 ± 6.6	50.0 ± 5.1
15	37 °C, 10 min	>95	59.8 ± 15.3
25		>95	52.2 ± 20.7

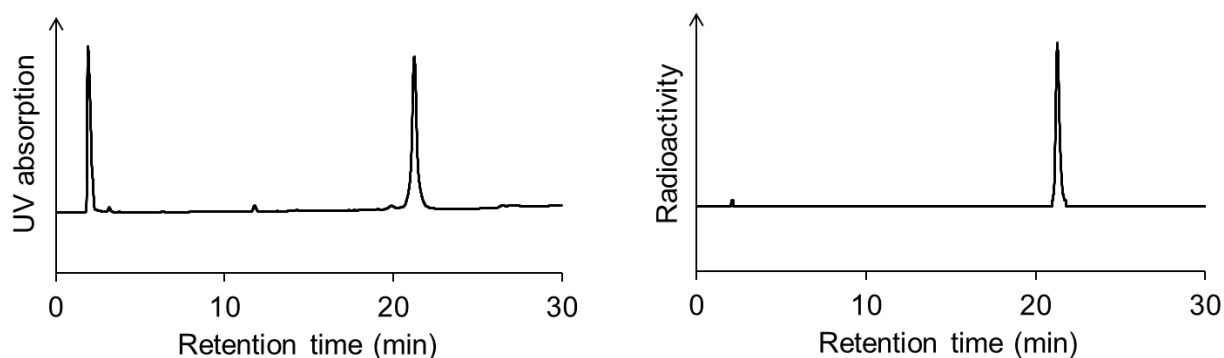


Figure 1-10. HPLC chromatograms of UV absorption at 254 nm and radioactivity for a mixture of [^{nat}In]In-EtDA and [¹¹¹In]In-EtDA.

血漿中安定性の評価

ADA を用いて合成した中分子 3 官能性放射性薬剤の安定性を評価する目的で, $[^{111}\text{In}]\text{In-EtDA}$ のマウス血漿中における安定性を評価した(**Figure 1-11**). $[^{111}\text{In}]\text{In-EtDA}$ をマウス血漿中 37 °C で 24 時間インキュベート後に逆相 HPLC を用いて分析したところ, RCP は 92.4%であった. 90%以上の高い RCP が維持されていたことから, ADA を用いて金属 RI 標識された中分子放射性薬剤が高い安定性を有することが示された.

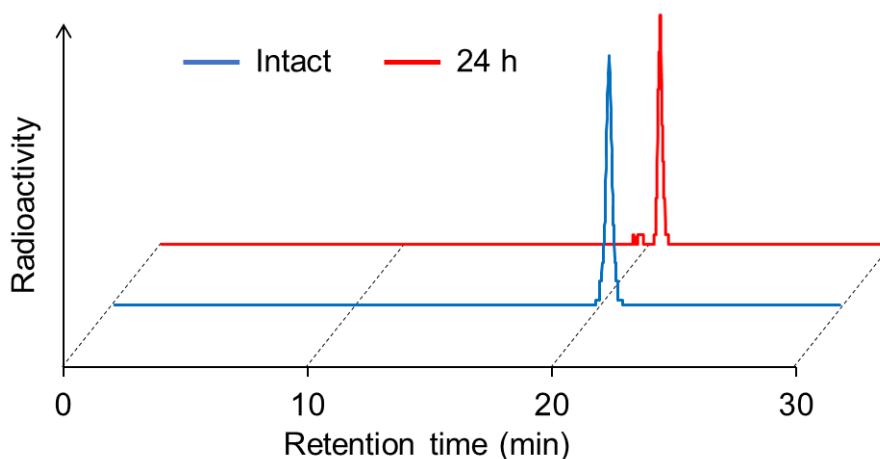


Figure 1-11. *In vitro* stability of $[^{111}\text{In}]\text{In-EtDA}$ before and after it was incubated in murine plasma at 37 °C for 24 h. The RCP was analyzed by reversed-phase HPLC.

インビトロ結合実験

[¹¹¹In]In-EtDA の GLP-1R に対する結合性を評価する目的で、GLP-1R が高発現した INS-1 細胞を用いて [¹¹¹In]In-EtDA の細胞結合実験を行った (Figure 1-12a). [¹¹¹In]In-EtDA は INS-1 細胞に対して高い結合性を示し (5.9% initial activity/mg protein), またその結合量は exendin-4-Cys⁴⁰ を過剰量添加することで有意に低減した (2.0% initial activity/mg protein). 一方で, [¹¹¹In]In-ADA は [¹¹¹In]In-EtDA の exendin-4-Cys⁴⁰ 添加群と同等の低い結合性を示した (1.9% initial activity/mg protein). これらの結果から, [¹¹¹In]In-EtDA が exendin-4 リガンドの導入により GLP-1R 特異性を有することが示された.

次に [¹¹¹In]In-EtDA のアルブミン結合性を評価する目的で, [¹¹¹In]In-EtDA のアルブミン結合実験を行った (Figure 1-12b). [¹¹¹In]In-EtDA をアルブミン非含有の PBS 溶液中でインキュベートした後に, ゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ, 高分子量の化合物が含まれる溶出液における放射エネルギーは低値であった (2.5% binding). 一方, アルブミン含有溶液中でインキュベートした際は, 101.1% binding の有意に高い値を示し, [¹¹¹In]In-EtDA のアルブミン結合性が示された. 以上の結果より, [¹¹¹In]In-EtDA が GLP-1R とアルブミンの両標的に結合性を有することが示され, ADA を用いて放射標識した中分子リガンドが 3 官能性放射性薬剤として機能することが示された.

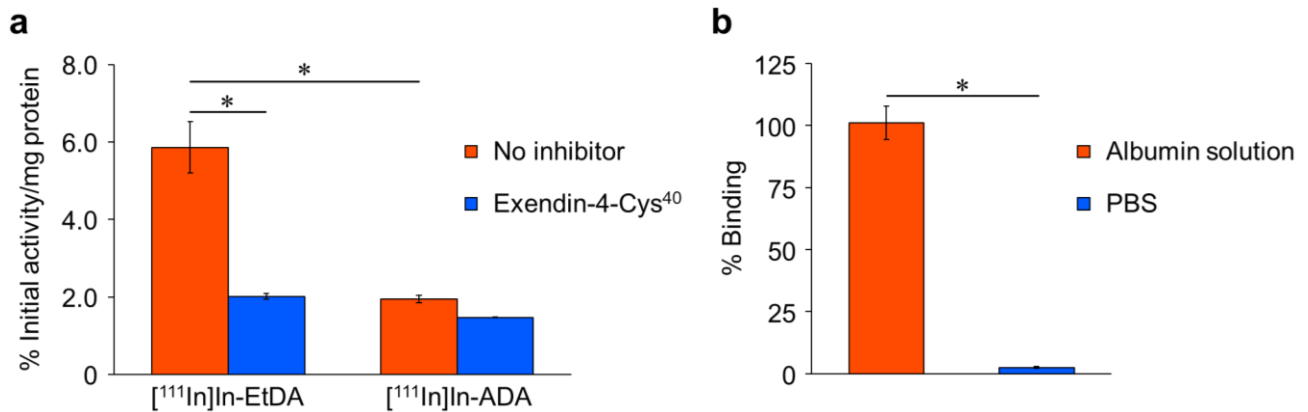


Figure 1-12. (a) Binding of [¹¹¹In]In-EtDA and [¹¹¹In]In-ADA to INS-1 cells. Exendin-4-Cys⁴⁰ (10 μM) was used as a GLP-1R-blocking compound. (b) Albumin binding of [¹¹¹In]In-EtDA in PBS with or without HSA. Data are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments. **P* < 0.05 (one-way ANOVA with post hoc Bonferroni's test for (a), and two-tailed Student's *t*-test for (b))

腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布評価

ADA を用いて合成した中分子 3 官能性放射性薬剤の体内動態を評価する目的で、INS-1 腫瘍移植モデルマウスを用いて^{[111In]In-EtDA}の体内放射能分布実験を行った(**Table 1-4**)。その結果、投与 1, 24, および 48 時間後における INS-1 腫瘍への高い放射能集積(それぞれ 13.7, 20.8, および 57.0% ID/g), および投与 1 時間後における放射能の高い血中滞留性が認められた(13.8% ID/g)。腎臓における放射能集積は全タイムポイントを通して中程度であったため、腫瘍/腎臓比は経時的に向上し、投与 48 時間後には 1.71 に到達した。また過剰量の exendin-4-Cys⁴⁰を共投与したところ、投与 1 時間後の腫瘍における放射能集積は有意に減少し(4.96% ID/g), GLP-1R を発現する正常臓器として知られる膵臓や肺においても、放射能集積の有意な減少が認められた。以上の結果より、^{[111In]In-EtDA}がインビボにおいて GLP-1R 特異性およびアルブミン結合性を有することが示され、ADA を用いて合成した中分子放射性化合物が、インビボにおいて 3 官能性放射性薬剤として機能することが示された。

Table 1-4. Biodistribution of radioactivity among organs and tissues after the intravenous injection of ^{[111In]In-EtDA} into INS-1 tumor-bearing mice.

Organs and tissues	Time since injection (h)				
	1 [†]	24 [†]	48 [†]	1 + Blocking [‡]	
Blood	13.81 ± 2.59	1.80 ± 0.20	1.06 ± 0.07	14.44 ± 0.39	
Spleen	3.71 ± 0.81	4.64 ± 0.93	3.70 ± 0.54	2.58 ± 0.41	
Pancreas	3.59 ± 0.69 [§]	3.95 ± 0.94	10.27 ± 2.09	1.27 ± 0.38	
Stomach*	0.50 ± 0.10	0.38 ± 0.05	0.56 ± 0.11	0.40 ± 0.04	
Intestine	1.84 ± 0.57	2.00 ± 0.34	1.73 ± 0.40	1.87 ± 0.19	
Kidney	28.23 ± 6.49	28.35 ± 4.86	33.23 ± 2.97	17.98 ± 0.36	
Liver	4.44 ± 0.55	6.92 ± 1.01	6.46 ± 1.21	3.20 ± 0.54	
Heart	3.75 ± 0.64	2.04 ± 0.42	1.83 ± 0.17	3.56 ± 0.21	
Lung	9.95 ± 1.05 [§]	3.86 ± 0.76	5.83 ± 0.59	6.67 ± 0.26	
Brain	0.36 ± 0.09	0.18 ± 0.03	0.25 ± 0.15	0.29 ± 0.06	
Tumor	13.67 ± 2.55 [§]	20.83 ± 5.44	57.02 ± 7.68	4.96 ± 0.13	
Muscle	1.29 ± 0.26	0.91 ± 0.17	0.69 ± 0.11	0.98 ± 0.15	
Tumor/Blood	1.00 ± 0.15	11.51 ± 2.46	54.27 ± 8.86	0.34 ± 0.02	
Ratio	Tumor/Muscle	10.63 ± 0.25	23.28 ± 6.45	83.11 ± 1.90	5.13 ± 0.69
	Tumor/Kidney	0.50 ± 0.13	0.74 ± 0.17	1.71 ± 0.11	0.28 ± 0.00

*Data are expressed as % ID values. [†]Each value represents the mean ± standard deviation of four mice. [‡]Each value represents the mean ± standard deviation of three mice coinjected of exendin-4-Cys⁴⁰ (20 µg/mouse) with ^{[111In]In-EtDA}. [§]*P* < 0.05 as compared with 1 h + Blocking (two-tailed Student's *t*-test)

SPECT/CT

ADA を用いて合成した中分子 3 官能性放射性薬剤のインビゴにおける有用性を評価する目的で、INS-1 腫瘍移植モデルマウスを用いて、 $[^{111}\text{In}]\text{In-EtDA}$ の SPECT/CT 撮像を行った(**Figure 1-13**). $[^{111}\text{In}]\text{In-EtDA}$ の投与 48 時間後において、INS-1 腫瘍に高い放射能集積が認められ、腫瘍が明瞭に描出された。この結果より、 $[^{111}\text{In}]\text{In-EtDA}$ が GLP-1R 高発現腫瘍を明瞭に描出可能であることが示され、ADA を用いた中分子放射性薬剤のインビゴにおける有用性が示された。

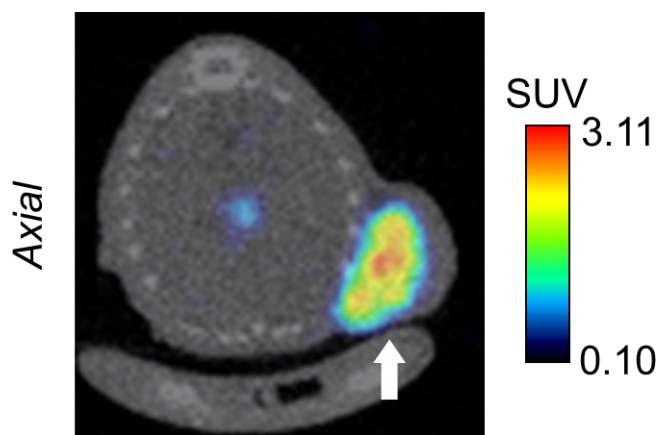


Figure 1-13. An axial SPECT/CT image of the INS-1 tumor-bearing mouse at 48-h postinjection of $[^{111}\text{In}]\text{In-EtDA}$. The white arrow indicates the INS-1 tumor.

1.2.3. 小括

前節において、低分子モダリティのラジオセラノスティクス薬剤の開発に資する分子設計基盤として、「クリック反応部位」、「金属配位子」、および「アルブミン結合部位」から成る 3 官能性キレート薬剤 ADA の有用性を明らかとした。そこで本節において、ADA の中分子モダリティへの応用可能性を評価した。中分子リガンドのモデルとして GLP-1R 標的リガンドを、金属 RI のモデルとして ^{111}In を選択し、ADA を用いた放射標識の検討および合成した 3 官能性放射性薬剤 ^{111}In ADA の有用性評価を通して、以下に述べる結果を得た。

- (1) ADA は中分子リガンドに対して高いクリック反応性を示し、温和かつリガンド濃度が希薄な条件下において、リガンドの迅速な放射標識が可能であった。
- (2) ^{111}In ADA はマウス血漿中において高い安定性を示した。
- (3) ^{111}In ADA はインビトロおよびインビボにおいて、GLP-1R およびアルブミンに対する結合性を示し、良好な腫瘍集積を示した。
- (4) ^{111}In ADA を用いた SPECT/CT において、GLP-1R 高発現腫瘍が明瞭に描出された。

以上の結果より、中分子リガンドの放射標識における ADA の優れた特性、および ADA を用いた中分子 3 官能性放射性薬剤の有用性が示され、低分子のみならず、中分子 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤としての ADA の有用性が示された。

第2章

腫瘍集積向上を目的とした3官能性放射性抗体薬剤の開発

背景

モノクローナル抗体(mAb)は高い標的特異性および安定性を有する高分子量の生体分子である。mAbを用いた抗体薬剤は幅広いがんの診断および治療において有望な結果を示しており、現在のがん医療に必要不可欠なモダリティとなっている。⁶⁰ 臨床核医学診断・治療の分野においては、mAbの高い標的指向性を活かし、mAbをキャリアとしてRIを腫瘍特異的に送達する放射性抗体薬剤(radioimmunoconjugate, RIC)が開発されてきた。¹⁸ RICは低・中分子放射性薬剤と比較して高い腫瘍集積性を示すため、PET等による診断薬または内用放射線療法による治療薬として、その発展が期待されている。

RICの高い腫瘍集積性は、mAbの高い標的指向性だけでなく、胎児性Fc受容体(FcRn)との相互作用にも由来する。⁶¹ 細胞内に取り込まれたmAbは、FcRnと結合することでリサイクリングを受け、分解されることなく細胞外に排出される。そのため、生体に投与されたRICの血中濃度は高く維持され、腫瘍に放射能を高効率で送達することが可能になる。一方、血中における高い放射エネルギーは骨髄への放射線照射量を増加させるため、血液毒性がRICの開発を制限してきた。¹⁹ 放射能の血液クリアランスを高める手法として、分子量の小さいフラグメント抗体や、低分子量の放射性化合物を生体内でmAbと結合させるプレターゲットイング法の利用が近年注目されている。⁶²⁻⁶³ これらの戦略は血中放射エネルギーを効果的に低減可能である一方で、放射性薬剤の標的指向性の低下により腫瘍集積性が減少することが知られている。診断・治療用薬剤において腫瘍集積性は最も重要な要素であるため、腫瘍集積性を損なうことなく、腫瘍と血液における放射能濃度比である腫瘍/血液比を改善可能な手法の開発が望まれている。しかし、金属配位子を用いたRICに効果的な体内動態制御ユニットは未だ報告されていない。加えて、前章において有用性を報告したALBは、薬剤の血中滞留性を増加させることで腫瘍集積性を向上させる体内動態制御ユニットであるため、血中滞留性の高いRICへの応用は期待できない。高い腫瘍集積性および腫瘍/血液比を示すRICを設計するためには、新たな体内動態制御ユニットの開発が求められる。

多くのRICは腫瘍細胞表面の抗原と結合した後に内在化され、最終的にリソソーム内で放射性代謝物へと分解される。⁶⁴⁻⁶⁵ その放射性代謝物のリソソーム内滞留性が、RICの腫瘍滞留性に大きな影響を与えることが知られている。⁶⁶ 例えば、放射性ヨウ素で標識された抗体薬剤については、リソソーム内で生成する脂溶性の高い低分子量代謝物が迅速に腫瘍細胞外に排出されるため、インビボにおける放射能の低い腫瘍滞留性が課題となってきた。⁶⁷ そこで、放射性ヨウ素標識代謝物の腫瘍細胞内滞留性を向上させる目的で、極性の高いグアニジノ基を有する放射標識用化合物が開発された。⁶⁸⁻⁷⁰ グアニジノ基の導入は放射性ヨウ素標識代謝物の膜透過性の減少に成功し、従来型の放射性ハロ

ゲン標識抗体薬剤と比較して腫瘍滞留性の向上を実証している。一方、放射性ハロゲン標識抗体薬剤と比較して、金属配位子を用いた金属 RI 標識抗体薬剤については、代謝物の滞留性に関する検討はほとんど行われてこなかった。これは、金属 RI と金属配位子が水溶性の高い複合体を形成するため、未修飾の放射性代謝物であっても細胞内に滞留すると考えられてきたためであると予想される。金属配位子を基盤骨格とする放射性代謝物の細胞内滞留性を向上させることで、金属 RI 標識抗体薬剤の開発の促進が期待される。

本章では、金属配位子 DOTA を有する RIC 由来の放射性代謝物の細胞内滞留性を向上可能な、新規戦略を開発することにした。DOTA 含有放射性代謝物の細胞内滞留性に関して、正の電荷を帯びた分子を導入することで、リソソーム膜との静電的反発が増強され、細胞からの流出が抑制されると考えられる(**Figure 2-1**)。そこで DOTA を基盤骨格に、チオール基と反応するマレイミド構造および正電荷を有するポリエチレンジアミン(PEI)構造を導入した、新規 3 官能性キレート化合物 maleimide-DOTA-PEI (MDI)を設計した。PEI は高い正電荷密度を有し、かつ鎖長の変更により容易に正味電荷を調整可能な化学構造であるため、体内動態制御ユニットとして選択した。特に、第一級および第二級アミノ基の総数が偶数である PEI 構造は、リソソーム内の酸性環境下で効率的に正電荷を帯びることが知られている。⁷¹ そこで PEI 構造としてジエチレントリアミン(PEI2)またはテトラエチレンペンタミン(PEI4)を選択し、それぞれ 3 官能性キレート化合物 MDI2 および MDI4 を設計した(**Figure 2-2a**)。また正電荷を有さないコントロール化合物として、MDI2 および MDI4 の PEI 構造をそれぞれ同じ鎖長のポリエチレングリコール(PEG)構造に変更した、maleimide-DOTA-PEG2 (MDG2)および maleimide-DOTA-PEG4 (MDG4)を設計した(**Figure 2-2b**)。さらに 2 官能性キレートのコントロール化合物として、マレイミド構造と DOTA のみから成る maleimide-DOTA (MD)を設計した(**Figure 2-2c**)。mAb のモデルとしてヒト上皮成長因子受容体 2 型(HER2/neu)標的のトラスツズマブを、金属 RI のモデルとして ¹¹¹In を選択し、これら 5 種類のキレート化合物の有用性評価を通して、PEI 構造を導入する戦略の有用性を検証した。

2.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、大阪薬研株式会社、東京化成工業株式会社、ナカライテスク株式会社、富士フイルム和光純薬株式会社、渡辺化学工業株式会社、Angene International Limited 社、BLD Pharmatech 社、および Sigma-Aldrich 社から購入した。中圧分取液体クロマトグラフィーには、山善株式会社製自動設定中圧分取液体クロマトグラフシステム[EPCLC-W-Prep 2XY; 送液ポンプ(ミキサー内蔵): No. 580D, 検出器(波長固定型): prep UV-254W, フラクションコレクター: FR-260]を使用し、HI-FLASH COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 μm, カラムサイズ: L または 2L) および INJECT COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 μm, カラムサイズ: M または L) を装着した。NMR には、日本電子株式会社製 JNM-ECS400 および JNM-ECA500 を用い、¹H NMR は重クロロホルムの 7.26 ppm および重水の 4.79 ppm の残留溶媒シグナルを、¹³C NMR は TFA の 164.2 ppm のシグナルを内部標準物質として測定した。ピークのカップリングは一重線を s, 三重線を t, 多重線を m と記載した。MS [ESI] を行う場合は株式会社島津製作所の LCMS-2020 を、HRMS [ESI] には、株式会社島津製作所の LCMS-IT-TOF を用いた。HPLC には、送液ポンプとして株式会社島津製作所製 LC-20AD または LC-20AT を使用し、検出器として株式会社島津製作所製紫外スペクトル検出器 SPD-20A と、日立アロカメディカル株式会社製シンチレーションサーベイメーター TCS-172 またはユニバーサル技研株式会社製 HPLC 用放射線検出器 US-3000T を使用した。逆相 HPLC 用カラムは、ナカライテスク株式会社製 Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm または 10 mm I.D. × 250 mm) または Cosmosil 3PBr (4.6 mm I.D. × 150 mm) を使用した。またサイズ排除 HPLC 用カラムは、東ソー株式会社の TSKgel G3000SW_{XL} (5 μm, 7.8 mm I.D. × 300 mm) を使用した。¹¹¹In]InCl₃ は、日本メジフィジックス株式会社より購入した。放射能の測定には、パーキンエルマー株式会社製ガンマカウンター 2470 WIZARD², 2480 WIZARD², および ALOKA 社製キュリーメーター IGC-7 を用いた。抗体の濃度は、株式会社セントラル科学貿易製の NanoVue Plus を用いて算出した。

合成

1-(*tert*-Butyl)-5-methyl 2-(7-(6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)-4,10-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)pentanedioate (1)

化合物 **1** は既報に従って合成した.⁷²

4-(7-(6-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)-4,10-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid (1.1)

化合物 **1** (613 mg, 0.67 mmol)をメタノール(12 mL)に溶解させ、0.2 N NaOH 水溶液(80 mg, 2.0 mmol, 10 mL)を加え、室温で 20 時間攪拌した。5 w/w% HCl 水溶液を添加し pH 3 に調整した後、ロータリーエバポレーターを用いてメタノールを減圧留去した。残った水溶液に酢酸エチルを加えて有機層を回収し、回収した有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、ろ過を行った。ろ液の溶媒を減圧留去した後、376 mg の残渣を精製せずに化合物 **1.1** として得た(収率 62%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{47}H_{80}N_5O_{12}^+$, 906.5798 [M + H]⁺; found, 906.5799

tert-Butyl-(2-aminoethyl)(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamate (2)

化合物 **2** は既報に従って合成した.⁷³

tert-Butyl-(2-aminoethyl)(8,11-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4-oxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecane-13-yl)carbamate (3)

化合物 **3** は既報に従って合成した.⁷³

Di-*tert*-butyl-2,2'-(4-(6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)-10-(8-(*tert*-butoxycarbonyl)-2,2,18,18-tetramethyl-4,12,16-trioxo-3,17-dioxa-5,8,11-triazanonadecan-15-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (4)

化合物 **1.1** (376 mg, 0.41 mmol, 1.0 equiv)を無水 DMF (1 mL)に溶解させ、COMU (351 mg, 0.82 mmol, 2.0 equiv)を 0 °C で加え、0 °C で 15 分間攪拌した。その後、化合物 **2** (249 mg, 0.82 mmol, 2.0 equiv)を加え、室温で 13 時間攪拌した。反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. × 250 mm)および移動相 (H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]、流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し、272 mg の化合物 **4** を得た(収率 56%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{61}H_{108}N_8O_{15}^{2+}$, 596.3962 [M + 2H]²⁺; found, 596.3964

Di-*tert*-butyl-2,2'-(4-(6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)-10-(8,11,14-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-2,2,24,24-tetramethyl-4,18,22-trioxo-3,23-dioxa-5,8,11,14,17-pentaazapentacosan-21-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (5)

化合物 **1.1** (392 mg, 0.43 mmol, 1.0 equiv)を無水 DMF (800 μL)に溶解させ、COMU (184 mg, 0.43

mmol, 1.0 equiv)を0 °Cで加え、0 °Cで15分間攪拌した。その後、化合物 **3** (635 mg, 0.43 mmol, 1.0 equiv)を加え、室温で11時間攪拌した。反応溶液を中圧分取液体クロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=9/1)で精製し、293 mgの化合物 **5** を得た(収率 46%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{75}H_{134}N_{10}O_{19}^{2+}$, 739.4908 $[M + 2H]^{2+}$; found, 739.4910

Di-*tert*-butyl-2,2'-(4-(1-(*tert*-butoxy)-6-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-1-oxohexan-2-yl)-10-(5-(2-hydrazineylethyl)-2,2,15,15-tetramethyl-4,9,13-trioxo-3,14-dioxa-5,8-diazahexadecan-12-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (**6**)

化合物 **4** (262 mg, 0.22 mmol)をメタノール(20 mL)に溶解し、10%パラジウム炭素(100 mg)を添加し、水素ガス雰囲気下にて13時間室温で激しく攪拌した。その後、ハイフロスーパーセルを用いてろ過を行い、ろ液の溶媒を減圧留去した。残渣(159 mg, 0.15 mmol, 1.0 equiv)を無水DMF (800 μ L)に溶解し、6-maleimidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (56 mg, 0.18 mmol, 1.2 equiv)およびトリエチルアミン(23 mg, 0.23 mmol, 1.5 equiv)を加え、室温で12時間攪拌した。反応溶液をCosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]), 流速4.0 mL/min)を用いて逆相HPLCで精製し、21 mgの化合物 **6** を得た(収率 11%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{63}H_{112}N_9O_{16}^+$, 1250.8222 $[M + H]^+$; found, 1250.8219

Di-*tert*-butyl-2,2'-(4-(1-(*tert*-butoxy)-6-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-1-oxohexan-2-yl)-10-(8,11,14-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-2,2,24,24-tetramethyl-4,18,22-trioxo-3,23-dioxa-5,8,11,14,17-pentaazapentacosan-21-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (**7**)

化合物 **5** (293 mg, 0.20 mmol)をメタノール(20 mL)に溶解し、10%パラジウム炭素(100 mg)を添加し、水素ガス雰囲気下にて16時間室温で激しく攪拌した。その後、ハイフロスーパーセルを用いてろ過を行い、ろ液の溶媒を減圧留去した。残渣の一部(50 mg, 37 μ mol, 1.0 equiv)を無水DMF (550 μ L)に溶解し、6-maleimidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (46 mg, 0.15 mmol, 4.0 equiv)およびトリエチルアミン(15 mg, 0.15 mmol, 4.0 equiv)を加え、室温で21時間攪拌した。反応溶液をCosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]), 流速4.0 mL/min)を用いて逆相HPLCで精製し、24 mgの化合物 **7** を得た(収率 42%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{77}H_{138}N_{11}O_{20}^+$, 1537.0115 $[M + H]^+$; found, 1537.0113

Maleimide-DOTA-PEI2 (MDI2) (**8**)

化合物 **6** (61 mg, 48 μ mol)をTFA (1.6 mL)およびジクロロメタン(400 μ L)の混合溶液に溶解し、室温で13時間攪拌した。その後、溶媒を留去し、残渣をCosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)]), 流速4.0 mL/min)を用いて逆相HPLCで精製し、25 mgの化合物 **8** を得た(収率 63%)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 6.84 (s, 2H), 4.25–2.89 (m, 34H), 2.69–2.42 (m, 2H), 2.21 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.04–1.83 (m, 2H), 1.80–1.36 (m, 10H), 1.30–1.21 (m, 2H).

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ 178.08 (1C), 178.04 (1C), 177.65 (1C), 177.63 (1C), 174.72 (2C), 170.45 (1C), 170.21 (1C), 135.63 (2C), 61.06 (1C), 59.93 (1C), 57.10 (1C), 56.25 (1C), 52.68 (1C), 52.49 (1C), 49.06 (1C), 46.65 (1C), 46.50 (1C), 45.77 (1C), 45.36 (1C), 40.06 (1C), 40.02 (1C), 39.97 (1C), 38.80 (1C), 37.25 (1C), 37.15 (1C), 36.91 (1C), 36.79 (1C), 34.19 (1C), 29.64 (1C), 29.59 (1C), 29.57 (1C), 28.60 (1C), 26.66 (1C), 26.27 (1C), 26.23 (1C). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{N}_9\text{O}_{12}^+$, 826.4669 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found, 826.4669

Maleimide-DOTA-PEI4 (MDI4) (9)

化合物 **7** (24 mg, 16 μmol) を TFA (1.6 mL) およびジクロロメタン (400 μL) の混合溶液に溶解し、室温で 14 時間攪拌した。その後、溶媒を留去し、残渣の半分を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm) および移動相 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (40 min)]), 流速 1.0 mL/min) を用いて逆相 HPLC で精製し、0.49 mg の化合物 **9** を得た (収率 6.9%)。 ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 6.84 (s, 2H), 4.04–2.81 (m, 42H), 2.58–2.38 (m, 2H), 2.22 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.14–1.97 (m, 2H), 1.79–1.38 (m, 10H), 1.31–1.22 (m, 2H). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{74}\text{N}_{11}\text{O}_{12}^+$, 912.5513 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found, 912.5515

Maleimide- ^{nat}In]In-DOTA-PEI2 (^{nat}In]In-MDI2) (10)

本合成では、天然存在比のインジウム(III) (^{nat}In) を有する塩化インジウム(III) ($^{nat}\text{InCl}_3$) を使用した。化合物 **8** (1.5 mg, 1.8 μmol , 1.0 equiv) を酢酸緩衝液 (1.0 M, pH 5.1, 200 μL) に溶解し、塩化インジウム(III) (3.9 mg, 18 μmol , 10 equiv) を加え、90 $^\circ\text{C}$ で 30 分間加熱した。その後、反応液を遠心分離して不溶物を除去した。上清を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm) および移動相 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)]), 流速 1.0 mL/min) を用いて逆相 HPLC で精製し、さらに Cosmosil 3PBr (4.6 mm I.D. \times 150 mm) および移動相 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ [100/0/0.01 (0 min) to 70/30/0.01 (30 min)]), 流速 1.0 mL/min) を用いて逆相 HPLC で精製し、0.45 mg の化合物 **10** を得た (収率 27%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{61}^{115}\text{InN}_9\text{O}_{12}^+$, 938.3473 $[\text{M} + 2\text{H}]^+$; found, 938.3473

Maleimide- ^{nat}In]In-DOTA-PEI4 (^{nat}In]In-MDI4) (11)

化合物 **9** (1.13 mg, 1.2 μmol , 1.0 equiv) を酢酸緩衝液 (1.0 M, pH 5.1, 200 μL) に溶解し、塩化インジウム(III) (2.7 mg, 12 μmol , 10 equiv) を加え、90 $^\circ\text{C}$ で 30 分間加熱した。その後、反応液を遠心分離して不溶物を除去した。上清の 6 割を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm) および移動相 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ [90/10/0.1 (0 min) to 80/20/0.1 (20 min)]), 流速 1.0 mL/min) を用いて逆相 HPLC で精製し、0.07 mg の化合物 **11** を得た (収率 9.2%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{72}^{115}\text{InN}_{11}\text{O}_{12}^{2+}$, 512.7195 $[\text{M} + 3\text{H}]^{2+}$; found, 512.7197

Di-*tert*-butyl-2,2'-(4-(6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)-10-(1-(*tert*-butoxy)-5-((2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (12)

化合物 **1.1** (189 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv)を無水 DMF (700 μ L)に溶解させ、EDC \cdot HCl (44 mg, 0.23 mmol, 1.1 equiv), HOAt (57 mg, 0.42 mmol, 2.0 equiv), および DIPEA (54 mg, 0.42 mmol, 2.0 equiv)を 0 $^{\circ}$ C で加え, 0 $^{\circ}$ C で 15 時間攪拌した. その後, 2-(2-aminoethoxy)ethanol (33 mg, 0.31 mmol, 1.5 equiv)を加え, 室温で 11 時間攪拌した. 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]), 流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 113 mg の化合物 **12** を得た(収率 54%). HRMS (ESI) m/z calcd for C₅₁H₈₉N₆O₁₃⁺, 993.6483 [M + H]⁺; found, 993.6483

Di-*tert*-butyl-2,2'-(4-(6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)-10-(1-hydroxy-19,19-dimethyl-13,17-dioxo-3,6,9,18-tetraoxa-12-azaicosan-16-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (13)

化合物 **1.1** (76 mg, 84 μ mol, 1.0 equiv)を無水 DMF (600 μ L)に溶解させ、EDC \cdot HCl (32 mg, 0.17 mmol, 2.0 equiv), HOAt (46 mg, 0.33 mmol, 4.0 equiv), および DIPEA (43 mg, 0.33 mmol, 4.0 equiv)を 0 $^{\circ}$ C で加え, 0 $^{\circ}$ C で 15 時間攪拌した. その後, 2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol (48 mg, 0.25 mmol, 3.0 equiv)を加え, 室温で 7 時間攪拌した. 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]), 流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 61 mg の化合物 **13** を得た(収率 67%). HRMS (ESI) m/z calcd for C₅₅H₉₇N₆O₁₅⁺, 1081.7007 [M + H]⁺; found, 1081.7009

Di-*tert*-butyl-2,2'-(4-(1-(*tert*-butoxy)-5-((2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-10-(1-(*tert*-butoxy)-6-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-1-oxohexan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (14)

化合物 **12** (113 mg, 0.11 mmol)をメタノール(15 mL)に溶解し, 10%パラジウム炭素(100 mg)を加え, 水素ガス雰囲気下にて 20 時間室温で激しく攪拌した. その後, ハイフロスーパーセルを用いてろ過を行い, ろ液の溶媒を減圧留去した. 残渣の一部(50 mg, 58 μ mol, 1.0 equiv)を無水 DMF (500 μ L)に溶解し, 6-maleimidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (18 mg, 58 μ mol, 1.0 equiv)およびトリエチルアミン(6.5 mg, 64 μ mol, 1.1 equiv)を加え, 室温で 17 時間攪拌した. 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)]), 流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 24 mg の化合物 **14** を得た(収率 39%). HRMS (ESI) m/z calcd for C₅₃H₉₄N₇O₁₄⁺, 1052.6854 [M + H]⁺; found, 1052.6857

Di-*tert*-butyl-2,2'-(4-(1-(*tert*-butoxy)-6-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-1-oxohexan-2-yl)-10-(1-hydroxy-19,19-dimethyl-13,17-dioxo-3,6,9,18-tetraoxa-12-azaicosan-16-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetate (15)

化合物 **13** (34 mg, 31 μmol , 1.0 equiv)をメタノール(10 mL)に溶解し, 10%パラジウム炭素(11 mg)を加え, 水素ガス雰囲気下にて 13 時間室温で激しく攪拌した. その後, ハイフロスーパーセルを用いてろ過を行い, ろ液の溶媒を減圧留去した. 残渣を無水 DMF (600 μL)に溶解し, 6-maleimidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (38 mg, 0.12 mmol, 4.0 equiv)およびトリエチルアミン(13 mg, 0.12 mmol, 4.0 equiv)を加え, 室温で 16 時間攪拌した. 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. \times 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min)]), 流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 14 mg の化合物 **15** を得た(収率 40%). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₅₇H₁₀₃N₇O₁₆²⁺, 570.8724 [M + 2H]²⁺; found, 570.8724

Maleimide-DOTA-PEG2 (MDG2) (16)

化合物 **14** (24 mg, 23 μmol)を TFA (1.6 mL)およびジクロロメタン(0.4 mL)の混合溶液に溶解し, 室温で 14 時間攪拌した. その後, 溶媒を留去し, 残渣を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 9.4 mg の化合物 **16** を得た(収率 50%). ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 6.84 (s, 2H), 4.04–2.82 (m, 34H), 2.61–2.44 (m, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.06–1.95 (m, 2H), 1.80–1.40 (m, 10H), 1.31–1.22 (m, 2H). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₃₇H₆₂N₇O₁₄⁺, 828.4350 [M + H]⁺; found, 828.4350

Maleimide-DOTA-PEG4 (MDG4) (17)

化合物 **15** (14 mg, 13 μmol)を TFA (1.6 mL)およびジクロロメタン(400 μL)の混合溶液に溶解し, 室温で 14 時間攪拌した. その後, 溶媒を留去し, 残渣の 8 割を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 2.6 mg の化合物 **17** を得た(収率 28%). ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 6.84 (s, 2H), 4.15–2.76 (m, 42H), 2.64–2.49 (m, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.05–1.93 (m, 2H), 1.84–1.33 (m, 10H), 1.31–1.20 (m, 2H). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₄₁H₇₀N₇O₁₆⁺, 916.4874 [M + H]⁺; found, 916.4874

Maleimide-[^{nat}In]In-DOTA-PEG2 ([^{nat}In]In-MDG2) (18)

化合物 **16** (1.0 mg, 1.2 μmol , 1.0 equiv)を酢酸緩衝液(1.0 M, pH 5.1, 200 μL)に溶解し, 塩化インジウム(III) (2.7 mg, 12 μmol , 10 equiv)を加え, 90 °C で 30 分間加熱した. その後, 反応液を遠心分離して不溶物を除去した. 上清を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)]), 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 0.24 mg の化合物 **18** を得た(収率 21%). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₃₇H₅₉¹¹⁵InN₇O₁₄⁺, 940.3154 [M + 2H]⁺; found, 940.3161

Maleimide-^{[nat]In}In-DOTA-PEG4 (^{[nat]In}In-MDG4) (19)

化合物 **17** (2.3 mg, 2.5 μmol, 1.0 equiv)を酢酸緩衝液(1.0 M, pH 5.1, 100 μL)に溶解し, 塩化インジウム(III) (5.6 mg, 25 μmol, 10 equiv)を加え, 90 °C で 30 分間加熱した. その後, 反応液を遠心分離して不溶物を除去した. 上清を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)], 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 0.69 mg の化合物 **19** を得た(収率 27%). HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₁H₆₈¹¹⁵InN₇O₁₆²⁺, 514.6875 [M + 3H]²⁺; found, 514.6876

Tri-*tert*-butyl-2,2',2''-(10-(6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (20)

化合物 **20** は既報に従って合成した.⁷⁴

Tri-*tert*-butyl-2,2',2''-(10-(1-(*tert*-butoxy)-6-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-1-oxohexan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (21)

化合物 **20** (784 mg, 0.94 mmol)をメタノール(15 mL)に溶解し, 10%パラジウム炭素(150 mg)を添加し, 水素ガス雰囲気下にて 19 時間室温で激しく攪拌した. その後, ハイフロスーパーセルを用いてろ過を行い, ろ液の溶媒を減圧留去した. 残渣の一部(100 mg, 0.14 mmol, 1.0 equiv)を無水 DMF (400 μL)に溶解し, 6-maleimidoheptanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (88 mg, 0.28 mmol, 2.0 equiv)およびトリエチルアミン(58 mg, 0.57 mmol, 4.0 equiv)を加え, 室温で 13 時間攪拌した. 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm I.D. × 250 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min)], 流速 4.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 20 mg の化合物 **21** を得た(収率 15%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (s, 2H), 4.12–2.55 (m, 27H), 2.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.52–1.14 (m, 48H). HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₆H₈₁N₆O₁₁⁺, 893.5958 [M + H]⁺; found, 893.5958

Maleimide-DOTA (MD) (22)

化合物 **21** (20 mg, 22 μmol)を TFA (1.6 mL)およびジクロロメタン(0.4 mL)の混合溶液に溶解し, 室温で 14 時間攪拌した. その後, 溶媒を留去し, 残渣を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)], 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 8.3 mg の化合物 **22** を得た(収率 57%). ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 6.83 (s, 2H), 4.18–2.89 (m, 27H), 2.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.89–1.40 (m, 10H), 1.30–1.19 (m, 2H). HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₀H₄₉N₆O₁₁⁺, 669.3454 [M + H]⁺; found, 669.3454

Maleimide-^{[nat]In}In-DOTA (^{[nat]In}In-MD) (23)

化合物 **22** (1.0 mg, 1.5 μmol , 1.0 equiv)を酢酸緩衝液(1.0 M, pH 5.1, 100 μL)に溶解し, 塩化インジウム(III) (3.3 mg, 15 μmol , 10 equiv)を加え, 90 °C で 30 分間加熱した. その後, 反応液を遠心分離して不溶物を除去した. 上清を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)], 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 0.41 mg の化合物 **23** を得た(収率 35%). HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₀H₄₆¹¹⁵InN₆O₁₁⁺, 781.2258 [M + 2H]⁺; found, 781.2258

トラスツズマブへのチオール基の導入

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製のハーセプチン(3.0 mg)を 2 M エチレンジアミン四酢酸(EDTA)含有 0.1 M ホウ酸緩衝液(pH 8.0, 4 mL)に溶解させ, Merck Millipore 社製アミコンウルトラ-4 (公称分画分子量 50 kDa)を用いて精製およびバッファー交換を行った. 2-イミノチオラン塩酸塩を 2 M EDTA 含有 0.1 M ホウ酸緩衝液(pH 8.0)に溶解させて 7 mM に調製し, 濃縮液中のトラスツズマブに対して 2 モル当量になるように加えた後, 遮光環境下で 1 時間インキュベートした. 反応液を Thermo Fisher Scientific 社製 Zeba Spin Desalting Column (40K MWCO, 0.5 mL)で精製し, チオール基が導入されたトラスツズマブ(trastuzumab-SH)を得た. 精製した trastuzumab-SH は速やかに標識反応に用いた.

チオール基導入数はエルマン法により決定した.⁷⁵ 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (エルマン試薬) (3.3 mg)を 2 M EDTA 含有 0.1 M ホウ酸緩衝液(pH 8.0, 833 μL)に溶解させ, エルマン試薬溶液を調製した. また, 2 mM EDTA 含有 0.1 M ホウ酸緩衝液(pH 8.0)を, 抗体を含まないコントロール溶液とした. エルマン試薬溶液(4 μL)を既知の抗体濃度の trastuzumab-SH 溶液(20 μL)またはコントロール溶液(20 μL)に加え, 20 分間室温でインキュベートした. インキュベート後, コントロール溶液をリファレンスとして, 抗体溶液の 412 nm における吸光度を測定した. エルマン試薬がチオールと反応した際の生成物である 2-nitro-5-thiobenzoic acid の 412 nm におけるモル吸光係数を 14.15 mM⁻¹ cm⁻¹ として, チオール濃度を算出した. またエルマン試薬を加える前の抗体濃度およびエルマン試薬を加える前後の溶液量から, 吸光度を測定した際の抗体濃度を算出した. チオール濃度を抗体濃度で除算することで, 1 抗体あたりのチオール基導入数を算出した.

¹¹¹In 標識キレート化合物の合成

化合物 **8**, **9**, **16**, **17**, および **22** (1.0 mg/mL DMSO 溶液, 3.0–7.0 μL)をそれぞれ酢酸緩衝液(0.1 M, pH 6, 300–350 μL)に溶解させ, [¹¹¹In]InCl₃ 溶液(300–650 μL , 20.4–37.0 MBq)を加えた後, 90 °C で 6 分間加熱した. 反応溶液を Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. \times 150 mm)および移動相(H₂O/MeCN/TFA [90/10/0.1 (0 min) to 70/30/0.1 (20 min)], 流速 1.0 mL/min)を用いて逆相 HPLC で精製し, 目的の化合物を含む分画の溶媒を窒素ガス気流下で留去した.

¹¹¹In 標識抗体薬剤の合成

[¹¹¹In]In-MDI2, [¹¹¹In]In-MDI4, [¹¹¹In]In-MDG2, [¹¹¹In]In-MDG4, および[¹¹¹In]In-MD のリン酸緩衝液(0.1 M, pH 7, 500 μL)溶液に, trastuzumab-SH (0.6 mg)を加えた後, 室温で遮光環境下において6-9時間インキュベートした. その後, 反応液をアミコンウルトラ-4 (公称分画分子量 50 kDa)を用いて精製および濃縮し, 放射性抗体薬剤を得た. RCP は, TSKgel G3000SW_{XL} (5 μm, 7.8 mm I.D. × 300 mm)および移動相(リン酸緩衝液(0.1 M, pH 7), 流速 0.5 mL/min)を用いたサイズ排除 HPLC で分析した.

セルロース・アセテート膜電気泳動(cellulose acetate electrophoresis, CAE)

株式会社常光製セルロース・アセテート(CA)膜 SELECA-VSP (6 × 9 cm)およびサイティバ社製クロマトグラフィー用ペーパーWhatman 3MM CHR (6.25 × 10 cm × 2)を, リン酸緩衝液(20 mM, pH 7.4)に浸した後, 日本エイドー株式会社製のセルロース・アセテート膜電気泳動装置 NA-4700-B 型に設置した. [¹¹¹In]In-MDI2, [¹¹¹In]In-MDI4, [¹¹¹In]In-MDG2, [¹¹¹In]In-MDG4, および[¹¹¹In]In-MD (400 Bq, 1 μL)を CA 膜に 1 cm 間隔で滴下し, 7 mA で 20 分間電気泳動を行った. CA 膜を ¹¹¹In 標識体ごとに裁断した後に, さらに各 CA 膜を幅 4 mm に裁断した. ガンマカウンター2470 Wizard²を用いて, 各 CA 膜断片の放射能を測定した.

細胞培養

HER2/*neu* 陽性卵巣がん細胞 SK-OV-3 細胞は, American Type Culture Collection 社より購入した. 細胞は抗生物質(ペニシリンおよびストレプトマイシン) 100 U/mL および非働化ウシ胎児血清 10 v/v%を含むナカライテスク株式会社製 RPMI 1640 中, 37 °C, 5 v/v% CO₂ 下で培養した.

動物

動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を得, その指針を遵守して行った. 雌性 BALB/*c-nu/nu* ノードマウスは, 清水実験材料株式会社より購入した. 動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し, 飼料と水は自由に与えた.

体内放射能分布実験で使用するモデルマウスは, RPMI 1640 と Corning Life Sciences 社製 Matrigel の混合液(1:1, 100 μL)に SK-OV-3 細胞(1 × 10⁶または 4 × 10⁶cells/mouse)を懸濁させ, イソフルラン(2 v/v%)麻酔下, ノードマウスの右腰に皮下移植することで作製した. 腫瘍移植マウスは3-5週間飼育し, 腫瘍径が 0.5 cm に達したマウスを体内放射能分布実験に, 0.8 cm に達したマウスを SPECT/CT 撮像に使用した.

免疫反応性の評価

^{111}In 標識抗体薬剤の免疫反応性は既報に従って評価した。⁷⁶ SK-OV-3 細胞($0.63, 1.25, 2.5, 5.0 \times 10^6$ cells)をエッペンドルフ社製 Protein LoBind Tube 内で培地($300 \mu\text{L}$)に懸濁させた。細胞懸濁液に ^{111}In 標識抗体薬剤(0.74 kBq)を加え、1 時間転倒混和しながらインキュベートした。非特異的結合は、過剰量のトラスツズマブ($50 \mu\text{g}$)を加えることで評価した。インキュベート後、細胞懸濁液を $860 \times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を取り除いた。1 w/v% BSA を含む PBS で細胞塊を再懸濁させ、再度 $860 \times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を取り除いた。PBS を用いた洗浄を再度繰り返した後、ガンマカウンター-2480 Wizard²を用いて、細胞に添加した放射性抗体薬剤含有培地($300 \mu\text{L}, 0.74 \text{ kBq}$)および細胞塊の放射能を測定した。各放射性抗体薬剤の免疫反応性は、横軸が細胞濃度の逆数($\text{mL}/\text{million}$)、縦軸が特異的結合率の逆数($\text{total applied}/\text{specific binding}$)となる散布図を作成し、その近似直線の切片の逆数を算出することで求めた。

細胞内在化実験

^{111}In 標識抗体薬剤($148 \text{ kBq}/10^6$ 細胞)を SK-OV-3 細胞懸濁液(1 mL)に加え、 4°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、「免疫反応性の評価」に記載した手法に従って細胞を 1 w/v% BSA 含有 PBS で洗浄した。細胞塊を新しい培地で再懸濁させ、 $500 \mu\text{L}$ あたり 1.0×10^6 細胞となるように調製して分注し、 37°C 、5 v/v% CO_2 環境下で 0, 1, 2, 4, または 24 時間インキュベートした。その後、 $860 \times g$ で 3 分間遠心分離し、上清を培地面分として回収した。同様に細胞塊を 1 w/v% BSA 含有 PBS で 2 回洗浄し、全ての上清をまとめて培地面分とした。細胞表面に結合した放射性成分と細胞内に存在する放射性成分とを分離する目的で、細胞塊をクエン酸ナトリウム緩衝液($0.2 \text{ M}, \text{pH} 2, 300 \mu\text{L}$)で再懸濁させた。 4°C で 3 分間インキュベートした後、 $860 \times g$ で 3 分間遠心分離を行い、上清を細胞表面画分として回収した。同様にクエン酸ナトリウム緩衝液による洗浄を再度行い、上清をまとめて細胞表面画分、残った細胞塊を細胞内在化画分として回収した。各画分について、ガンマカウンター-2480 Wizard²で放射能を測定した。

インキュベート 24 時間後の培地面分について、アミコンウルトラ-4 (公称分画分子量 50 kDa)を用いて分子サイズによる分離を行い、細胞表面から解離した放射性抗体薬剤由来の放射性成分と、細胞の代謝物由来の放射性成分とを分離した。濃縮液を解離画分として回収し、ガンマカウンター-2480 Wizard²で放射能を測定した。またアミコンに残った放射能を代謝画分の放射能とした。それぞれの RIC について、細胞に結合した全放射能に対する回収した画分の放射能百分率を算出した。

腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布評価

^{111}In 標識抗体薬剤の生理食塩水溶液(315–333 kBq, 18 μg , 100 μL)を SK-OV-3 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈から投与し, 4, 24, 48, 72, 96, または 192 時間後に 1 群 4 匹のモデルマウスを屠殺した。採血後, 脾臓, 膵臓, 胃, 腸, 腎臓, 肝臓, 心臓, 肺, 脳, 腫瘍, および筋肉を摘出し, 重量および放射能を測定した。投与放射能に対する集積した放射能の百分率(% ID)を血液重量または臓器重量(g)で除した値(% ID/g)を放射能分布を示す指標として算出した。また, 放射能の減衰補正を未実施の体内放射能分布実験の結果をもとに, 血液および腫瘍における曲線下面積(AUC)を GraphPad Prism 6 を用いて算出した。

SPECT/CT

^{111}In In-TMDI2 の生理食塩水溶液(0.7 MBq, 50 μg , 100 μL)を SK-OV-3 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈から投与した。投与 72 時間後に, Gamma Medical-Ideas 社製 FX3000 pre-clinical imaging system にて SPECT/CT を行った。SPECT 画像は, イソフルラン麻酔下, 回転半径 35 mm, 投影時間 100 秒, 投影回数 32 回にて, 直径 1.0 mm, 焦点距離 75 mm のピンホールコリメーターを用いて撮像した。SPECT 後, CT (管電圧: 60 kV, 管電流: 270 μA)を行った。SPECT の投影データについて, 3 次元 ordered subset expectation maximization 法(8 subsets, 5 iterations)による画像再構成を行った。得られた SPECT/CT 画像は, PMOD Technologies 社製 PMOD ソフトウェア(Version 3.6)で解析した。

統計解析

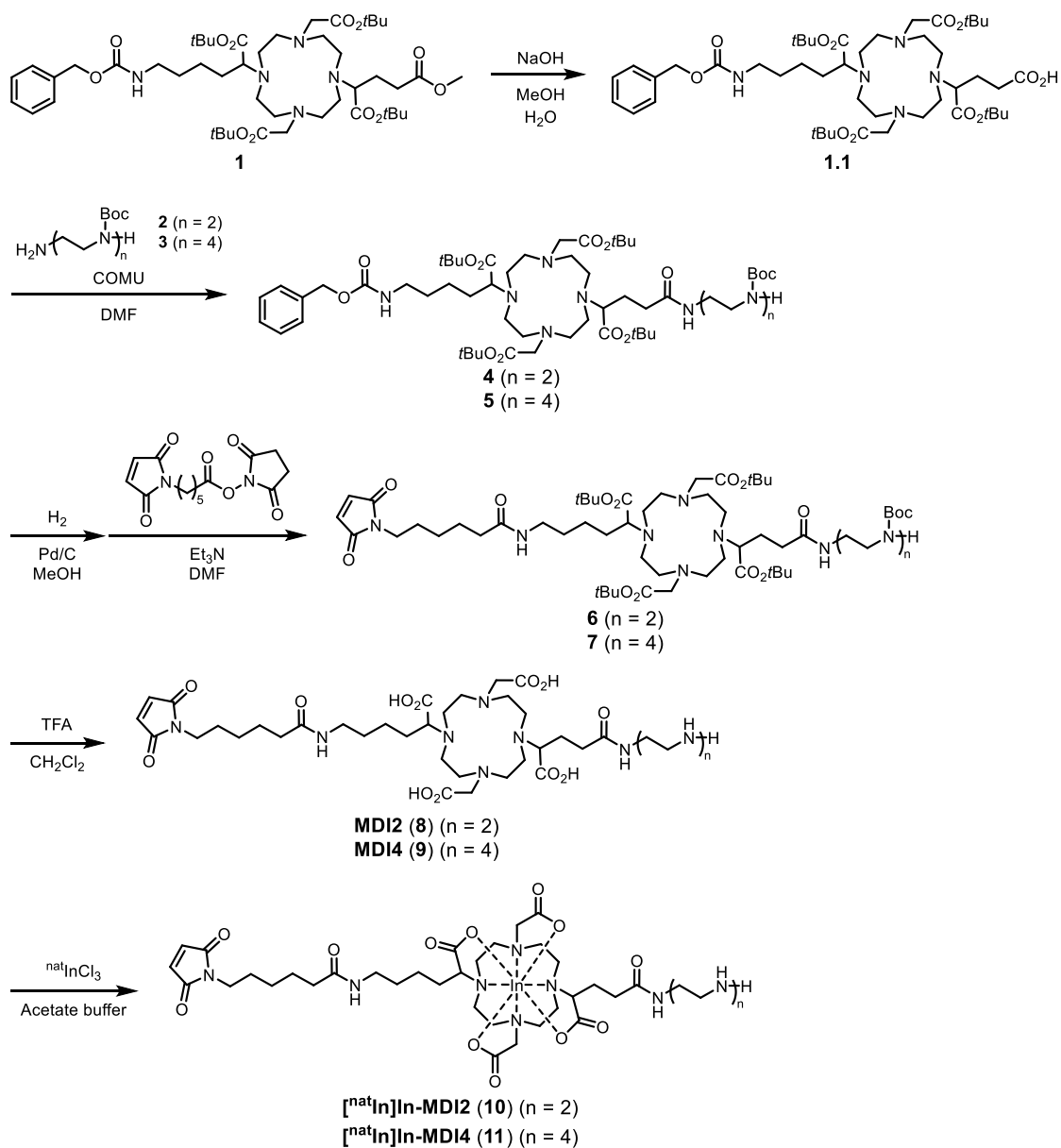
全てのデータは, GraphPad Prism 6 または Microsoft Excel を用いて解析した。細胞内在化実験および体内放射能分布実験における有意差検定は, 一元配置分散分析または二元配置分散分析およびボンフェローニの多重比較検定を組み合わせ, 信頼区間 95%で行った。

2.2. 結果と考察

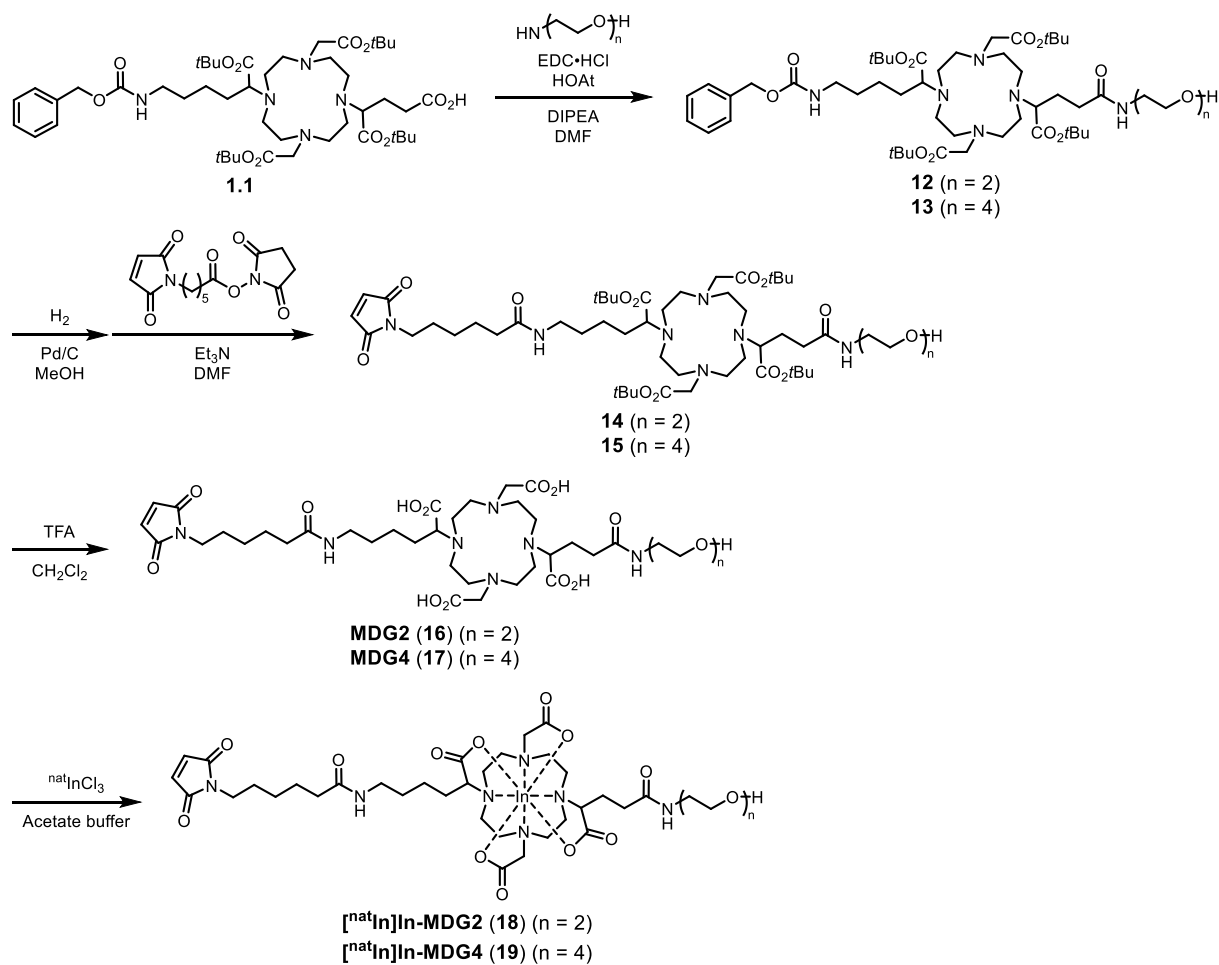
標識前駆体および非放射性 In 標識体の合成

Scheme 2-1 に MDI2 (化合物 **8**) および MDI4 (化合物 **9**) の合成経路を示す。2 つの反応点を有する既報の DOTA 誘導体を出発原料に,⁷²PEI 構造(化合物 **2** または **3**) およびマレイミド構造を順に導入することで, MDI2 および MDI4 を得た。**Scheme 2-2** には MDG2 (化合物 **16**) および MDG4 (化合物 **17**) の合成経路を示す。MDI2 および MDI4 と同様の合成経路において, PEI 構造を PEG 構造に変更することで, MDG2 および MDG4 を得た。**Scheme 2-3** には MD (化合物 **22**) の合成経路を示す。1 つの反応点のみを有する既報の DOTA 誘導体を出発原料に,⁷⁴マレイミド構造を導入することで MD を得た。また, 天然存在比のインジウム(III) (^{nat}In) を有する塩化インジウム(III) (^{nat}InCl₃) を使用して, 酢酸緩衝液中における配位子交換反応により, 各標識前駆体から対応する非放射性 In 標識体(化合物 **10**, **11**, **18**, **19**, または **23**) を合成した。

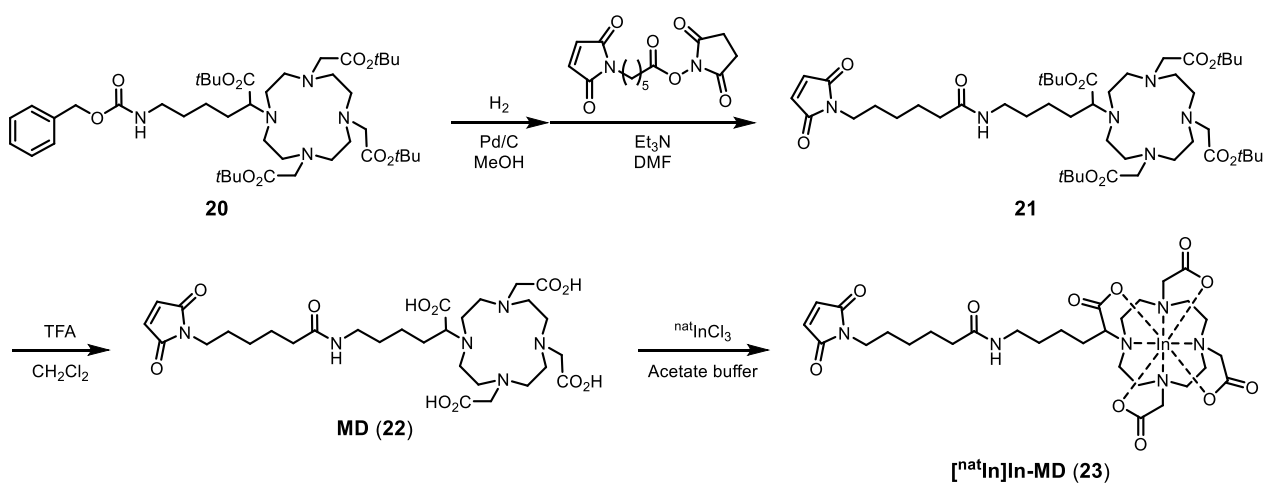
Scheme 2-1. Synthetic routes for MDI2/4 and nonradioactive In-labeled MDI2/4.



Scheme 2-2. Synthetic routes for MDG2/4 and nonradioactive In-labeled MDG2/4.



Scheme 2-3. Synthetic routes for MD and nonradioactive In-labeled MD.



^{111}In 標識抗体薬剤の合成

^{111}In 標識 RIC は 2 段階放射標識法により合成した(Scheme 2-4). 1 段階目の放射標識では, MDI2, MDI4, MDG2, MDG4, および MD を酸性緩衝液中 90 °C で加熱することで, 配位子交換反応により ^{111}In を導入し, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDI2}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDI4}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDG2}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDG4}$, および $[^{111}\text{In}]\text{In-MD}$ を合成した. また並行して, トラスツズマブを 2-イミノチオラン塩酸塩で処理することで, リジン残基にチオール基を導入した trastuzumab-SH を調製した. 2 段階目の放射標識では, trastuzumab-SH をマイケル付加反応により各 ^{111}In 標識化合物と反応させることで, 対応する ^{111}In 標識 RIC である $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDI2}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDI4}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG2}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG4}$, および $[^{111}\text{In}]\text{In-TMD}$ を得た. マイケル付加反応は低温かつ中性の条件下で進行するため, 2 段階標識法を行うことにより, 配位子交換反応時の高温かつ酸性の条件下に mAb を添加せずに済む. そのため, mAb の抗原認識能を維持した RIC の合成が可能になると考えられる.

Scheme 2-4. Radiosynthetic routes for ^{111}In -labeled RICs.

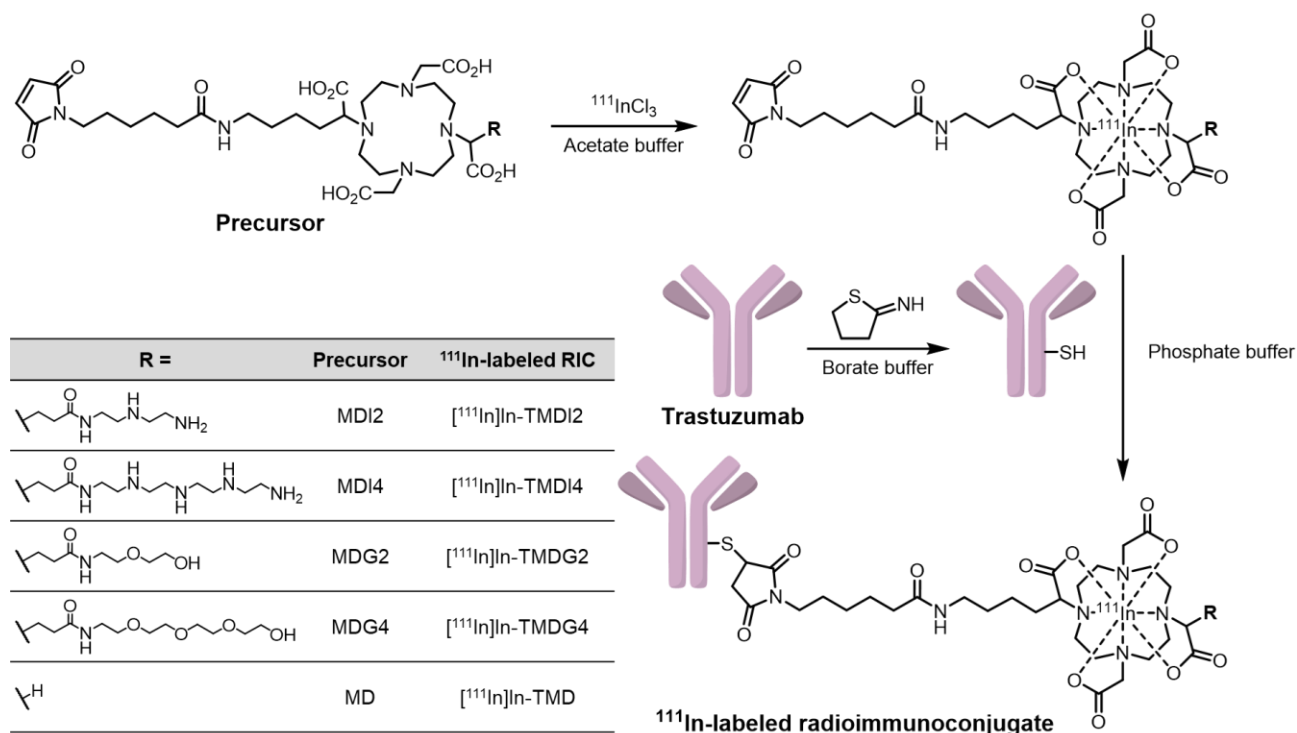


Table 2-1に2段階放射標識法の結果を示す。2段階放射標識を通した総放射化学的収率(Total RCY)は、1段階目の標識時に添加した $^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ 溶液の放射エネルギーに対する、得られた ^{111}In 標識抗体薬剤の放射能百分率として算出した。1段階目の放射標識において、MDI2/4, MDG2/4, および MD は53–72%のRCYで ^{111}In 標識反応が進行し、逆相HPLCにおいて95%以上の高いRCPおよび対応する非放射性In標識体との保持時間の一致を示した(**Figure 2-3**)。トラスツズマブへのチオール基の導入反応は良好に進行し、1抗体分子あたりのチオール基導入数は、エルマン法により 1.32 ± 0.16 と算出された。1抗体分子に対して2モル当量の2-イミノチオラン塩酸塩を使用しているため、これは妥当な導入数であると考えられる。また、1抗体分子あたりのチオール基導入数を1付近の低値に留めておくことで、1抗体分子に過度にキレート化合物が導入されることを避け、抗体の抗原認識能を損なわない放射標識が可能であると考えられる。2段階目の放射標識において、トラスツズマブの ^{111}In 標識反応は54–68%のRCYで進行し、95%以上の高いRCPでRICが得られた(**Table 2-1**, **Figure 2-4**)。また2段階放射標識を通した総RCYは32–39%となり(**Table 2-1**)、生物学的評価の実施に十分な収率でRICを合成可能であった。

Table 2-1. RCYs of ^{111}In -labeled RICs.

^{111}In -labeled RIC	RCY in first step (%)	RCY in second step (%)	Total RCY (%)
$^{111}\text{In}]\text{In-TMDI2}$	59.1	64.0	37.8
$^{111}\text{In}]\text{In-TMDI4}$	52.9	67.7	35.8
$^{111}\text{In}]\text{In-TMDG2}$	70.1	55.0	38.5
$^{111}\text{In}]\text{In-TMDG4}$	71.9	55.5	38.9
$^{111}\text{In}]\text{In-TMD}$	60.2	53.6	32.3

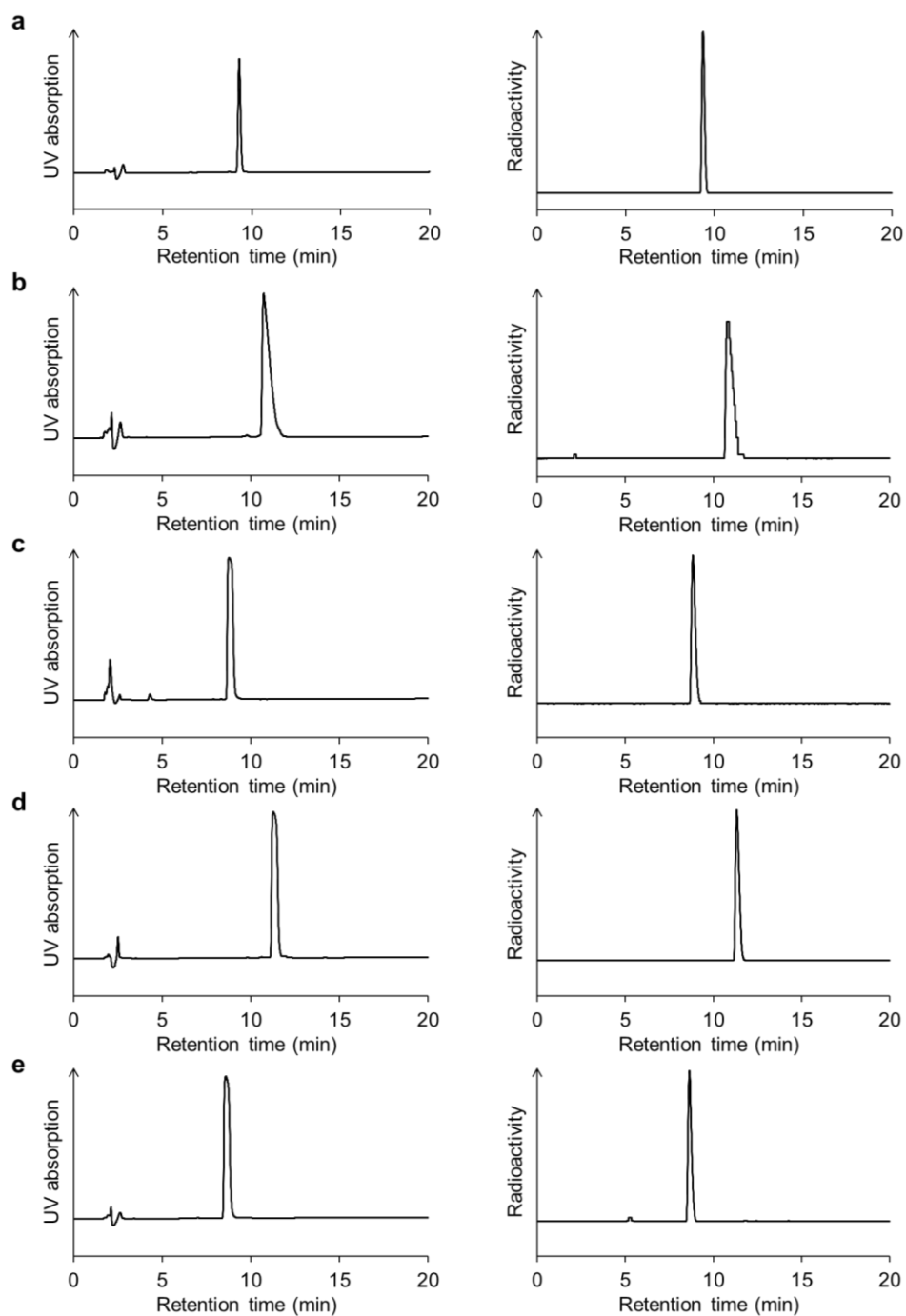


Figure 2-3. HPLC chromatograms of UV absorption at 220 nm and radioactivity for a mixture of [^{nat}In]In-MDI2 and [^{111}In]In-MDI2 (a), [^{nat}In]In-MDI4 and [^{111}In]In-MDI4 (b), [^{nat}In]In-MDG2 and [^{111}In]In-MDG2 (c), [^{nat}In]In-MDG4 and [^{111}In]In-MDG4 (d), and [^{nat}In]In-MD and [^{111}In]In-MD (e).

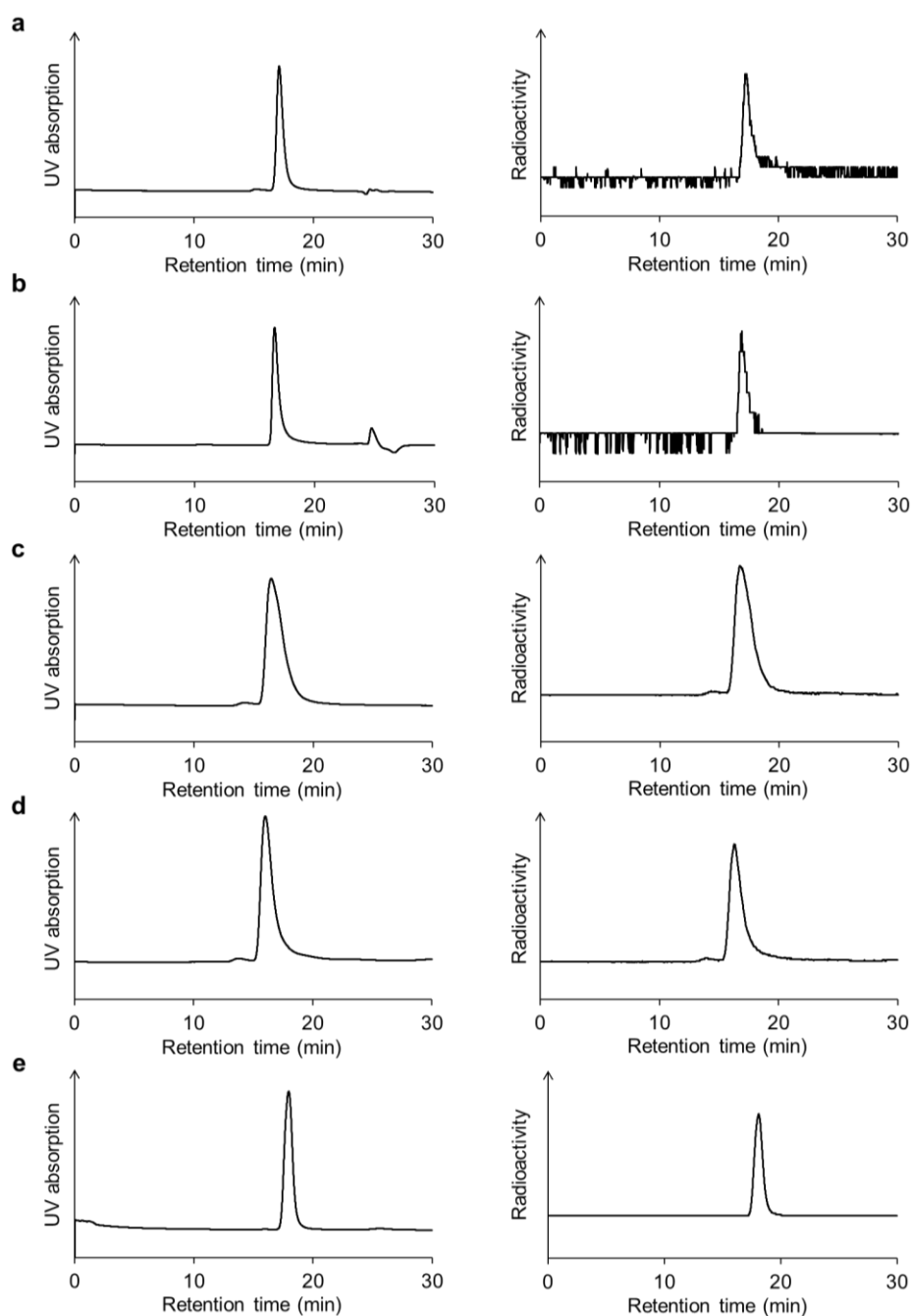


Figure 2-4. HPLC chromatograms of UV absorption at 254 nm and radioactivity for [^{111}In]In-TMDI2 (a), [^{111}In]In-TMDI4 (b), [^{111}In]In-TMDG2 (c), [^{111}In]In-TMDG4 (d), and [^{111}In]In-TMD (e).

セルロース・アセテート膜電気泳動(CAE)

キレート化合物の総電荷が PEI 構造の導入により変化することを確認する目的で、 ^{111}In 標識キレート化合物の CAE を実施した。In-DOTA 複合体の正味電荷は-1 であるため,⁷⁷ [^{111}In]In-MDG2, [^{111}In]In-MDG4, および [^{111}In]In-MD の総電荷は-1 であると予想される。2 つの第一級または第二級アミノ基を有する PEI2 構造, および 4 つの第一級または第二級アミノ基を有する PEI4 構造は, 生理的条件下においてそれぞれプロトン化およびジプロトン化されていると考えられる。⁷¹ そのため, [^{111}In]In-MDI2 および [^{111}In]In-MDI4 の総電荷はそれぞれ ± 0 および +1 であると考えられる。

CAEの結果, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDI2}$ は滴下点からほとんど移動しなかった(**Figure 2-5a**). 一方, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDI4}$ は陰極側に移動し(**Figure 2-5b**), $[^{111}\text{In}]\text{In-MDG2}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDG4}$, および $[^{111}\text{In}]\text{In-MD}$ は陽極側に移動した(**Figure 2-5c-e**). また, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDI4}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDG2}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-MDG4}$, および $[^{111}\text{In}]\text{In-MD}$ の滴下点からの移動距離は概ね同等であった. これらの結果より, ^{111}In 標識キレート化合物が予想通りの総電荷を有することが示された.

RICは抗体構造がリソソーム内のペプチダーゼにより分解されるため, リジン残基, 2-イミノチオラン, および ^{111}In 標識キレート化合物から成る化学構造が主な放射性代謝物になると想定される. トラスツズマブのリジン残基のアミノ基と 2-イミノチオランが反応する際, 生理的条件下に置いて +1 の正電荷を有するアミジン構造を形成する. またリソソーム内の酸性環境において, PEI2 および PEI4 は追加の正電荷を帯びると考えられる.⁷¹ これらを考慮すると, $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDI2}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDI4}$ 由来の放射性代謝物は正に帯電し, $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG2}$, $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG4}$, および $[^{111}\text{In}]\text{In-TMD}$ 由来の代謝物の総電荷は ± 0 であると予想される. CAEの結果は, PEIの導入により正に帯電した放射性代謝物を実現可能であることを示唆している.

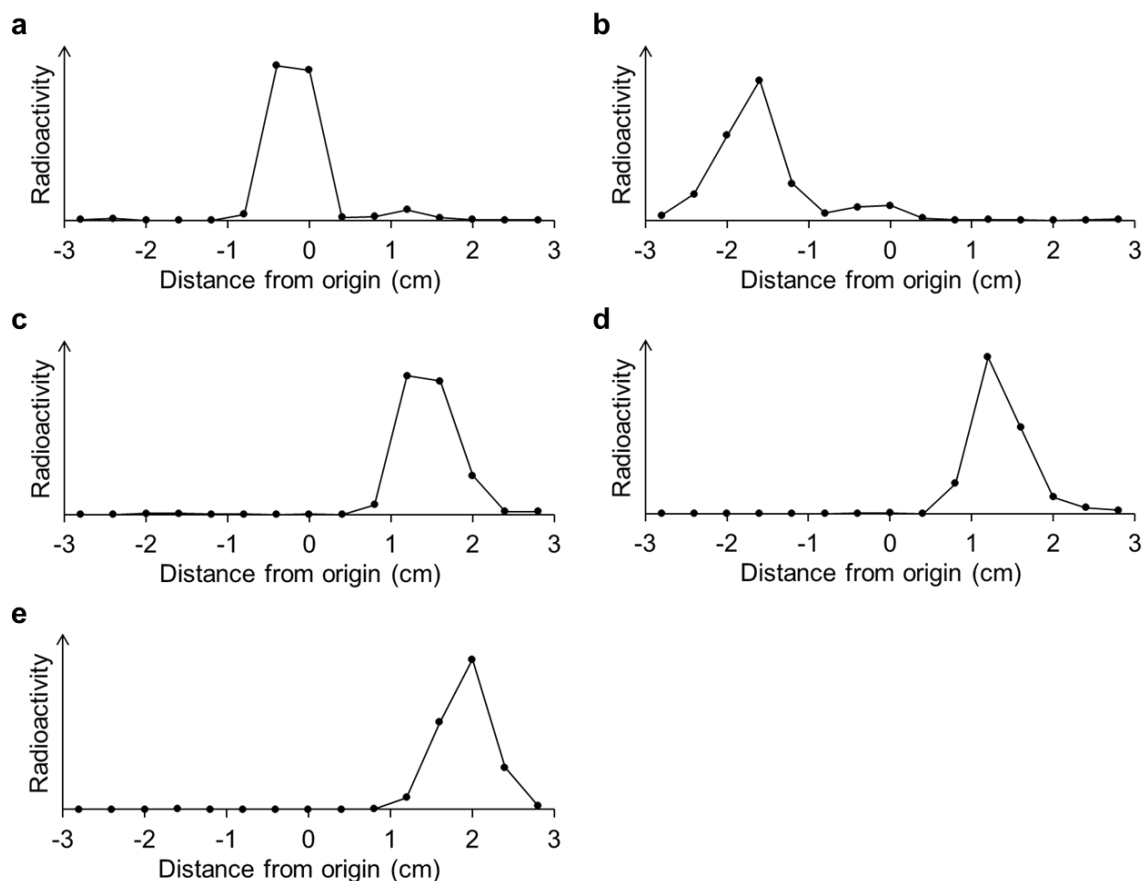


Figure 2-5. CAE radioactivity profiles of $[^{111}\text{In}]\text{In-MDI2}$ (a), $[^{111}\text{In}]\text{In-MDI4}$ (b), $[^{111}\text{In}]\text{In-MDG2}$ (c), $[^{111}\text{In}]\text{In-MDG4}$ (d), and $[^{111}\text{In}]\text{In-MD}$ (e). Positive or negative distance from the origin means migration to the anode or cathode, respectively.

免疫反応性の評価

キレート化合物を用いた放射標識が抗体の抗原認識能に与える影響を評価する目的で、既報の手法に従い,⁷⁶ HER2/*neu* が高発現した SK-OV-3 細胞との結合性評価を通して(**Figure 2-6**), ¹¹¹In 標識抗体薬剤の免疫反応性(immunoreactivity)を算出した(**Table 2-2**). [¹¹¹In]In-TMDI2, [¹¹¹In]In-TMDI4, [¹¹¹In]In-TMDG2, [¹¹¹In]In-TMDG4, および[¹¹¹In]In-TMD は、それぞれ 99.5, 95.5, 91.1, 84.1, および 80.8%の免疫反応性を示した。これらの値は、既報の DOTA 含有トラスツズマブの免疫反応性(65–94%)と同等かそれ以上であった。⁷⁸⁻⁸² 以上の結果より、3 官能性キレート化合物を用いた 2 段階放射標識法が、抗体の抗原認識能に影響を与えないことが示された。

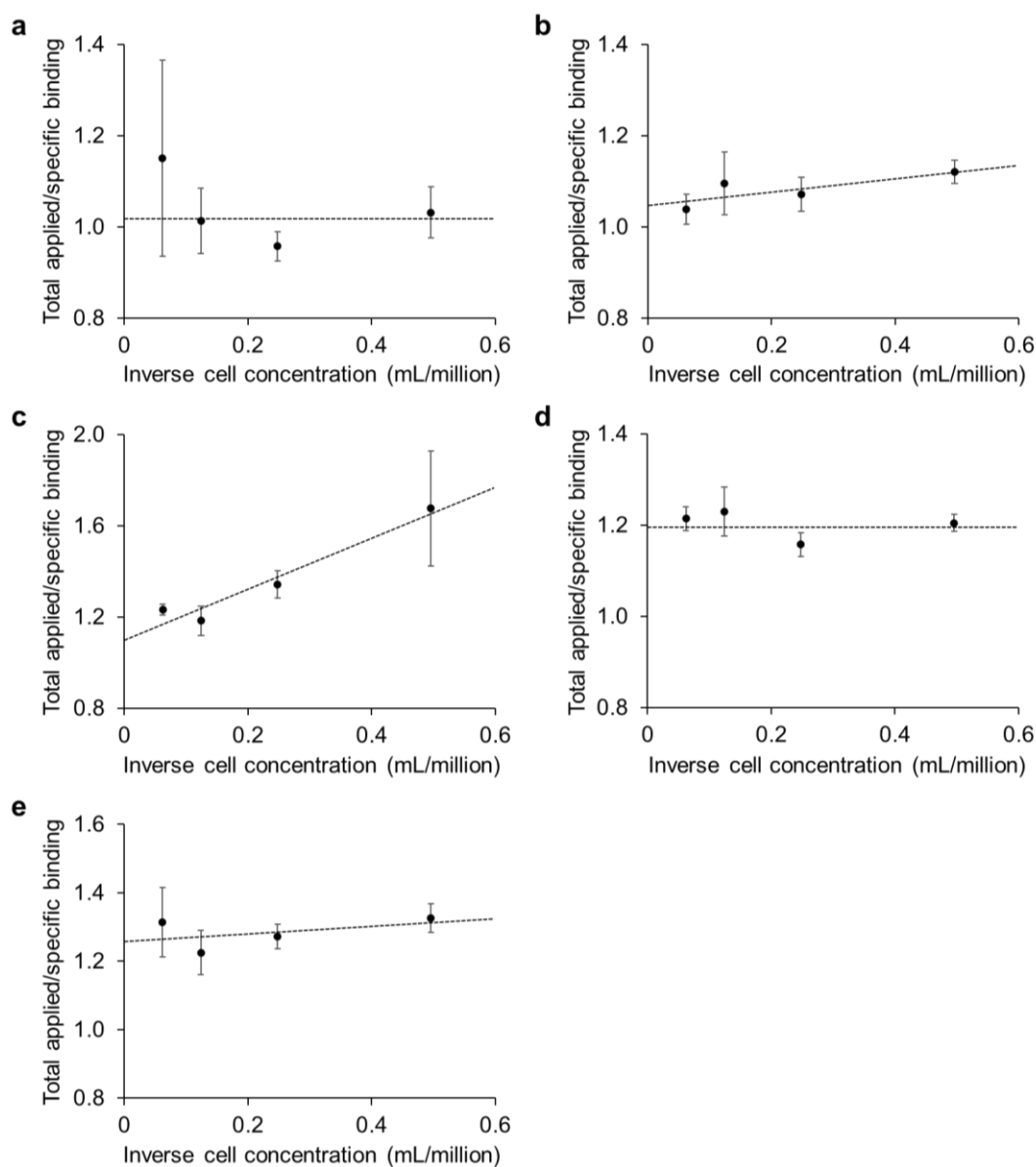


Figure 2-6. Determination of the immunoreactivity of [¹¹¹In]In-TMDI2 (a), [¹¹¹In]In-TMDI4 (b), [¹¹¹In]In-TMDG2 (c), [¹¹¹In]In-TMDG4 (d), and [¹¹¹In]In-TMD (e). The immunoreactivity of RICs was determined as the inverse of the intercept extrapolated from the fitted straight line.

Table 2-2. Determined immunoreactivity of ¹¹¹In-labeled RICs.

¹¹¹ In-labeled RIC	Immunoreactivity (%)
[¹¹¹ In]In-TMDI2	99.5 ± 2.2
[¹¹¹ In]In-TMDI4	95.5 ± 3.3
[¹¹¹ In]In-TMDG2	91.1 ± 3.5
[¹¹¹ In]In-TMDG4	84.1 ± 0.9
[¹¹¹ In]In-TMD	80.8 ± 5.5

細胞内在化実験

RIC が標的分子と結合した後の細胞上の放射能分布を評価する目的で、SK-OV-3 細胞を用いた細胞内在化実験を行った。まず RIC を細胞表面上の HER2/*neu* に結合させ、その後 0, 1, 2, 4, および 24 時間インキュベート後の放射能分布を評価した。すべての RIC について、内在化画分および培地画分の放射能百分率は経時的に増加する傾向を示した(**Figure 2-7, Table 2-3**)。24 時間インキュベート後において、[¹¹¹In]In-TMDI2 および[¹¹¹In]In-TMDI4 はそれぞれ 21.7 および 18.5%の細胞内在化率を示し、[¹¹¹In]In-TMDG2, [¹¹¹In]In-TMDG4, および[¹¹¹In]In-TMDと比較して有意に高かった(それぞれ 15.6, 15.5, および 14.8%) (**Figure 2-7a**)。[¹¹¹In]In-TMDI2 および[¹¹¹In]In-TMDI4 と 24 時間インキュベート後の培地画分の放射能百分率については、それぞれ 14.5 および 13.0%となり、[¹¹¹In]In-TMDG2, [¹¹¹In]In-TMDG4, および[¹¹¹In]In-TMDと比較して 2 倍近く低値を示した(それぞれ 24.3, 21.3, および 29.1%) (**Figure 2-7b**)。また細胞内在化画分の放射エネルギーを培地画分の放射エネルギーで除した比率は、インキュベート 4 時間後において[¹¹¹In]In-TMDI2 および[¹¹¹In]In-TMDI4 は 1.0 を超え、24 時間後にはそれぞれ 1.49 および 1.43 に達した(**Figure 2-7c**)。一方、[¹¹¹In]In-TMDG2, [¹¹¹In]In-TMDG4, および[¹¹¹In]In-TMDは 24 時間経過後において有意に低い比率を示した(それぞれ 0.64, 0.73, および 0.51)。これらの結果より、[¹¹¹In]In-TMDG2, [¹¹¹In]In-TMDG4, および[¹¹¹In]In-TMDと比較して、[¹¹¹In]In-TMDI2 および[¹¹¹In]In-TMDI4 が良好な放射能の滞留傾向を有することが示された。

放射能分布をさらに詳細に評価する目的で、24 時間インキュベート後の培地画分における放射性成分を分子量により分離した。細胞表面から解離した RIC が含まれる解離画分においては、RIC 間で有意な差は認められなかった(**Figure 2-7d**)。一方で、RIC 由来の放射性代謝物が含まれる代謝画分の放射能百分率については、[¹¹¹In]In-TMDI2 および[¹¹¹In]In-TMDI4 はそれぞれ 8.0 および 5.0%を示し、[¹¹¹In]In-TMDG2, [¹¹¹In]In-TMDG4, および[¹¹¹In]In-TMDと比較して有意に低値であった(それぞれ 18.3, 14.6, および 21.2%) (**Figure 2-7e**)。また、インキュベート 24 時間後における内在化率と代謝物の細胞外流出率の比率は、[¹¹¹In]In-TMDI2 および[¹¹¹In]In-TMDI4 はそれぞれ 2.72 および 3.87 を示し、[¹¹¹In]In-TMDG2, [¹¹¹In]In-TMDG4, および[¹¹¹In]In-TMDと比較して有意に高値であった(それぞれ 0.85, 1.06, および 0.70) (**Figure 2-7f**)。これらの結果より、[¹¹¹In]In-TMDG2/4 および[¹¹¹In]In-TMDと比較して、[¹¹¹In]In-TMDI2/4 が高い細胞内滞留性を示す放射性代謝物へと分解されることが示された。

従来、金属配位子を有する RIC の分子設計においては、金属配位子とリガンド導入部位から成る 2 官能性キレート化合物が用いられてきた。これらの RIC は放射性薬剤としての基礎的性質を示してきたものの、RIC としての有用性は基盤となる抗体の特性に大きく依存していた。本章における細胞内在化実験の結果は、3 官能性キレート化合物である MDI2/4 を使用することで、従来の 2 官能性キレート化合物を用いた RIC よりも高い細胞内滞留性を示す RIC が合成可能であることを明らかとした。加えて、MDI2/4 を用いた RIC 由来の放射性代謝物は、類似した化学構造である一方で正電荷を有さない MDG2/4 と比較しても、高い細胞内滞留性を示した。これらの結果は、正電荷を有する PEI 構造が放射性代謝物の細胞内滞留性向上に重要であることを示している。また細胞内滞留性に関して、 $[^{111}\text{In}]\text{In-TMD}$ と比較して $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG2}$ 由来の放射性代謝物の滞留性が高く、 $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG2}$ と比較して $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG4}$ 由来の代謝物の滞留性が高い傾向が認められている (Figure 2-7e)。この結果より、MDI2/4 を用いて放射標識した RIC 由来の代謝物の高い細胞内滞留性は、MD と比較して分子量が増大したことにも起因すると考えられる。

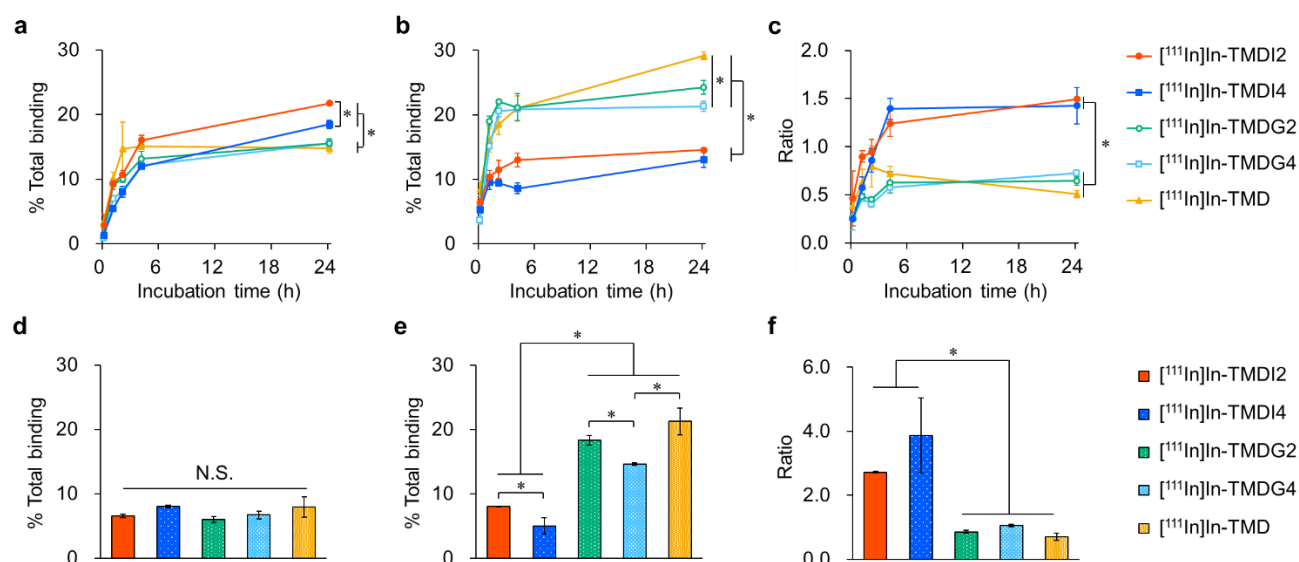


Figure 2-7. Internalization assay of ^{111}In -labeled RICs using SK-OV-3 cells. The percentage of the total binding is shown with respect to time for the internalized fraction (a) and medium fraction (b). The ratio of the internalized fraction to the medium fraction is also shown with respect to time (c). The percentage of the total binding after 24-h incubation is shown for the dissociated fraction (d) and degraded fraction (e). The ratio of the internalized fraction to the degraded fraction is also shown (f). * $P < 0.05$ (two-way ANOVA with post hoc Bonferroni's test for (a–c) after 24-h incubation, and one-way ANOVA with post hoc Bonferroni's test for (d–f)). N.S. means no significant difference.

Table 2-3. Internalization assay of ¹¹¹In-labeled RICs using SK-OV-3 cells

		Incubation time (h)				
		0	1	2	4	24
[¹¹¹ In]In-TMDI2						
% Total binding	Medium	6.3 ± 0.7	10.4 ± 1.0	11.5 ± 1.5	13.0 ± 1.1	14.5 ± 0.3
	Surface	90.8 ± 1.4	80.4 ± 1.3	77.8 ± 1.6	71.0 ± 1.0	63.7 ± 0.6
	Internalized	2.9 ± 1.6	9.3 ± 0.3	10.7 ± 0.6	16.0 ± 0.7	21.7 ± 0.3
	Dissociated	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.6 ± 0.3
	Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.0 ± 0.0
Ratio	Internalized /Medium	0.46 ± 0.29	0.90 ± 0.06	0.94 ± 0.13	1.24 ± 0.13	1.49 ± 0.01
	Internalized /Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.72 ± 0.03
[¹¹¹ In]In-TMDI4						
% Total binding	Medium	5.3 ± 0.5	9.5 ± 1.2	9.4 ± 0.3	8.6 ± 0.8	13.0 ± 1.2
	Surface	93.4 ± 0.7	85.0 ± 0.8	82.6 ± 0.6	79.5 ± 1.2	68.5 ± 0.7
	Internalized	1.3 ± 0.2	5.4 ± 0.4	8.0 ± 0.9	11.9 ± 0.4	18.5 ± 0.7
	Dissociated	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.0 ± 0.2
	Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.0 ± 1.2
Ratio	Internalized /Medium	0.25 ± 0.02	0.58 ± 0.11	0.86 ± 0.12	1.40 ± 0.11	1.43 ± 0.19
	Internalized /Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.87 ± 1.17
[¹¹¹ In]In-TMDG2						
% Total binding	Medium	5.6 ± 0.2	19.0 ± 0.7	22.0 ± 0.2	21.2 ± 2.1	24.3 ± 1.0
	Surface	92.9 ± 0.7	71.8 ± 1.5	68.0 ± 0.3	65.7 ± 1.0	60.1 ± 1.1
	Internalized	1.4 ± 0.5	9.2 ± 0.9	10.0 ± 0.5	13.1 ± 1.2	15.6 ± 0.7
	Dissociated	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.9 ± 0.5
	Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	18.3 ± 0.7
Ratio	Internalized /Medium	0.25 ± 0.07	0.48 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.63 ± 0.11	0.64 ± 0.04
	Internalized /Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.85 ± 0.04
[¹¹¹ In]In-TMDG4						
% Total binding	Medium	3.6 ± 0.6	15.1 ± 0.4	20.6 ± 0.8	20.8 ± 0.4	21.3 ± 0.8
	Surface	95.5 ± 0.6	78.0 ± 0.7	71.2 ± 0.7	67.1 ± 0.7	63.2 ± 1.4
	Internalized	0.9 ± 0.4	6.9 ± 0.3	8.3 ± 0.4	12.1 ± 0.4	15.5 ± 0.7
	Dissociated	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.7 ± 0.6
	Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	14.6 ± 0.2
Ratio	Internalized /Medium	0.25 ± 0.12	0.46 ± 0.01	0.40 ± 0.03	0.58 ± 0.01	0.73 ± 0.02
	Internalized /Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.06 ± 0.04

		[¹¹¹ In]In-TMD				
% Total binding	Medium	8.5 ± 1.0	16.1 ± 1.8	18.6 ± 1.6	21.0 ± 1.9	29.1 ± 0.6
	Surface	88.1 ± 2.1	73.8 ± 1.4	66.7 ± 4.6	63.9 ± 1.8	56.1 ± 0.4
	Internalized	3.3 ± 1.2	10.1 ± 1.0	14.7 ± 4.1	15.0 ± 0.3	14.8 ± 0.8
	Dissociated	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.9 ± 1.6
	Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21.2 ± 2.1
Ratio	Internalized /Medium	0.39 ± 0.10	0.64 ± 0.13	0.79 ± 0.22	0.72 ± 0.08	0.51 ± 0.04
	Internalized /Degraded	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.70 ± 0.11

Values are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments. N.D. means no data.

腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布評価

各 RIC のインビボにおける特性を評価する目的で、SK-OV-3 腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験を行った(**Table 2-4**). 全ての RIC は高い血中滞留性を示し、心臓や肺などの血液を含む臓器、および脾臓、腎臓、肝臓などの正常臓器において、RIC 間で同様の放射能分布を示した。¹¹¹In]In-TMDI2 および¹¹¹In]In-TMDI4 の投与 72 時間後において、腫瘍における放射能集積はそれぞれ 33.5 および 41.3% ID/g に到達し、¹¹¹In]In-TMDG2, ¹¹¹In]In-TMDG4, および¹¹¹In]In-TMD と比較して高値であった(それぞれ 26.0, 23.9, および 24.7% ID/g) (**Figure 2-8a**). これらのインビボにおける腫瘍集積の差は、インビトロにおける RIC 間の放射性代謝物の滞留性の差を反映していると考えられる. 血中放射エネルギーについては、¹¹¹In]In-TMDI2, ¹¹¹In]In-TMDG2, ¹¹¹In]In-TMDG4, および¹¹¹In]In-TMD 間でほとんど差は認められなかった一方で、¹¹¹In]In-TMDI4 は他の RIC と比較して高い血中滞留性を示した(**Figure 2-8b**). ¹¹¹In]In-TMDI4 の投与 24 時間後以降で血中放射エネルギーが増加が認められていたため、¹¹¹In]In-TMDI4 がリソソーム内で生じる正に帯電した代謝物は、全身循環に放出された後に血漿中タンパク質と非特異的に相互作用する可能性が考えられる. また腫瘍を明瞭に描出するためには、腫瘍/血液比が少なくとも 2.0 に到達することが望まれる.⁸³ 全ての RIC の腫瘍/血液比は経時的な増加傾向を示し、¹¹¹In]In-TMDI2 および¹¹¹In]In-TMDI4 は投与 72 時間後で 2.0 に到達した(それぞれ 2.25 および 2.60) (**Figure 2-8c**). 一方で、¹¹¹In]In-TMDG2 および¹¹¹In]In-TMDG4 は投与 96 時間後に(それぞれ 2.46 および 2.35), ¹¹¹In]In-TMD は投与 192 時間後に 2.0 に到達した(3.07). これらの結果より、¹¹¹In]In-TMDI2 および¹¹¹In]In-TMDI4 が早期のタイムポイントから診断用薬剤として機能しうることが示され、従来の 2 官能性キレート化合物と比較して、PEI 含有 3 官能性キレート化合物がインビボにおいて優れた特性を有することが示された.

さらに RIC の体内動態を詳細に比較する目的で、腫瘍および血液における曲線下面積(AUC)値を算出した. ¹¹¹In]In-TMDI2 および¹¹¹In]In-TMDI4 の腫瘍 AUC 値はそれぞれ 2133 および 2259% ID/g·h であり、¹¹¹In]In-TMDG2 および¹¹¹In]In-TMDG4 と比較して高く(それぞれ 1776 および 1897% ID/g·h), ¹¹¹In]In-TMD と比較して有意に高かった(1583% ID/g·h) (**Figure 2-8d**). この結果は、¹¹¹In]In-TMDI2

および ^{111}In In-TMDI4 が、他の RIC と比較して、より効率的に放射能を腫瘍に送達可能であることを示している。血中放射能について、 ^{111}In In-TMDI2, ^{111}In In-TMDG2, ^{111}In In-TMDG4, および ^{111}In In-TMD の AUC 値間では有意な差が認められなかった一方で(それぞれ 1535, 1468, 1519, および 1613% ID/g·h), ^{111}In In-TMDI4 は高値を示した(1726% ID/g·h) (**Figure 2-8e**)。その結果、 ^{111}In In-TMDI2 が最も高い腫瘍および血液における AUC 値比を示し(1.39), ^{111}In In-TMDI4, ^{111}In In-TMDG4, ^{111}In In-TMDG2, および ^{111}In In-TMD が ^{111}In In-TMDI2 に続いた(それぞれ 1.31, 1.25, 1.21, および 0.98) (**Figure 2-8f**)。 ^{111}In In-TMD と比較して、血中滞留性を上昇させることなく腫瘍集積性を向上可能な ^{111}In In-TMDI2 は、最も優れた体内動態を示した RIC であると考えられる。以上の結果より、MDI2 が RIC の腫瘍 AUC 値および腫瘍/血液 AUC 値比を効果的に改善可能であることが示され、MDI2 を用いて合成した放射性抗体薬剤が、インビボにおいて優れた体内動態を示すことが明らかとなった。

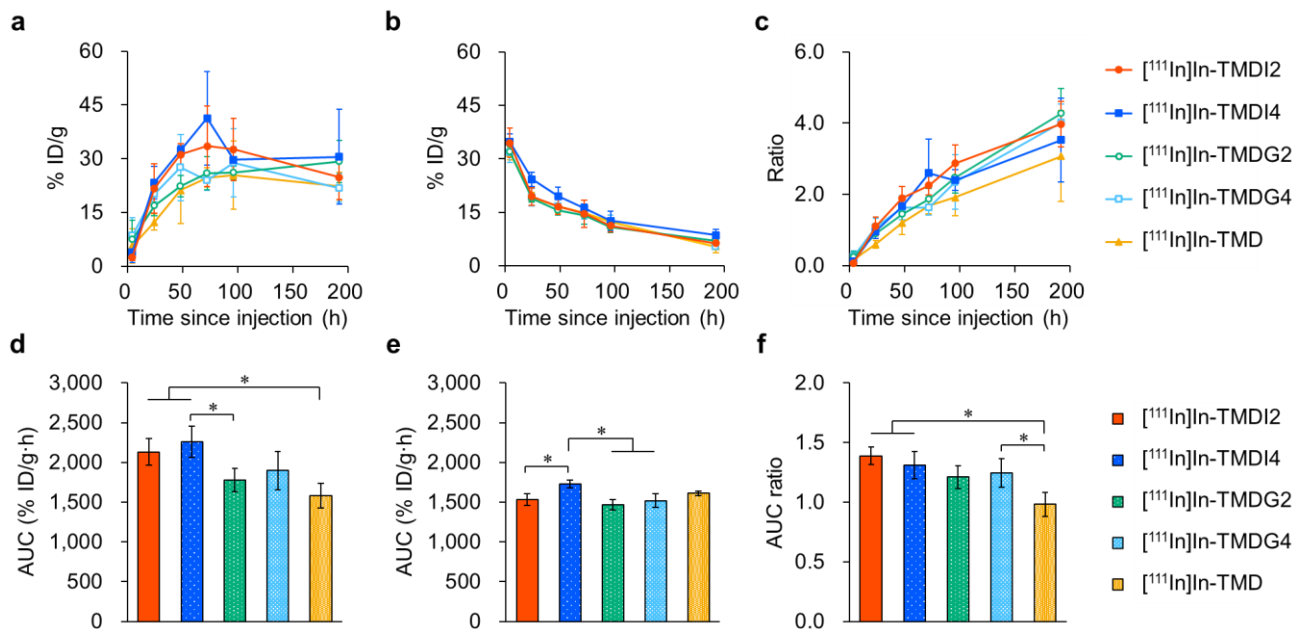


Figure 2-8. Comparison of the tumor radioactivity (a), blood radioactivity (b), and tumor/blood ratio (c) among five RICs. Comparison of the area under the curve (AUC) value of the tumor (d) and blood (e) and the tumor/blood AUC value ratio (f) between five RICs. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA with post hoc Bonferroni's test).

Table 2-4. Biodistribution of radioactivity among organs and tissues after the intravenous injection of ^{111}In -labeled RICs into SK-OV-3 tumor-bearing mice.

Organs and tissues	Time since injection (h)						
	4	24	48	72	96	192	
[^{111}In]In-TMDI2							
% ID/g	Blood	34.51 ± 4.07	19.43 ± 2.43	16.62 ± 2.18	14.63 ± 3.82	11.26 ± 1.76	6.32 ± 1.66
	Spleen	8.78 ± 1.55	6.83 ± 1.42	7.13 ± 1.46	7.55 ± 0.77	5.90 ± 0.61	5.17 ± 0.74
	Pancreas	1.88 ± 0.35	2.49 ± 0.64	2.04 ± 0.36	2.68 ± 0.48	2.54 ± 0.80	1.91 ± 0.80
	Stomach*	0.48 ± 0.16	0.37 ± 0.05	0.34 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.35 ± 0.07	0.24 ± 0.05
	Intestine	2.66 ± 0.28	2.05 ± 0.35	1.93 ± 0.21	1.95 ± 0.28	1.73 ± 0.31	0.83 ± 0.12
	Kidney	8.45 ± 1.44	7.31 ± 1.24	7.39 ± 0.89	7.21 ± 1.03	6.58 ± 0.88	3.84 ± 0.19
	Liver	9.71 ± 1.40	7.46 ± 1.79	7.40 ± 0.79	8.48 ± 1.30	6.58 ± 0.97	5.11 ± 1.03
	Heart	7.97 ± 1.21	4.76 ± 0.77	3.95 ± 0.36	3.06 ± 0.42	2.67 ± 0.12	1.64 ± 0.30
	Lung	18.12 ± 3.14	11.10 ± 1.43	8.85 ± 0.78	8.75 ± 1.74	6.84 ± 1.10	4.18 ± 1.07
	Brain	0.70 ± 0.29	0.59 ± 0.16	0.43 ± 0.06	0.45 ± 0.10	0.29 ± 0.04	0.19 ± 0.05
	Tumor	2.47 ± 0.84	21.72 ± 6.86	31.16 ± 3.10	33.47 ± 11.26	32.58 ± 8.66	24.80 ± 6.21
	Muscle	0.96 ± 0.41	1.62 ± 0.44	1.56 ± 0.22	1.50 ± 0.31	1.18 ± 0.12	0.68 ± 0.15
Ratio	Tumor/Blood	0.07 ± 0.02	1.10 ± 0.27	1.90 ± 0.33	2.25 ± 0.28	2.87 ± 0.52	3.97 ± 0.64
	Tumor/Muscle	2.63 ± 0.43	13.37 ± 1.93	20.42 ± 4.45	23.26 ± 9.67	28.07 ± 9.59	37.22 ± 9.18
[^{111}In]In-TMDI4							
% ID/g	Blood	34.73 ± 2.31	24.24 ± 2.06	19.56 ± 2.52	16.16 ± 1.24	12.61 ± 2.72	8.60 ± 1.54
	Spleen	7.65 ± 1.71	7.38 ± 1.32	7.51 ± 1.35	6.47 ± 1.04	6.50 ± 1.11	5.66 ± 1.50
	Pancreas	1.31 ± 0.26	2.12 ± 0.11	1.75 ± 0.38	1.59 ± 0.26	1.39 ± 0.35	1.43 ± 0.32
	Stomach*	0.41 ± 0.09	0.36 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.24 ± 0.07
	Intestine	2.20 ± 0.56	2.15 ± 0.02	1.66 ± 0.19	1.69 ± 0.30	1.54 ± 0.17	1.15 ± 0.17
	Kidney	7.64 ± 0.88	8.02 ± 0.48	7.88 ± 0.99	7.76 ± 0.48	7.22 ± 0.99	5.31 ± 0.92
	Liver	12.03 ± 1.76	9.73 ± 1.32	9.39 ± 1.52	8.57 ± 1.67	9.36 ± 2.14	5.75 ± 0.49
	Heart	8.56 ± 0.75	5.12 ± 0.42	4.59 ± 0.55	3.17 ± 0.30	3.20 ± 0.63	2.23 ± 0.39
	Lung	18.93 ± 2.11	14.01 ± 2.87	11.13 ± 2.75	9.71 ± 1.04	8.07 ± 1.10	5.09 ± 1.29
	Brain	0.56 ± 0.06	0.52 ± 0.10	0.37 ± 0.08	0.35 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.22 ± 0.05
	Tumor	4.00 ± 3.03	23.35 ± 4.54	32.32 ± 1.29	41.31 ± 13.06	29.72 ± 3.61	30.52 ± 13.24
	Muscle	0.69 ± 0.04	1.62 ± 0.18	1.62 ± 0.26	1.58 ± 0.23	1.12 ± 0.23	0.95 ± 0.20
Ratio	Tumor/Blood	0.12 ± 0.10	0.97 ± 0.21	1.67 ± 0.16	2.60 ± 0.95	2.40 ± 0.29	3.53 ± 1.18
	Tumor/Muscle	5.71 ± 4.05	14.54 ± 3.41	20.24 ± 2.46	26.82 ± 11.08	27.07 ± 3.59	33.04 ± 14.43

		$[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG2}$					
% ID/g	Blood	31.90 ± 1.38	18.88 ± 1.04	15.57 ± 1.42	14.12 ± 2.43	10.76 ± 1.39	6.97 ± 1.49
	Spleen	8.11 ± 1.99	5.77 ± 1.26	4.01 ± 0.56	4.61 ± 0.60	4.91 ± 1.48	4.77 ± 1.61
	Pancreas	1.35 ± 0.09	1.47 ± 0.14	1.49 ± 0.12	1.50 ± 0.13	1.29 ± 0.06	0.99 ± 0.08
	Stomach*	0.35 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.08	0.29 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.20 ± 0.03
	Intestine	2.43 ± 0.45	1.45 ± 0.08	1.26 ± 0.12	1.21 ± 0.12	1.24 ± 0.08	0.89 ± 0.12
	Kidney	8.27 ± 0.73	6.69 ± 0.20	6.32 ± 0.88	6.10 ± 0.29	5.48 ± 0.13	4.30 ± 0.49
	Liver	8.56 ± 1.06	5.20 ± 1.70	4.14 ± 0.81	4.18 ± 0.46	4.35 ± 0.38	3.63 ± 0.64
	Heart	6.87 ± 0.23	3.86 ± 0.66	3.41 ± 0.28	3.25 ± 0.15	2.76 ± 0.39	1.73 ± 0.29
	Lung	16.84 ± 2.06	10.01 ± 1.26	7.06 ± 1.23	6.64 ± 1.15	6.11 ± 0.47	4.24 ± 0.89
	Brain	0.65 ± 0.07	0.39 ± 0.04	0.43 ± 0.14	0.40 ± 0.03	0.32 ± 0.05	0.19 ± 0.02
	Tumor	7.48 ± 5.24	16.88 ± 2.86	22.35 ± 3.03	25.99 ± 4.61	26.02 ± 1.79	29.25 ± 5.89
	Muscle	0.97 ± 0.19	1.43 ± 0.17	1.13 ± 0.05	1.23 ± 0.31	1.08 ± 0.19	0.63 ± 0.13
Ratio	Tumor/Blood	0.23 ± 0.16	0.89 ± 0.14	1.45 ± 0.30	1.86 ± 0.30	2.46 ± 0.43	4.26 ± 0.71
	Tumor/Muscle	8.35 ± 6.18	11.91 ± 2.12	19.86 ± 3.10	21.59 ± 3.55	24.83 ± 5.58	47.43 ± 10.46
		$[^{111}\text{In}]\text{In-TMDG4}$					
% ID/g	Blood	31.74 ± 2.72	19.25 ± 2.50	16.62 ± 2.31	14.76 ± 1.58	12.38 ± 1.91	5.43 ± 0.68
	Spleen	7.61 ± 2.39	5.21 ± 0.79	4.97 ± 1.44	5.28 ± 1.20	4.16 ± 0.46	3.11 ± 0.27
	Pancreas	1.50 ± 0.19	1.64 ± 0.20	1.68 ± 0.21	1.59 ± 0.19	1.35 ± 0.10	0.84 ± 0.09
	Stomach*	0.32 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.24 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.17 ± 0.06
	Intestine	2.85 ± 0.46	1.33 ± 0.17	1.43 ± 0.21	1.42 ± 0.22	1.26 ± 0.19	0.67 ± 0.13
	Kidney	7.84 ± 0.81	6.30 ± 0.95	6.81 ± 1.03	7.12 ± 0.46	6.23 ± 0.71	3.64 ± 0.65
	Liver	8.23 ± 1.32	4.68 ± 0.88	5.16 ± 0.82	4.89 ± 0.43	4.46 ± 0.71	4.83 ± 0.95
	Heart	6.62 ± 1.23	4.16 ± 0.77	3.60 ± 0.44	3.36 ± 0.11	2.66 ± 0.30	1.41 ± 0.29
	Lung	14.86 ± 2.77	9.13 ± 1.71	8.75 ± 1.88	8.51 ± 1.54	7.26 ± 1.32	3.38 ± 0.40
	Brain	0.73 ± 0.11	0.36 ± 0.05	0.39 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.05	0.16 ± 0.04
	Tumor	8.61 ± 4.84	20.21 ± 2.24	27.50 ± 9.29	23.87 ± 2.73	28.88 ± 9.52	21.81 ± 3.97
	Muscle	0.85 ± 0.07	1.40 ± 0.13	1.36 ± 0.28	1.25 ± 0.14	1.00 ± 0.12	0.63 ± 0.19
Ratio	Tumor/Blood	0.27 ± 0.15	1.07 ± 0.25	1.63 ± 0.33	1.63 ± 0.20	2.35 ± 0.77	4.02 ± 0.52
	Tumor/Muscle	9.94 ± 5.41	14.61 ± 2.57	19.86 ± 2.77	19.34 ± 3.35	28.76 ± 8.32	35.64 ± 5.81

		[¹¹¹ In]In-TMD					
% ID/g	Blood	33.23 ± 2.02	20.58 ± 1.27	17.94 ± 1.94	14.65 ± 0.52	13.18 ± 0.93	7.79 ± 1.88
	Spleen	7.87 ± 4.29	4.82 ± 1.12	4.58 ± 0.83	4.22 ± 0.30	5.14 ± 1.55	3.76 ± 0.82
	Pancreas	1.42 ± 0.01	1.66 ± 0.14	1.55 ± 0.08	1.50 ± 0.10	1.31 ± 0.10	0.96 ± 0.09
	Stomach*	0.36 ± 0.06	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.20 ± 0.03
	Intestine	2.18 ± 0.25	1.88 ± 0.28	1.66 ± 0.30	1.39 ± 0.06	1.29 ± 0.29	0.78 ± 0.14
	Kidney	8.48 ± 0.89	8.00 ± 0.50	7.35 ± 0.57	6.79 ± 0.48	6.39 ± 0.52	4.65 ± 0.90
	Liver	8.34 ± 1.16	6.43 ± 0.45	6.44 ± 1.35	6.08 ± 0.60	5.51 ± 0.90	5.05 ± 0.66
	Heart	6.77 ± 1.28	3.79 ± 0.49	3.92 ± 0.48	2.97 ± 0.27	2.65 ± 0.14	1.58 ± 0.19
	Lung	15.97 ± 3.08	10.41 ± 1.97	9.54 ± 1.10	7.35 ± 0.48	7.24 ± 1.24	4.89 ± 0.89
	Brain	0.58 ± 0.10	0.40 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.18 ± 0.06
	Tumor	5.64 ± 2.13	12.29 ± 2.18	21.19 ± 3.99	24.72 ± 4.19	25.32 ± 6.99	22.30 ± 4.29
	Muscle	0.83 ± 0.11	1.32 ± 0.21	1.17 ± 0.05	1.12 ± 0.13	1.07 ± 0.01	0.62 ± 0.13
	Ratio	Tumor/Blood	0.17 ± 0.06	0.60 ± 0.12	1.21 ± 0.34	1.68 ± 0.22	1.92 ± 0.51
Tumor/Muscle		6.69 ± 1.75	9.38 ± 1.07	18.25 ± 3.82	22.41 ± 5.27	23.76 ± 6.52	38.12 ± 16.44

Each value represents the mean ± standard deviation of four mice. *Data are expressed as % ID values.

SPECT/CT

MDI2 を用いて合成した放射性抗体薬剤のインビボにおける有用性を評価する目的で、SK-OV-3 腫瘍移植モデルマウスを用いて、[¹¹¹In]In-TMDI2 の SPECT/CT 撮像を行った(Figure 2-9)。[¹¹¹In]In-TMDI2 の投与 72 時間後において、SK-OV-3 腫瘍に高い放射能集積が認められ、腫瘍が明瞭に描出された。以上より、[¹¹¹In]In-TMDI2 が HER2/*neu* 高発現腫瘍をインビボで描出可能であることが示され、MDI2 を用いた放射性抗体薬剤のインビボにおける有用性が示された。

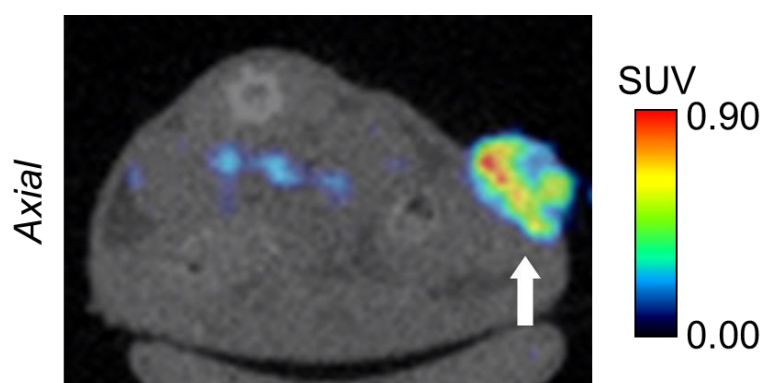


Figure 2-9. An axial SPECT/CT image of the SK-OV-3 tumor-bearing mouse at 72-h postinjection of [¹¹¹In]In-TMDI2. The white arrow indicates the SK-OV-3 tumor.

2.3. 小括

本章において、高い腫瘍集積性を示す RIC の開発に資する分子設計基盤の構築を目的として、「マレイミド構造」、「金属配位子」、および「PEI 構造」から成る 3 官能性キレート化合物 MDI を設計・合成した。PEI は正電荷を帯びた化学構造であり、RIC が生じる代謝物の細胞内滞留性を向上させることで、RIC の腫瘍集積の増強を企図した新規体内動態制御ユニットである。PEI としてジエチレントリアミン(PEI2)またはテトラエチレンペンタミン(PEI4)を、mAb のモデルとして HER2/*neu* 標的のトラスツズマブを、金属 RI のモデルとして ^{111}In を選択し、MDI2/4 を用いた放射標識の検討および合成した 3 官能性放射性薬剤 [^{111}In]In-TMDI2/4 の有用性評価を通して、以下に述べる結果を得た。

- (1) MDI2/4 は温和な条件下において mAb の放射標識が可能であった。また得られた [^{111}In]In-TMDI2/4 の抗原認識能は維持されていた。
- (2) [^{111}In]In-TMDI2/4 はインビトロにおいて PEI の導入により高い細胞内滞留性を示し、RIC 由来の放射性代謝物の細胞内滞留性に向上が認められた。
- (3) [^{111}In]In-TMDI2/4 はインビボにおいて PEI の導入により腫瘍集積・腫瘍/血液比が向上し、特に PEI2 を有する [^{111}In]In-TMDI2 は最も良好な腫瘍/血液比を示した。
- (4) [^{111}In]In-TMDI2 を用いた SPECT/CT では、HER2/*neu* 高発現腫瘍が明瞭に描出された。

以上の結果より、放射標識における MDI2 の優れた特性、および MDI2 を基盤とする 3 官能性放射性抗体薬剤の有用性が示され、高分子 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤としての MDI2 の有用性が示された。

結 語

本研究は、多様なモダリティのラジオセラノスティクス薬剤の開発に有用な分子設計基盤の構築を目的として行った。「標的認識ユニット」、「放射線放出ユニット」、および「体内動態制御ユニット」から成る 3 官能性放射性薬剤の設計概念を基盤に、「リガンド導入ユニット」、「金属配位子」、「モダリティに応じた体内動態制御ユニット」を組み合わせた 3 官能性キレート化合物を分子設計基盤として開発し、以下に述べる知見を得た。

1. 第 1 章では、低・中分子モダリティに有用な分子設計基盤の構築を目的として、「クリック反応部位 ADIBO」、「金属配位子 DOTA」、および「アルブミン結合部位 Lys-IPBA」を組み合わせることで、3 官能性キレート化合物 ADIBO-DOTADG-ALB (ADA)を開発した。アルブミン結合部位は、血漿中のアルブミンとの相互作用により薬剤の血中滞留性を向上させることで、腫瘍集積性の増加や腎臓集積性の低減を実現する体内動態制御ユニットである。金属 RI のモデルとして ^{111}In を、低分子リガンドのモデルとして PSMA 標的の Lys-Glu urea 構造を、中分子リガンドのモデルとして GLP-1R 標的の exendin-4 (分子量: 4.2 kDa)を選択し、ADA の有用性評価を行った。ADA は Lys-Glu urea 構造および exendin-4 を温和な条件下において迅速に放射標識可能であり、高いクリック反応性を示した。ADA を用いて合成した 3 官能性放射性薬剤 [^{111}In]In-PtDA および [^{111}In]In-EtDA は、インビトロにおいてそれぞれ PSMA および GLP-1R に対する特異的結合性、およびアルブミン結合性を示し、3 官能性放射性薬剤として機能することが示された。インビボにおいて、血中アルブミンとの相互作用により [^{111}In]In-PtDA は高い腫瘍集積を、 [^{111}In]In-EtDA は高い腫瘍/腎臓比を示し、アルブミン結合部位の導入による体内動態の改善が認められた。 [^{111}In]In-PtDA および [^{111}In]In-EtDA を用いた SPECT/CT 撮像では腫瘍が明瞭に描出され、インビボにおける有用性が示された。以上の結果より、放射標識における ADA の優れた特性、および ADA を用いた 3 官能性放射性薬剤の有用性が示され、低・中分子 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤としての ADA の有用性が示された。
2. 第 2 章では、高分子モダリティである mAb に有用な分子設計基盤の構築を目的として、「マレイミド構造」、「金属配位子 DOTA」、および「PEI 構造」を組み合わせることで、3 官能性キレート化合物 maleimide-DOTA-PEI (MDI)を開発した。PEI は正電荷を帯びた化学構造であり、RIC 由来の放射性代謝物の細胞内滞留性を向上させることで、腫瘍滞留性の増強を企図した新規体内動態制御ユニットである。PEI としてジエチレントリアミン(PEI2)またはテトラエチレンペンタミン(PEI4)を、金属 RI のモデルとして ^{111}In を、mAb のモデルとして HER2/neu 標的のトラスツズマブ(分子量: 148 kDa)を選択し、MDI2/4 の有用性評価を行った。MDI2/4 はチオール基含有トラスツズマブを温和な条件下において放射標識可能であり、mAb の抗原認識能を維持した放射標識を実現した。MDI2/4 を用いて合成した 3 官能性放射性抗体薬剤 [^{111}In]In-

TMDI2/4 は、インビトロにおいて PEI 構造の導入により放射性代謝物の細胞内滞留性が向上し、放射能の腫瘍細胞内滞留性が向上した。インビボにおいて、 $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDI2/4}$ は PEI の導入により腫瘍集積および腫瘍/血液比に改善が認められ、PEI 構造が体内動態制御ユニットとして機能することを実証した。特に PEI2 を有する $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDI2}$ は最も良好な腫瘍/血液比を示した。 $[^{111}\text{In}]\text{In-TMDI2}$ を用いた SPECT/CT 撮像では腫瘍が明瞭に描出され、インビボにおける有用性が示された。以上の結果より、mAb の放射標識における MDI2 の優れた特性、および MDI2 を用いた 3 官能性放射性抗体薬剤の有用性が示され、高分子 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤としての MDI2 の有用性が示された。

以上、本研究は低分子から高分子まで多様なモダリティを用いたセラノスティクスに対して有用な 3 官能性放射性薬剤の開発に成果を収めたものであり、これらの知見は今後のラジオセラノスティクス薬剤の開発研究の発展に貢献すると考えられる。

引用文献

1. Ogawa, K., Development of diagnostic and therapeutic probes with controlled pharmacokinetics for use in radiotheranostics. *Chem. Pharm. Bull.* **2019**, *67*, 897-903.
2. Price, E. W.; Orvig, C., Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 260-290.
3. Clarke, E. T.; Martell, A. E., Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *190*, 37-46.
4. McDevitt, M. R.; Ma, D.; Simon, J.; Frank, R. K.; Scheinberg, D. A., Design and synthesis of ^{225}Ac radioimmunopharmaceuticals. *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, *57*, 841-847.
5. Breeman, W. A.; De Jong, M.; Visser, T. J.; Erion, J. L.; Krenning, E. P., Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 917-920.
6. Pandya, D. N.; Bhatt, N.; Yuan, H.; Day, C. S.; Ehrmann, B. M.; Wright, M.; Bierbach, U.; Wadas, T. J., Zirconium tetraazamacrocycle complexes display extraordinary stability and provide a new strategy for zirconium-89-based radiopharmaceutical development. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2309-2314.
7. Stasiuk, G. J.; Long, N. J., The ubiquitous DOTA and its derivatives: the impact of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid on biomedical imaging. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2732-2746.
8. Moradi, S. V.; Hussein, W. M.; Varamini, P.; Simerska, P.; Toth, I., Glycosylation, an effective synthetic strategy to improve the bioavailability of therapeutic peptides. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2492-2500.
9. Lau, J.; Jacobson, O.; Niu, G.; Lin, K. S.; Benard, F.; Chen, X., Bench to bedside: albumin binders for improved cancer radioligand therapies. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 487-502.
10. Bentzen, S. M., Theragnostic imaging for radiation oncology: dose-painting by numbers. *Lancet Oncol.* **2005**, *6*, 112-117.
11. Tao, Y.; Jakobsson, V.; Chen, X.; Zhang, J., Exploiting albumin as a versatile carrier for cancer theranostics. *Acc. Chem. Res.* **2023**, *56*, 2403-2415.
12. Müller, C.; Struthers, H.; Winiger, C.; Zhernosekov, K.; Schibli, R., DOTA conjugate with an albumin-binding entity enables the first folic acid-targeted ^{177}Lu -radionuclide tumor therapy in mice. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 124-131.
13. Iikuni, S.; Okada, Y.; Shimizu, Y.; Watanabe, H.; Ono, M., Modulation of the pharmacokinetics of a radioligand targeting carbonic anhydrase-IX with albumin-binding moieties. *Mol. Pharm.* **2021**, *18*, 966-975.

14. Minami, K.; Takazawa, A.; Taniguchi, Y.; Higashino, H.; Kataoka, M.; Asai, T.; Oku, N.; Yamashita, S., Challenge for oral delivery of middle-molecular drugs: use of osmolarity-sensitive liposome as a drug carrier in the GI tract. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* **2020**, *56*, 101041.
15. Krecisz, P.; Czarnecka, K.; Krolicki, L.; Mikiciuk-Olasik, E.; Szymanski, P., Radiolabeled peptides and antibodies in medicine. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32*, 25-42.
16. Bergsma, H.; Konijnenberg, M. W.; van der Zwan, W. A.; Kam, B. L.; Teunissen, J. J.; Kooij, P. P.; Mauff, K. A.; Krenning, E. P.; Kwkkeboom, D. J., Nephrotoxicity after PRRT with ¹⁷⁷Lu-DOTA-octreotate. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 1802-1811.
17. Gallyamov, M.; Meyrick, D.; Barley, J.; Lenzo, N., Renal outcomes of radioligand therapy: experience of ¹⁷⁷lutetium-prostate-specific membrane antigen ligand therapy in metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Clin. Kidney J.* **2020**, *13*, 1049-1055.
18. Vivier, D.; Sharma, S. K.; Zeglis, B. M., Understanding the in vivo fate of radioimmunoconjugates for nuclear imaging. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **2018**, *61*, 672-692.
19. O'Donoghue, J. A.; Baidoo, N.; Deland, D.; Welt, S.; Divgi, C. R.; Sgouros, G., Hematologic toxicity in radioimmunotherapy: dose-response relationships for I-131 labeled antibody therapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2002**, *17*, 435-443.
20. Vegt, E.; de Jong, M.; Wetzels, J. F.; Masereeuw, R.; Melis, M.; Oyen, W. J.; Gotthardt, M.; Boerman, O. C., Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1049-1058.
21. de Jong, M.; Rolleman, E. J.; Bernard, B. F.; Visser, T. J.; Bakker, W. H.; Breeman, W. A.; Krenning, E. P., Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo. *J. Nucl. Med.* **1996**, *37*, 1388-1392.
22. Chan, H. S.; Konijnenberg, M. W.; Daniels, T.; Nysus, M.; Makvandi, M.; de Blois, E.; Breeman, W. A.; Atcher, R. W.; de Jong, M.; Norenberg, J. P., Improved safety and efficacy of ²¹³Bi-DOTATATE-targeted alpha therapy of somatostatin receptor-expressing neuroendocrine tumors in mice pre-treated with L-lysine. *EJNMMI Res.* **2016**, *6*, 83.
23. Barone, R.; Pauwels, S.; De Camps, J.; Krenning, E. P.; Kvols, L. K.; Smith, M. C.; Bouterfa, H.; Devuyt, O.; Jamar, F., Metabolic effects of amino acid solutions infused for renal protection during therapy with radiolabelled somatostatin analogues. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2004**, *19*, 2275-2281.
24. Courault, P.; Deville, A.; Habouzit, V.; Gervais, F.; Bolot, C.; Bournaud, C.; Levigoureux, E., Amino acid solutions for ¹⁷⁷Lu-oxodotreotide premedication: a tolerance study. *Cancers* **2022**, *14*, 5212.
25. Zorzi, A.; Linciano, S.; Angelini, A., Non-covalent albumin-binding ligands for extending the circulating half-life of small biotherapeutics. *Medchemcomm.* **2019**, *10*, 1068-1081.
26. Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, A. T.; Rutjes, F. P.; van Delft, F. L., Bioconjugation with strained alkenes and alkynes. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805-815.

27. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F., Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209-249.
28. Bjartell, A.; Lumen, N.; Maroto, P.; Paiss, T.; Gomez-Veiga, F.; Birtle, A.; Kramer, G.; Kalinka, E.; Spaeth, D.; Feyereabend, S.; Matveev, V.; Lefresne, F.; Lukac, M.; Wapenaar, R.; Costa, L.; Chowdhury, S., Real-world safety and efficacy outcomes with abiraterone acetate plus prednisone or prednisolone as the first- or second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer: data from the prostate cancer registry. *Target. Oncol.* **2021**, *16*, 357-367.
29. Ross, J. S.; Sheehan, C. E.; Fisher, H. A.; Kaufman, R. P., Jr.; Kaur, P.; Gray, K.; Webb, I.; Gray, G. S.; Mosher, R.; Kallakury, B. V., Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 6357-6362.
30. Kinoshita, Y.; Kuratsukuri, K.; Landas, S.; Imaida, K.; Rovito, P. M., Jr.; Wang, C. Y.; Haas, G. P., Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World J. Surg.* **2006**, *30*, 628-636.
31. Zhang, A. X.; Murelli, R. P.; Barinka, C.; Michel, J.; Cocleaza, A.; Jorgensen, W. L.; Lubkowski, J.; Spiegel, D. A., A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12711-12716.
32. Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Leotta, K.; Zoller, F.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Eder, M., A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for ⁶⁸Ga-PET imaging of prostate cancer. *EJNMMI Res.* **2012**, *2*, 23.
33. Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Schäfer, M.; Klika, K. D.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M., Linker modification strategies to control the prostate-specific membrane antigen (PSMA)-targeting and pharmacokinetic properties of DOTA-conjugated PSMA inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1761-1775.
34. Kopka, K.; Benešová, M.; Bařinka, C.; Haberkorn, U.; Babich, J., Glu-ureido-based inhibitors of prostate-specific membrane antigen: lessons learned during the development of a novel class of low-molecular-weight theranostic radiotracers. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 17S-26S.
35. Benešová, M.; Umbricht, C. A.; Schibli, R.; Müller, C., Albumin-binding PSMA ligands: optimization of the tissue distribution profile. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 934-946.
36. Kuo, H. T.; Merkens, H.; Zhang, Z.; Uribe, C. F.; Lau, J.; Zhang, C.; Colpo, N.; Lin, K. S.; Bénard, F., Enhancing treatment efficacy of ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 with the conjugation of an albumin-binding motif: preclinical dosimetry and endoradiotherapy studies. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 5183-5191.
37. Umbricht, C. A.; Benešová, M.; Schibli, R.; Müller, C., Preclinical development of novel PSMA-targeting radioligands: modulation of albumin-binding properties to improve prostate cancer therapy. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 2297-2306.

38. Wang, Z.; Tian, R.; Niu, G.; Ma, Y.; Lang, L.; Szajek, L. P.; Kiesewetter, D. O.; Jacobson, O.; Chen, X., Single low-dose injection of evans blue modified PSMA-617 radioligand therapy eliminates prostate-specific membrane antigen positive tumors. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 3213-3221.
39. Dumelin, C. E.; Trussel, S.; Buller, F.; Trachsel, E.; Bootz, F.; Zhang, Y.; Mannocci, L.; Beck, S. C.; Drumea-Mirancea, M.; Seeliger, M. W.; Baltes, C.; Muggler, T.; Kranz, F.; Rudin, M.; Melkko, S.; Scheuermann, J.; Neri, D., A portable albumin binder from a DNA-encoded chemical library. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 3196-3201.
40. Choy, C. J.; Ling, X.; Geruntho, J. J.; Beyer, S. K.; Latoche, J. D.; Langton-Webster, B.; Anderson, C. J.; Berkman, C. E., ¹⁷⁷Lu-labeled phosphoramidate-based PSMA inhibitors: the effect of an albumin binder on biodistribution and therapeutic efficacy in prostate tumor-bearing mice. *Theranostics* **2017**, *7*, 1928-1939.
41. Kelly, J.; Amor-Coarasa, A.; Ponnala, S.; Nikolopoulou, A.; Williams, C., Jr.; Schlyer, D.; Zhao, Y.; Kim, D.; Babich, J. W., Trifunctional PSMA-targeting constructs for prostate cancer with unprecedented localization to LNCaP tumors. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2018**, *45*, 1841-1851.
42. Siwowska, K.; Haller, S.; Bortoli, F.; Benešová, M.; Groehn, V.; Bernhardt, P.; Schibli, R.; Müller, C., Preclinical comparison of albumin-binding radiofolates: impact of linker entities on the in vitro and in vivo properties. *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 523-532.
43. Davis, R. A.; Hausner, S. H.; Harris, R.; Sutcliffe, J. L., A comparison of evans blue and 4-(p-iodophenyl)butyryl albumin binding moieties on an integrin $\alpha_v\beta_6$ binding peptide. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 745.
44. Mushtaq, S.; Yun, S. J.; Jeon, J., Recent advances in bioorthogonal click chemistry for efficient synthesis of radiotracers and radiopharmaceuticals. *Molecules* **2019**, *24*, 3567.
45. Abiraj, K.; Jaccard, H.; Kretschmar, M.; Helm, L.; Maecke, H. R., Novel DOTA-based prochelator for divalent peptide vectorization: synthesis of dimeric bombesin analogues for multimodality tumor imaging and therapy. *Chem. Commun.* **2008**, 3248-3250.
46. Shi, W.; Tang, F.; Ao, J.; Yu, Q.; Liu, J.; Tang, Y.; Jiang, B.; Ren, X.; Huang, H.; Yang, W.; Huang, W., Manipulating the click reactivity of dibenzoazacyclooctynes: from azide click component to caged acylation reagent by silver catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, *59*, 19940-19944.
47. Davis, D. L.; Price, E. K.; Aderibigbe, S. O.; Larkin, M. X.; Barlow, E. D.; Chen, R.; Ford, L. C.; Gray, Z. T.; Gren, S. H.; Jin, Y.; Keddington, K. S.; Kent, A. D.; Kim, D.; Lewis, A.; Marrouche, R. S.; O'Dair, M. K.; Powell, D. R.; Scadden, M. H.; Session, C. B.; Tao, J.; Trieu, J.; Whiteford, K. N.; Yuan, Z.; Yun, G.; Zhu, J.; Heemstra, J. M., Effect of buffer conditions and organic cosolvents on the rate of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 6816-6819.

48. Gourni, E.; Canovas, C.; Goncalves, V.; Denat, F.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R., (R)-NODAGA-PSMA: a versatile precursor for radiometal labeling and nuclear imaging of PSMA-positive tumors. *PLoS One* **2015**, *10*, e0145755.
49. Evans, B. J.; King, A. T.; Katsifis, A.; Matesic, L.; Jamie, J. F., Methods to enhance the metabolic stability of peptide-based PET radiopharmaceuticals. *Molecules* **2020**, *25*, 2314.
50. Jansen, T. J. P.; van Lith, S. A. M.; Boss, M.; Brom, M.; Joosten, L.; Behe, M.; Buitinga, M.; Gotthardt, M., Exendin-4 analogs in insulinoma theranostics. *J. Labelled. Comp. Radiopharm.* **2019**, *62*, 656-672.
51. Nicolas, G. P.; Morgenstern, A.; Schottelius, M.; Fani, M., New developments in peptide receptor radionuclide therapy. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 167-171.
52. Mansi, R.; Nock, B. A.; Dalm, S. U.; Busstra, M. B.; van Weerden, W. M.; Maina, T., Radiolabeled bombesin analogs. *Cancers* **2021**, *13*, 5766.
53. Bison, S. M.; Konijnenberg, M. W.; Melis, M.; Pool, S. E.; Bernsen, M. R.; Teunissen, J. J.; Kwekkeboom, D. J.; de Jong, M., Peptide receptor radionuclide therapy using radiolabeled somatostatin analogs: focus on future developments. *Clin. Transl. Imaging* **2014**, *2*, 55-66.
54. Christ, E.; Antwi, K.; Fani, M.; Wild, D., Innovative imaging of insulinoma: the end of sampling? A review. *Endocr. Relat. Cancer* **2020**, *27*, R79-R92.
55. Kaeppli, S. A. M.; Jodal, A.; Gotthardt, M.; Schibli, R.; Behe, M., Exendin-4 derivatives with an albumin-binding moiety show decreased renal retention and improved GLP-1 receptor targeting. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 3760-3769.
56. Iikuni, S.; Kamei, I.; Ohara, T.; Watanabe, H.; Ono, M., Development of an ¹¹¹In-labeled glucagon-like peptide-1 receptor-targeting exendin-4 derivative that exhibits reduced renal uptake. *Mol. Pharm.* **2022**, *19*, 1019-1027.
57. Akizawa, H.; Uehara, T.; Arano, Y., Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1319-1328.
58. Murakami, T.; Fujimoto, H.; Hamamatsu, K.; Yamauchi, Y.; Kodama, Y.; Fujita, N.; Fujikura, J.; Shimizu, Y.; Nakamoto, Y.; Kimura, H.; Saji, H.; Inagaki, N., Distinctive detection of insulinoma using [¹⁸F]FB(ePEG12)12-exendin-4 PET/CT. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 15014.
59. Nedrow-Byers, J. R.; Moore, A. L.; Ganguly, T.; Hopkins, M. R.; Fulton, M. D.; Benny, P. D.; Berkman, C. E., PSMA-targeted SPECT agents: mode of binding effect on in vitro performance. *Prostate* **2013**, *73*, 355-362.
60. Patra, M.; Zarschler, K.; Pietzsch, H. J.; Stephan, H.; Gasser, G., New insights into the pretargeting approach to image and treat tumours. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6415-6431.
61. Rondon, A.; Rouanet, J.; Degoul, F., Radioimmunotherapy in oncology: overview of the last decade clinical trials. *Cancers* **2021**, *13*, 5570.

62. Rossin, R.; van Duijnhoven, S. M.; Läppchen, T.; van den Bosch, S. M.; Robillard, M. S., Trans-cyclooctene tag with improved properties for tumor pretargeting with the diels-alder reaction. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 3090-3096.
63. D'Huyvetter, M.; De Vos, J.; Xavier, C.; Pruszynski, M.; Sterckx, Y. G. J.; Massa, S.; Raes, G.; Caveliers, V.; Zalutsky, M. R.; Lahoutte, T.; Devoogdt, N., ¹³¹I-labeled anti-HER2 camelid sdAb as a theranostic tool in cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 6616-6628.
64. Mattes, M. J.; Griffiths, G. L.; Diril, H.; Goldenberg, D. M.; Ong, G. L.; Shih, L. B., Processing of antibody-radioisotope conjugates after binding to the surface of tumor cells. *Cancer* **1994**, *73*, 787-793.
65. Rudnick, S. I.; Lou, J.; Shaller, C. C.; Tang, Y.; Klein-Szanto, A. J.; Weiner, L. M.; Marks, J. D.; Adams, G. P., Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2250-2259.
66. Shih, L. B.; Thorpe, S. R.; Griffiths, G. L.; Diril, H.; Ong, G. L.; Hansen, H. J.; Goldenberg, D. M.; Mattes, M. J., The processing and fate of antibodies and their radiolabels bound to the surface of tumor cells in vitro: a comparison of nine radiolabels. *J. Nucl. Med.* **1994**, *35*, 899-908.
67. Press, O. W.; Shan, D.; Howell-Clark, J.; Eary, J.; Appelbaum, F. R.; Matthews, D.; King, D. J.; Haines, A. M.; Hamann, P.; Hinman, L.; Shochat, D.; Bernstein, I. D., Comparative metabolism and retention of iodine-125, yttrium-90, and indium-111 radioimmunoconjugates by cancer cells. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2123-2129.
68. Vaidyanathan, G.; Affleck, D. J.; Li, J.; Welsh, P.; Zalutsky, M. R., A polar substituent-containing acylation agent for the radioiodination of internalizing monoclonal antibodies: *N*-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-[¹³¹I]iodobenzoate ([¹³¹I]SGMIB). *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 428-438.
69. Vaidyanathan, G.; McDougald, D.; Choi, J.; Koumariou, E.; Weitzel, D.; Osada, T.; Lyerly, H. K.; Zalutsky, M. R., Preclinical evaluation of ¹⁸F-labeled anti-HER2 nanobody conjugates for imaging HER2 receptor expression by immuno-PET. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 967-973.
70. Chitneni, S. K.; Koumariou, E.; Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R., Observations on the effects of residualization and dehalogenation on the utility of *N*-succinimidyl ester acylation agents for radioiodination of the internalizing antibody trastuzumab. *Molecules* **2019**, *24*, 3907.
71. Uchida, H.; Miyata, K.; Oba, M.; Ishii, T.; Suma, T.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Odd-even effect of repeating aminoethylene units in the side chain of *N*-substituted polyaspartamides on gene transfection profiles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15524-15532.
72. Sim, N.; Pal, R.; Parker, D.; Engelmann, J.; Mishra, A.; Gottschalk, S., Magnetic resonance and optical imaging probes for NMDA receptors on the cell surface of neurons: synthesis and evaluation in cellulo. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9389-9404.
73. Srinivasachari, S.; Fichter, K. M.; Reineke, T. M., Polycationic beta-cyclodextrin "click clusters": monodisperse and versatile scaffolds for nucleic acid delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4618-4627.

74. Waghorn, P. A.; Jones, C. M.; Rotile, N. J.; Koerner, S. K.; Ferreira, D. S.; Chen, H. H.; Probst, C. K.; Tager, A. M.; Caravan, P., Molecular magnetic resonance imaging of lung fibrogenesis with an oxyamine-based probe. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 9825-9828.
75. Sharma, S. K.; Adumeau, P.; Keinanen, O.; Sisodiya, V.; Sarvaiya, H.; Tchelepi, R.; Korsen, J. A.; Pourat, J.; Edwards, K. J.; Ragupathi, A.; Hamdy, O.; Saunders, L. R.; Rudin, C. M.; Poirier, J. T.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M., Synthesis and comparative in vivo evaluation of site-specifically labeled radioimmunoconjugates for DLL3-targeted immunoPET. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32*, 1255-1262.
76. Lindmo, T.; Boven, E.; Cuttitta, F.; Fedorko, J.; Bunn, P. A., Jr., Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods* **1984**, *72*, 77-89.
77. Rinne, S. S.; Leitao, C. D.; Mitran, B.; Bass, T. Z.; Andersson, K. G.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Löfblom, J.; Orlova, A., Optimization of HER3 expression imaging using affibody molecules: Influence of chelator for labeling with indium-111. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 655.
78. Rasaneh, S.; Rajabi, H.; Babaei, M. H.; Daha, F. J.; Salouti, M., Radiolabeling of trastuzumab with ¹⁷⁷Lu via DOTA, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36*, 363-369.
79. Abbas, N.; Bruland, Ø. S.; Brevik, E. M.; Dahle, J., Preclinical evaluation of ²²⁷Th-labeled and ¹⁷⁷Lu-labeled trastuzumab in mice with HER-2-positive ovarian cancer xenografts. *Nucl. Med. Commun.* **2012**, *33*, 838-847.
80. Moreau, M.; Raguin, O.; Vrigneaud, J. M.; Collin, B.; Bernhard, C.; Tizon, X.; Boschetti, F.; Duchamp, O.; Brunotte, F.; Denat, F., DOTAGA-trastuzumab. A new antibody conjugate targeting HER2/Neu antigen for diagnostic purposes. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1181-1188.
81. Alirezapour, B.; Jalilian, A. R.; Rasae, M. J.; Rajabifar, S.; Yavari, K.; Kamalidehghan, M.; Bolourinovin, F.; Aslani, G., Optimized preparation and preliminary evaluation of ⁶⁴Cu-DOTA-trastuzumab for targeting ErbB2/Neu expression. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, *295*, 1261-1271.
82. Alirezapour, B.; Jalilian, A. R.; Rajabifar, S.; Mirzaii, M.; Moradkhani, S.; Pouladi, M.; Aslani, G., Preclinical evaluation of [¹¹¹In]-DOTA-trastuzumab for clinical trials. *J. Cancer Res. Ther.* **2014**, *10*, 112-120.
83. Ren, Q.; Mohri, K.; Warashina, S.; Wada, Y.; Watanabe, Y.; Mukai, H., Improved immuno-PET imaging of HER2-positive tumors in mice: urokinase injection-triggered clearance enhancement of ⁶⁴Cu-trastuzumab. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 1065-1073.

学 術 雑 誌 公 表 論 文

第 1 章 アルブミン結合性を有する 3 官能性放射性薬剤の分子設計基盤の構築

Development of a novel radiotheranostic platform with a DOTA-based trifunctional chelating agent

Kazuma Nakashima, Shimpei Iikuni, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono

2021 年 6 月発行 *Chemical Communications* 第 57 巻 6432 ページ–6435 ページ

DOI: 10.1039/d1cc00823d に掲載

Application of the chelator-based clickable radiotheranostic platform to moderate-molecular-weight ligands

Kazuma Nakashima, Shimpei Iikuni, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono

2022 年 9 月発行 *ACS Medicinal Chemistry Letters* 第 13 巻 1642 ページ–1647 ページ

DOI: 10.1021/acsmchemlett.2c00320 に掲載

第 2 章 腫瘍集積向上を目的とした 3 官能性放射性抗体薬剤の開発

Development of novel trifunctional chelating agents that enhance tumor retention of radioimmunoconjugates

Kazuma Nakashima, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono

2023 年 9 月発行 *Journal of Medicinal Chemistry* 第 66 巻 12812 ページ–12827 ページ

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c00472 に掲載

謝 辞

本研究の終わりに鑑み、終始御懇意なる御指導と御鞭撻を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 小野 正博 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始懇切なる御指導と御教示を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 渡邊 裕之 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多くの有益な御助言と御協力を戴きました、飯國 慎平 博士に厚く御礼申し上げます。

懇切なる御指導を戴きました、京都大学医学部附属病院 志水 陽一 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり討論に参加して戴きました、京都大学大学院薬学研究科 貝出 翔 博士、岡田 祐哉 修士、川野 聖志朗 修士、垂水 勇太 修士、中川 航平 修士、井出 卓志 学士、岸本 峻明 学士、北野 杏奈 学士、前川 鈴香 学士、赤坂 貴浩 修士、数多 伸紀 修士、齋藤 浩輔 学士、土橋 昌平 学士をはじめとする病態機能分析学分野の方々に深く感謝申し上げます。

最後に、著者が研究に専念できるように支え、応援して戴きました、家族、友人に心より感謝申し上げます。