

アルブミンとの相互作用を利用した
新規がん標的放射性薬剤の開発に関する研究

2 0 2 5

数多 伸紀

目 次

緒言	1
第 1 章	前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤のアルブミン結合性と腫瘍集積性との関係性に関する評価
背景	3
1.1. 実験方法	5
1.2. 結果および考察	10
1.3. 小括	21
第 2 章	アミノ酸リンカーが前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤の体内動態に与える影響の検証
背景	22
2.1. 実験方法	24
2.2. 結果および考察	32
2.3 小括	48
第 3 章	新規リンカー技術を用いた前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤の開発とその応用
背景 I	49
3.1. 実験方法 I	50
3.2. 結果および考察 I	55
背景 II	66
3.3. 実験方法 II	68
3.4. 結果および考察 II	72
3.5. 小括	83
結語	84
引用文献	85
学術雑誌公表論文	90
謝辞	91

緒 言

近年、がん医療において、「診断(diagnostics)」と「治療(therapeutics)」を一体的に行う新たな医療概念「セラノスティクス(theranostics)」が注目されている。¹ 特に、放射性同位元素(radioisotope, RI)で標識された放射性薬剤を用いるラジオセラノスティクスは、生体透過性の高い γ 線を利用した核医学画像診断と、細胞殺傷性の高い α 線や β 線を利用した標的アイソトープ治療を組み合わせることで、高度がん医療の実現に大きく貢献する。² ラジオセラノスティクスの発展に向け、放射性薬剤開発における腫瘍集積性の向上が喫緊の課題となっている。血漿中に存在する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)は、薬剤の血中半減期を延長しその腫瘍集積を増加させる。³ そのため、ALB によるアルブミンとの相互作用を利用した分子設計が、放射性薬剤の腫瘍集積性の向上に有用であると考えられている。^{3,4} これまでの報告では、ALB を有する放射性薬剤と ALB を有さない放射性薬剤との比較が主に行われてきた。⁵⁻⁸ しかし、異なるアルブミン結合性を持つ複数の放射性薬剤間での直接的な放射能動態比較は限られており、³ アルブミン結合性と腫瘍集積性の関係性については未解明な点が多い。したがって、合理的な分子設計の確立には、放射性薬剤のアルブミン結合性と体内動態の詳細な検討が必要である。本研究では、放射性薬剤のアルブミン結合性と体内動態との関係性を多角的に評価し、アルブミンとの相互作用を利用した新規がん標的放射性薬剤を開発することを目指した。

前立腺特異的膜抗原(PSMA)は前立腺がんの治療標的として注目されており、^{9,10} ラジオセラノスティクスの実現に向け、ALB を有する PSMA 標的放射性薬剤の開発が進められている。一方で、ALB より高いアルブミン結合性を示す PSMA 標的放射性薬剤に関する知見は少なく、アルブミン結合性と腫瘍集積性に関する関係性については明らかとなっていない。そこで本研究では、ヒト血清アルブミン(HSA)と共有結合を形成する PSMA 標的放射性薬剤^{[111In]In-PNT-DM-HSA} を設計し、その体内動態について、ALB を有する^{[111In]In-PNT-DA1} およびアルブミン結合ユニットを有さない^{[111In]In-PSMA-617} と比較した。PSMA 高発現腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験の結果、^{[111In]In-PNT-DA1} の腫瘍集積は、^{[111In]In-PNT-DM-HSA} および^{[111In]In-PSMA-617} と比較して顕著に増加し、ALB による可逆的なアルブミンとの相互作用が、PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積向上に有用であることが示された。

続いて、アミノ酸リンカーが PSMA 標的放射性薬剤の体内動態に与える影響を検証するため、^{[111In]In-PNT-DA1} に対して水溶性アミノ酸の D-グルタミン酸(D-Glu)、または脂溶性アミノ酸の 4-アミノメチル安息香酸(AMBA)のいずれかを導入したモノリンカー体(^{[111In]In-PNT-DA2-5})を設計し、その体内動態を評価した。HSA を用いたアルブミン結合実験および PSMA 高発現腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験の結果、モノリンカー体のアルブミン結合性および腫瘍と腎臓における放射能集積比は大きく変化し、アミノ酸をリンカーとして 1 つ導入することで^{[111In]In-PNT-DA1} の体内動態を制御可能であることが示された。

さらに、複数のアミノ酸リンカーの導入が PSMA 標的放射性薬剤の体内動態に与える影響につい

て検討した。すなわち， $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ に対し D-Glu および AMBA を導入した PSMA 標的放射性薬剤 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6/7}$ を設計し，各種生物学的評価を行った。その結果， $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ はアミノ酸リンカーの導入位置を逆転させた $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ や，これまでに評価した PSMA 標的放射性薬剤と比較して高いアルブミン結合性および腫瘍における濃度時間曲線下面積値を示した。これらの結果より，2 種類のアミノ酸をリンカーとして適切な配置で導入する新規リンカー技術により，PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積向上が達成可能であることが示された。

また，インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を標的とした放射性薬剤に対する，新規リンカー技術の応用可能性を検討した。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ は，多様ながん細胞において過剰発現することが知られ，ラジオセラノスティクスを用いたがん医療に資する標的である。¹¹ 新規リンカー技術を用いたインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤 $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA6}$ は，新規リンカー技術を用いない対照化合物と比較して高いアルブミン結合性および腫瘍集積性を示した。これらの結果より，インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤の開発においても新規リンカー技術の有用性が示された。

以上，本研究はアルブミンとの相互作用を利用した新規がん標的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のさらなる発展に向けて有益な情報を提供するものと考えられる。

これらの結果について，以下に詳述する。

第 1 章

前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤のアルブミン結合性と腫瘍集積性との関係性に関する評価

背景

前立腺がんは、2022 年において男性罹患者数が世界第 2 位、死亡率が世界第 5 位を占める深刻な悪性腫瘍である。¹² 前立腺がんの治療には、男性ホルモンであるテストステロンの産生を抑えるアンドロゲン遮断療法が標準療法として選択されている。¹³ しかし、多くの症例でアンドロゲン遮断療法に抵抗性を示す転移性去勢抵抗性前立腺がん(mCRPC)へと進行し、mCRPC 患者の生存期間の中央値は 3~5 年であることが課題となっており、¹³ より効果的な治療法の確立が希求されている。前立腺特異的膜抗原(PSMA)は、前立腺がん細胞に過剰発現している膜貫通タンパク質であり、その発現量と治療予後が相関することが知られている。^{10, 14} そのため、PSMA は mCRPC 治療における有望な標的として注目されている。

ラジオセラノスティクスによる高精度な前立腺がん治療の実現に向けて、PSMA 標的放射性薬剤の開発が盛んに進められている。近年では β 線放出核種である ^{177}Lu で標識した PSMA 標的放射性薬剤 [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 が、PSMA 陽性の mCRPC に対する標的アイソトープ治療薬としてアメリカ食品医薬品局(FDA)や欧州医薬品庁(EMA)に承認された。¹⁵ しかし、腫瘍集積性が十分でないことに起因する治療奏効率の低さが課題となっており、^{16, 17} より高効率なラジオセラノスティクスの実現には、PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積性のさらなる向上が望まれている。

著者の所属研究室は、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)を導入した PSMA 標的放射性薬剤 [^{111}In]In-PNT-DA1 を報告している。⁸ [^{111}In]In-PNT-DA1 は、PSMA に対する標的指向性部位(リガンド)、RI 導入部位である 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)誘導体 DOTADG、および ALB である lysine-*p*-(iodophenyl)butyric acid (Lys-IPBA)から構成されている。PSMA 高発現腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験の結果、[^{111}In]In-PNT-DA1 の腫瘍における濃度時間曲線下面積(AUC)値は、ALB を有さない [^{111}In]In-PSMA-617 と比較して大きく増加し、ALB の導入が PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積向上に有用であることが示された。一方で、ALB よりも高いアルブミン結合性を示す PSMA 標的放射性薬剤に関する知見は限られており、放射性薬剤のアルブミン結合性と腫瘍集積性との関係性については未だ十分に明らかにされていない。そこで、ALB よりも高いアルブミン結合性を有する PSMA 標的放射性薬剤として、アルブミンと共有結合を形成した PSMA 標的放射性薬剤 [^{111}In]In-PNT-DM-HSA を設計した(**Figure 1-1**)。[^{111}In]In-PNT-DM-HSA は、PSMA リガンドを有する放射性薬剤 [^{111}In]In-PNT-DM とヒト血清アルブミン(HSA)を共有結合させた構造を持つ。[^{111}In]In-PNT-DM は分子内にマレイミド基を有し、マイケル付加反応によりチオール基と共有結合を形成する。HSA は 34 残基目のシステインのみが遊離のチ

オール基を有することが知られており,^{4,18} [¹¹¹In]In-PNT-DM と部位特異的な共有結合を形成可能である。本研究では, [¹¹¹In]In-PNT-DM と HSA との間で共有結合が確実に形成されていることを確認するため, 生体内に投与する前に予め共有結合を形成させた。¹⁹ [¹¹¹In]In-PNT-DM-HSA の体内動態について, ALB を有する [¹¹¹In]In-PNT-DA1 およびアルブミン結合ユニットを有さない [¹¹¹In]In-PSMA-617 と比較し, PSMA 標的放射性薬剤のアルブミン結合性と腫瘍集積性との関係性を評価した(**Figure 1-1**)。

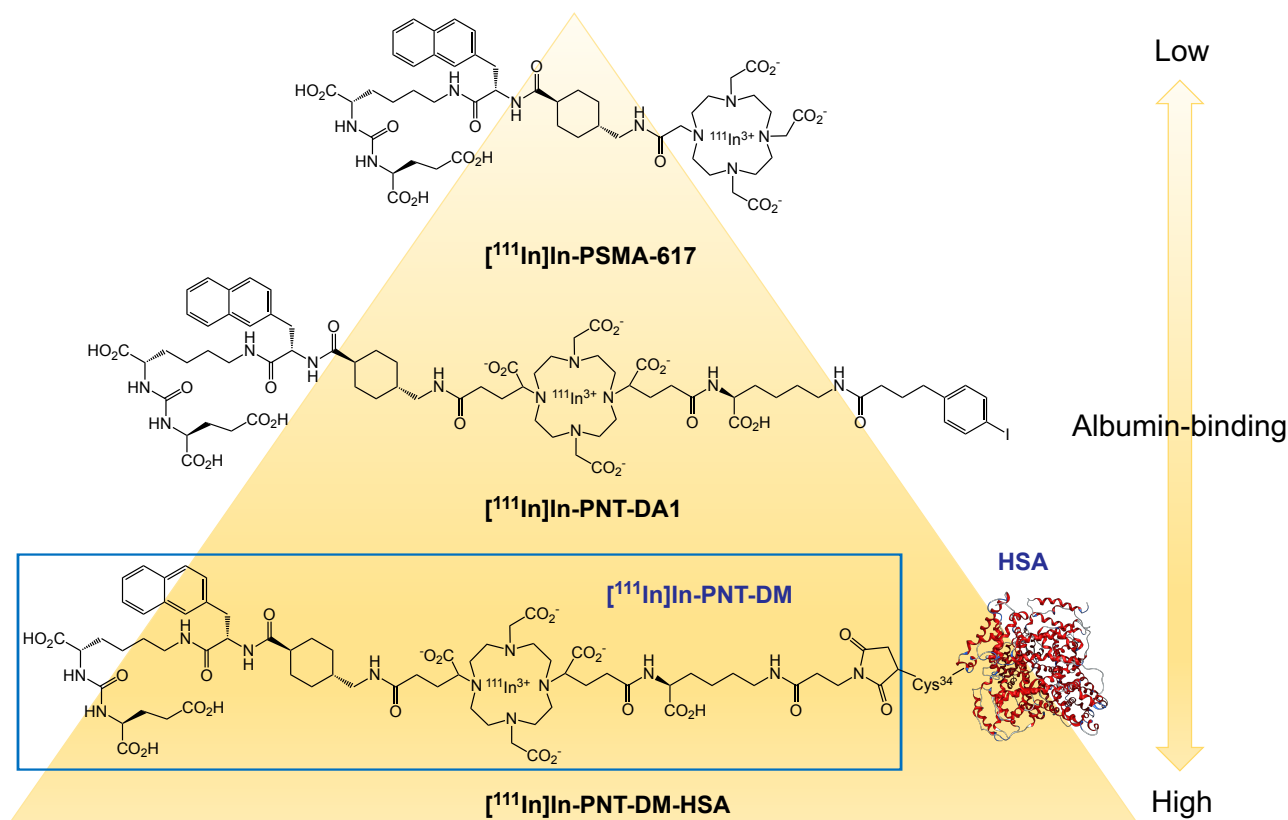


Figure 1-1. Chemical structures of [¹¹¹In]In-PNT-DM-HSA, [¹¹¹In]In-PNT-DA1, and [¹¹¹In]In-PSMA-617. The HSA structure was made with Molecular Operating Environment software (PDB ID: 1AO6).²⁰

1.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、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、および BLD Pharmatech 社から購入した。中圧分取液体クロマトグラフィー装置には、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-254 W, 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(electron ionization mass spectrometry, MS [ESI])または電子イオン化高分解能質量分析(electron ionization high-resolution mass spectrometry, HRMS [ESI])には、島津製作所株式会社製高速クロマトグラフ質量分析計 LCMS-2020 あるいは液体クロマトグラフィー/質量分析イオントラップ飛行時間型質量分析計 LCMS-IT-TOF を用いた。 $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ は日本メジフィジックス株式会社より購入した。2-(Phosphonomethyl)pentanedioic acid (2-PMPA) は Tocris Bioscience 社より購入した。高速液体クロマトグラフィー(high-performance liquid chromatography, HPLC)またはサイズ排除 HPLC には、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 を使用した。HPLC 用カラムには、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 Tosoh Bioscience 社製 TSK gel G3000SW_{XL} column (5 µm, 7.8 mm I.D. × 300 mm) を使用した。放射能の測定には、パーキンエルマー社製 Wallac WIZARD 2470 および ALOKA 社製キュリーメーター IGC-7 を用いた。

合成

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoate (1)

化合物 **1** は、3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionic acid を出発原料に、既報に従って合成した。²¹

tert-Butyl N²-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-N⁶-diphenyl(p-tolyl)methyl)-L-lysinate (2)

化合物 **2** は、N²-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-N⁶-(diphenyl(p-tolyl)methyl)-L-lysine を出発原料に、既報に従って合成した。²²

tert-Butyl *N*⁶-(diphenyl(*p*-tolyl)methyl)-L-lysinate (3)

化合物 **2** (904 mg, 1.33 mmol)を無水 *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF) (4 mL)およびピペリジン(1 mL)の混合溶液に溶解した。室温にて 5 時間攪拌した後、反応液に超純水(50 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 50 mL)で 2 回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をヘキサン/酢酸エチル(20/80)を抽出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、化合物 **3** を収量 495 mg (81%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.53 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.26–7.22 (m, 4H), 7.13 (dd, *J* = 7.6, 7.2 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.29 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 2.44–2.13 (m, 6H), 1.51–1.46 (m, 17H). MS (ESI) *m/z* calcd for C₃₀H₃₉N₂O₂⁺, 459.3 [M + H]⁺; found, 459.1.

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) (4)

化合物 **4** は、既報に従って合成した。^{23, 24}

4-(4,10-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-(1-(*tert*-butoxy)-5-(((*S*)-1-(*tert*-butoxy)-6-((diphenyl(*p*-tolyl)methyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid (5)

化合物 **4** (600 mg, 0.77 mmol) の無水 DMF 溶液 (3 mL) に、1-((1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylaminomorpholino))uronium hexafluorophosphate (COMU) (329 mg, 0.77 mmol) および *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA) (134 μL, 0.77 mmol)を 0°C で加え、反応液を 0°C で 15 分間攪拌した。次いで、化合物 **3** (179 mg, 0.39 mmol)の無水 DMF 溶液(338 μL)を 0°C で加えた。室温にて 1 日間攪拌した後、反応液に超純水(40 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 40 mL)で 3 回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をクロロホルム/メタノール(87/13)を抽出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、化合物 **5** を収量 54 mg (12%)で得た。HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₆₈H₁₀₅N₆O₁₃⁺, 1213.7740 [M + H]⁺; found, 1213.7738.

4-(4,10-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-(1-(*tert*-butoxy)-5-(((*S*)-1-(*tert*-butoxy)-6-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propanamido)-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** (54 mg, 0.044 mmol)をトリフルオロ酢酸(TFA)/トリイソプロピルシラン(TIPS)/ジクロロメタン(DCM) (2/3/95)の混合溶媒(1 mL)に溶解した。室温で 8 時間攪拌した後、溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を無水 DMF (350 μL)に溶解した。次いで、化合物 **1** (11.7 mg, 0.044 mmol)とトリエチルアミン(12.2 μL, 0.088 mmol)を加え、室温で 15 時間攪拌した。反応液を逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 40/60/0.1 (25 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. × 250 mm, 流量 4 mL/min]で精製

して化合物 **6** を収量 12 mg (24%) で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{55}H_{94}N_7O_{16}^+$, 1108.6757 $[M + H]^+$; found, 1108.6755.

PSMA リガンド(**7**)

PSMA リガンド(**7**)は, 既報を参考にして 2-chlorotrityl chloride resin (樹脂密度: 1.3 mmol/g) に固定化した (*S*)-2-((((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-((1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)-3-methylbutyl)amino)hexanoic acid から, 固相合成法を用いて合成した.⁸

(((1*S*)-1-Carboxy-5-((2*S*)-2-((1*R*,4*S*)-4-((4-carboxy-4-(7-(1-carboxy-4-(((*S*)-1-carboxy-5-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propanamido)pentyl)amino)-4-oxobutyl)-4,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanamido)pentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (PNT-DM) (**8**)

化合物 **6** (11.8 mg, 0.011 mmol) の無水 DMF 溶液 (300 μ L) に, O-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (4.2 mg, 0.011 mmol) および DIPEA (5.8 μ L, 0.033 mmol) を加えた. 混合物を樹脂に固定化した **7** (8.0 mg の樹脂, 0.010 mmol) に加え, 室温にて 14 時間振盪した. DMF (1 mL) を 3 回および DCM (1 mL) を 2 回加えて樹脂を洗浄した後, 樹脂を真空中で乾燥した. その後, TFA/DCM (50/50) の混合溶媒 (500 μ L) を添加し, 室温にて 17 時間振盪した. 得られた溶液についてアルゴンガスを用いて濃縮し, 得られた残渣を逆相 HPLC [H_2O /MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. $\times$ 250 mm, 流量 4 mL/min] で精製して, 化合物 **8** を収量 1.6 mg (11%) で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{68}H_{98}N_{12}O_{24}^{2+}$, 733.3409 $[M + 2H]^{2+}$; found, 733.3407.

[^{nat}In]In-PNT-DM (**9**)

化合物 **8** (1.3 mg, 0.89 μ mol) を H_2O /MeCN/TFA (50/50/0.1) の混合溶媒 (300 μ L) に溶解した後, 塩化インジウム(III)無水和物 (6.1 mg, 28 μ mol) を加えた. 反応液を室温にて 2 日間攪拌した後, 逆相 HPLC [H_2O /MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 50/50/0.1 (20 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min] で精製して化合物 **9** を収量 1.2 mg (86%) で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{68}H_{91}InN_{12}O_{24}^{2-}$, 787.2660 $[M - 2H]^{2-}$; found, 787.2630.

放射標識

[¹¹¹In]InCl₃ 溶液 (9.6 MBq, 200 μ L) と PNT-DM のジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液 (1 mg/mL, 2 μ L) を 2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES) 緩衝液 (0.1 M, pH 5.6, 200 μ L) 中で混和し, 90°C にて 30 分間加熱した. 室温に戻した後, 反応液を逆相 HPLC [H_2O /MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 20/80/0.1 (35 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min] で精製した.

アルブミン結合阻害実験

[¹¹¹In]In-PSMA-617 は、既報を参考にして調製した.²⁵ HSA のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液(4 mg/mL, 150 µL)を[¹¹¹In]In-PNT-DM または[¹¹¹In]In-PSMA-617 (37 kBq, 15 µL)と混合し、グルタチオン(GSH)の存在下(1 mM)または非存在下 37°C で 30 分間インキュベートした. 混合溶液に 300 µL の PBS を添加した後、Merck Millipore 社製アミコンウルトラ 0.5 mL (公称分画分子量 30 kDa)を用いて、溶液を 14000 ×g で 30 分間遠心分離した. 遠心後に濾過フィルターを反転させ、200 ×g で 3 分間遠心分離した. 再遠心後に得られたアルブミン結合画分、一度目の遠心で得られた濾液画分、および濾過フィルター画分の放射能をそれぞれ γ カウンターにより測定した. HSA に対する結合比率(%)は、{(アルブミン結合画分)/(アルブミン結合画分+濾液画分+濾過フィルター画分)×100}として計算した.

[¹¹¹In]In-PNT-DM-HSA の合成

HSA の PBS 溶液(40 mg/mL)を[¹¹¹In]In-PNT-DM (4.1 MBq)と混合し、37°C で 12 時間インキュベートした. 混合溶液をアミコンウルトラ 0.5 mL (公称分画分子量 30 kDa)を用いてアルブミン結合阻害実験と同様の方法により濃縮し、アルブミン結合画分をサイズ排除 HPLC [PBS (pH 7.3), TSK gel G3000SW_{XL}, 5 µm, 7.8 mm I.D. × 300 mm, 流量 0.5 mL/min]で精製した. 体内放射能分布実験の実施に向けて、精製後の化合物の吸光度値を GE Healthcare UK 社製 NanoVue Plus を用いて測定し、測定した値を HSA のモル吸光係数(35700 M⁻¹cm⁻¹)²⁶ で除すことにより、精製後の化合物に含まれる HSA (66.5 kDa)の濃度を求めた.

細胞培養

PSMA 陽性ヒト前立腺がん細胞である LNCaP 細胞および PSMA 陰性ヒト前立腺がん細胞である PC-3 細胞は、American Type Culture Collection および DS Pharma Biomedical 社よりそれぞれ購入した. 細胞は抗生物質 1% (ペニシリンおよびストレプトマイシン)と非働化ウシ胎児血清(FBS) 10%を含むナカライテスク株式会社製 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)培地中、37°C、5%二酸化炭素環境下で培養した.

動物

動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を得て、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* ノードマウスは日本エスエルシー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 社製 Matrigel を 1:1 で混合した溶液に、LNCaP 細胞(5 × 10⁶ cells/mouse)を懸濁させ、イソフルラン(2%)麻酔下、BALB/c-*nu/nu* ノードマウス(雄、5 週齢)の右脇腹に皮下移植することで作製した.

マウス血漿を用いたインビトロ安定性評価

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 バティキュナ採血管に回収し、1200×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。^[111In]In-PNT-DM-HSA (148 kBq) を 50% PBS 含有マウス血漿(150 µL)と混和し、37°C で 24 時間インキュベートした(n=3)。混合溶液を 2 倍希釈した後、10 µL を採取し、Atto 株式会社製 e-PAGEL HR を用いて電気泳動を実施した(電流: 20 mA, 泳動時間 80 分)。次いで、GE Healthcare UK 社製 Amersham Typhoon Scanning System を用いてオートラジオグラフィーを実施し、電気泳動により分離された¹¹¹In 標識体のバンドを検出した。

細胞結合実験

LNCaP 細胞および PC-3 細胞を 12 ウェルプレート(4 × 10⁵ cells/well)に播種し、37°C, 5%二酸化炭素環境下にて 48 時間静置した。培地を除去した後、アッセイ用培地(0.5% FBS 含有 RPMI 1640)(500 µL)で 2 回洗浄した。続いて、^[111In]In-PNT-DM-HSA (19 kBq)を含むアッセイ用培地(1 mL)を加え、37°C, 5%二酸化炭素環境下にて 1 時間静置した。非特異的結合は 100 µM の 2-PMPA を添加することにより評価した。培地を除去した後、アッセイ用培地(500 µL)で 2 回洗浄し、1 N 水酸化ナトリウム水溶液(200 µL)を 2 回加えて細胞を溶解した。細胞溶液中の放射能を γ カウンターで測定した後、細胞溶液中の総タンパク質濃度を Thermo Fisher Scientific 社製 BCA Protein Assay kit により測定した。

LNCaP 腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験

^[111In]In-PNT-DA1 は既報を参考にして調製した。⁸ ^[111In]In-PNT-DM-HSA (115 kBq, 0.43 mg of protein), ^[111In]In-PNT-DA1 (130 kBq)または^[111In]In-PSMA-617 (115 kBq)の 10%エタノール含有生理食塩水溶液(100 µL)を 1 群 3 匹の LNCaP 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈より投与した。投与 4, 24, および 48 時間後にマウスを屠殺し、採血後、目的の臓器および組織を摘出した。各試料の重量を測定し、γ カウンターを用いて各臓器の放射能を測定した。

統計解析

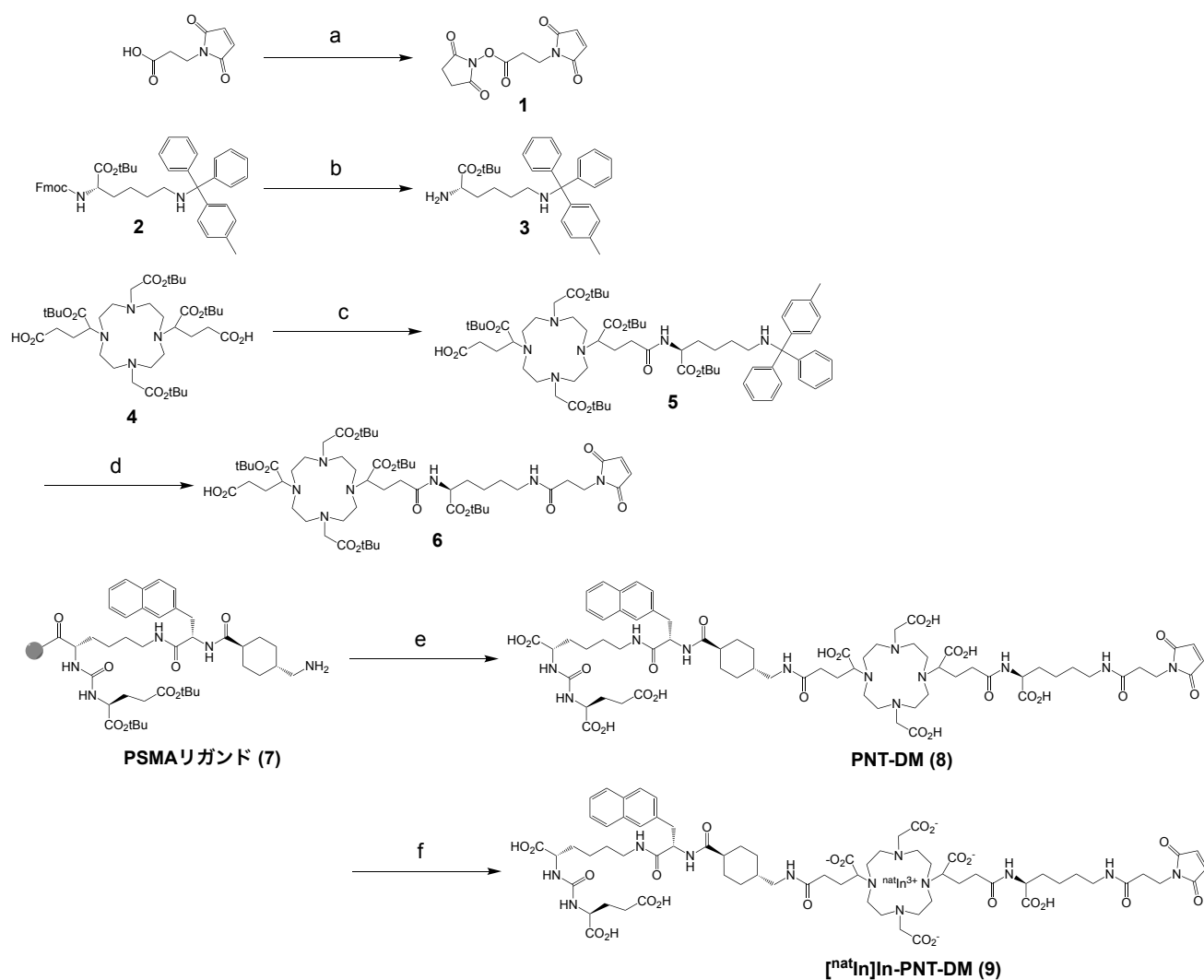
全てのデータは、GraphPad Prism (Version 6)または Microsoft Excel を用いて解析した。一元配置分散分析およびテューキーの多重比較検定を組み合わせる有意差を評価し、 $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

1.2. 結果および考察

標識前駆体および非放射性 In 標識体の合成

Scheme 1-1 に標識前駆体である PNT-DM の合成経路を示す. 化合物 **5** 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. 既報の方法に従って合成した PSMA リガンド(化合物 **7**)に対して, 化合物 **5** を固相上で導入し, TFA による脱樹脂および脱保護反応を経て PNT-DM (化合物 **8**)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) ($^{nat}\text{InCl}_3$)を使用して, 対応する非放射性 In 標識体である [^{nat}In]In-PNT-DM (化合物 **9**)を合成した.

Scheme 1-1. Synthetic routes of PNT-DM and nonradioactive In-labeled PNT-DM.



放射標識

Scheme 1-2 に PNT-DM の ^{111}In 標識経路を示す。 ^{111}In 標識は、標識前駆体を MES 緩衝液中で $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ と加熱することにより実施した。逆相 HPLC を用いて精製を行い、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$ を放射化学的収率 51% および放射化学的純度 95% 以上で得た(**Figure 1-2**)。

Scheme 1-2. Radiosynthesis of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$.

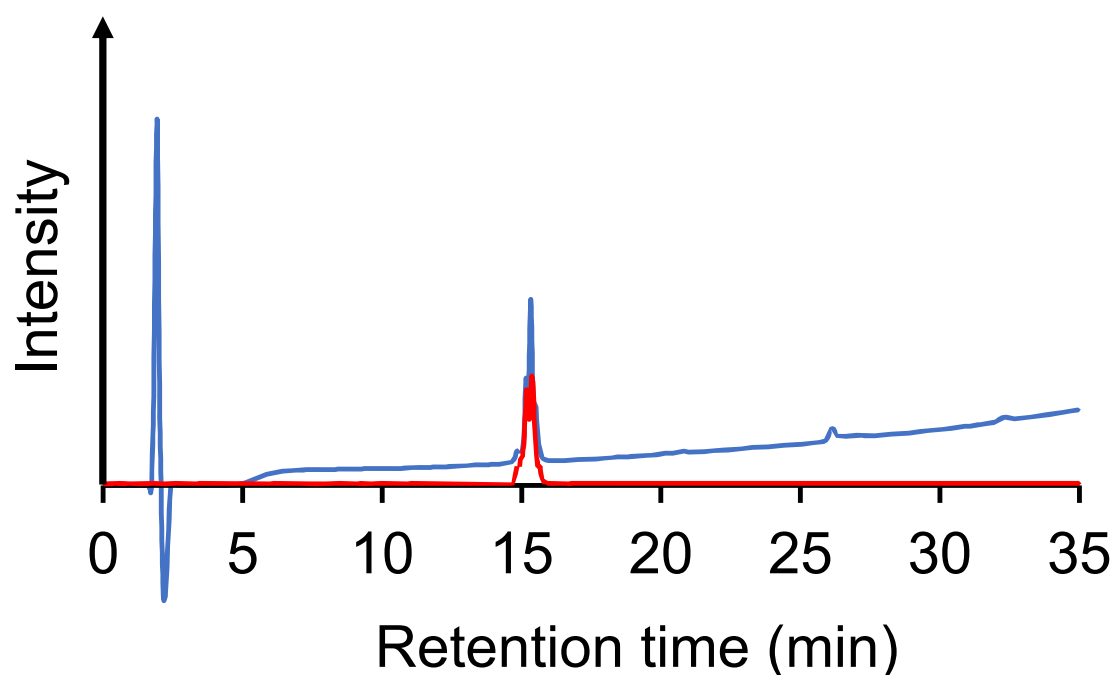
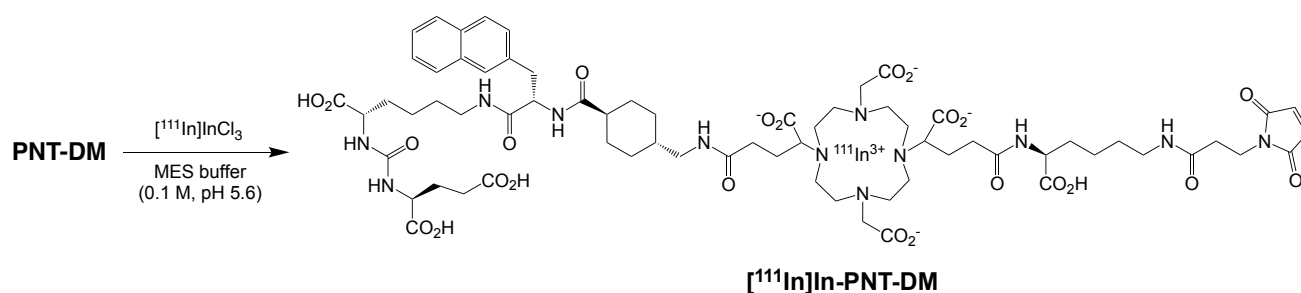


Figure 1-2. HPLC chromatograms of radioactivity (red) and UV absorption (blue) for a mixture of $[^{111/\text{nat}}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$.

アルブミン結合阻害実験

$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$ が HSA と共有結合を形成することを確認するため、アルブミン結合阻害実験を行った。 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$ のアルブミン結合画分の割合は 78.4% であり、その値は GSH の添加 (40.5%) により有意に減少した(**Figure 1-3**)。GSH は分子中にシステイン残基を有するトリペプチドであり、マイケル付加反応によりマレイミド構造と共有結合を形成することが知られている。²⁷ 本実

験結果からも, $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$ がマレイミド基と HSA のチオールとの間で共有結合を形成することが示唆された. また, GSH 存在下における $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$ のアルブミン結合画分の割合は, 同じ PSMA リガンドを有する $[^{111}\text{In}]\text{In-PSMA-617}$ の GSH 存在下および非存在下におけるアルブミン結合画分の割合(それぞれ 36.6%および 36.9%)と同等であった. PSMA-617 のリガンド構造はアルブミンに対する結合性に寄与することが示唆されている.^{28, 29} したがって, GSH 存在下における $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$ の HSA に対する結合は, PSMA リガンドを介した非共有結合に由来するものであると考えられる.

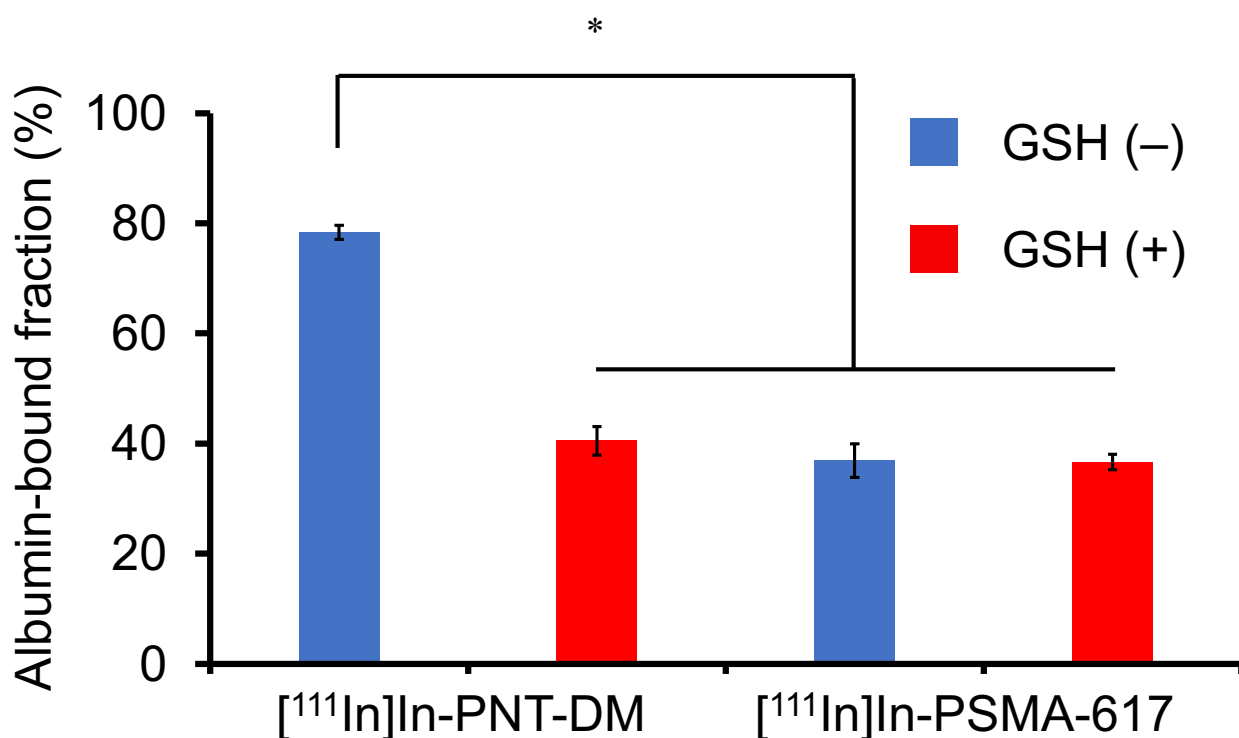


Figure 1-3. Binding of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$ and $[^{111}\text{In}]\text{In-PSMA-617}$ to HSA with (red) or without (blue) GSH. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation for three individual experiments. * $P < 0.05$.

$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM-HSA}$ の合成

Scheme 1-3 に $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM-HSA}$ の合成経路を示す. $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM}$ を HSA と 37°C で 12 時間インキュベートした後, サイズ排除 HPLC を用いた精製を行うことにより, $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM-HSA}$ を放射化学的収率 30%および放射化学的純度 95%以上で得た(**Figure 1-4**).

Scheme 1-3. Radiosynthesis of [^{111}In]In-PNT-DM-HSA.

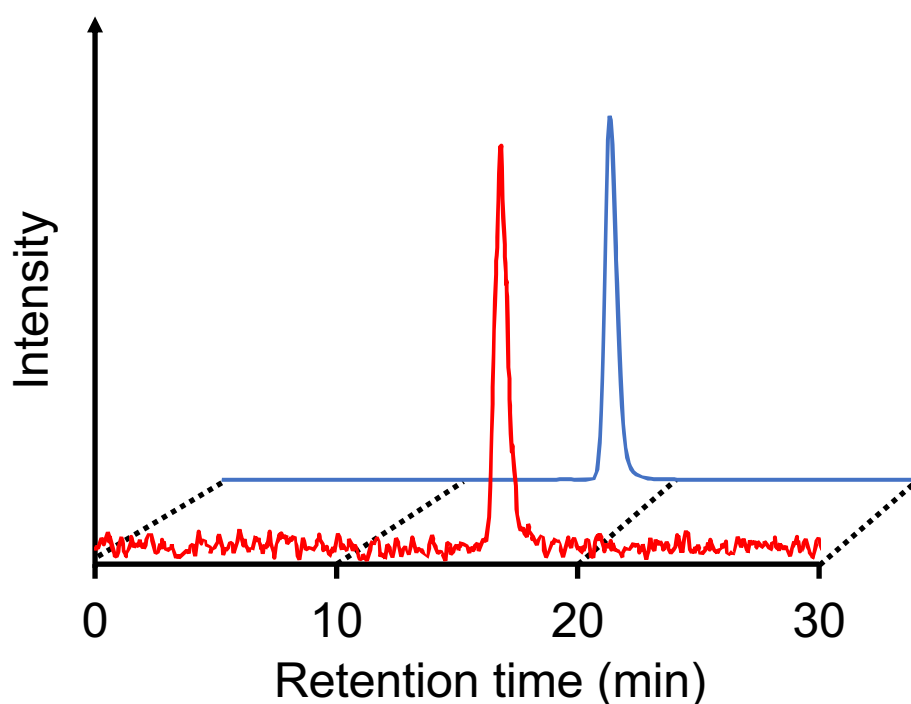
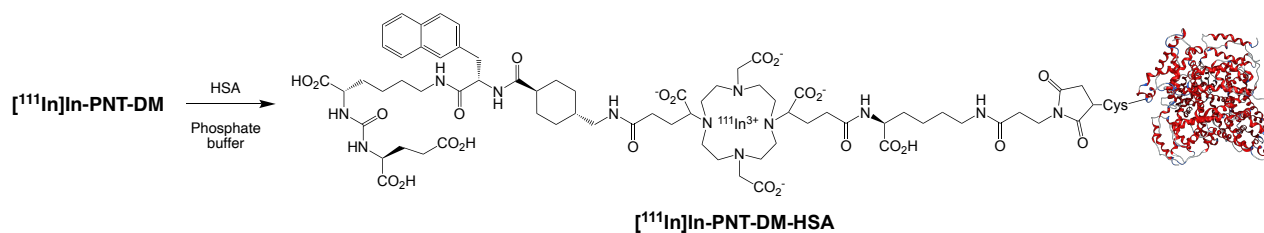


Figure 1-4. HPLC chromatograms of radioactivity (red) and UV absorption (blue) of [^{111}In]In-PNT-DM-HSA.

マウス血漿を用いたインビトロ安定性評価

マウス血漿を用いて、 $[\text{}^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM-HSA}$ の安定性を評価した(**Figure 1-5**)。電気泳動およびオートラジオグラフィーを用いて分析したところ、 $[\text{}^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM-HSA}$ をマウス血漿中 37°C で 24 時間インキュベートしても、そのバンド強度に変化は認められなかった。この結果より、 $[\text{}^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DM-HSA}$ が血漿中において 24 時間安定に存在することが示唆された。

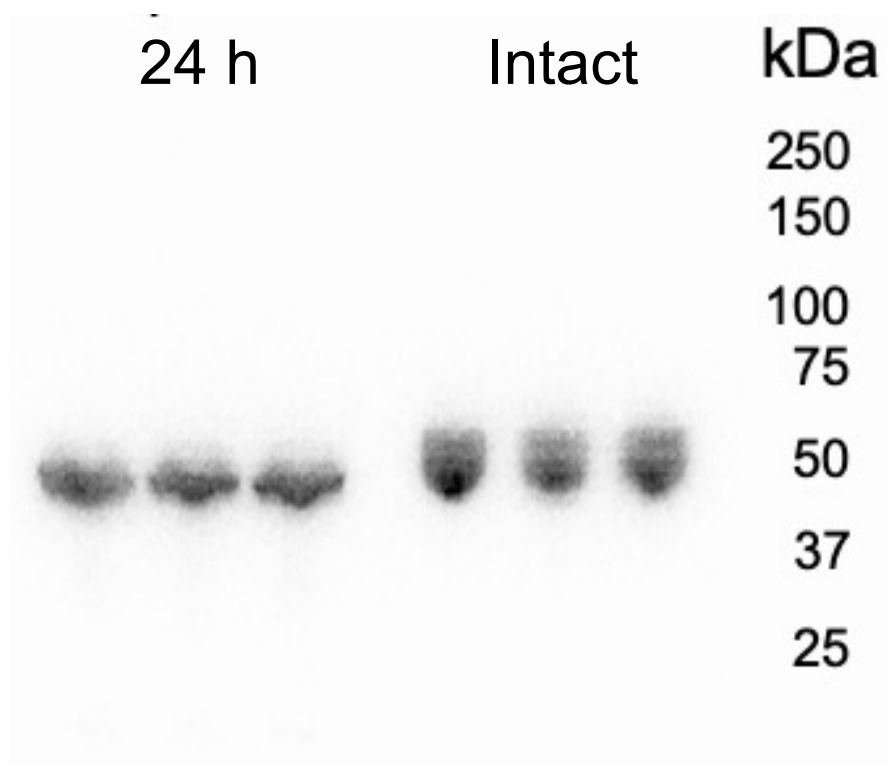


Figure 1-5. Autoradiogram of [^{111}In]In-PNT-DM-HSA after (24 h) and before (intact) incubation with mouse plasma.

細胞結合実験

PSMA を高発現する LNCaP 細胞と低発現の PC-3 細胞を用いて, [^{111}In]In-PNT-DM-HSA の PSMA に対する結合性を評価した(**Figure 1-6**). [^{111}In]In-PNT-DM-HSA は PC-3 細胞と比較して(0.36% Initial dose/mg protein), LNCaP 細胞に対する高い結合性を示した(1.0% Initial dose/mg protein). また [^{111}In]In-PNT-DM-HSA の LNCaP 細胞に対する結合は, PSMA の阻害剤である 2-PMPA を過剰量添加することで有意に減少した(0.27% Initial dose/mg protein). これらの結果から, [^{111}In]In-PNT-DM-HSA の PSMA に対する特異的な結合性が示された.

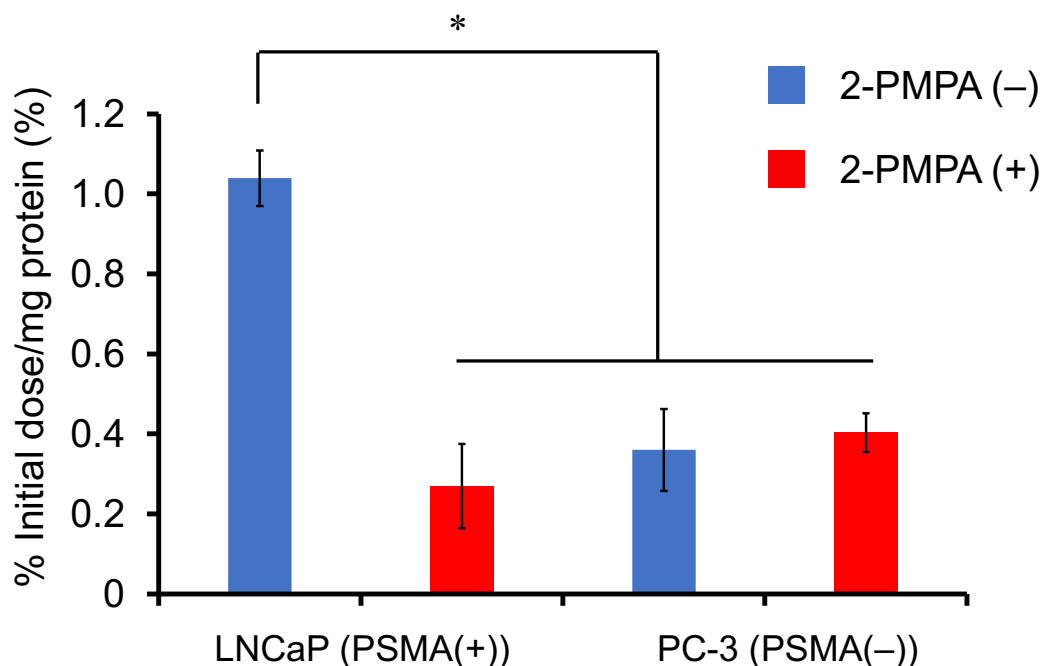


Figure 1-6. Binding of [^{111}In]In-PNT-DM-HSA to LNCaP and PC-3 cells with (red) or without (blue) 2-PMPA. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation for three individual experiments. * $P < 0.05$.

LNCaP 腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験

[^{111}In]In-PNT-DM-HSA, [^{111}In]In-PNT-DA1, および [^{111}In]In-PSMA-617 の体内動態を比較するため, LNCaP 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(**Figure 1-7, Tables 1-1–1-3**). [^{111}In]In-PNT-DM-HSA の血中放射能量は投与 4, 24, および 48 時間後において, それぞれ 17.3, 6.1, および 4.0% Injected dose (ID)/g であった. [^{111}In]In-PNT-DM-HSA は既報の ^{111}In 標識 HSA と同等の血中クリアランスを示しており,³⁰ HSA に対する [^{111}In]In-PNT-DM の導入は, 血中滞留性に影響を与えないことが示唆された. [^{111}In]In-PNT-DA1 の血中放射能量は投与 4, 24, および 48 時間後において, それぞれ 15.5, 8.1, および 6.4% ID/g であった. 一方で, [^{111}In]In-PSMA-617 の血中放射能量は [^{111}In]In-PNT-DM-HSA および [^{111}In]In-PNT-DA1 と比較して大きく低下した(投与 4, 24, および 48 時間後において, それぞれ 0.12, 0.02, および 0.02% ID/g). これらの結果より, アルブミンとの相互作用により, PSMA 標的放射性薬剤の血中滞留性が向上することが示唆された. 投与 24 および 48 時間後において, [^{111}In]In-PNT-DM-HSA (6.1 および 4.0% ID/g)は, [^{111}In]In-PNT-DA1 (8.1 および 6.4% ID/g)よりも低い% ID/g の値を示した. ALB である IPBA を有する薬剤は, HSA と共有結合を形成した薬剤と比較して血中半減期が長いことが報告されており,³¹ 分子中に IPBA を有する [^{111}In]In-PNT-DA1 は, IPBA による可逆的なアルブミンとの相互作用により, 高い血中滞留性を示したと考えられる.

投与4時間後における ^{111}In In-PNT-DA1および ^{111}In In-PSMA-617の腫瘍集積は、それぞれ20.3および23.6% ID/gであった。一方で、 ^{111}In In-PNT-DM-HSAの投与4時間後における腫瘍集積は、 ^{111}In In-PNT-DA1および ^{111}In In-PSMA-617と比較して大きく低下した(4.0% ID/g)。投与48時間後において、 ^{111}In In-PNT-DM-HSAの腫瘍集積は19.2% ID/gに増加し、この値は ^{111}In In-PSMA-617(13.2% ID/g)と同等であった。 ^{111}In In-PNT-DA1は投与48時間後において、 ^{111}In In-PNT-DM-HSAおよび ^{111}In In-PSMA-617と比較して有意に高い腫瘍集積を示した(80.0% ID/g)。ALBを有する放射性薬剤は、腫瘍組織においてアルブミンから解離した後、がん細胞上に存在する標的分子に結合するという仮説が提唱されている。⁴これらの知見から、ALBを導入した ^{111}In In-PNT-DA1は、アルブミンから解離することで腫瘍細胞に対する移行性が保持され、その結果、アルブミンと共有結合を形成した ^{111}In In-PNT-DM-HSAと比較して腫瘍集積性が向上したと考えられる。

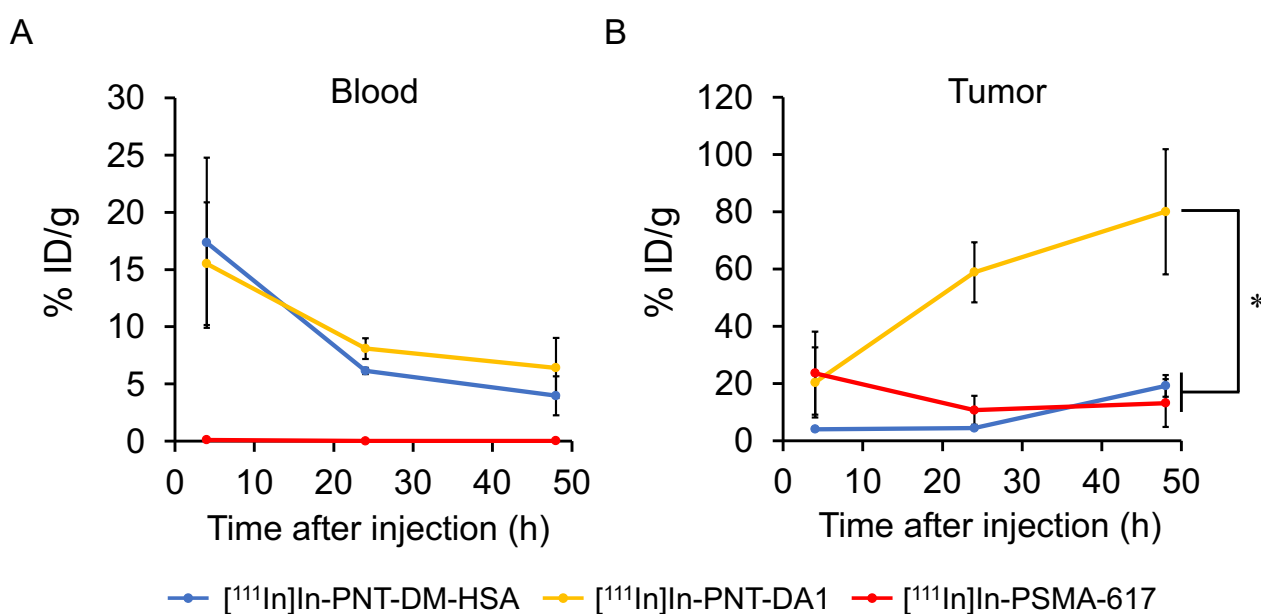


Figure 1-7. Comparison of the radioactivity in the blood (A) and LNCaP tumor (B) at 4, 24, and 48 h postinjection of ^{111}In In-PNT-DM-HSA, ^{111}In In-PNT-DA1, and ^{111}In In-PSMA-617 into LNCaP tumor-bearing mice. * $P < 0.05$.

Table 1-1. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DM-HSA into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	48
Blood	17.3 ± 7.4	6.1 ± 0.27	4.0 ± 1.7
Spleen	3.6 ± 1.1	6.2 ± 0.58	6.6 ± 2.9
Pancreas	1.7 ± 0.49	3.2 ± 0.54	2.6 ± 0.86
Stomach ^a	0.34 ± 0.23	0.46 ± 0.19	0.35 ± 0.14
Intestine	1.3 ± 0.57	1.3 ± 0.29	1.3 ± 0.11
Kidney	9.4 ± 3.4	8.1 ± 0.87	9.1 ± 6.9
Liver	4.8 ± 2.4	5.9 ± 0.50	6.3 ± 0.69
Heart	5.1 ± 2.1	3.0 ± 0.61	3.2 ± 0.50
Lung	6.9 ± 1.3	5.3 ± 0.09	4.4 ± 0.86
Brain	0.38 ± 0.16	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.01
Tumor	4.0 ± 0.39	4.4 ± 0.49	19.2 ± 3.8
Muscle	0.73 ± 0.32	2.3 ± 1.2	0.93 ± 0.24

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation for three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 1-2. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DA1 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	48
Blood	15.5 $\pm$ 5.4	8.1 $\pm$ 0.92	6.4 $\pm$ 2.6
Spleen	8.1 $\pm$ 5.7	9.4 $\pm$ 3.5	6.5 $\pm$ 3.1
Pancreas	1.9 $\pm$ 0.62	1.8 $\pm$ 0.23	1.2 $\pm$ 0.36
Stomach ^a	0.67 $\pm$ 0.52	0.33 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.06
Intestine	0.98 $\pm$ 0.23	0.89 $\pm$ 0.29	0.60 $\pm$ 0.15
Kidney	22.1 $\pm$ 10.6	47.2 $\pm$ 1.1	48.5 $\pm$ 16.2
Liver	3.0 $\pm$ 0.84	2.6 $\pm$ 0.65	2.2 $\pm$ 0.77
Heart	3.2 $\pm$ 0.79	2.5 $\pm$ 0.27	2.2 $\pm$ 1.1
Lung	6.6 $\pm$ 1.4	6.5 $\pm$ 1.6	5.9 $\pm$ 2.4
Brain	0.29 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.07
Tumor	20.3 $\pm$ 12.3	58.9 $\pm$ 10.5	80.0 $\pm$ 21.9
Muscle	0.98 $\pm$ 0.31	1.4 $\pm$ 1.0	1.2 $\pm$ 0.78

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation for three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 1-3. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PSMA-617 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	48
Blood	0.12 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Spleen	2.8 ± 1.2	0.22 ± 0.06	0.14 ± 0.08
Pancreas	0.49 ± 0.26	0.10 ± 0.02	0.04 ± 0.02
Stomach ^a	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Intestine	0.28 ± 0.08	0.11 ± 0.10	0.06 ± 0.03
Kidney	160 ± 34	3.5 ± 2.1	2.1 ± 2.7
Liver	0.37 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Heart	0.19 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Lung	0.60 ± 0.04	0.10 ± 0.07	0.07 ± 0.05
Brain	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.00
Tumor	23.6 ± 14.5	10.7 ± 5.1	13.2 ± 8.3
Muscle	0.13 ± 0.06	0.04 ± 0.03	0.09 ± 0.10

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation for three mice. ^aData are expressed as % ID.

1.3. 小括

本章では、PSMA 標的放射性薬剤のアルブミン結合性と腫瘍集積性との関係性を評価することを目的として、HSA と共有結合を形成した PSMA 標的放射性薬剤 ^{111}In]-PNT-DM-HSA を設計・合成した。 ^{111}In]-PNT-DM-HSA の体内動態を、ALB を有する ^{111}In]-PNT-DA1 およびアルブミン結合ユニットを有さない ^{111}In]-PSMA-617 と比較した結果、以下の知見が得られた。

- (1) ^{111}In]-PNT-DM-HSA および ^{111}In]-PNT-DA1 は、 ^{111}In]-PSMA-617 と比較して高い血中滞留性を示した。
- (2) ^{111}In]-PNT-DA1 の腫瘍集積は、 ^{111}In]-PNT-DM-HSA および ^{111}In]-PSMA-617 と比較して有意に増加した。また ^{111}In]-PNT-DM-HSA の腫瘍集積は ^{111}In]-PSMA-617 と同等であった。

以上の結果より、ALB による可逆的なアルブミンとの相互作用が、PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積向上に有用であることが示された。

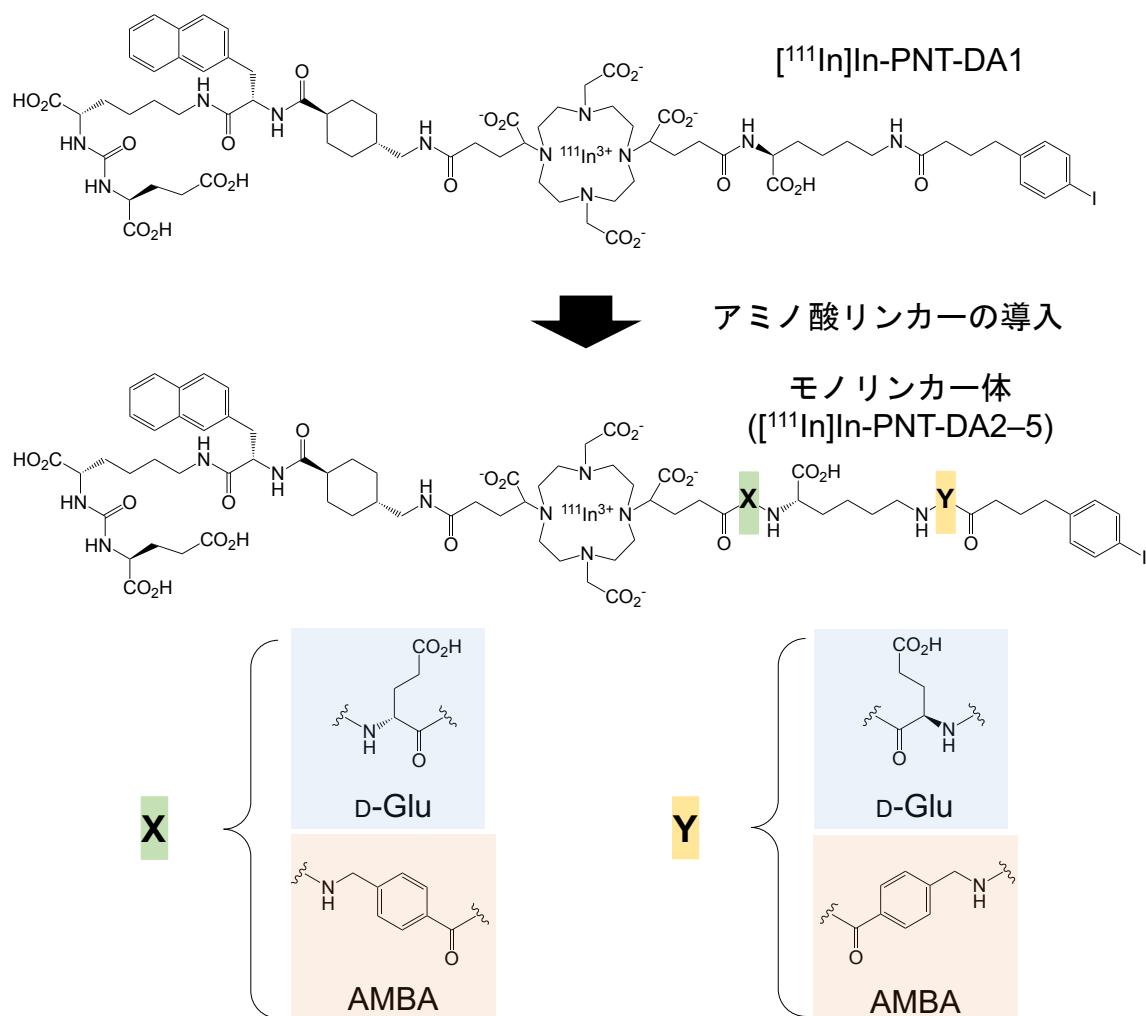
第 2 章

アミノ酸リンカーが前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤の 体内動態に与える影響の検証

背景

第 1 章において、ALB による可逆的なアルブミンとの相互作用が、共有結合による相互作用と比較して、PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積性の向上に有用であることを明らかにした。そこで本章では、ALB を有する PSMA 標的放射性薬剤 ^{111}In]-PNT-DA1 を基盤とし、ALB による可逆的なアルブミンとの相互作用を変化させる分子設計を行うことで、ラジオセラノスティクスのさらなる有効性向上に資する PSMA 標的放射性薬剤の開発を目指した。

薬剤へのリンカー導入は、その有用性を高める戦略のひとつである。³²⁻³⁴ 放射性薬剤の開発においても、リンカーの導入が体内動態に影響を与えることが示唆されている。³⁵⁻⁴⁰ 特に、放射性薬剤の ALB に対して脂溶性の異なるアミノ酸をリンカーとして導入することで、そのアルブミン結合性および体内動態を変化させることが報告されている。⁴¹ これらの知見から、 ^{111}In]-PNT-DA1 の ALB である Lys-IPBA に、脂溶性の異なるアミノ酸をリンカーとして導入する戦略が、薬剤の有用性の向上に寄与すると考えた。 ^{111}In]-PNT-DA1 は DOTADG と Lys 残基、および Lys 残基と IPBA の間にそれぞれアミド結合を形成している(Figure 2-1)。2 つのアミド結合形成部位を利用することで、アミノ酸の導入が可能となる。そこで、 ^{111}In]-PNT-DA1 の DOTADG と Lys 残基の間を X 位、Lys 残基と IPBA の間を Y 位として設定し、それぞれに水溶性アミノ酸の D-グルタミン酸(D-Glu)、または脂溶性アミノ酸の 4-アミノメチル安息香酸(AMBA)を導入した 4 種類のモノリンカー体(^{111}In]-PNT-DA2-5)を設計した(Figure 2-1)。モノリンカー体のアルブミン結合性と体内動態に関する評価を通じ、アミノ酸リンカーである D-Glu または AMBA の導入が、PSMA 標的放射性薬剤の体内動態に与える影響を検証した。



Compound	X	Y
[¹¹¹ In]In-PNT-DA1	-	-
[¹¹¹ In]In-PNT-DA2	D-Glu	-
[¹¹¹ In]In-PNT-DA3	AMBA	-
[¹¹¹ In]In-PNT-DA4	-	D-Glu
[¹¹¹ In]In-PNT-DA5	-	AMBA

Figure 2-1. Chemical structures of [¹¹¹In]In-PNT-DA1-5.

2.1. 実験方法

試薬・機器

第1章と同じ試薬・機器を使用した。

合成

tert-Butyl *N*⁶-(4-(4-iodophenyl)butanoyl)-L-lysinate (1)

化合物 **1** は、既報に従って合成した。²²

tert-Butyl *N*²-((*R*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoyl)-*N*⁶-(4-(4-iodophenyl)butanoyl)-L-lysinate (2)

(*R*)-2-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid monohydrate (286 mg, 0.65 mmol) の無水 DMF 溶液 (1 mL) に、1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (171 mg, 0.90 mmol) および 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridine-3-ol (HOAt) (116 mg, 0.85 mmol) を 0°C で加え、反応液を 0°C で 15 分間攪拌した。次いで化合物 **1** (200 mg, 0.42 mmol) の無水 DMF 溶液 (1 mL) およびトリエチルアミン (117 μL, 0.84 mmol) を 0°C で加えた。室温にて 1 日間攪拌した後、反応液に超純水 (30 mL) を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物 (83/17, 30 mL) で 3 回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をクロロホルム/メタノール (94/6) を抽出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、化合物 **2** を収量 146 mg (39%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.30 (dd, *J* = 7.6, 6.8 Hz, 2H), 7.21 (dd, *J* = 7.6, 3.2 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.38–4.11 (m, 5H), 3.15–3.02 (m, 2H), 2.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.36–2.20 (m, 3H), 2.03 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.91–1.73 (m, 4H), 1.39–1.18 (m, 25H). MS (ESI) *m/z* calcd for C₄₄H₅₇IN₃O₈⁺, 882.3 [M + H]⁺; found, 882.2.

tert-Butyl *N*²-((*R*)-2-amino-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoyl)-*N*⁶-(4-(4-iodophenyl)butanoyl)-L-lysinate (3)

化合物 **2** (165 mg, 0.19 mmol) を無水 DMF (4 mL) およびピペリジン (1 mL) の混合溶液に溶解した。室温にて 3 時間攪拌した後、反応液に超純水 (40 mL) を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物 (83/17, 40 mL) で 3 回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をクロロホルム/メタノール (93/7) を抽出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、化合物 **3** を収量 95 mg (77%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.34–4.28 (m, 1H), 3.30–3.27 (m, 1H), 3.09–3.07 (m, 2H), 2.47 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.29–2.19 (m, 2H), 2.06–1.96 (m, 5H), 1.84–1.68 (m, 4H), 1.59–1.49 (m, 1H), 1.43–1.16 (m, 24H). MS (ESI) *m/z* calcd for C₂₉H₄₇IN₃O₆⁺, 660.3 [M + H]⁺; found, 660.2.

tert-Butyl *N*²-(4-(aminomethyl)benzoyl)-*N*⁶-(4-(4-iodophenyl)butanoyl)-L-lysinate (4)

4-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)methyl)benzoic acid (373 mg, 1.0 mmol)の無水 DMF 溶液(1.4 mL)に, EDC·HCl (192 mg, 1.0 mmol)および HOAt (136 mg, 1.0 mmol)を 0°C で加え, 反応液を 0°C で 15 分間攪拌した. 次いで, 化合物 **1** (237 mg, 0.5 mmol)の無水 DMF 溶液(500 μ L)およびトリエチルアミン(139 μ L, 1.0 mmol)を 0°C で加えた. 室温にて 1 日間攪拌した後, 反応液に超純水(30 mL)を加え, ヘキサン/酢酸エチル混合物(83/17, 30 mL)で 3 回抽出を行った. 有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し, 得られた残渣をクロロホルム/メタノール(94/6)を抽出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製して, 得られた画分を減圧濃縮した. 次いで, 濃縮した画分を無水 DMF (2.4 mL)およびピペリジン(600 μ L)の混合溶液に溶解した. 室温にて 3 時間攪拌した後, 反応液に超純水(30 mL)を加え, ヘキサン/酢酸エチル混合物(83/17, 30 mL)で 3 回抽出を行った. 有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し, 得られた残渣をクロロホルム/メタノール(50/50)を抽出溶媒とするアミノシリカゲルクロマトグラフィーで精製して, 化合物 **4** を収量 60 mg (20%)で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.62–4.60 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.17 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.51–2.45 (m, 2H), 2.08–2.04 (m, 2H), 1.84–1.72 (m, 7H), 1.51–1.40 (m, 14H). MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{IN}_3\text{O}_4^+$, 608.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found, 608.2.

(R)-5-(tert-Butoxy)-2-(4-(4-iodophenyl)butanamido)-5-oxopentanoic acid (**5**)

1,1-Carbonyldiimidazole (CDI) (169 mg, 1.0 mmol)の無水テトラヒドロフラン(THF)溶液(5 mL)に, 4-(*p*-iodophenyl)butyric acid (290 mg, 1.0 mmol)を 0°C で加えた. 反応液を室温にて 3 時間攪拌した後, (*S*)-2-amino-5-(tert-butoxy)-5-oxopentanoic acid (212 mg, 1.0 mmol)の 1 N 水酸化ナトリウム水溶液(1 mL)をゆっくりと加えた. 反応液を 18 時間攪拌し, 次いで減圧濃縮した. 得られた残渣に超純水/酢酸エチル混合物(50/50, 10 mL)を加え, 0.2 N 塩酸水溶液を用いて pH を 4.5 に調整した後, 酢酸エチル (20 mL)で 3 回抽出を行った. 有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し, 得られた残渣をクロロホルム/メタノール(81/19)を抽出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製して, 化合物 **5** を収量 163 mg (34%)で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.49 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.84 (s, 2H), 2.48 (s, 2H), 2.15 (s, 4H), 1.82 (s, 3H), 1.34–1.16 (m, 13H). MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{INO}_5^-$, 474.1 $[\text{M} - \text{H}]^-$; found, 473.9.

tert-Butyl N^2 -((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-L-lysinate (**6**)

化合物 **6** は, 既報に従って合成した.²²

tert-Butyl N^6 -((R)-5-(tert-butoxy)-2-(4-(4-iodophenyl)butanamido)-5-oxopentanoyl)-L-lysinate (**7**)

化合物 **5** (152 mg, 0.32 mmol)の無水 DMF 溶液(1.1 mL)に, COMU (137 mg, 0.32 mmol)および DIPEA (56 μ L, 0.32 mmol)を 0°C で加え, 反応液を 0°C で 15 分間攪拌した. 次いで, 化合物 **6** (134 mg, 0.17 mmol)の無水 DMF 溶液(320 μ L)を 0°C で加えた. 室温にて 1 日間攪拌した後, 反応液に超純水(20

mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 20 mL)で3回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣を無水 DMF (2.4 mL)およびピペリジン(600 μ L)の混合溶液に溶解した。室温にて4時間攪拌した後、反応液に超純水(30 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 30 mL)で3回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をクロロホルム/メタノール(90/10)を抽出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製した後、さらに逆相 HPLC [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 70/30/0.1$ (0 min) to $10/90/0.1$ (30 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. $\times$ 250 mm, 流量 4 mL/min]で精製して、化合物 **7** を収量 43 mg (21%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.47 (s, 2H), 7.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.34 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.86 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.04 (s, 1H), 2.51 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.35–2.14 (m, 4H), 1.98–1.82 (m, 6H), 1.57–1.22 (m, 23H). MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{IN}_3\text{O}_6^+$, 660.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found, 660.3.

4-((4-(4-Iodophenyl)butanamido)methyl)benzoic acid (**8**)

CDI (327 mg, 2.0 mmol)の無水 THF 溶液(10 mL)に、4-(*p*-iodophenyl)butyric acid (580 mg, 2.0 mmol)を0°Cで加えた。反応液を室温にて3時間攪拌した後、4-(aminomethyl)benzoic acid (302 mg, 2.0 mmol)の1 N 水酸化ナトリウム水溶液(2 mL)をゆっくりと加え、室温にて終夜攪拌した。反応液をガラスフィルターで濾過し、THF (20 mL)で洗浄した。得られた残渣を真空中で乾燥させ、化合物 **8** を収量 650 mg (77%)で得た。¹H NMR (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) δ 7.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 3.31–3.23 (m, 2H), 2.58 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.25 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.95–1.88 (m, 2H). MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{INO}_3^+$, 424.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found, 423.8.

tert-Butyl *N*⁶-(4-((4-(4-iodophenyl)butanamido)methyl)benzoyl)-L-lysinate (**9**)

化合物 **8** (163 mg, 0.38 mmol)の無水 DMF 溶液(2 mL)に、COMU (196 mg, 0.46 mmol)および DIPEA (78 μ L, 0.45 mmol)を0°Cで加え、反応液を0°Cで15分間攪拌した。次いで、化合物 **6** (82 mg, 0.19 mmol)を0°Cで加えた。室温にて14時間攪拌した後、反応液に超純水(30 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 30 mL)で3回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣を無水 DMF (3.2 mL)およびピペリジン(800 μ L)の混合溶液に溶解した。室温にて3時間攪拌した後、反応液に超純水(30 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 30 mL)で3回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をクロロホルム/メタノール(89/11)を抽出溶媒とするアミノシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、化合物 **9** を収量 53 mg (45%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.65 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.40 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.41 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.56 (dd, $J = 8.4, 7.6$ Hz, 2H), 2.19 (dd, $J = 7.2, 6.8$ Hz, 2H), 1.93 (dd, $J = 7.6, 7.2$ Hz, 3H), 1.76–1.58 (m, 4H), 1.53–1.42 (m, 15H). MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{IN}_3\text{O}_4^+$, 608.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found, 608.1.

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) (10)

化合物 **10** は、第 1 章と同様の方法により合成した。

4-(4,10-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-((10*R*,13*S*)-10-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxopropyl)-13-(*tert*-butoxycarbonyl)-22-(4-iodophenyl)-2,2-dimethyl-4,8,11,19-tetraoxo-3-oxa-9,12,18-triazadocosan-5-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid (11)

化合物 **10** (84 mg, 0.11 mmol)の無水 DMF 溶液(1.9 mL)に、COMU (50 mg, 0.12 mmol)および DIPEA (40 μ L, 0.23 mmol)を 0°C で加え、反応液を 0°C で 15 分間攪拌した。次いで、化合物 **3** (24 mg, 0.036 mmol)の無水 DMF 溶液(200 μ L)を 0°C で加えた。室温にて 19 時間攪拌した後、反応液に超純水(10 mL)を加え、酢酸エチル(10 mL)で 2 回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をクロロホルム/メタノール(75/25)を抽出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、化合物 **11** を収量 27 mg (52%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{67}H_{114}IN_7O_{17}^{2+}$, 707.8658 $[M + 2H]^{2+}$; found, 707.8657.

4-(4,10-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-(1-(*tert*-butoxy)-5-((4-(((*S*)-1-(*tert*-butoxy)-6-(4-(4-iodophenyl)butanamido)-1-oxohexan-2-yl)carbamoyl)benzyl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid (12)

化合物 **4** (12 mg, 0.020 mmol)および化合物 **10** (46 mg, 0.060 mmol)を用いて、化合物 **11** と同様の合成法により化合物 **12** を合成し、収量 13 mg (47%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{66}H_{106}IN_7O_{15}^{2+}$, 681.8391 $[M + 2H]^{2+}$; found, 681.8390.

4-(4,10-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-((10*S*,17*R*)-10-(*tert*-butoxycarbonyl)-17-(4-(4-iodophenyl)butanamido)-2,2,22,22-tetramethyl-4,8,16,20-tetraoxo-3,21-dioxa-9,15-diazatricosan-5-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid (13)

化合物 **7** (40 mg, 0.061 mmol)および化合物 **10** (130 mg, 0.17 mmol)を用いて、化合物 **11** と同様の合成法により化合物 **13** を合成し、収量 21 mg (23%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{67}H_{113}IN_7O_{17}^{+}$, 1414.7238 $[M + H]^{+}$; found, 1414.7283.

4-(4,10-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-(1-(*tert*-butoxy)-5-(((*S*)-1-(*tert*-butoxy)-6-(4-((4-(4-iodophenyl)butanamido)methyl)benzamido)-1-oxohexan-2-yl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid (14)

化合物 **9** (20 mg, 0.033 mmol)および化合物 **10** (76 mg, 0.099 mmol)を用いて、化合物 **11** と同様の合成法により化合物 **14** を合成し、収量 18 mg (35%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{66}H_{106}IN_7O_{15}^{2+}$, 681.8391 $[M + 2H]^{2+}$; found, 681.8394.

PSMA リガンド(15)

PSMA リガンド(化合物 **15**)は、第 1 章と同様の方法により合成した。

(((1*S*)-1-Carboxy-5-((2*S*)-2-((1*R*,4*S*)-4-((4-carboxy-4-(7-(1-carboxy-4-(((*R*)-4-carboxy-1-(((*S*)-1-carboxy-5-(4-(4-iodophenyl)butanamido)pentyl)amino)-1-oxobutan-2-yl)amino)-4-oxobutyl)-4,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanamido)pentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (PNT-DA2) (**16**)

化合物 **11** (73 mg, 0.052 mmol)の無水 DMF 溶液(500 μ L)に、HBTU (51 mg, 0.13 mmol)および DIPEA (35 μ L, 0.20 mmol)を加えた。混合物を樹脂に固定化した **15** (36 mg の樹脂, 0.047 mmol)に加え、室温にて終夜振盪した。DMF (1 mL)を 3 回および DCM (1 mL)を 3 回加えて樹脂を洗浄した後、樹脂を真空中で乾燥した。その後、TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5)の混合溶媒(1 mL)を添加し、室温にて 22 時間振盪した。得られた溶液についてアルゴンガスを用いて濃縮し、得られた残渣を逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. $\times$ 250 mm, 流量 4 mL/min]で精製して、化合物 **16** を収量 5.4 mg (6.1%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₆H₁₀₇IN₁₂O₂₅⁻, 1714.6515 [M]⁻; found, 1714.6539.

(((1*S*)-1-Carboxy-5-((2*S*)-2-((1*R*,4*S*)-4-((4-carboxy-4-(7-(1-carboxy-4-(((*S*)-1-carboxy-5-(4-(4-iodophenyl)butanamido)pentyl)carbamoyl)benzyl)amino)-4-oxobutyl)-4,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanamido)pentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (PNT-DA3) (**17**)

化合物 **12** (30 mg, 0.022 mmol)および化合物 **15** (40 mg の樹脂, 0.052 mmol)を用いて、化合物 **16** と同様の合成法により化合物 **17** を合成し、収量 1.5 mg (4.0%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₉H₁₀₉IN₁₂O₂₃²⁺, 860.3387 [M + 2H]²⁺; found, 860.3378.

(((1*S*)-1-Carboxy-5-((2*S*)-2-((1*R*,4*S*)-4-((4-carboxy-4-(7-(1-carboxy-4-(((*S*)-1-carboxy-5-(((*R*)-4-carboxy-2-(4-(4-iodophenyl)butanamido)butanamido)pentyl)amino)-4-oxobutyl)-4,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanamido)pentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (PNT-DA4) (**18**)

化合物 **13** (15 mg, 0.011 mmol)および化合物 **15** (11 mg の樹脂, 0.014 mmol)を用いて、化合物 **16** と同様の合成法により化合物 **18** を合成し、収量 1.5 mg (7.9%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₆H₁₀₉IN₁₂O₂₅²⁺, 858.3336 [M + 2H]²⁺; found, 858.3331.

(((1*S*)-1-Carboxy-5-((2*S*)-2-((1*R*,4*S*)-4-((4-carboxy-4-(7-(1-carboxy-4-(((*S*)-1-carboxy-5-(4-(4-iodophenyl)butanamido)methyl)benzamido)pentyl)amino)-4-oxobutyl)-4,10-bis(carboxymethyl)-

1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanamido)pentyl)carbamoyl)-L-glutamic acid (PNT-DA5) (19)

化合物 **14** (18 mg, 0.013 mmol)および化合物 **15** (11 mg の樹脂, 0.014 mmol)を用いて, 化合物 **16** と同様の合成法により化合物 **19** を合成し, 収量 5.0 mg (20%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{79}H_{109}In_{12}O_{23}^{2+}$, 860.3387 $[M + 2H]^{2+}$; found, 860.3391.

$[^{nat}In]$ In-PNT-DA2 (**20**)

化合物 **16** (5.0 mg, 2.9 μ mol)を $H_2O/MeCN/TFA$ (50/50/0.1)の混合溶媒(2 mL)に対して溶解した後, 塩化インジウム(III)無水和物(3.0 mg, 14 μ mol)を加えた. 反応液を室温にて 1 日間攪拌した後, 逆相 HPLC [$H_2O/MeCN/TFA$ = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. $\times$ 250 mm, 流量 4 mL/min]で精製して化合物 **20** を収量 3.8 mg (71%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{76}H_{106}InN_{12}O_{25}^{2+}$, 914.2738 $[M + 2H]^{2+}$; found, 914.2732.

$[^{nat}In]$ In-PNT-DA3 (**21**)

化合物 **17** (1.0 mg, 0.57 μ mol)および塩化インジウム(III)無水和物(2.4 mg, 11 μ mol)を用いて, 化合物 **20** と同様の合成法により化合物 **21** を合成し, 収量 0.60 mg (60%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{76}H_{106}InN_{12}O_{23}^{2+}$, 916.2789 $[M + 2H]^{2+}$; found, 916.2788.

$[^{nat}In]$ In-PNT-DA4 (**22**)

化合物 **18** (1.3 mg, 0.76 μ mol)および塩化インジウム(III)無水和物(3.2 mg, 15 μ mol)を用いて, 化合物 **20** と同様の合成法により化合物 **22** を合成し, 収量 0.80 mg (58%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{76}H_{106}InN_{12}O_{25}^{2+}$, 914.2738 $[M + 2H]^{2+}$; found, 914.2738.

$[^{nat}In]$ In-PNT-DA5 (**23**)

化合物 **19** (1.0 mg, 0.57 μ mol)を $H_2O/MeCN/TFA$ (50/50/0.1)の混合溶液(1 mL)に溶解させた後, 塩化インジウム(III)無水和物(3.0 mg, 14 μ mol)を加えた. 反応液を室温にて 15 時間攪拌した後, 逆相 HPLC [$H_2O/MeCN/TFA$ = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min]で精製して化合物 **23** を収量 0.70 mg (65%)で得た. MS (ESI) m/z calcd for $C_{76}H_{106}InN_{12}O_{23}^{2+}$, 916.3 $[M + 2H]^{2+}$; found, 916.4.

放射標識

$[^{111}In]InCl_3$ 溶液と PNT-DA2–5 の DMSO 溶液(終濃度 12 または 13 μ M)を MES 緩衝液(0.1 M, pH 5.6)中で混和し, 90°C にて 30 分間加熱した. 室温に戻した後, 反応液を逆相 HPLC [$H_2O/MeCN/TFA$ = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min]で精製した.

分配係数

1-オクタノール(1.5 mL)および PBS (pH 7.4, 1.3 mL)が入った遠沈管に各 ^{111}In 標識体の 10%エタノール含有 PBS 溶液(200 μL , 111 kBq)を加え, 2 分間激しく攪拌した後, 4,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した. 1-オクタノール層または PBS 層からそれぞれ 1 mL または 500 μL ずつ溶液を採取した後, それぞれの放射能を γ カウンターで測定し, 1-オクタノール/PBS における放射能の比から分配係数を求めた.

細胞培養

第 1 章と同様の方法により行った.

細胞結合飽和実験

[^{111}In]In-PNT-DA1 は, 第 1 章と同様の方法により調製した. LNCaP 細胞を 12 ウェルプレート(2×10^5 cells/well)に播種し, 37°C, 5%二酸化炭素環境下にて 48 時間静置した. 培地を除去した後, アッセイ用培地(500 μL)を加えて 4°C にて 30 分間静置した. 続いて, 異なる濃度の各 ^{111}In 標識体(1.8–4.4 MBq/nmol, 0.39–100 または 200 nM)を含むアッセイ用培地溶液(1 mL)を加え, 4°C にて 1 時間静置した. 非特異的結合については 100 μM の 2-PMPA を添加することで評価した. 以降の実験操作は, 第 1 章と同様の方法により行った.

動物

第 1 章と同様に, 購入・飼育した. 体内放射能分布実験で使用するモデルマウスは, RPMI 1640 と Matrigel を 1:1 で混合した溶液に, LNCaP 細胞(5×10^6 cells/mouse)を懸濁させ, イソフルラン(2%)麻酔下, BALB/c-*nu/nu* ノードマウス(雄, 5 週齢)の右脇腹に皮下移植することで作製した. SPECT/CT で使用するモデルマウスは, LNCaP 細胞(5×10^6 cells/mouse)を右脇腹に皮下移植した 3 週間後に, RPMI 1640 と Matrigel を 1:1 で混合した溶液に, PC-3 細胞(5×10^6 cells/mouse)を懸濁させ, イソフルラン(2%)麻酔下, 左脇腹に皮下移植することで作製した.

マウス血漿を用いたインビトロ安定性評価

第 1 章と同様の方法で得た ddY 系雄性マウス由来の血漿(200 または 250 μL)に, 各 ^{111}In 標識体(184–250 kBq)を加え, 37°C にて 24 時間インキュベートした($n = 3$). MeCN (350 μL)を加え混和した後, 10,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した. 上清を回収してコスモナイスフィルター S (0.45 μm , 4 mm)で濾過した後, 濾液を逆相 HPLC で分析した. 分析条件は放射標識と同一とした.

アルブミン結合性評価

[^{111}In]In-PSMA-617 は, 第 1 章と同様の方法により調製した. HSA に対する結合性の評価は, 既報

で用いられた限外濾過法を参考にして実施した.⁴² 各 ^{111}In 標識体の 10%エタノール含有生理食塩水溶液(5.3 MBq/nmol, 50 kBq, 15 μL)を HSA の PBS 溶液(0.3–3000 μM , 150 μL)と 37°C にて 30 分間インキュベートした. 混合溶液に 300 μL の PBS を添加した後, Merck Millipore 社製アミコンウルトラ 0.5 mL (公称分画分子量 30 kDa)を用いて, 溶液を 14000 $\times g$ で 30 分間遠心分離した. 遠心後に濾過フィルターを反転させ, 200 $\times g$ で 3 分間遠心分離した. 再遠心後に得られたアルブミン結合画分, 一度目の遠心で得られた濾液画分, および濾過フィルター画分の放射能をそれぞれ γ カウンターにより測定した. HSA に対する結合比率(%)は, $\{(\text{アルブミン結合画分})/(\text{アルブミン結合画分}+\text{濾液画分}+\text{濾過フィルター画分}) \times 100\}$ として計算した. HSA に対する結合比率を HSA とリガンドの濃度比に対してプロットし, GraphPad Prism (Version 6)を使用して非線形回帰曲線(Hill slope, 最大結合部位数を 100%に設定)を作成することで, 半値最大結合(B_{50})値を算出した. 各化合物のアルブミンに対する相対的な結合性(relative affinity)は, 各化合物の B_{50} 値と $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ の B_{50} 値との比の逆数で評価した.

LNCaP 腫瘍移植モデルマウスにおける体内放射能分布実験

各 ^{111}In 標識体(5.3 MBq/nmol, 115–152 kBq, 100 μL)の 10%エタノール含有生理食塩水溶液を 1 群 3 匹の LNCaP 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈より投与した. 投与 4, 24, および 96 時間後でマウスを屠殺し, 採血後, 目的の臓器および組織を摘出した. 各試料の重量を測定し, γ カウンターを用いて各臓器の放射能を測定した. 各化合物の血液, 腫瘍, および腎臓における AUC 値は, 減衰補正されていない生体内分布データに基づいて決定した.

SPECT/CT

$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA3}$ (1.8 MBq)の 10%エタノール含有生理食塩水溶液(150 μL)を LNCaP および PC-3 腫瘍両移植モデルマウスに尾静脈より投与した. 投与 96 時間後に TriFoil imaging 社製 Triumph combined PET/SPECT/CT systems を用いて, 既報の方法を参考に SPECT/CT 撮像を行った.⁴³ SPECT 画像はイソフルラン(2%)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: 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)による画像再解析を行った. 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

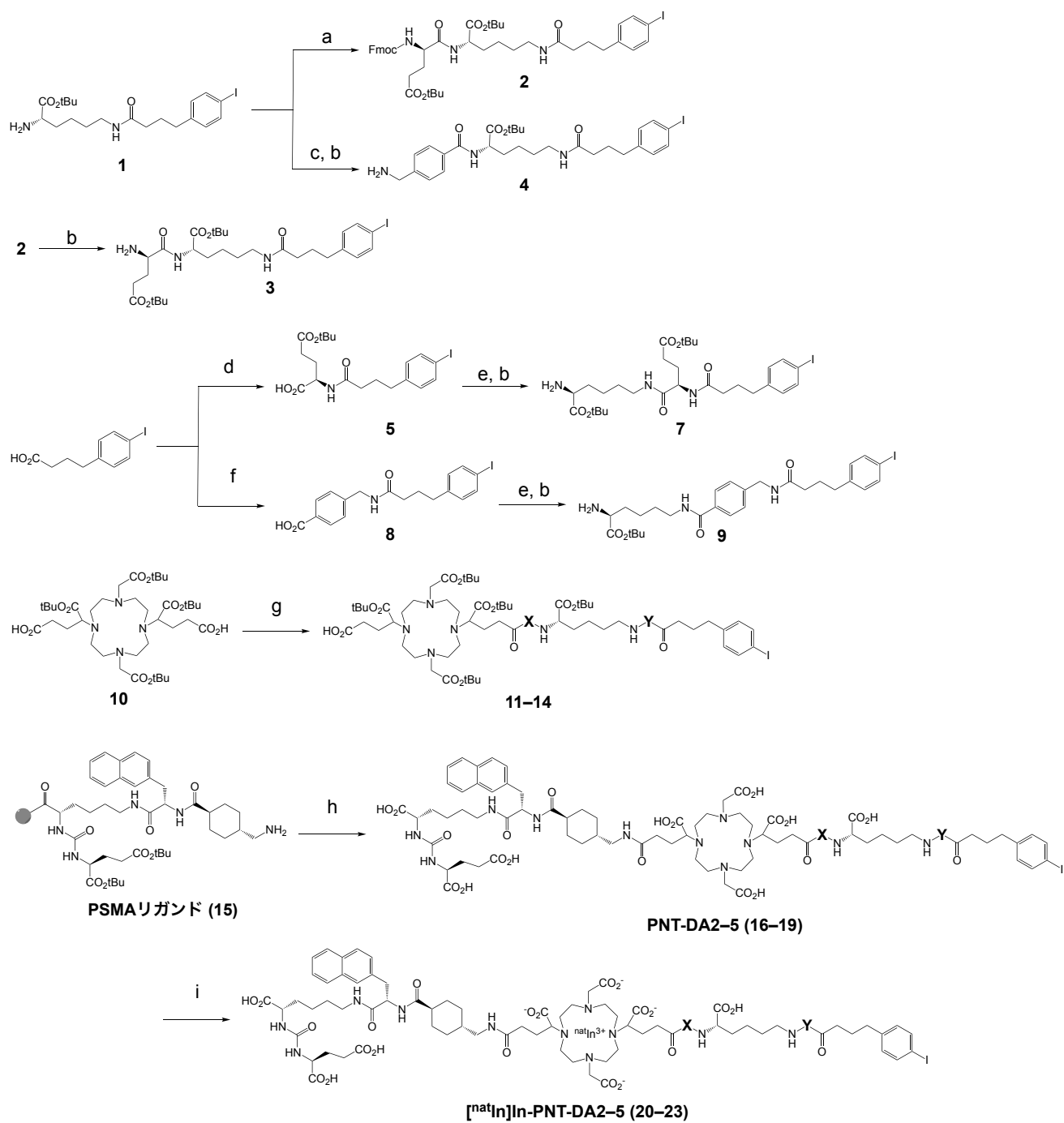
全てのデータは, GraphPad Prism (Version 6)または Microsoft Excel を用いて解析した. 一元配置分散分析およびテューキーの多重比較検定を組み合わせで有意差を評価し, $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした.

2.2. 結果および考察

標識前駆体および非放射性 In 標識体の合成

Scheme 2-1 に標識前駆体である PNT-DA2-5 の合成経路を示す. Lys-IPBA に対してアミノ酸リンカーを導入した化合物 **3, 4, 7, 9** は, *tert*-Butyl *N*⁶-(4-(4-iodophenyl)butanoyl)-L-lysinate²² または IPBA を出発原料として, α 位のアミノ基を Fmoc 基で保護したアミノ酸との縮合反応および脱保護反応を経て合成した. 各化合物について, 縮合反応に寄与しないカルボキシ基を *tert*-Butyl ester で保護した DOTADG (化合物 **10**)との縮合反応により化合物 **11-14** を合成し, それらを固相上で PSMA リガンド(化合物 **15**)に導入した. 次いで, TFA による脱樹脂および脱保護反応を経て, PNT-DA2-5 (化合物 **16-19**)を得た. さらに, ^{nat}InCl₃ を使用して, 対応する非放射性 In 標識体である [^{nat}In]In-PNT-DA2-5 (化合物 **20-23**)を合成した.

Scheme 2-1. Synthetic routes of PNT-DA2-5 and their nonradioactive In-labeled counterparts.



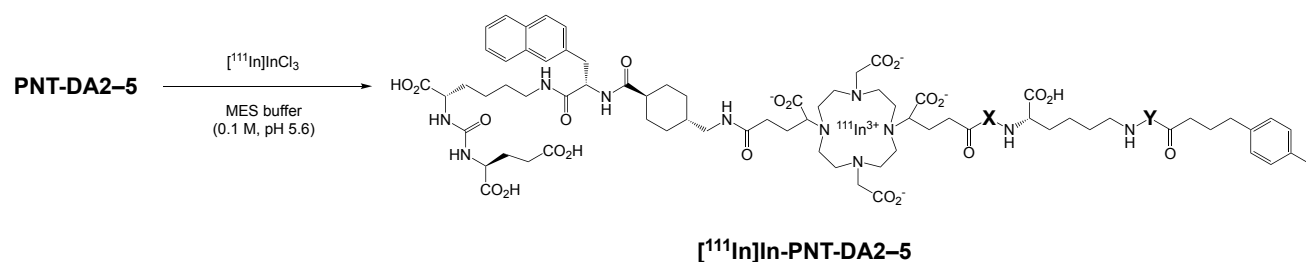
Compound	X	Y
11	D-Glu(OtBu)	-
12	AMBA	-
13	-	D-Glu(OtBu)
14	-	AMBA
PNT-DA2 (16)	D-Glu	-
PNT-DA3 (17)	AMBA	-
PNT-DA4 (18)	-	D-Glu
PNT-DA5 (19)	-	AMBA
[^{nat} In]In-PNT-DA2 (20)	D-Glu	-
[^{nat} In]In-PNT-DA3 (21)	AMBA	-
[^{nat} In]In-PNT-DA4 (22)	-	D-Glu
[^{nat} In]In-PNT-DA5 (23)	-	AMBA

Reactions and conditions: (a) Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH·H₂O, EDC·HCl, HOAt, Triethylamine, DMF; (b) Piperidine, DMF; (c) Fmoc-AMBA-OH, EDC·HCl, HOAt, TEA, DMF; (d) H-D-Glu(OtBu)-OH, CDI, 1 N NaOH a.q., THF; (e) **6**, COMU, DIPEA, DMF; (f) AMBA, CDI, 1 N NaOH a.q., THF; (g) **3** or **4** or **7** or **9**, COMU, DIPEA, DMF; (h) (1) **11–14**, HBTU, DIPEA, DMF; (2) TFA/TIPS/H₂O = 95/2.5/2.5; (i) InCl₃, H₂O/MeCN/TFA = 50/50/0.1.

放射標識

Scheme 2-2 に PNT-DA2–5 の ¹¹¹In 標識経路を示す。¹¹¹In 標識は、標識前駆体を MES 緩衝液中で [¹¹¹In]InCl₃ と加熱することにより実施した。逆相 HPLC を用いて精製を行い、[¹¹¹In]In-PNT-DA2–5 を放射化学的収率 26–58% および放射化学的純度 95% 以上で得た(**Figure 2-2**, **Table 2-1**).

Scheme 2-2. Radiosynthesis of [¹¹¹In]In-PNT-DA2–5.



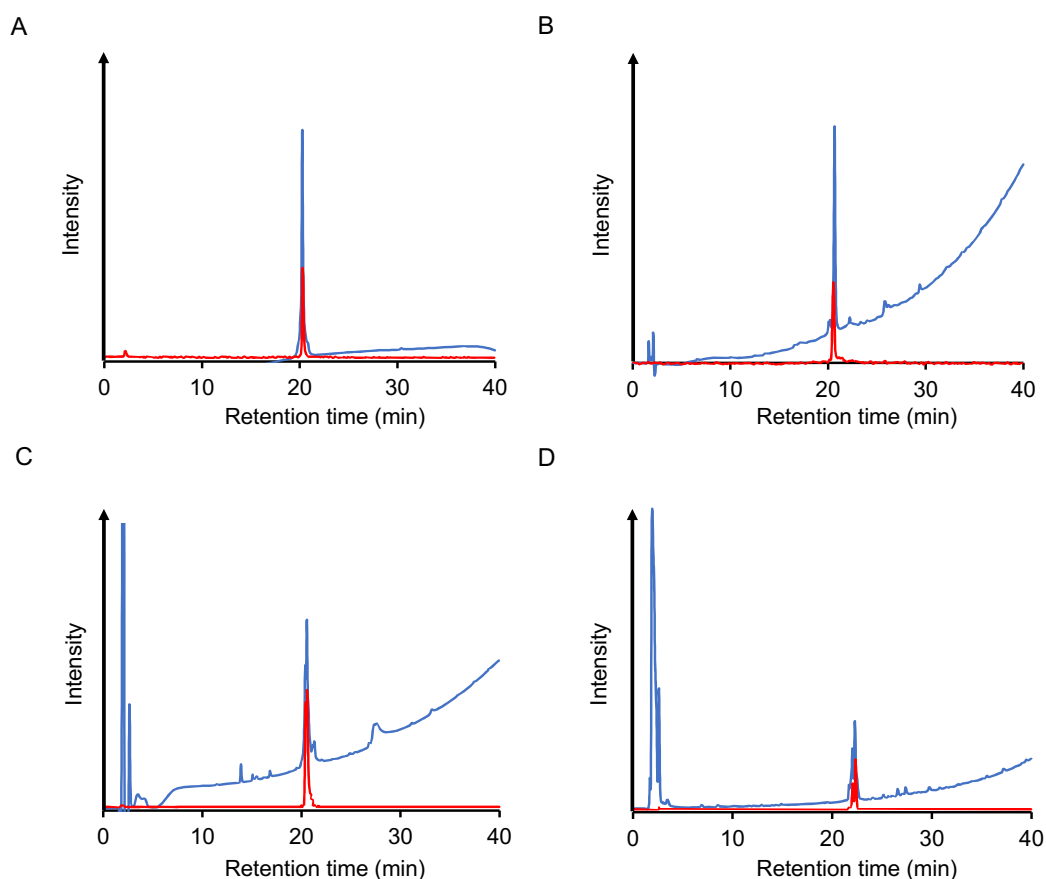


Figure 2-2. HPLC chromatograms of radioactivity (red) and UV absorption (blue) for a mixture of [$^{111}/^{nat}\text{In}$]In-PNT-DA2 (A), [$^{111}/^{nat}\text{In}$]In-PNT-DA3 (B), [$^{111}/^{nat}\text{In}$]In-PNT-DA4 (C), and [$^{111}/^{nat}\text{In}$]In-PNT-DA5 (D).

基礎的物性の評価

アミノ酸リンカーの導入が化合物の基礎的物性に与える影響について評価するため、モノリンカー体の $\text{Log } D_{7.4}$ 値の測定および血漿中における安定性を評価した。モノリンカー体の $\text{Log } D_{7.4}$ 値は -2.7 から -3.4 であり、アミノ酸リンカーの導入が化合物の脂溶性に影響を与えることが示された (**Table 2-1**)。また、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ と同様に,⁸ モノリンカー体はマウス血漿中において、 37°C で 24 時間経過後も 95%以上が未変化体として存在した(**Figure 2-3**)。これらの結果より、アミノ酸リンカーの導入は PSMA 標的放射性薬剤の安定性に影響を与えないことが示唆された。

Table 2-1. Radiochemical characteristics of [¹¹¹In]In-PNT-DA2-5.

Compound	RCY (%)	RCP (%)	Log <i>D</i> _{7.4} ^a
[¹¹¹ In]In-PNT-DA2	58	> 95	-3.2 ± 0.13
[¹¹¹ In]In-PNT-DA3	58	> 95	-3.1 ± 0.03
[¹¹¹ In]In-PNT-DA4	33	> 95	-3.4 ± 0.09
[¹¹¹ In]In-PNT-DA5	26	> 95	-2.7 ± 0.05

RCY: radiochemical yield, RCP: radiochemical purity. Log *D*_{7.4}: distribution coefficients. ^aData are expressed as the mean ± standard deviation for three individual experiments.

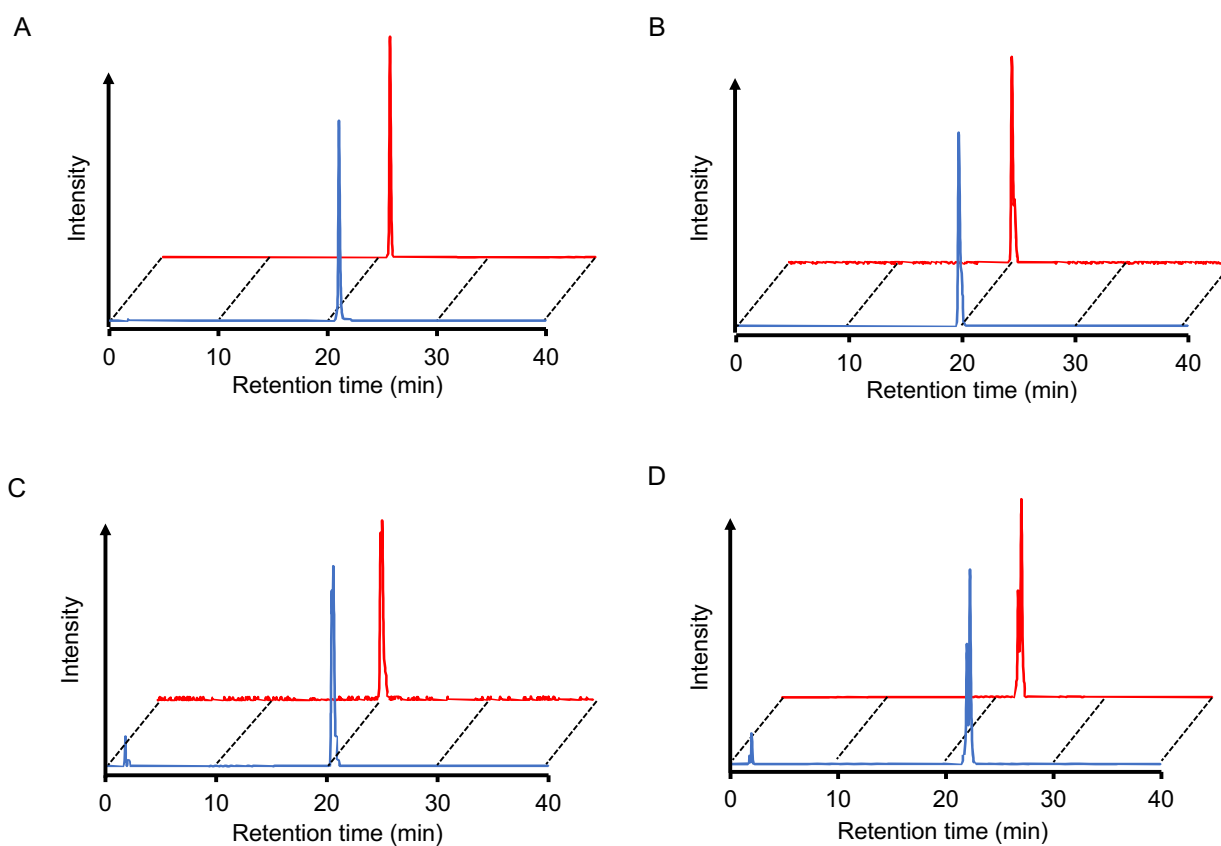


Figure 2-3. Radiochromatograms of [¹¹¹In]In-PNT-DA2 (A), [¹¹¹In]In-PNT-DA3 (B), [¹¹¹In]In-PNT-DA4 (C), and [¹¹¹In]In-PNT-DA5 (D) before (blue) or after (red) incubation in mouse plasma for 24 h.

細胞結合飽和実験

アミノ酸リンカーの導入が PSMA に対する結合性に与える影響を評価するため、LNCaP 細胞を用いた細胞結合飽和実験を実施した(**Figure 2-4**, **Table 2-2**). モノリンカー体の LNCaP 細胞に対する *K*_d

値は 12.7–42.2 nM と算出された。これらの値には ^{111}In]In-PNT-DA1 の K_d 値(8.4 nM)と比較して有意差は認められなかった。以上の結果から、アミノ酸リンカーの導入は、PSMA に対する結合性に大きな影響を与えないことが示唆された。モノリンカー体は、 ^{111}In]In-PNT-DA1 と同様に DOTADG を介して PSMA リガンドと ALB を対角に導入し、それぞれが効率的に機能を発揮する構造を有している。^{8, 22} そのため、ALB である Lys-IPBA の近傍にアミノ酸リンカーを導入しても、PSMA とそのリガンドとの相互作用に大きな影響を与えなかったと考えられる。

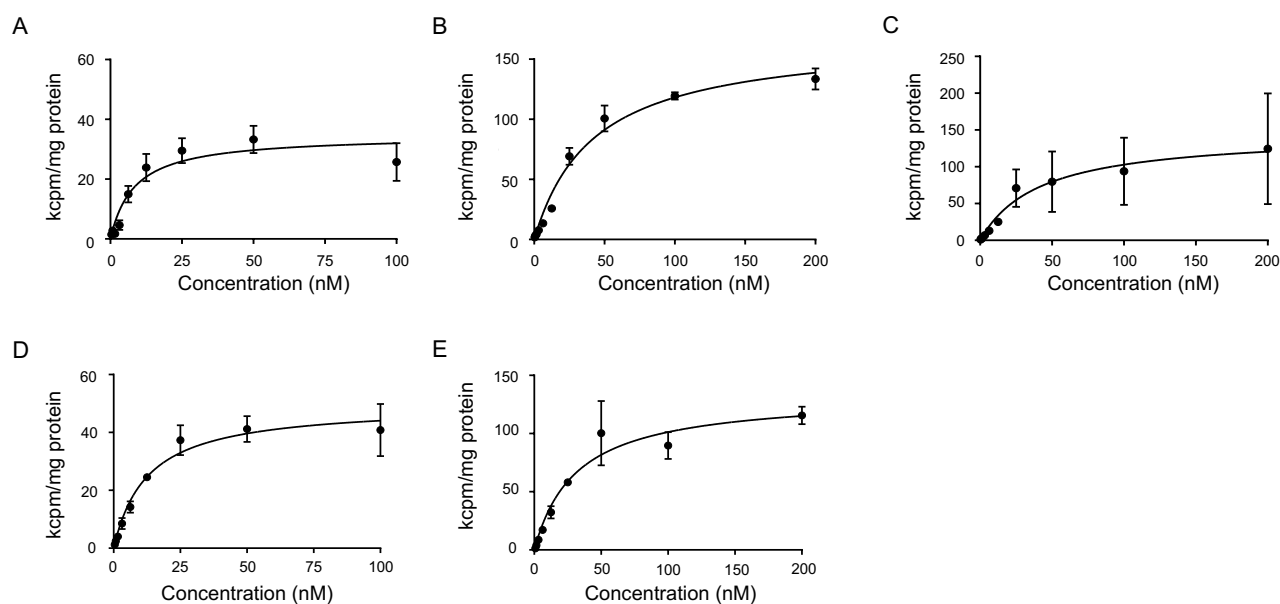


Figure 2-4. The specific binding of ^{111}In]In-PNT-DA1 (A), ^{111}In]In-PNT-DA2 (B), ^{111}In]In-PNT-DA3 (C), ^{111}In]In-PNT-DA4 (D), and ^{111}In]In-PNT-DA5 (E) to LNCaP cells in the cell saturation binding assay.

Table 2-2. PSMA affinity of ^{111}In]In-PNT-DA1–5.

Compound	K_d (nM) ^a
^{111}In]In-PNT-DA1	8.4 ± 2.2
^{111}In]In-PNT-DA2	42.2 ± 5.0
^{111}In]In-PNT-DA3	41.5 ± 20
^{111}In]In-PNT-DA4	12.7 ± 2.2
^{111}In]In-PNT-DA5	15.8 ± 3.3

^aData are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments.

アルブミン結合性評価

アミノ酸リンカーの導入がアルブミン結合性に与える影響を評価するため、HSA を用いたアルブ

ミン結合実験を行った。[¹¹¹In]In-PNT-DA1-5 および[¹¹¹In]In-PSMA-617 のアルブミン結合画分は、HSA 濃度の上昇に伴い増加した(**Figure 2-5**)。化合物のアルブミン結合性を比較するため、[¹¹¹In]In-PNT-DA1 の結合性を 1.0 として設定した relative affinity を算出した(**Table 2-3**)。ALB を有する[¹¹¹In]In-PNT-DA1-5 は、[¹¹¹In]In-PSMA-617 (0.03) と比較して高い relative affinity を示し(0.14–1.9)、ALB の導入により PSMA 標的放射性薬剤のアルブミン結合性が向上することが示された。X 位に D-Glu を有する[¹¹¹In]In-PNT-DA2 の relative affinity は 1.1 であり、[¹¹¹In]In-PNT-DA1 と同等であった。一方、Y 位に D-Glu を有する[¹¹¹In]In-PNT-DA4 の relative affinity は、[¹¹¹In]In-PNT-DA1 と比較して大きく低下した(0.14)。AMBA を導入した[¹¹¹In]In-PNT-DA3 および[¹¹¹In]In-PNT-DA5 の relative affinity は、それぞれ 1.4 および 1.9 と[¹¹¹In]In-PNT-DA1 よりも高く、Y 位に AMBA を導入した[¹¹¹In]In-PNT-DA5 は、評価化合物の中で最も高いアルブミン結合性を示した。これらの結果より、アミノ酸リンカーの導入によってアルブミン結合性は変化し、特に Y 位にアミノ酸リンカーを導入することで、その結合性が大きく変化することが示唆された。IPBA はアルブミンの薬物結合部位の 1 つである site II に結合することが知られており、^{44,45} IPBA を分子中に有するモノリンカー体についても site II に結合していると考えられる。Site II に対する結合性には、結合する化合物の構造変化が大きな影響を与えることが知られており、⁴⁶ アミノ酸リンカーの導入による構造変化が、モノリンカー体のアルブミン結合性に影響を及ぼした可能性が考えられる。

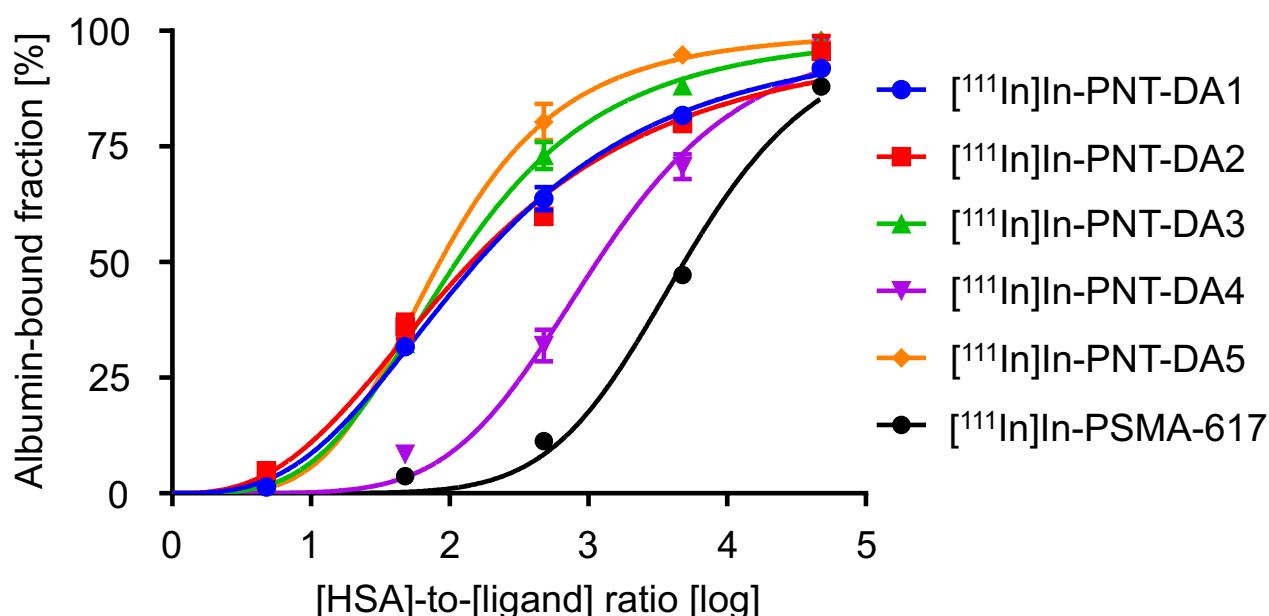


Figure 2-5. Albumin-binding curves of [¹¹¹In]In-PNT-DA1-5 and [¹¹¹In]In-PSMA-617 using HSA. Data are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments.

Table 2-3. Relative affinity of [^{111}In]In-PNT-DA1–5 and [^{111}In]In-PSMA-617 for HSA.

Compound	Relative affinity for HSA ^a
[^{111}In]In-PNT-DA1	1.0
[^{111}In]In-PNT-DA2	1.1
[^{111}In]In-PNT-DA3	1.4
[^{111}In]In-PNT-DA4	0.14
[^{111}In]In-PNT-DA5	1.9
[^{111}In]In-PSMA-617	0.03

^aThe affinity of [^{111}In]In-PNT-DA1 was set to 1.0 as a reference.

LNCaP 腫瘍移植モデルマウスにおける体内放射能分布実験

アミノ酸リンカーの導入が PSMA 標的放射性薬剤の体内動態に与える影響について評価するため、LNCaP 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(**Figure 2-6, Tables 2-4–2-9**). 投与 4 時間後において、[^{111}In]In-PNT-DA3 を除く全ての化合物で、血中放射エネルギーの順序がインビトロで評価したアルブミンに対する *relative affinity* の順序と合致した。また、血液中の AUC 値も投与 4 時間後の血中放射エネルギーの順序を反映した。これらの結果より、アミノ酸リンカーの導入によって、モノリンカー体のアルブミン結合性が変化し、それが血中滞留性に影響を与えることが示唆された。[^{111}In]In-PNT-DA3 は、インビトロにおいて [^{111}In]In-PNT-DA1 よりも高い *relative affinity* を示した一方、投与 4 時間後の血中放射エネルギーは [^{111}In]In-PNT-DA1 よりも低かった(それぞれ 6.7 および 15.5% ID/g)。ここで、[^{111}In]In-PNT-DA3 の血中放射エネルギーは、投与 24 および 96 時間後にはそれぞれ 6.9 および 4.3% ID/g となった。これらの結果は、[^{111}In]In-PNT-DA3 が血中滞留性を有し、血中半減期を延長するという ALB の機能を有していることを示している。

[^{111}In]In-PNT-DA4 以外のモノリンカー体は、投与 4 時間後と比較して 24 および 96 時間後における腫瘍集積が増加し、この傾向は [^{111}In]In-PNT-DA1 の腫瘍集積の増加と一致した。投与 4 時間後における [^{111}In]In-PNT-DA4 の腫瘍集積(17.5% ID/g)は、[^{111}In]In-PNT-DA1 (20.3% ID/g)と同等であったが、徐々に減少し投与 24 および 96 時間後にはそれぞれ 17.5 および 12.1% ID/g となった。その結果、腫瘍における [^{111}In]In-PNT-DA4 の AUC 値(991% ID/g·h)は、[^{111}In]In-PNT-DA1 (3596% ID/g·h)と比較して大きく低下した。[^{111}In]In-PNT-DA4 以外のモノリンカー体の腫瘍における AUC 値は [^{111}In]In-PNT-DA1 の AUC 値と同等であり、D-Glu または AMBA の導入は、PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積の増加に大きな影響を与えないことが示された。[^{111}In]In-PNT-DA4 の腫瘍における AUC 値が [^{111}In]In-PNT-DA1 と比較して低下した要因として、血液中における [^{111}In]In-PNT-DA4 の AUC 値が [^{111}In]In-PNT-DA1 よりも顕著に低く、血液からの迅速なクリアランスにより、腫瘍への放射能送達が妨げられた可能性が考えられる。

正常組織のうち、各化合物は腎臓に最も顕著に集積した。 [^{111}In]In-PNT-DA2 および [^{111}In]In-PNT-DA5 は、投与 24 時間後において腎臓集積が最大値を示し、それぞれ 69.9 および 34.6% ID/g であり、これは [^{111}In]In-PNT-DA1 の腎臓集積の推移と一致した。腎臓における AUC 値は、 [^{111}In]In-PNT-DA2 が 3374% ID/g·h であり、 [^{111}In]In-PNT-DA1 (2377% ID/g·h) の 1.4 倍を示した。対照的に、 [^{111}In]In-PNT-DA5 の腎臓 AUC 値は 1650% ID/g·h であり、 [^{111}In]In-PNT-DA1 の 0.69 倍であった。 [^{111}In]In-PNT-DA4 は、全てのタイムポイントにおいて最も高い腎臓集積を示し、腎臓 AUC 値も 5419% ID/g·h と、評価化合物中で最大であった。これに対し、 [^{111}In]In-PNT-DA3 は、全てのタイムポイントで最も低い腎臓集積および AUC 値(649% ID/g·h)を示した。これらの結果は、D-Glu の導入によりモノリンカー体の腎臓集積が増加する一方で、AMBA の導入は腎臓集積を低下させることを示唆している。腎臓 AUC 値は、血液 AUC 値と逆相関する傾向が認められ、これは ALB によるアルブミンとの相互作用により化合物の糸球体濾過が抑制されたためと考えられる。^{4, 47} 以上より、アミノ酸リンカーの導入によりモノリンカー体のアルブミン結合性が変化し、それに伴って腎臓集積も変化することが示された。

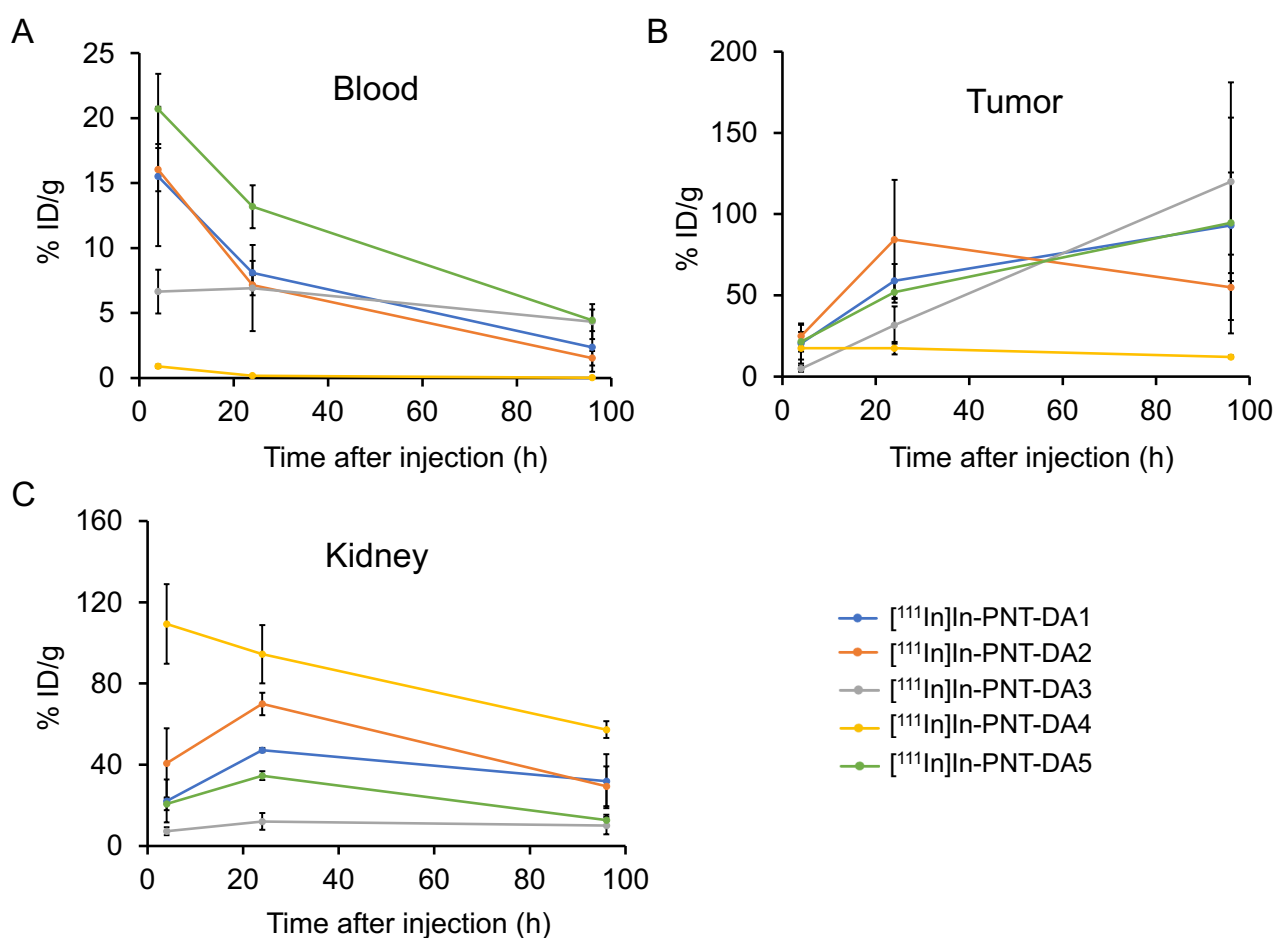


Figure 2-6. Comparison of radioactivity in the blood (A), LNCaP tumor (B), and kidney (C) at 4, 24, and 96 h postinjection of [^{111}In]In-PNT-DA1–5 into LNCaP tumor-bearing mice.

Table 2-4. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DA1 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	96
Blood	15.5 $\pm$ 5.4	8.1 $\pm$ 0.92	2.4 $\pm$ 1.9
Spleen	8.1 $\pm$ 5.7	9.4 $\pm$ 3.5	4.3 $\pm$ 1.1
Pancreas	1.9 $\pm$ 0.62	1.8 $\pm$ 0.23	1.1 $\pm$ 0.56
Stomach ^a	0.67 $\pm$ 0.52	0.33 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.03
Intestine	0.98 $\pm$ 0.23	0.89 $\pm$ 0.29	0.46 $\pm$ 0.13
Kidney	22.1 $\pm$ 10.6	47.2 $\pm$ 1.1	31.8 $\pm$ 13.3
Liver	3.0 $\pm$ 0.84	2.6 $\pm$ 0.65	1.7 $\pm$ 0.66
Heart	3.2 $\pm$ 0.79	2.5 $\pm$ 0.27	1.5 $\pm$ 0.38
Lung	6.6 $\pm$ 1.4	6.5 $\pm$ 1.6	4.0 $\pm$ 0.50
Brain	0.29 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.10
Tumor	20.3 $\pm$ 12.3	58.9 $\pm$ 10.5	93.0 $\pm$ 66.4
Muscle	0.98 $\pm$ 0.31	1.4 $\pm$ 1.0	0.65 $\pm$ 0.14

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation for three mice. ^aData are expressed as % ID. Data were reproduced from Chapter 1.

Table 2-5. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DA2 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	96
Blood	16.0 ± 1.7	8.5 ± 2.2	1.5 ± 0.56
Spleen	25.0 ± 7.6	20.0 ± 1.0	4.3 ± 1.8
Pancreas	2.4 ± 0.90	1.9 ± 0.36	0.45 ± 0.13
Stomach ^a	0.39 ± 0.06	0.34 ± 0.08	0.17 ± 0.10
Intestine	0.86 ± 0.22	1.2 ± 0.34	0.42 ± 0.16
Kidney	40.7 ± 17.2	69.9 ± 5.6	29.3 ± 9.8
Liver	2.5 ± 0.69	2.5 ± 0.48	1.0 ± 0.25
Heart	3.7 ± 1.8	2.2 ± 0.22	0.73 ± 0.23
Lung	8.0 ± 1.5	6.5 ± 2.1	1.4 ± 0.32
Brain	0.25 ± 0.09	0.21 ± 0.04	0.07 ± 0.03
Tumor	25.0 ± 6.9	84.3 ± 36.7	54.9 ± 20.1
Muscle	1.6 ± 0.50	2.2 ± 0.89	0.50 ± 0.16

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation for three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 2-6. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DA3 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	96
Blood	6.7 ± 1.7	6.9 ± 3.3	4.3 ± 1.3
Spleen	3.4 ± 0.82	3.9 ± 1.5	3.5 ± 1.9
Pancreas	0.68 ± 0.10	0.81 ± 0.25	0.75 ± 0.33
Stomach ^a	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.08	0.19 ± 0.13
Intestine	0.50 ± 0.16	0.76 ± 0.42	0.67 ± 0.31
Kidney	7.2 ± 2.0	12.1 ± 4.2	10.0 ± 4.3
Liver	1.0 ± 0.39	2.2 ± 0.95	2.3 ± 0.67
Heart	0.89 ± 0.24	1.7 ± 0.79	1.4 ± 0.67
Lung	2.3 ± 1.0	3.4 ± 1.7	3.0 ± 1.4
Brain	0.11 ± 0.07	0.16 ± 0.07	0.16 ± 0.10
Tumor	4.9 ± 2.0	31.7 ± 11.4	120 ± 61
Muscle	0.38 ± 0.14	0.59 ± 0.28	0.49 ± 0.33

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation for three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 2-7. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DA4 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	96
Blood	0.90 ± 0.16	0.17 ± 0.04	0.03 ± 0.01
Spleen	33.6 ± 3.1	15.7 ± 2.6	4.1 ± 1.4
Pancreas	1.2 ± 0.40	0.64 ± 0.49	0.24 ± 0.24
Stomach ^a	0.16 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Intestine	0.39 ± 0.03	0.15 ± 0.04	0.08 ± 0.04
Kidney	109 ± 20	94.4 ± 14.3	57.3 ± 4.1
Liver	0.61 ± 0.15	0.30 ± 0.05	0.24 ± 0.04
Heart	0.57 ± 0.29	0.30 ± 0.07	0.13 ± 0.12
Lung	2.5 ± 0.77	0.86 ± 0.26	0.45 ± 0.08
Brain	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Tumor	17.5 ± 7.1	17.5 ± 3.9	12.1 ± 0.78
Muscle	0.34 ± 0.13	0.36 ± 0.33	0.18 ± 0.18

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation for three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 2-8. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DA5 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	96
Blood	20.7 ± 2.7	13.2 ± 1.7	4.4 ± 0.84
Spleen	13.3 ± 3.6	14.0 ± 4.6	8.5 ± 4.8
Pancreas	4.1 ± 0.73	2.8 ± 0.78	3.2 ± 0.95
Stomach ^a	0.36 ± 0.04	0.34 ± 0.08	0.33 ± 0.04
Intestine	1.7 ± 0.27	1.5 ± 0.34	1.2 ± 0.64
Kidney	20.7 ± 3.2	34.6 ± 2.2	12.6 ± 2.8
Liver	5.9 ± 0.55	4.8 ± 2.5	4.9 ± 1.3
Heart	6.5 ± 0.88	4.1 ± 0.81	2.2 ± 0.83
Lung	10.4 ± 0.84	7.7 ± 1.5	4.9 ± 1.4
Brain	0.55 ± 0.13	0.44 ± 0.31	0.49 ± 0.34
Tumor	21.4 ± 6.0	52.0 ± 6.5	94.6 ± 30.9
Muscle	1.6 ± 0.61	1.6 ± 0.26	0.78 ± 0.29

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation for three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 2-9. AUC values (% ID/g·h) of [¹¹¹In]In-PNT-DA1–5 based on non-decay-corrected biodistribution data.

Compound	AUC value (% ID/g·h)		
	Blood	Tumor	Kidney
[¹¹¹ In]In-PNT-DA1	701	3596	2377
[¹¹¹ In]In-PNT-DA2	709	4053	3374
[¹¹¹ In]In-PNT-DA3	583	2802	649
[¹¹¹ In]In-PNT-DA4	217	991	5419
[¹¹¹ In]In-PNT-DA5	972	3383	1650

化合物の体内動態を比較するため、PSMA 標的放射性薬剤の体内動態評価の指標として用いられる腫瘍/血液比および腫瘍/腎臓比を、^{29, 48-50} AUC 値に基づいて算出した(**Table 2-10**)。腫瘍/血液比の順序は、血液 AUC 値の順序に反比例する傾向が認められ、血中滞留性が高まることで腫瘍/血液比が低下する可能性が示唆された。最も低い血液 AUC 値を示した[¹¹¹In]In-PNT-DA4 は、[¹¹¹In]In-PNT-DA1 と比較し低い腫瘍/血液比を示し(それぞれ 4.6 および 5.1)、これは[¹¹¹In]In-PNT-DA4 が腫瘍において低い滞留性を示したためと考えられる。腫瘍/腎臓比については、[¹¹¹In]In-PNT-DA3 および [¹¹¹In]In-PNT-DA5 がそれぞれ 4.3 および 2.1 と、[¹¹¹In]In-PNT-DA1 (1.5)と比較して高い値を示した。一方、[¹¹¹In]In-PNT-DA2 および[¹¹¹In]In-PNT-DA4 は、それぞれ 1.2 および 0.18 と、[¹¹¹In]In-PNT-DA1 よりも低い腫瘍/腎臓比を示した。これらの結果は、アミノ酸リンカーの導入により PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍/腎臓比が変化し、特に AMBA の導入によって腫瘍/腎臓比が向上することを示唆している。[¹¹¹In]In-PNT-DA3 は[¹¹¹In]In-PNT-DA5 よりも高い腫瘍/腎臓比を示したが、[¹¹¹In]In-PNT-DA5 は[¹¹¹In]In-PNT-DA3 と比較して高いアルブミン結合性を示し(**Table 2-3**)、腫瘍/腎臓比の変化とアルブミン結合性の間には相関関係が認められなかった。その原因として、[¹¹¹In]In-PNT-DA5 の腫瘍以外の非標的組織において、全てのタイムポイントで[¹¹¹In]In-PNT-DA3 よりも高い集積を示したことが挙げられる(**Tables 2-6 and 2-8**)。[¹¹¹In]In-PNT-DA5 は、[¹¹¹In]In-PNT-DA3 と比較して高い脂溶性を有することが、Log *D*_{7.4} 値の違いより明らかとなっている(**Table 2-1**)。このことから、[¹¹¹In]In-PNT-DA5 は高い脂溶性により非標的組織に対する非特異的集積が増加した結果、腫瘍への放射能送達量が減少した可能性が考えられる。

Table 2-10. AUC value ratios of [^{111}In]In-PNT-DA1–5 based on non-decay-corrected biodistribution data.

Compound	AUC value ratios	
	Tumor/blood	Tumor/kidney
[^{111}In]In-PNT-DA1	5.1	1.5
[^{111}In]In-PNT-DA2	5.7	1.2
[^{111}In]In-PNT-DA3	4.8	4.3
[^{111}In]In-PNT-DA4	4.6	0.18
[^{111}In]In-PNT-DA5	3.5	2.1

SPECT/CT

最も高い腫瘍/腎臓比を示した[^{111}In]In-PNT-DA3について、LNCaP 腫瘍およびPSMA 低発現腫瘍であるPC-3 腫瘍を両移植したモデルマウスを用いて SPECT/CT 撮像を実施し、インビボにおける有用性を評価した(**Figure 2-7**). その結果、[^{111}In]In-PNT-DA3 は投与 96 時間後に LNCaP 腫瘍を明瞭に描出した一方、PC-3 腫瘍や腎臓などの他の組織において顕著な集積は認められなかった. この結果は、[^{111}In]In-PNT-DA3 が PSMA 高発現腫瘍を明瞭に描出可能であることを示しており、本化合物のインビボにおける有用性が示された.

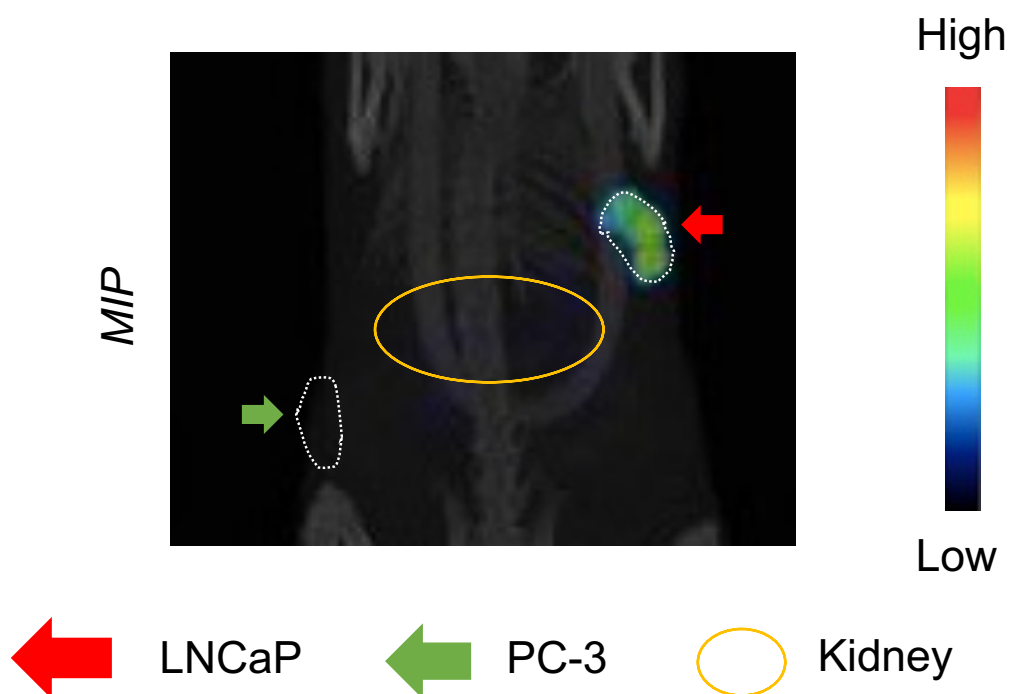


Figure 2-7. Maximum intensity projection (MIP) SPECT/CT image of an LNCaP and PC-3 tumor-bearing mouse obtained at 96 h postinjection using [^{111}In]In-PNT-DA3. Red arrow: the LNCaP tumor; green arrow: the PC-3 tumor; orange circle: the kidney.

2.3. 小括

本章では、アミノ酸リンカーの導入が ALB を有する PSMA 標的放射性薬剤 ^{111}In -PNT-DA1 の体内動態に与える影響を検証することを目的として、 ^{111}In -PNT-DA1 に対して D-Glu または AMBA を導入したモノリンカー体(^{111}In -PNT-DA2-5)を設計・合成した。インビトロおよびインビボ評価を通じて、以下の知見が得られた。

- (1) アミノ酸リンカーの導入は、PSMA 標的放射性薬剤の安定性および PSMA に対する結合性に大きな影響を与えなかった。
- (2) アルブミン結合実験において、導入するアミノ酸リンカーの性質やその導入位置によってモノリンカー体のアルブミンに対する結合性が変化した。
- (3) 体内放射能分布実験において、モノリンカー体の腫瘍/腎臓比は大きく変化した。

以上の結果より、アミノ酸リンカーを 1 つ導入することで、 ^{111}In -PNT-DA1 の体内動態を制御可能であることが示された。

第 3 章

新規リンカー技術を用いた 前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤の開発とその応用

背景 I

第 2 章では, $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ に D-Glu または AMBA を導入したモノリンカー体の評価を通じ, アミノ酸リンカーを 1 つ導入することで体内動態を制御可能であることを明らかにした. 一方で, 腫瘍 AUC 値は $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ と比較して同等または低い値を示し, 腫瘍集積性の向上に向けて, より高度な体内動態制御の必要性が示された. これまで, 2 種類のアミノ酸リンカーの導入が PSMA 標的放射性薬剤の体内動態に与える影響については明らかにされておらず, 複数のアミノ酸リンカーを導入するという戦略が, $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ の体内動態制御に新たな可能性をもたらすと考えられる.

本章では, $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ に D-Glu および AMBA の 2 種類のアミノ酸リンカーを導入した $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ を設計した(**Figure 3-1**). 第 2 章と同様に, DOTADG と Lys 残基の間を X 位, Lys 残基と IPBA の間を Y 位として設定し, $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ は X 位に D-Glu, Y 位に AMBA を導入した構造を有する. $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ は X 位に AMBA, Y 位に D-Glu を導入しており, $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ とは逆の配置を有する化合物である. これら 2 種類のアミノ酸をリンカーとして導入した化合物について, PSMA 標的放射性薬剤としての有用性を評価した.

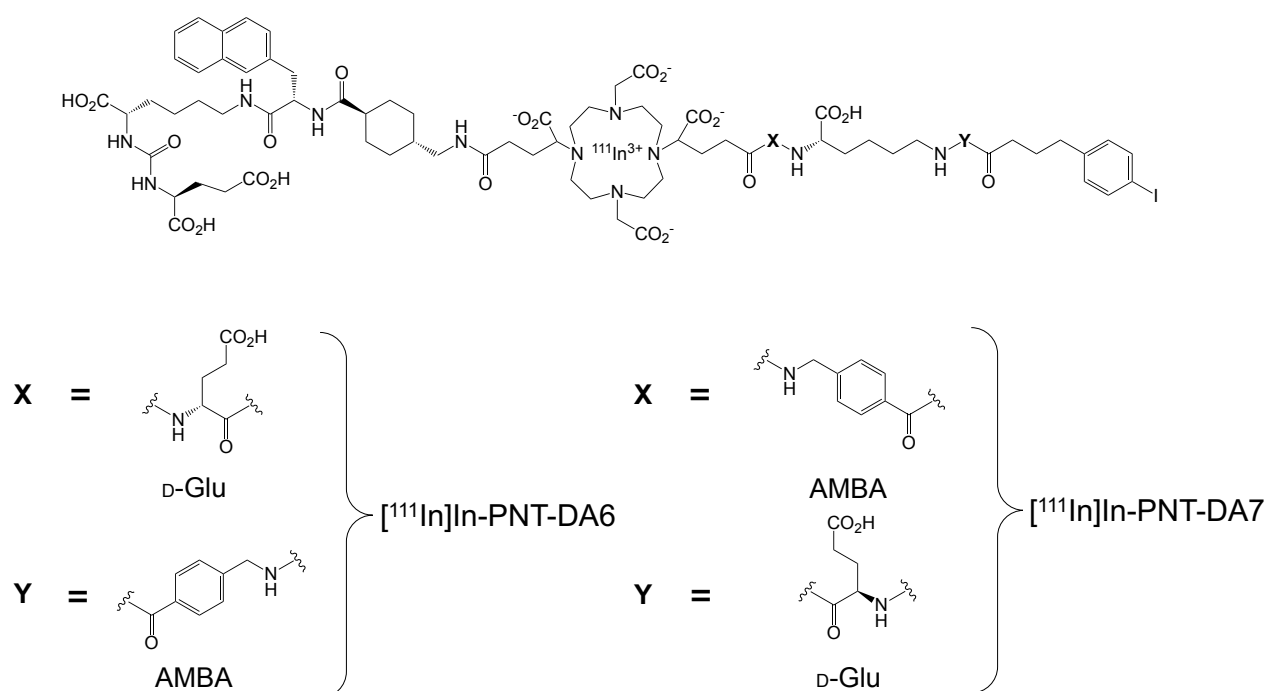


Figure 3-1. Chemical structures of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ and $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$.

3.1. 実験方法 I

試薬・機器

第 1 章および第 2 章と同じ試薬・機器を使用した.

合成

tert-Butyl *N*⁶-(4-((4-(4-iodophenyl)butanamido)methyl)benzoyl)-L-lysinate (1)

化合物 **1** は, 第 2 章と同様の方法により合成した.

tert-Butyl *N*⁶-((*R*)-5-(*tert*-butoxy)-2-(4-(4-iodophenyl)butanamido)-5-oxopentanoyl)-L-lysinate (2)

化合物 **2** は, 第 2 章と同様の方法により合成した.

tert-Butyl *N*²-((*R*)-2-amino-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoyl)-*N*⁶-(4-((4-(4-iodophenyl)butanamido)methyl)benzoyl)-L-lysinate (3)

(*R*)-2-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid monohydrate (66 mg, 0.15 mmol)の無水 DMF 溶液(540 μ L)に, EDC·HCl (38 mg, 0.20 mmol)および HOAt (27 mg, 0.20 mmol)を 0°C で加え, 反応液を 0°C で 15 分間攪拌した. 次いで, 化合物 **1** (60 mg, 0.42 mmol)の無水 DMF 溶液(700 μ L)およびトリエチルアミン(27 μ L, 0.20 mmol)を 0°C で加えた. 室温にて 19 時間攪拌した後, 反応液に酢酸エチル(20 mL)を加え, 飽和食塩水(20 mL)で 2 回洗浄した. 有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し, 得られた残渣を無水 DMF (2.4 mL)およびピペリジン(600 μ L)の混合溶液に溶解した. 室温にて 3 時間攪拌した後, 反応液に超純水(20 mL)を加え, 酢酸エチル(20 mL)で 2 回抽出を行った. 有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し, 得られた残渣をクロロホルム/メタノール(95/5)を抽出溶媒とするアミノシリカゲルクロマトグラフィーで精製して, 化合物 **3** を収量 35 mg (44%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.41 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.38 (s, 2H), 2.57 (dd, *J* = 9.2, 5.6 Hz, 2H), 2.26–2.19 (m, 4H), 1.93 (dd, *J* = 8.0, 7.6 Hz, 4H), 1.68–1.36 (m, 31H). MS (ESI) *m/z* calcd for C₃₇H₅₄IN₄O₇⁺, 793.3 [M + H]⁺; found, 793.3.

tert-Butyl *N*²-(4-(aminomethyl)benzoyl)-*N*⁶-((*R*)-5-(*tert*-butoxy)-2-(4-(4-iodophenyl)butanamido)-5-oxopentanoyl)-L-lysinate (4)

4-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)methyl)benzoic acid (373 mg, 1.0 mmol)の無水 DMF 溶液(3 mL)に, COMU (428 mg, 1.0 mmol)および DIPEA (215 μ L, 1.2 mmol)を 0°C で加え, 反応液を 0°C で 15 分間攪拌した. 次いで, 化合物 **2** (439 mg, 0.67 mmol)の無水 DMF 溶液(1.1 mL)を 0°C で加えた. 室温にて 12 時間攪拌した後, 反応液に超純水(40 mL)を加え, 酢酸エチル(40 mL)で 3 回抽出を行った. 有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し, 得られた残渣を無水 DMF (8 mL)およびピ

ペリジン(2 mL)の混合溶液に溶解した。室温にて 3 時間攪拌した後、反応液に超純水(100 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 100 mL)で 2 回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣をクロロホルム/メタノール(96/4)を抽出溶媒とするアミノシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、化合物 **4** を収量 358 mg (45%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 5.2 Hz, 4H), 6.79 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.53–4.51 (m, 1H), 4.32 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.09 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.42 (dd, J = 8.0, 7.2 Hz, 2H), 2.20–2.02 (m, 4H), 1.90–1.67 (m, 9H), 1.46–1.42 (m, 4H), 1.37 (s, 9H), 1.31 (s, 9H). MS (ESI) m/z calcd for C₃₇H₅₄IN₄O₇⁺, 793.3 [M + H]⁺; found, 793.1.

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、第 1 章と同様の方法により合成した。

4-(4,10-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-((7*S*,10*R*)-10-(3-(*tert*-butoxy)-3-oxopropyl)-7-(*tert*-butoxycarbonyl)-1-(4-((4-(4-iodophenyl)butanamido)methyl)phenyl)-18,18-dimethyl-1,9,12,16-tetraoxo-17-oxa-2,8,11-triazanonadecan-15-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxopentanoic acid (**6**)

化合物 **5** (88 mg, 0.11 mmol)の無水 DMF 溶液(380 μ L)に、COMU (49 mg, 0.11 mmol)および DIPEA (20 μ L, 0.11 mmol)を 0°C で加え、反応液を 0°C で 15 分間攪拌した。次いで、化合物 **3** (45 mg, 0.057 mmol)の無水 DMF 溶液(190 μ L)を加えた。室温にて終夜攪拌した後、逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 70/30/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (20 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. $\times$ 250 mm, 流量 4 mL/min]で精製して化合物 **6** を収量 7.3 mg (8.3%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₅H₁₂₀IN₈O₁₈⁺, 1547.7760 [M + H]⁺; found, 1547.7773.

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

化合物 **4** (45 mg, 0.057 mmol)および化合物 **5** (88 mg, 0.11 mmol)を用いて、化合物 **6** と同様の合成法により化合物 **7** を合成し、収量 3.8 mg (4.3%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₅H₁₂₀IN₈O₁₈⁺, 1547.7760 [M + H]⁺; found, 1547.7762.

PSMA リガンド(**8**)

PSMA リガンド(化合物 **8**)は、第 1 章と同様の方法により合成した。

(((1*S*)-1-Carboxy-5-((2*S*)-2-((1*R*,4*S*)-4-((4-carboxy-4-(7-(1-carboxy-4-(((*R*)-4-carboxy-1-(((*S*)-1-carboxy-5-

(4-((4-(4-iodophenyl)butanamido)methyl)benzamido)pentyl)amino)-1-oxobutan-2-yl)amino)-4-oxobutyl)-4,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanamido)pentyl)carbamoyle)-L-glutamic acid (PNT-DA6) (9)

化合物 **6** (12 mg, 7.8 μmol)および化合物 **8** (6.0 mg の樹脂, 7.8 μmol)を用いて, 第2章の「PNT-DA2の合成」と同様の合成法により化合物 **9** を合成し, 収量 3.0 mg (21%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{116}\text{IN}_{13}\text{O}_{26}^{2+}$, 924.8594 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; found, 924.8628.

(((1S)-1-Carboxy-5-((2S)-2-(((1R,4S)-4-((4-carboxy-4-(7-(1-carboxy-4-((4-(((S)-1-carboxy-5-((R)-4-carboxy-2-(4-(4-iodophenyl)butanamido)butanamido)pentyl)carbamoyle)benzyl)amino)-4-oxobutyl)-4,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)butanamido)methyl)cyclohexane-1-carboxamido)-3-(naphthalen-2-yl)propanamido)pentyl)carbamoyle)-L-glutamic acid (PNT-DA7) (10)

化合物 **7** (4.0 mg, 2.6 μmol)および化合物 **8** (2.0 mg の樹脂, 2.6 μmol)を用いて, 第2章の「PNT-DA2の合成」と同様の合成法により化合物 **10** を合成し, 収量 0.40 mg (8.5%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{116}\text{IN}_{13}\text{O}_{26}^{2+}$, 924.8594 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; found, 924.8621.

$[\text{nat}]\text{In}$]-PNT-DA6 (11)

化合物 **9** (1.6 mg, 0.87 μmol)を $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ (50/50/0.1)の混合溶媒(300 μL)に溶解させ, 塩化インジウム(III)無水和物(6.0 mg, 27 μmol)を加えた. 反応液を室温にて 2 日間攪拌した後, 逆相 HPLC [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ = 70/30/0.1 (0 min) to 50/50/0.1 (30 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min]で精製して化合物 **11** を収量 0.79 mg (46%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{113}\text{InN}_{13}\text{O}_{26}^{2+}$, 980.7996 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; found, 980.8048.

$[\text{nat}]\text{In}$]-PNT-DA7 (12)

化合物 **10** (1.6 mg, 0.87 μmol)を $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ (50/50/0.1)の混合溶媒(300 μL)に溶解させ, 塩化インジウム(III)無水和物(6.0 mg, 27 μmol)を加えた. 反応液を室温にて 14 時間攪拌した後, 逆相 HPLC [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ = 68/32/0.1, Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min]で精製して化合物 **12** を収量 0.25 mg (15%)で得た. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{113}\text{InN}_{13}\text{O}_{26}^{2+}$, 980.7996 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; found, 980.8024.

放射標識

$[\text{nat}]\text{In}$ 溶液と PNT-DA6 または PNT-DA7 の DMSO 溶液(終濃度 12 μM)を MES 緩衝液(0.1 M, pH 5.6)中で混和し, 90°C にて 30 分間加熱した. 室温に戻した後, 反応液を逆相 HPLC [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min]で精製した.

分配係数

1-オクタノール(1.5 mL)および PBS (pH 7.4, 1.3 mL)が入った遠沈管に ^{111}In]-PNT-DA6 または ^{111}In]-PNT-DA7 の 10%エタノール含有 PBS 溶液(200 μL , 111 kBq)を加えた。以降の操作は第 2 章と同様の方法により行った。

細胞培養

第 1 章と同様の方法により行った。

細胞結合飽和実験

異なる濃度の各 ^{111}In 標識体(2.6–3.5 MBq/nmol, 0.39–200 nM)を用いて、第 2 章と同様の方法により行った。

動物

第 1 章と同様に、購入・飼育した。体内放射能分布実験および SPECT/CT 撮像で使用するモデルマウスは、第 2 章と同様の方法により作製した。

マウス血漿を用いたインビトロ安定性評価

第 1 章と同様の方法で得た ddY 系雄性マウス由来の血漿(200 または 250 μL)に、各 ^{111}In 標識体(163–220 kBq)を加えた。以降の実験操作は第 2 章と同様の方法により行った。

アルブミン結合性評価

各 ^{111}In 標識体(5.3 MBq/nmol, 50 kBq)を用いて、第 2 章と同様の方法により行った。 ^{111}In]-PNT-DA1 の B_{50} 値を基準として、第 2 章と同様に各化合物の relative affinity を算出した。

LNCaP 腫瘍移植モデルマウスにおける体内放射能分布実験

各 ^{111}In 標識体(115 kBq, 100 μL)の 10%エタノール含有生理食塩水溶液を 1 群 3 匹の LNCaP 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈より投与し、投与 4, 24, および 96 時間後でマウスを屠殺した。以降の実験操作は第 2 章と同様の方法により行った。

SPECT/CT 撮像

^{111}In]-PNT-DA6 (1.3 MBq)の 10%エタノール含有生理食塩水溶液(150 μL)を LNCaP および PC-3 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈より投与した。以降の実験操作は第 2 章と同様の方法により行った。

統計解析

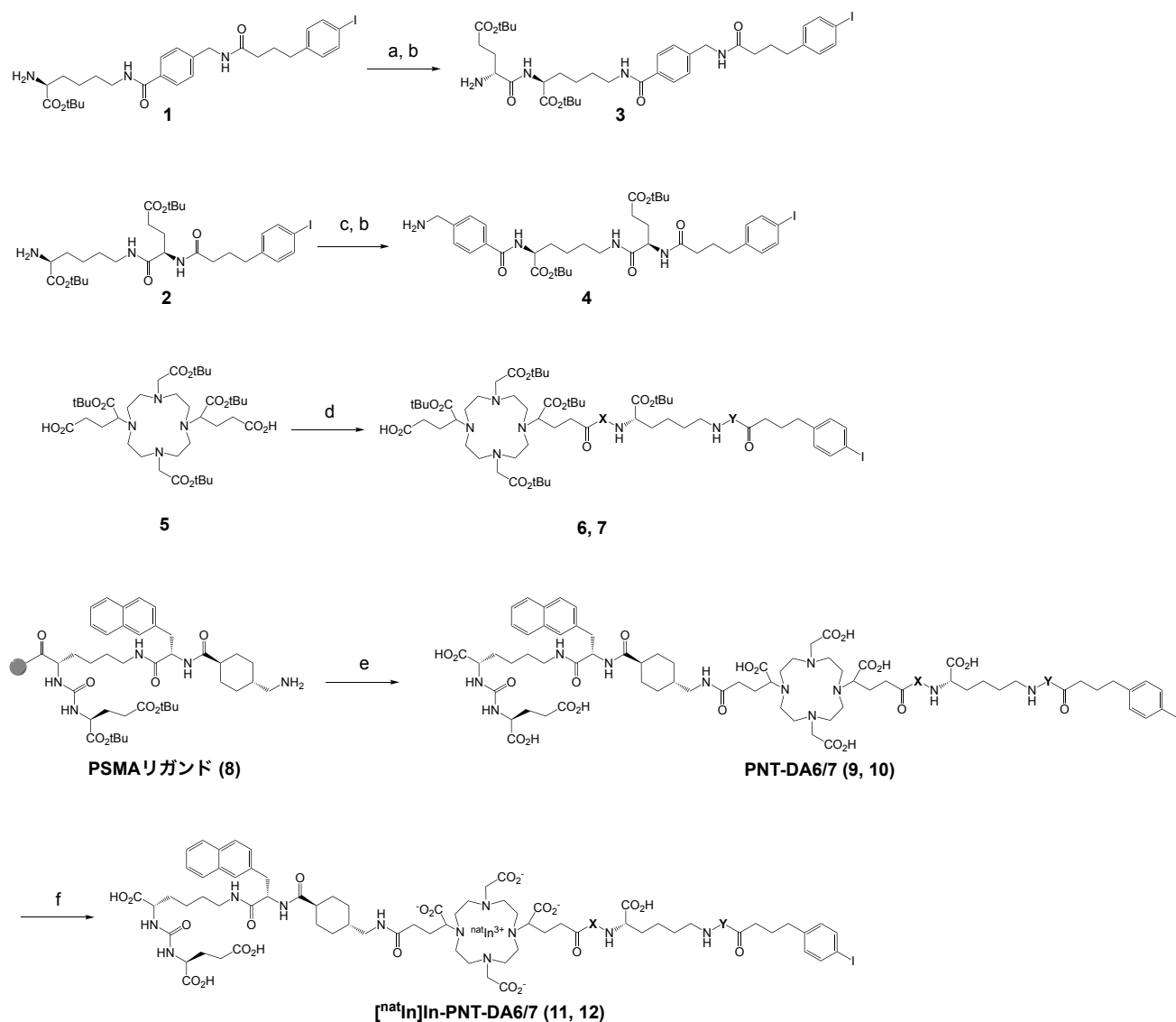
全てのデータは、GraphPad Prism (Version 6)または Microsoft Excel を用いて解析した。細胞結合飽和実験の結果については、一元配置分散分析およびテューキーの多重比較検定を組み合わせで有意差を評価した。体内放射能分布実験の結果については、二元配置分散分析およびボンフェローニの多重比較検定を組み合わせで有意差を評価した。各検定において、 $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

3.2. 結果および考察 I

標識前駆体および非放射性 In 標識体の合成

Scheme 3-1 に、標識前駆体である PNT-DA6 および PNT-DA7 の合成経路を示す。第 2 章で合成した化合物 **1** および **2** を用いて、2 種類のアミノ酸リンカーを有する化合物 **3** および **4** を合成した。次いで、第 2 章と同様の合成法により PNT-DA6 (化合物 **9**) および PNT-DA7 (化合物 **10**) を得た。さらに $^{\text{nat}}\text{InCl}_3$ を用いて、対応する非放射性 In 標識体である $[\text{natIn}]\text{In-PNT-DA6}$ (化合物 **11**) および $[\text{natIn}]\text{In-PNT-DA7}$ (化合物 **12**) を合成した。

Scheme 3-1. Synthetic routes of PNT-DA6, PNT-DA7, and their nonradioactive In-labeled counterparts.



Compound	X	Y
6	D-Glu(OtBu)	AMBA
7	AMBA	D-Glu(OtBu)
PNT-DA6 (9)	D-Glu	AMBA
PNT-DA7 (10)	AMBA	D-Glu
[^{nat} In]In-PNT-DA6 (11)	D-Glu	AMBA
[^{nat} In]In-PNT-DA7 (12)	AMBA	D-Glu

Reactions and conditions: (a) Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH·H₂O, EDC·HCl, HOAt, TEA, DMF; (b) Piperidine, DMF; (c) Fmoc-AMBA-OH, COMU, DIPEA, DMF; (d) **3** or **4**, COMU, DIPEA, DMF; (e) (1) **6** or **7**, HBTU, DIPEA, DMF; (2) TFA/TIPS/H₂O = 95/2.5/2.5; (f) InCl₃, H₂O /MeCN/TFA = 50/50/0.1.

放射標識

Scheme 3-2 に、PNT-DA6 および PNT-DA7 の ^{111}In 標識経路を示す。 ^{111}In 標識は、標識前駆体を MES 緩衝液中で $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ と加熱することにより実施した。逆相 HPLC にて精製を行い、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ をそれぞれ放射化学的収率 53 および 35%，および放射化学的純度 95%以上で得た(**Figure 3-2**)。

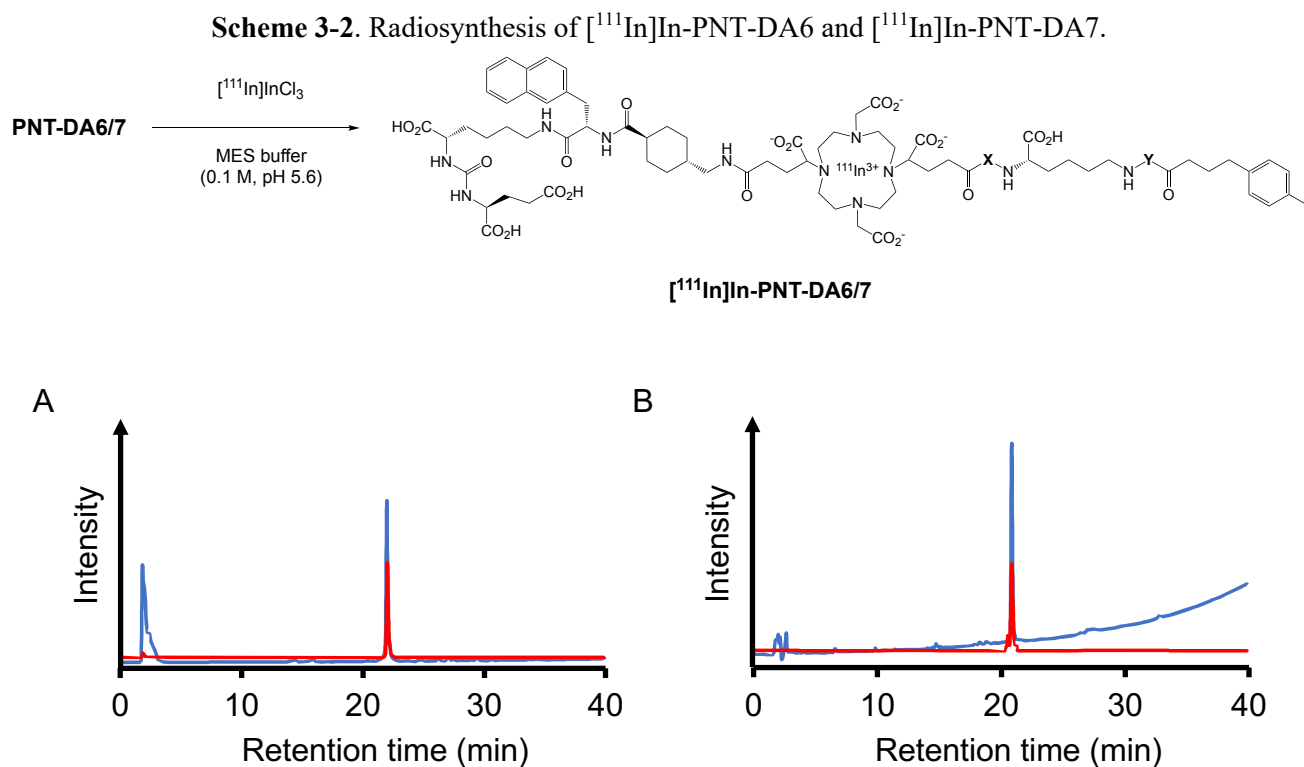


Figure 3-2. HPLC chromatograms of radioactivity (red) and UV absorption (blue) for a mixture of $[^{111/\text{nat}}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ (A) and $[^{111/\text{nat}}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ (B).

基礎的物性の評価

$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ について、第2章と同様に $\text{Log } D_{7.4}$ 値を算出した結果、それぞれ-2.6 および-3.4 の値を示した(**Table 3-1**)。これらの結果より、2種類のアミノ酸リンカーの配置が PSMA 標的放射性薬剤の脂溶性に影響を与えることが示された。これは、リンカーの導入位置が異なることにより、近傍の官能基との相互作用の変化が影響した可能性が考えられる。また、両化合物はマウス血漿中において、37°C で 24 時間経過後も 95%以上が未変化体として存在した(**Figure 3-3**)。これらの結果より、2種類のアミノ酸リンカーの導入は、PSMA 標的放射性薬剤の安定性に影響を与えないことが示唆された。

Table 3-1. Radiochemical characteristics of [^{111}In]In-PNT-DA6 and [^{111}In]In-PNT-DA7.

Compound	RCY (%)	RCP (%)	Log $D_{7.4}$ ^a
[^{111}In]In-PNT-DA6	53	> 95	-2.6 ± 0.1
[^{111}In]In-PNT-DA7	35	> 95	-3.4 ± 0.1

RCY: radiochemical yield, RCP: radiochemical purity, Log $D_{7.4}$: distribution coefficients. ^aData are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three individual experiments.

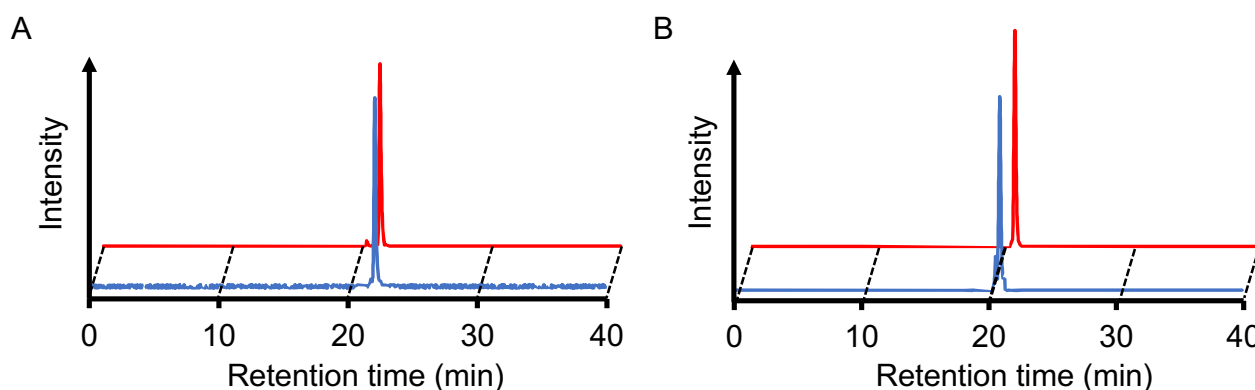


Figure 3-3. Radiochromatograms of [^{111}In]In-PNT-DA6 (A) and [^{111}In]In-PNT-DA7 (B) before (blue) or after (red) incubation in mouse plasma for 24 h.

細胞結合飽和実験

[^{111}In]In-PNT-DA6 および [^{111}In]In-PNT-DA7 の PSMA に対する結合性を評価するため、LNCaP 細胞を用いた細胞結合飽和実験を行った(**Figure 3-4, Table 3-2**). [^{111}In]In-PNT-DA6 および [^{111}In]In-PNT-DA7 の LNCaP 細胞に対する K_d 値は、それぞれ 26.9 および 12.7 nM と算出された. これらの K_d 値は、アミノ酸リンカーを 1 つ有するモノリンカー体($K_d = 12.7\text{--}42.2$ nM)の値と有意な差は認められなかった. 以上の結果より、2 種類のアミノ酸リンカーの導入は PSMA に対する結合性に大きな影響を与えないことが示唆された.

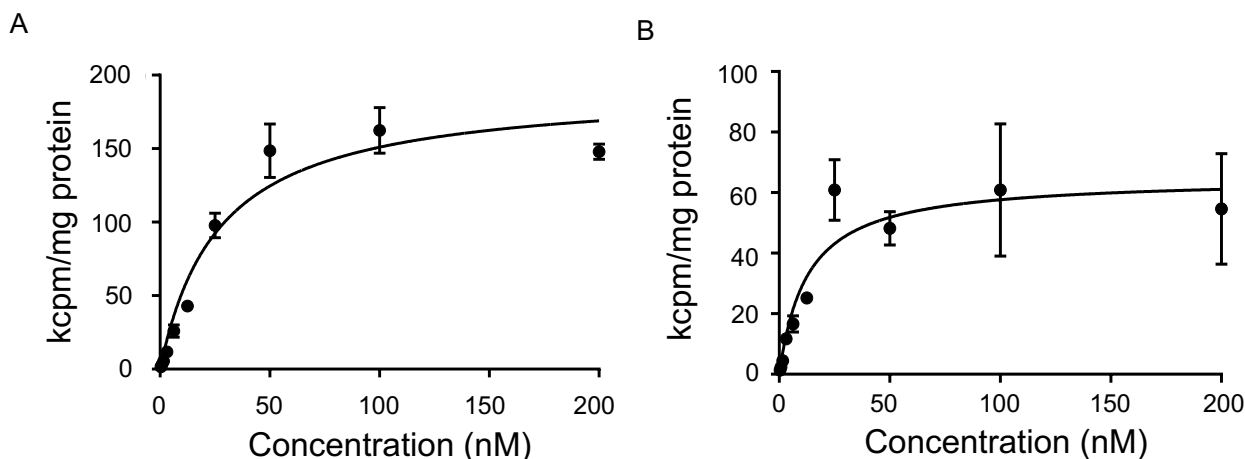


Figure 3-4. The specific binding of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ (A) and $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ (B) to LNCaP cells in the cell saturation binding assay.

Table 3-2. PSMA affinity of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ and $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$.

Compound	K_d (nM) ^a
$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$	26.9 ± 4.7
$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$	12.7 ± 3.9

^aData are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments.

アルブミン結合性評価

2種類のアミノ酸リンカーの導入が PSMA 標的放射性薬剤のアルブミン結合性に与える影響を評価するため、HSA を用いたアルブミン結合実験を行った(**Figure 3-5**). $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ は、HSA 濃度に応じてアルブミン結合画分の割合が増加する傾向を示した。これらの化合物について、第2章と同様に、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ の結合性を 1.0 と設定し、relative affinity を算出した(**Table 3-3**)。 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ は 9.1, $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ は 0.97 の relative affinity を示し、リンカー配置の相違が、アルブミンに対する結合性に影響を与えることが示唆された。第2章では、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ の Y 位に対してアミノ酸リンカーを導入することでアルブミン結合性が大きく変化した一方、X 位への導入では大きな変化は認められなかった。今回の結果では、X 位および Y 位の両方にアミノ酸リンカーを有する $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ は、Y 位に同じ種類のアミノ酸リンカーを有する $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA5}$ (1.9) および $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA4}$ (0.14) と比較して、relative affinity が増加した(**Table 3-3**)。これは、X 位にアミノ酸リンカーを導入することにより、DOTADG と ALB との立体的な配置が変化し、アルブミンとの結合における立体障害が低減した可能性が考えられる。さらに、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ はモノリンカー体(0.14–1.9)と比較しても高い relative affinity を示した。これらの知見より、2種類のアミノ酸リンカーの導入において X 位の存在がアル

ブミン結合性の向上に重要であり，特に X 位に D-Glu，Y 位に AMBA を導入する戦略が，PSMA 標的放射性薬剤のアルブミン結合性の向上に有用であることが示唆された。

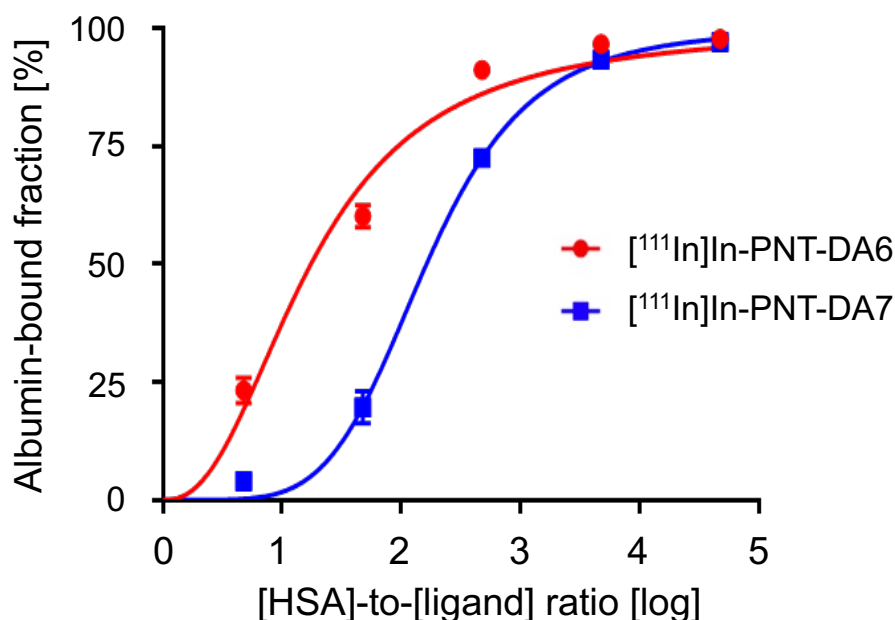


Figure 3-5. Albumin-binding curves of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ and $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ using HSA. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments.

Table 3-3. Relative affinity of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA4}$ – $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ for HSA.

Compound	X	Y	Relative affinity for HSA ^a
$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$	D-Glu	AMBA	9.1
$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$	AMBA	D-Glu	0.97
$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA4}$	-	D-Glu	0.14 ^b
$[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA5}$	-	AMBA	1.9 ^b

^aThe HSA affinity of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ was set at 1.0 as a reference. ^bData were reproduced from Chapter 2.

LNCaP 腫瘍移植モデルマウスにおける体内放射能分布実験

2 種類のアミノ酸リンカーの導入が PSMA 標的放射性薬剤の体内動態に与える影響について評価するため，LNCaP 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(**Figure 3-6**, **Tables 3-4–3-6**). $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ は，投与 96 時間後まで血中における滞留傾向が認められ，投与 4，24，および 96 時間後における血中放射エネルギーはそれぞれ 19.9，20.0，および 7.2% ID/g であった。 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ は，同時時点においてそれぞれ 2.5，0.79，および 0.13% ID/g と， $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ と比較して著しく低い血中放射エネルギーを示した。 また各化合物の AUC 値は， $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ が 1245%

ID/g·h, [^{111}In]In-PNT-DA7 が 259% ID/g·h であり, 両化合物の血中滞留性の違いはアルブミン結合性の違いと一致した. これにより, 2 種類のアミノ酸リンカーの配置がアルブミン結合性を調節することで, 放射性薬剤の血中滞留性に影響を与えることが示唆された. さらに, [^{111}In]In-PNT-DA6 の血液 AUC 値は, D-Glu または AMBA を 1 つ有するモノリンカー体(217–972% ID/g·h)と比較して高い値を示しており, X 位に D-Glu, Y 位に AMBA を導入することで, PSMA 標的放射性薬剤の血中滞留性が向上する可能性が示された.

投与 4 時間後において, [^{111}In]In-PNT-DA6 は[^{111}In]In-PNT-DA7 と比較して低い腫瘍集積を示し, それぞれ 11.0 および 25.6% ID/g であった. しかし, 投与 24 および 96 時間後には[^{111}In]In-PNT-DA6 の腫瘍集積は 100 および 144% ID/g に達し, [^{111}In]In-PNT-DA7 (それぞれ 34.4 および 23.5% ID/g)と比較して有意に高い値を示した. 腫瘍における AUC 値は, [^{111}In]In-PNT-DA6 が 5651% ID/g·h, [^{111}In]In-PNT-DA7 が 1846% ID/g·h となり, [^{111}In]In-PNT-DA6 の腫瘍滞留性が大きく向上することが示された. さらに, [^{111}In]In-PNT-DA6 はモノリンカー体(991–4053% ID/g·h)と比較しても高い腫瘍 AUC 値を示しており, X 位に D-Glu, Y 位に AMBA を導入することで, PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積性が顕著に向上することが示された.

正常組織の中で最も顕著な放射能集積が認められた腎臓について, [^{111}In]In-PNT-DA6 (投与 4, 24, および 96 時間後において, それぞれ 15.7, 47.5, および 21.9% ID/g)は全てのタイムポイントにおいて[^{111}In]In-PNT-DA7 (投与 4, 24, および 96 時間後において, それぞれ 179, 197, および 61.9% ID/g)と比較して低い腎臓集積を示した. 腎臓における AUC 値も, [^{111}In]In-PNT-DA6 が 2182% ID/g·h, [^{111}In]In-PNT-DA7 が 9980% ID/g·h と, [^{111}In]In-PNT-DA6 は低値を示した. 既報において, アルブミン結合性の向上により糸球体における濾過速度が低下することが知られており,^{4, 47} この腎臓集積の差異は, [^{111}In]In-PNT-DA6 が[^{111}In]In-PNT-DA7 よりも高いアルブミン結合性を示したために生じたと考えられる. また, [^{111}In]In-PNT-DA6 の腎臓 AUC 値は, モノリンカー体の中で最も低い腎臓 AUC 値を示した[^{111}In]In-PNT-DA3 (649% ID/g·h)よりも高い値を示した一方で, [^{111}In]In-PNT-DA1 (2377% ID/g·h)とは同程度であった. これらの結果より, X 位に D-Glu, および Y 位に AMBA を導入しても, PSMA 標的放射性薬剤の腎臓集積を大きく増加させることはないことが示唆された.

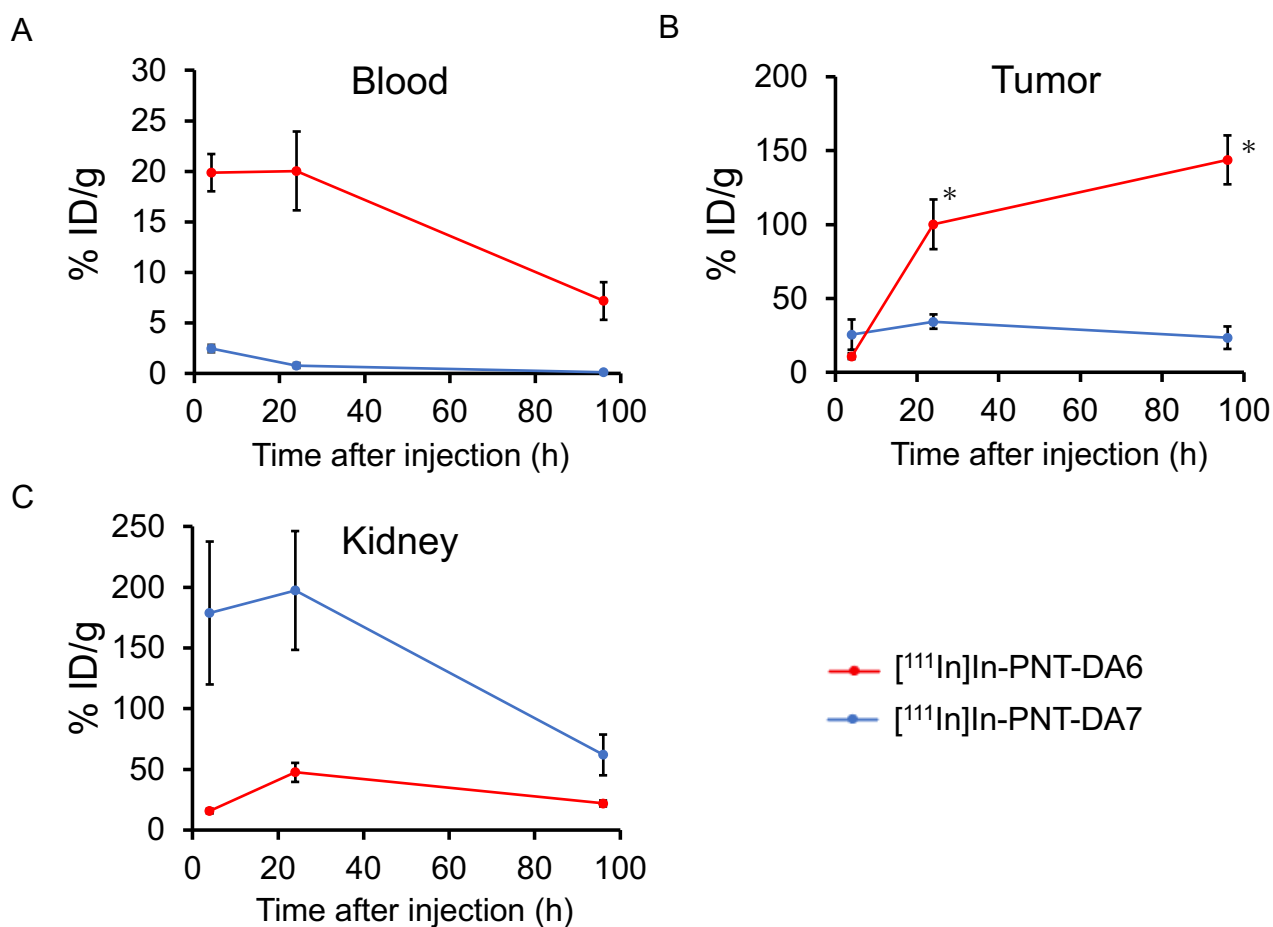


Figure 3-6. Comparison of radioactivity in the blood (A), LNCaP tumor (B), and kidney (C) at 4, 24, and 96 h postinjection of $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ and $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ into LNCaP tumor-bearing mice. * $P < 0.05$ compared with $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$.

Table 3-4. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DA6 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	96
Blood	19.9 $\pm$ 1.9	20.0 $\pm$ 3.9	7.2 $\pm$ 1.9
Spleen	13.1 $\pm$ 3.4	16.0 $\pm$ 4.9	11.1 $\pm$ 2.1
Pancreas	4.3 $\pm$ 0.5	8.2 $\pm$ 3.7	5.7 $\pm$ 0.8
Stomach ^a	0.45 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.41
Intestine	1.2 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 1.1
Kidney	15.7 $\pm$ 2.0	47.5 $\pm$ 7.9	21.9 $\pm$ 2.3
Liver	5.7 $\pm$ 1.7	7.3 $\pm$ 1.1	12.8 $\pm$ 5.7
Heart	4.9 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 1.0	4.4 $\pm$ 0.9
Lung	9.6 $\pm$ 1.6	14.1 $\pm$ 2.4	6.7 $\pm$ 1.7
Brain	0.45 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.08	0.63 $\pm$ 0.27
Tumor	11.0 $\pm$ 2.0	100 $\pm$ 17	144 $\pm$ 17
Muscle	1.4 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 1.4	1.6 $\pm$ 0.9

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation of three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 3-5. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-PNT-DA7 into LNCaP tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)		
	4	24	96
Blood	2.5 ± 0.4	0.79 ± 0.24	0.13 ± 0.03
Spleen	33.6 ± 11.0	10.0 ± 0.7	2.4 ± 0.5
Pancreas	2.7 ± 0.7	1.3 ± 0.3	0.48 ± 0.27
Stomach ^a	0.21 ± 0.05	0.23 ± 0.19	0.28 ± 0.34
Intestine	0.61 ± 0.09	0.62 ± 0.11	0.25 ± 0.13
Kidney	179 ± 59	197 ± 49	61.9 ± 16.8
Liver	2.5 ± 0.7	2.0 ± 0.6	0.97 ± 0.39
Heart	1.3 ± 0.3	0.73 ± 0.12	0.29 ± 0.01
Lung	3.9 ± 1.0	1.8 ± 0.5	0.63 ± 0.15
Brain	0.12 ± 0.04	0.07 ± 0.04	0.04 ± 0.01
Tumor	25.6 ± 10.3	34.4 ± 4.8	23.5 ± 7.5
Muscle	1.4 ± 0.8	0.53 ± 0.24	0.09 ± 0.08

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation of three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 3-6. AUC values (% ID/g·h) of [^{111}In]In-PNT-DA6 and [^{111}In]In-PNT-DA7 based on non-decay-corrected biodistribution data.

Compound	AUC value (% ID/g·h)		
	Blood	Tumor	Kidney
[^{111}In]In-PNT-DA6	1245	5651	2182
[^{111}In]In-PNT-DA7	259	1846	9980

SPECT/CT 撮像

最も高い腫瘍集積を示した[^{111}In]In-PNT-DA6 について、LNCaP および PC-3 腫瘍の両移植モデルマウスを用いた SPECT/CT 撮像を実施した(Figure 3-7). 投与 96 時間後において、[^{111}In]In-PNT-DA6 は腎臓および PC-3 腫瘍において顕著な放射能集積を示さなかった一方、LNCaP 腫瘍を明瞭に描出することに成功した. この結果より、[^{111}In]In-PNT-DA6 が PSMA 高発現腫瘍を明瞭に描出可能であることが示され、[^{111}In]In-PNT-DA6 の PSMA 標的放射性薬剤としての有用性が示唆された.

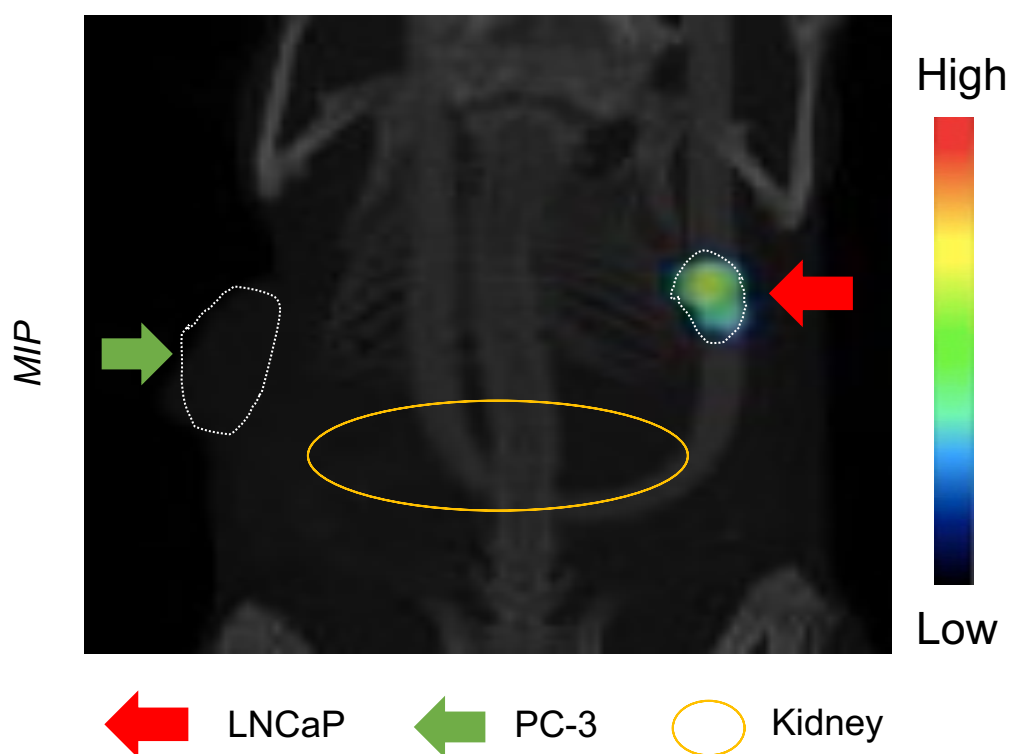


Figure 3-7. MIP SPECT/CT image of an LNCaP and PC-3 tumor-bearing mouse obtained at 96 h postinjection using [^{111}In]In-PNT-DA6. Red arrow: the LNCaP tumor; green arrow: the PC-3 tumor; and orange circle: the kidney.

背景 II

これまでの結果より、アミノ酸リンカーである D-Glu および AMBA を適切な配置で導入する新規リンカー技術を用いることで、PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積性が向上することが明らかとなった。そこで、異なるがん関連分子を標的とした放射性薬剤に対する、新規リンカー技術の応用可能性について検証した。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ は、腫瘍細胞において過剰発現し血管新生や転移に関与する。^{11, 52} そのため、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を標的とした放射性薬剤の開発は、さまざまながん治療の発展に資すると考えられる。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤は、速やかな血中からのクリアランスに起因する低い腫瘍集積性が課題とされており、^{3, 52} 薬剤の腫瘍集積性の向上が急務である。ALB の導入はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤によるがん治療の有効性を向上させる戦略として注目されている一方、^{6, 53-55} これまでに治療用として承認された ALB を有するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤は存在せず、さらなる開発が求められている。そこで、新規リンカー技術を用いたインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤 [¹¹¹In]In-RGD-DA6 を設計した(**Figure 3-8A**)。 [¹¹¹In]In-RGD-DA6 は、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的リガンドである c(RGDfK), DOTADG, D-Glu, Lys, AMBA, および IPBA から構成されている。新規リンカー技術の有用性について評価するため、ALB を有するがアミノ酸リンカーを有さない [¹¹¹In]In-RGD-DA1 を対照化合物として設計した(**Figure 3-8B**)。また、ALB とアミノ酸リンカーのいずれも有さない [¹¹¹In]In-DOTA-c(RGDfK) (**Figure 3-8C**) も対照化合物として設定し、^{56, 57} 各化合物の体内動態評価より、新規リンカー技術がインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤の体内動態に与える影響を検証した。

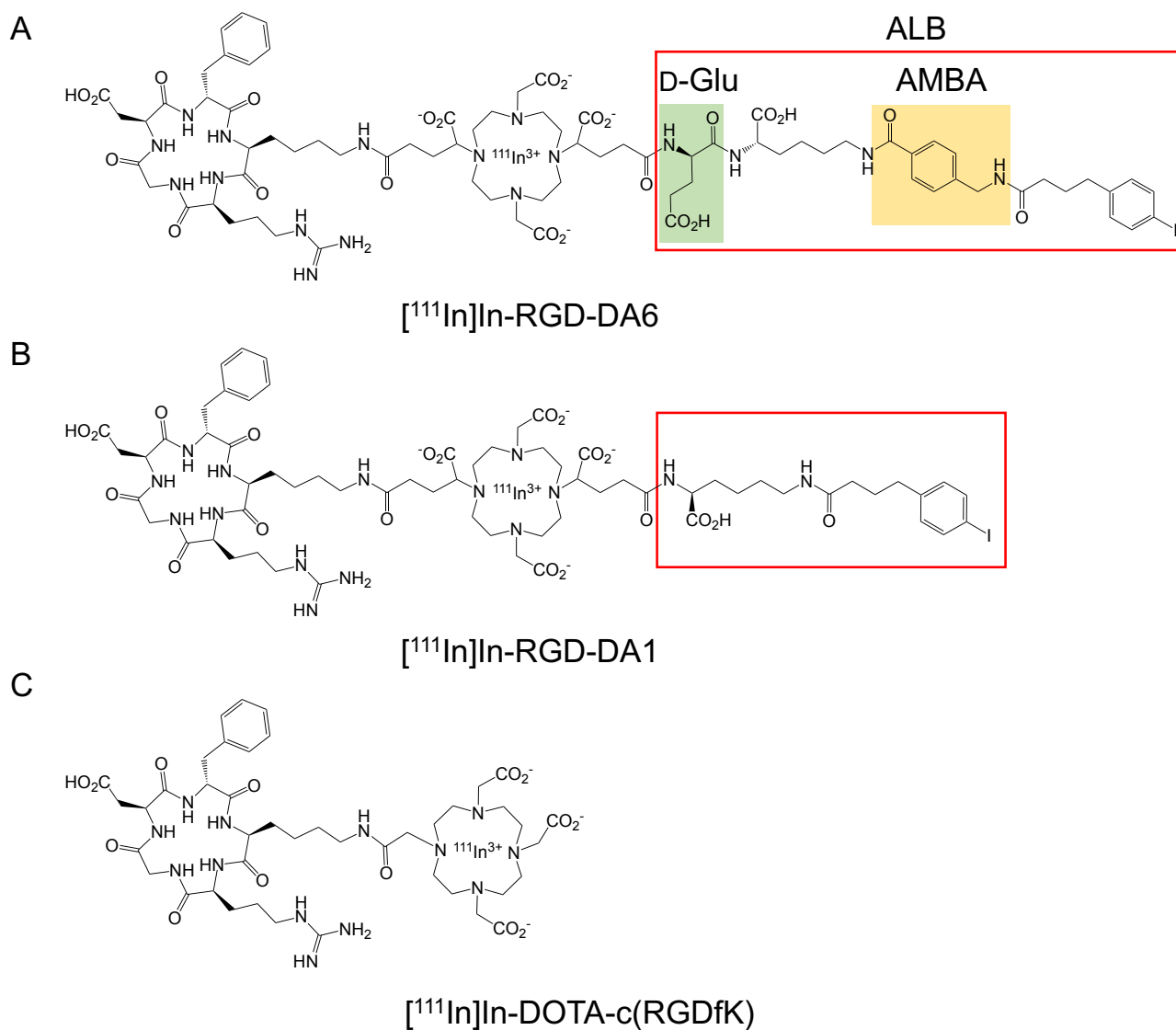


Figure 3-8. Chemical structures of $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA6}$ (A), $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA1}$ (B), and $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-c(RGDfK)}$ (C).

3.3. 実験方法 II

試薬・機器

c(RGDyK)は Selleck Chemicals 社より購入した。それ以外の試薬・機器については第 1 章および第 2 章と同じものを使用した。

合成

側鎖保護型 c(RGDfK)ペプチド(**13**)

側鎖保護型 c(RGDfK)ペプチド(化合物 **13**)は、以前に報告された方法を参考にして合成した。^{6, 51, 56} 固相合成法により合成した H-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(Dde)-Arg(Pbf)-Gly-OH を無水 DMF (5 mM)に溶解し、NaHCO₃ (3 equiv)と diphenylphosphorylazide (3 equiv)を添加した。室温で 7 時間攪拌した後、NaHCO₃と DMF をそれぞれ濾過と濃縮により除去した。残渣に 10%ヒドラジン含有無水 DMF 溶液を加えて室温で 10 時間攪拌した後、逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 40/60/0.1 (25 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. × 250 mm, 流量 4 mL/min]で精製して化合物 **13** を収量 19.6 mg (24%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₄H₆₆N₉O₁₀S⁺, 912.4648 [M + H]⁺; found, 912.4620.

RGD-DA6 (**14**)

化合物 **6** (8.7 mg, 5.6 μmol)の無水 DMF 溶液(100 μL)に、COMU (2.4 mg, 5.6 μmol)および DIPEA (12 μL, 67 μmol)を 0°C で加え、反応液を 0°C で 15 時間攪拌した。次いで、化合物 **13** (5.1 mg, 5.6 μmol)の無水 DMF 溶液(400 μL)を 0°C で加えた。室温にて 17 時間攪拌した後、反応液に超純水(10 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 10 mL)で 2 回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣に TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5)の混合溶媒(1 mL)を添加し、室温にて 9 時間攪拌した。アルゴンガスを用いて濃縮した後、得られた残渣を逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. × 250 mm, 流量 4 mL/min]で 2 回精製して、化合物 **14** を収量 1.9 mg (19%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₈H₁₁₂IN₁₇O₂₄²⁺, 898.8550 [M + 2H]²⁺; found, 898.8548.

[^{nat}In]In-RGD-DA6 (**15**)

化合物 **14** (0.5 mg, 0.28 μmol)の DMSO 溶液(330 μL)に H₂O/MeCN/TFA (50/50/0.1)の混合溶媒(1 mL)をゆっくりと加え、次いで塩化インジウム(III)無水和物(11 mg, 49 μmol)を加えた。反応液を室温にて 3 日間攪拌した後、逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. × 150 mm, 流量 1 mL/min]で精製して化合物 **15** を収量 0.49 mg (92%)で得た。MS (ESI) m/z calcd for C₇₈H₁₀₉IInN₁₇O₂₄²⁺, 954.8 [M + 2H]²⁺; found, 954.9.

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 (16)

化合物 **16** は、既報に従って合成した。²²

RGD-DA1 (17)

化合物 **16** (29 mg, 24 μ mol)の無水 DMF 溶液(350 μ L)に、COMU (10 mg, 24 μ mol)および DIPEA (28 μ L, 159 μ mol)を 0°C で加え、反応液を 0°C で 15 分間攪拌した。次いで、化合物 **13** (15 mg, 16 μ mol)の無水 DMF 溶液(250 μ L)を 0°C で加えた。室温にて 20 時間攪拌した後、反応液に超純水(20 mL)を加え、ヘキサン/酢酸エチル混合物(80/20, 20 mL)で 2 回抽出を行った。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮し、得られた残渣に TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5)の混合溶媒(500 μ L)を添加し、室温にて 7 時間攪拌した。アルゴンガスを用いて濃縮した後、得られた残渣を逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 10 mm I.D. $\times$ 250 mm, 流量 4 mL/min]で精製して、化合物 **17** を収量 2.5 mg (10%)で得た。HRMS (ESI) m/z calcd for C₆₅H₉₈IN₁₅O₂₀²⁺, 767.8073 [M + 2H]²⁺; found, 767.8072.

[^{nat}In]In-RGD-DA1 (18)

化合物 **17** (1.0 mg, 0.65 μ mol)の DMSO 溶液(330 μ L)に H₂O/MeCN/TFA (50/50/0.1)の混合溶媒(1 mL)をゆっくりと加え、次いで塩化インジウム(III)無水和物(17 mg, 77 μ mol)を加えた。反応液を室温にて 5 日間攪拌した後、逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 30/70/0.1 (30 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min]で精製して化合物 **18** を収量 0.57 mg (53%)で得た。MS (ESI) m/z calcd for C₆₅H₉₅IIInN₁₅O₂₀²⁺, 823.7 [M + 2H]²⁺; found, 823.8.

放射標識

[¹¹¹In]InCl₃溶液(100 μ L)と RGD-DA6 または RGD-DA1 の DMSO 溶液(RGD-DA6 の場合は 1 mg/mL, RGD-DA1 の場合は 3 mg/mL をそれぞれ 1 μ L)を MES 緩衝液(0.1 M, pH 5.6, 100 μ L)中で混和し、90°C にて 30 分間加熱した。室温に戻した後、反応液を逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90/10/0.1 (0 min) to 10/90/0.1 (40 min), Cosmosil 5C₁₈-AR-II, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 流量 1 mL/min]で精製した。

細胞培養

U87MG ヒト膠芽腫細胞は、American Type Culture Collection 社より購入した。U87MG 細胞は抗生物質 1% (ペニシリンおよびストレプトマイシン)と FBS 10%を含むナカライテスク株式会社製 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培地中、37°C、5%二酸化炭素環境下で培養した。

細胞結合阻害実験

DOTA-c(RGDfK)および [¹²⁵I]I-c(RGDyK)は、以前の報告を参考にして調製した。^{51, 56, 58, 59} U87MG 細

胞を 12 ウェルプレート(3×10^5 cells/well)に播種し、37°C、5%二酸化炭素環境下にて 24 時間静置した。培地を除去した後、 $[^{125}\text{I}]\text{I-c(RGDyK)}$ (19 kBq)および異なる濃度の評価化合物(10 pM–100 μM)を含む DMEM 培地(500 μL)を加えて 37°C、5%二酸化炭素環境下にて 1 時間静置した。培地を除去した後、PBS (500 μL)で 2 回洗浄し、1 N 水酸化ナトリウム水溶液(200 μL)を 2 回加えて細胞を溶解した。以降の操作は第 2 章と同様の方法により行った。

動物

第 2 章と同様に、購入・飼育した。体内放射能分布実験で使用するモデルマウスは、DMEM と Matrigel を 1:1 で混合した溶液に、U87MG 細胞(2×10^6 cells/mouse)を懸濁させ、イソフルラン(2%)麻酔下、BALB/c-*nu/nu* ノードマウス(雄、5 週齢)の右脇腹に皮下移植することで作製した。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対するインビボ選択性評価で使用するモデルマウスは、U87MG 細胞(2×10^6 cells/mouse)を右脇腹に皮下移植した 2 週間後に、RPMI 1640 と Matrigel を 1:1 で混合した溶液に、PC-3 細胞(5×10^6 cells/mouse)を懸濁させ、イソフルラン(2%)麻酔下、左脇腹に皮下移植することで作製した。

マウス血漿を用いたインビトロ安定性評価

第 1 章と同様の方法で得た ddY 系雄性マウス由来の血漿(200 μL)に、各 ^{111}In 標識体(120–180 kBq)を加えた。以降の実験操作は第 2 章と同様の方法により行った。

アルブミン結合性評価

$[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-c(RGDfK)}$ は、以前の報告を参考にして調製した。⁵¹ 各 ^{111}In 標識体(5.3 MBq/nmol, 50 kBq)を用いて、第 2 章と同様の方法により行い、 $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA1}$ の B_{50} 値を基準として、各化合物の relative affinity を算出した。

U87MG 腫瘍移植モデルマウスにおける体内放射能分布実験

各 ^{111}In 標識体(111 kBq, 100 μL)の 10%エタノール含有生理食塩水溶液を 1 群 3 匹の U87MG 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈より投与した。投与 1, 4, 24, 48, および 96 時間後でマウスを屠殺した。以降の実験操作は第 2 章と同様の方法により行った。

U87MG/PC-3 腫瘍移植モデルマウスにおけるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対するインビボ選択性評価

$[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA6}$ (111 kBq, 100 μL)の 10%エタノール含有生理食塩水溶液を 1 群 4 匹の U87MG/PC-3 腫瘍両移植モデルマウスに尾静脈より投与した。投与 48 時間後でマウスを屠殺した。以降の実験操作は第 2 章と同様の方法により行った。

統計解析

全てのデータは、GraphPad Prism (Version 6)または Microsoft Excel を用いて解析した。細胞結合阻

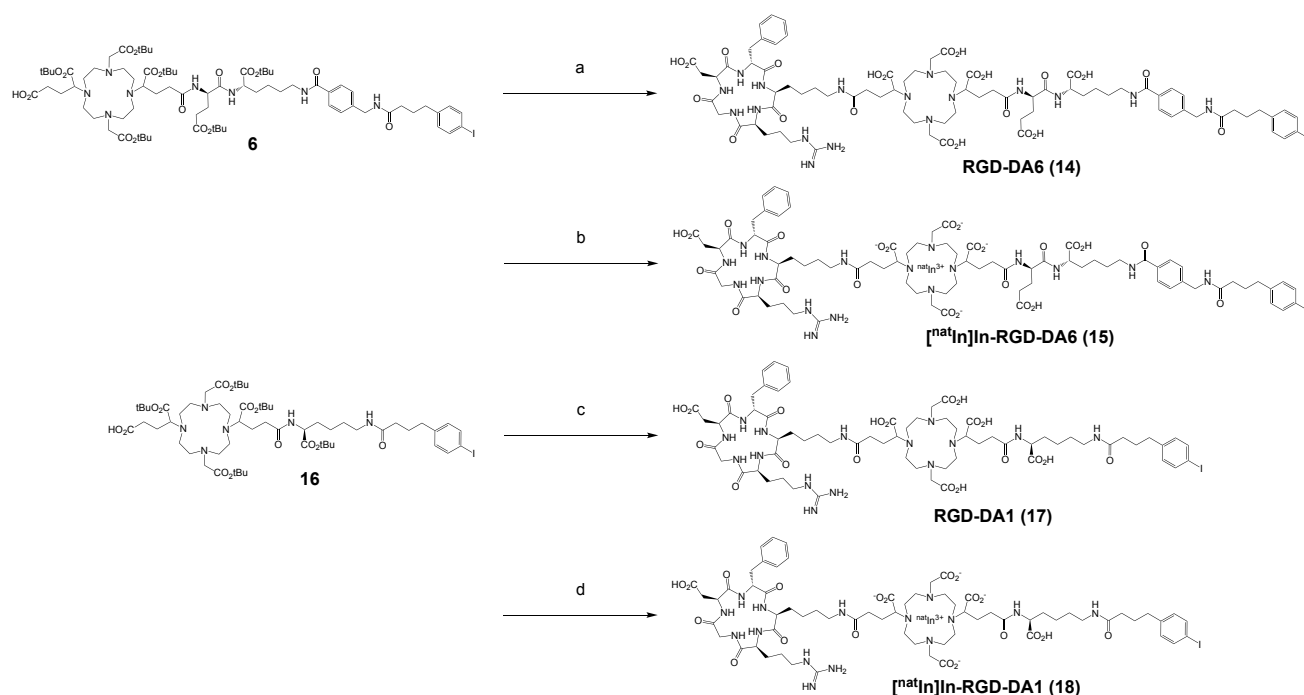
害実験の結果については，一元配置分散分析およびテューキーの多重比較検定を組み合わせで有意差を評価した．体内放射能分布実験の結果については，二元配置分散分析およびボンフェローニの多重比較検定を組み合わせで有意差を評価した．インテグリン $\alpha_5\beta_3$ に対するインビボ選択性評価の結果については，スチューデントの t 検定を用いて有意差を評価した．各検定において， $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした．

3.4. 結果および考察 II

標識前駆体および非放射性 In 標識体の合成

Scheme 3-3 に、標識前駆体である RGD-DA6 および RGD-DA1 の合成経路を示す。側鎖保護型 c(RGDfK)ペプチド(化合物 **13**)は、既報を参考に固相合成法を用いて合成した。^{56, 58} 続いて、合成したペプチドを化合物 **6** または化合物 **16** に導入し、TFA による脱保護反応を経て RGD-DA6 (化合物 **14**) および RGD-DA1 (化合物 **17**) を合成した。さらに、^{nat}InCl₃ を用いて、対応する非放射性 In 標識体である [^{nat}In]In-RGD-DA6 (化合物 **15**) と [^{nat}In]In-RGD-DA1 (化合物 **18**) を合成した。

Scheme 3-3. Synthetic routes of RGD-DA6, RGD-DA1, and their nonradioactive In-labeled counterparts.



Reactions and conditions: (a) (1) Side chain-protected c(RGDfK) (**13**), COMU, DIPEA, DMF; (2) TFA/TIPS/H₂O = 95/2.5/2.5; (b) InCl₃, H₂O/MeCN/DMSO/TFA = 38/38/25/0.1.

放射標識

Scheme 3-4 に RGD-DA6 および RGD-DA1 の ^{111}In 標識経路を示す。 ^{111}In 標識は、標識前駆体を MES 緩衝液中で $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ と加熱することにより実施した。 逆相 HPLC を用いた精製を行い、 $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA6}$ および $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA1}$ をそれぞれ放射化学的収率 73 および 65%， および放射化学的純度 95%以上で得た(**Figure 3-9**)。

Scheme 3-4. Radiosynthesis of $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA6}$ and $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA1}$.

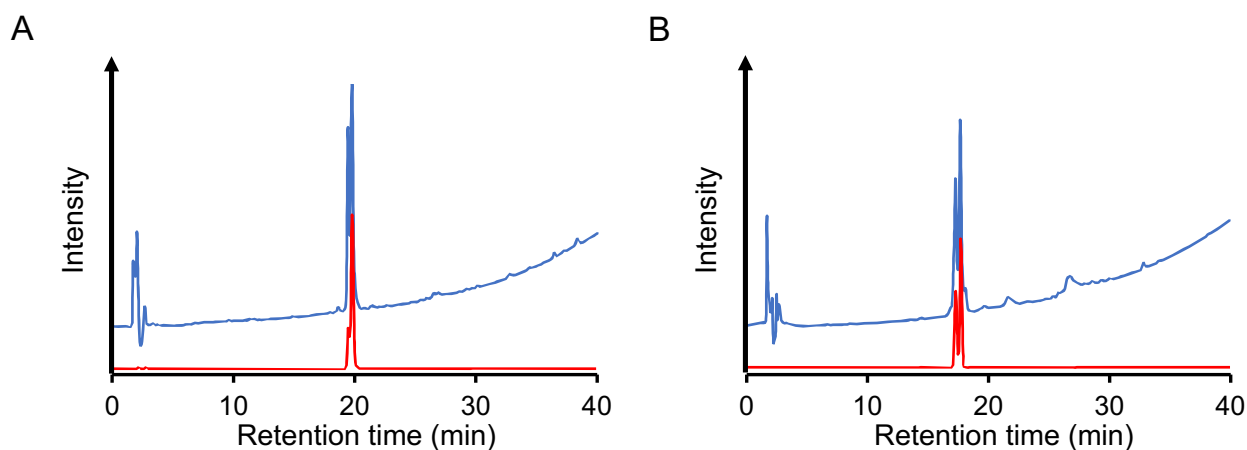
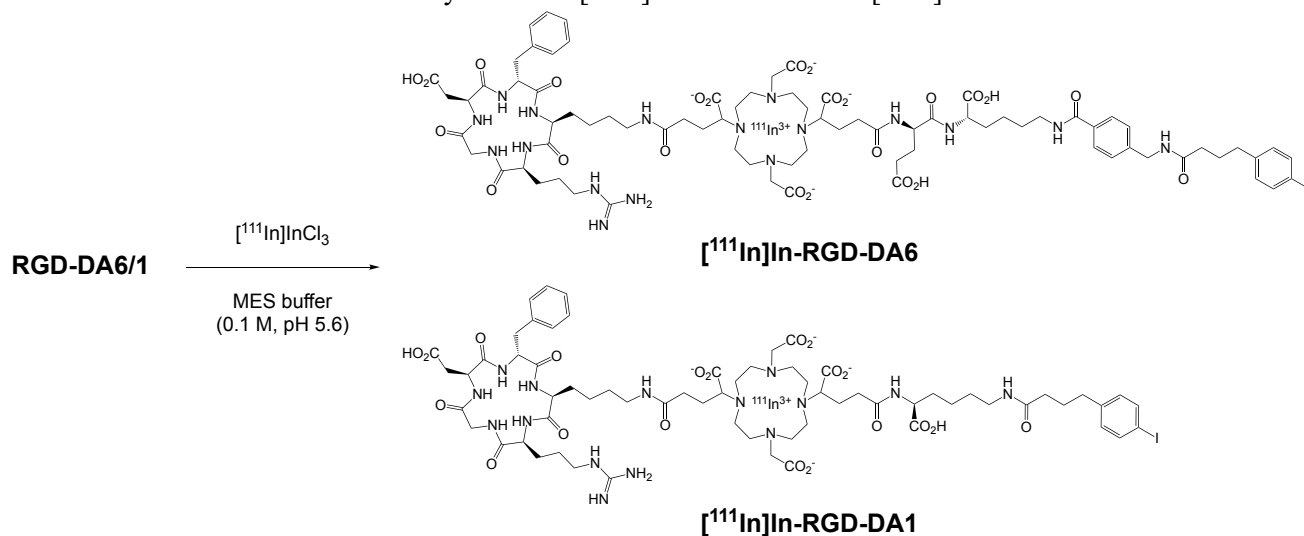


Figure 3-9. HPLC chromatograms of radioactivity (red) and UV absorption (blue) for a mixture of $[^{111/\text{nat}}\text{In}]\text{In-RGD-DA6}$ (A) and $[^{111/\text{nat}}\text{In}]\text{In-RGD-DA1}$ (B).

マウス血漿を用いたインビトロ安定性評価

[¹¹¹In]In-RGD-DA6 および [¹¹¹In]In-RGD-DA1 について、マウス血漿を用いて安定性を評価した (Figure 3-10)。両化合物は、37°C で 24 時間経過後も 95%以上が未変化体として存在し、血漿中において 24 時間安定に存在することが示唆された。

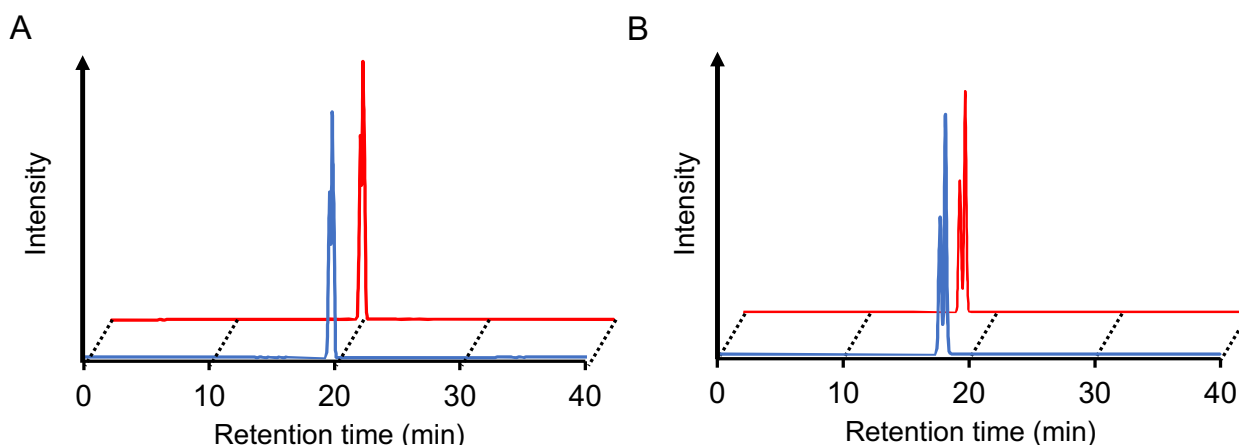


Figure 3-10. Radiochromatograms of [¹¹¹In]In-RGD-DA6 (A) and [¹¹¹In]In-RGD-DA1 (B) before (blue) and after (red) incubation in mouse plasma for 24 h.

細胞結合阻害実験

化合物のインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 発現細胞に対する結合性を評価するため、U87MG 細胞を用いた細胞結合阻害実験を行った (Figure 3-11, Table 3-7)。RGD-DA6 は対照化合物である DOTA-c(RGDfK) と同等の IC_{50} 値を示し、それぞれ 0.52 および 0.86 μM で有意差は認められなかった。一方、RGD-DA1 の IC_{50} 値は 1.8 μM と、RGD-DA6 および DOTA-c(RGDfK) と比較して有意に高い値を示した。これらの結果から、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤に ALB および 2 種類のアミノ酸リンカーの両方を導入することで、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対する結合性が維持される一方、ALB のみを導入した場合には結合性が低下する可能性が示された。既報では、ALB の導入により c(RGDfK) を有するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤の IC_{50} 値が増加することが報告されており、⁶⁰ 本研究においても、c(RGDfK) を有するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤に Lys-IPBA を導入することで、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対する結合性に影響を与える可能性が考えられる。

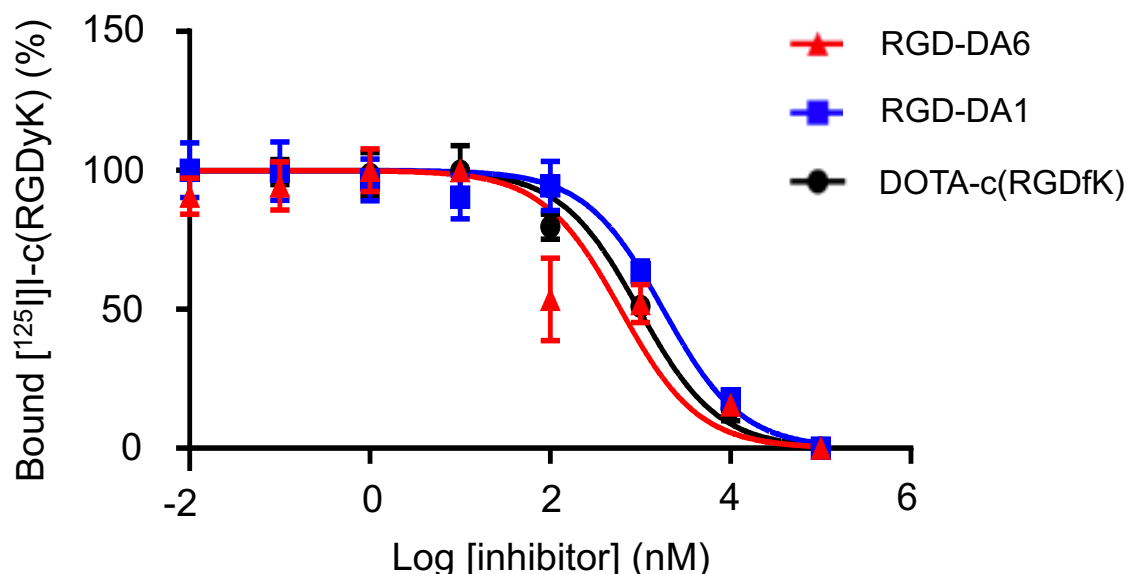


Figure 3-11. Displacement curves of competitive binding to the integrin $\alpha_v\beta_3$ of [^{125}I]I-c(RGDyK) with RGD-DA6, RGD-DA1, and DOTA-c(RGDfK).

Table 3-7. IC_{50} values of RGD-DA6, RGD-DA1, and DOTA-c(RGDfK).

Compound	IC_{50} (μM) ^a
RGD-DA6	0.52 ± 0.35
RGD-DA1	1.8 ± 0.30
DOTA-c(RGDfK)	0.86 ± 0.29

^aData are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments.

アルブミン結合性評価

化合物のアルブミン結合性を評価するため、HSA を用いたアルブミン結合実験を行った(**Figure 3-12**). [^{111}In]In-RGD-DA6 および [^{111}In]In-RGD-DA1 は、HSA 濃度と相関してアルブミン結合画分の割合が増加する傾向を示した。一方、[^{111}In]In-DOTA-c(RGDfK)では、HSA 濃度の変化に伴うアルブミン結合画分の増加はほとんど認められなかった。この結果より、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤に ALB を導入することで、アルブミン結合性が顕著に増加することが示された。[^{111}In]In-RGD-DA1 の結合性を 1.0 と設定して relative affinity を算出したところ、[^{111}In]In-RGD-DA6 は 4.5 と高い relative affinity を示した(**Table 3-8**)。この結果は、X 位に D-Glu, Y 位に AMBA を導入することで、ALB を有するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤のアルブミン結合性が向上することを示している。この知見は、2 種類のアミノ酸リンカーを導入した PSMA 標的放射性薬剤に関する結果と一致しており、新規リンカー技術が、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤のアルブミン結合性の増加に資する有効な方法であることが示唆された。

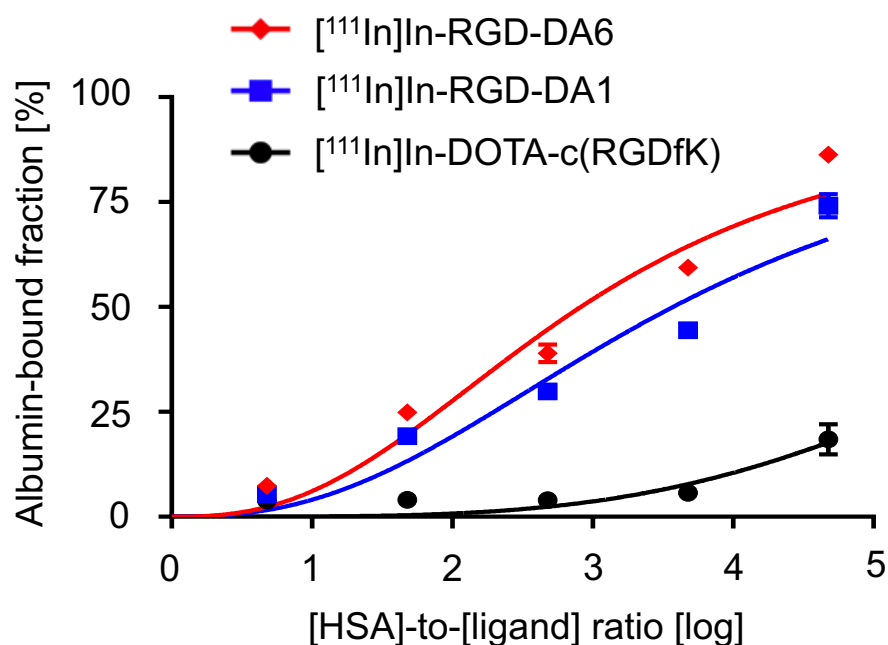


Figure 3-12. Albumin-binding curves of [¹¹¹In]In-RGD-DA6, [¹¹¹In]In-RGD-DA1, and [¹¹¹In]In-DOTA-c(RGDfK) using HSA. Data are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments.

Table 3-8. Relative affinity of [¹¹¹In]In-RGD-DA6, [¹¹¹In]In-RGD-DA1, and [¹¹¹In]In-DOTA-c(RGDfK) for HSA.

Compound	Relative affinity for HSA ^a
[¹¹¹ In]In-RGD-DA6	4.5
[¹¹¹ In]In-RGD-DA1	1.0
[¹¹¹ In]In-DOTA-c(RGDfK)	n.d. ^b

^aThe HSA affinity of [¹¹¹In]In-RGD-DA1 was set to 1.0 as a reference. ^bn.d., not determined as the binding ratio of [¹¹¹In]In-DOTA-c(RGDfK) remained below 50%.

U87MG 腫瘍移植モデルマウスにおける体内放射能分布実験

化合物の体内動態を比較するため、U87MG 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(**Figure 3-13, Tables 3-9–3-11**). ^{111}In]-RGD-DA6 は、全てのタイムポイントにおいて最も高い値を示し、投与 1, 4, 24, 48, および 96 時間後において、それぞれ 21.5, 15.4, 10.5, 6.5, および 3.6% ID/g であった。次いで、 ^{111}In]-RGD-DA1 が 16.7, 13.5, 5.5, 2.3, および 0.55% ID/g, ^{111}In]-DOTA-c(RGDfK) が 0.21, 0.02, 0.01, 0.00, および 0.01% ID/g の順であった。これらの血中放射能量の順序は、インビトロで評価したアルブミン結合性の順序と一致しており、ALB の導入がインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤のアルブミン結合性を向上させることで、血中滞留性を増加させることが示唆された。X 位に D-Glu, Y 位に AMBA を導入した ^{111}In]-RGD-DA6 は、 ^{111}In]-RGD-DA1 と比較しても血中滞留性が高く、新規リンカー技術が、ALB を有するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤の血中滞留性をさらに向上させることが示された。

投与 1 時間後において、 ^{111}In]-RGD-DA6, ^{111}In]-RGD-DA1, および ^{111}In]-DOTA-c(RGDfK) はいずれも同等の腫瘍集積を示し、それぞれ 4.6, 5.6, および 5.3% ID/g であった。一方で、投与 24, 48, および 96 時間後において、 ^{111}In]-RGD-DA6 がそれぞれ 7.9, 8.3, および 6.6% ID/g と、 ^{111}In]-RGD-DA1 (4.9, 4.9, および 3.2% ID/g) および ^{111}In]-DOTA-c(RGDfK) (2.1, 1.8, および 0.55% ID/g) と比較して有意に高い腫瘍集積を示した。これらの結果から、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤に ALB を導入することでその腫瘍集積が増加し、さらに X 位に D-Glu, Y 位に AMBA を導入することで、その腫瘍集積が一層向上することが示唆された。これらの知見は、PSMA 標的放射性薬剤における結果とも一致しており、新規リンカー技術が、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤の腫瘍集積向上に有効であることを示している。

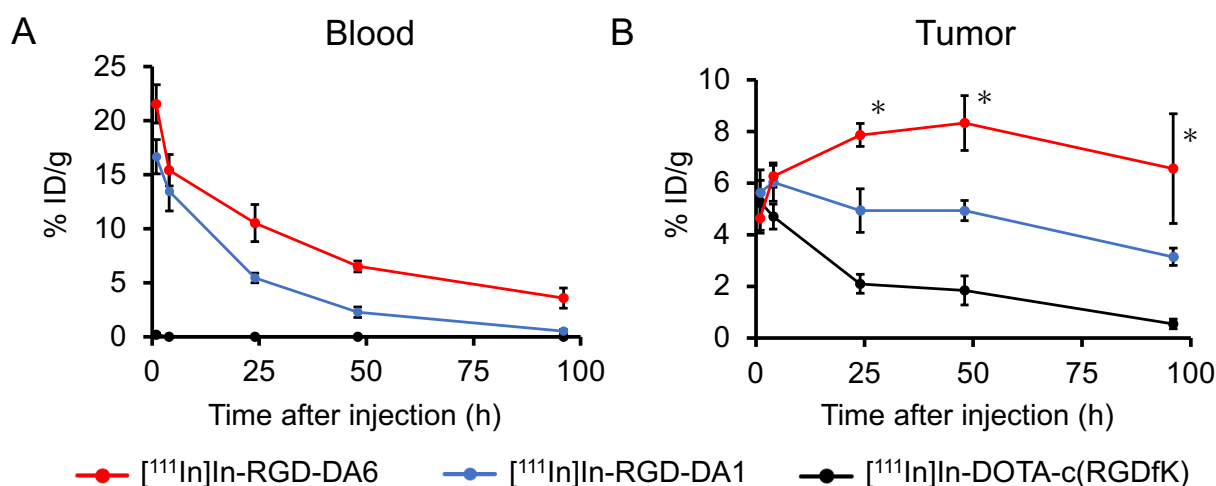


Figure 3-13. Comparison of radioactivity in the blood (A) and U87MG tumor (B) at 1, 4, 24, 48, and 96 h postinjection of ^{111}In]-RGD-DA6, ^{111}In]-RGD-DA1, and ^{111}In]-DOTA-c(RGDfK) into U87MG tumor-bearing mice. * $P < 0.05$ compared with ^{111}In]-RGD-DA1 and ^{111}In]-DOTA-c(RGDfK).

Table 3-9. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-RGD-DA6 into U87MG tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)				
	1	4	24	48	96
Blood	21.5 ± 1.8	15.4 ± 1.5	10.5 ± 1.7	6.5 ± 0.5	3.6 ± 0.93
Spleen	4.2 ± 0.50	4.2 ± 0.74	4.9 ± 0.72	4.2 ± 0.43	3.5 ± 1.2
Pancreas	2.6 ± 0.43	2.1 ± 0.37	2.2 ± 0.34	1.7 ± 0.08	1.3 ± 0.05
Stomach ^a	0.56 ± 0.13	0.54 ± 0.00	0.55 ± 0.06	0.35 ± 0.02	0.21 ± 0.03
Intestine	1.8 ± 0.06	1.7 ± 0.26	1.1 ± 0.20	0.82 ± 0.11	0.54 ± 0.08
Kidney	7.6 ± 1.3	7.1 ± 0.65	6.6 ± 0.97	5.0 ± 0.32	3.7 ± 0.75
Liver	4.8 ± 0.51	3.5 ± 0.63	2.7 ± 0.47	2.4 ± 0.13	1.8 ± 0.32
Heart	5.5 ± 0.54	4.5 ± 0.22	3.5 ± 0.16	2.6 ± 0.13	2.0 ± 0.42
Lung	11.3 ± 1.4	7.7 ± 1.6	6.6 ± 0.84	4.4 ± 0.46	3.0 ± 0.36
Brain	0.46 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.27 ± 0.01	0.21 ± 0.04	0.14 ± 0.04
Tumor	4.6 ± 0.46	6.3 ± 0.42	7.9 ± 0.45	8.3 ± 1.06	6.6 ± 2.1
Muscle	1.3 ± 0.05	1.5 ± 0.24	1.8 ± 0.32	1.1 ± 0.11	0.89 ± 0.05

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation of three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 3-10. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-RGD-DA1 into U87MG tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)				
	1	4	24	48	96
Blood	16.7 ± 1.6	13.5 ± 1.8	5.5 ± 0.45	2.3 ± 0.48	0.55 ± 0.15
Spleen	2.6 ± 0.48	2.8 ± 0.20	2.0 ± 0.21	1.8 ± 0.43	1.4 ± 0.13
Pancreas	2.4 ± 0.15	2.1 ± 0.31	1.0 ± 0.23	0.72 ± 0.19	0.44 ± 0.08
Stomach ^a	0.40 ± 0.11	0.48 ± 0.08	0.30 ± 0.12	0.16 ± 0.02	0.06 ± 0.01
Intestine	1.9 ± 0.16	2.9 ± 0.41	1.1 ± 0.05	0.38 ± 0.15	0.16 ± 0.04
Kidney	4.5 ± 0.39	4.3 ± 0.07	2.3 ± 0.20	1.5 ± 0.31	0.89 ± 0.17
Liver	4.0 ± 0.44	3.8 ± 0.17	2.1 ± 0.10	1.5 ± 0.21	1.2 ± 0.23
Heart	4.8 ± 0.41	3.7 ± 0.60	1.8 ± 0.27	1.1 ± 0.12	0.53 ± 0.11
Lung	8.2 ± 1.5	7.0 ± 0.83	3.3 ± 0.25	2.0 ± 0.58	0.71 ± 0.15
Brain	0.33 ± 0.04	0.30 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Tumor	5.6 ± 0.48	6.0 ± 0.75	4.9 ± 0.84	4.9 ± 0.39	3.2 ± 0.33
Muscle	1.6 ± 0.25	1.3 ± 0.49	0.65 ± 0.10	0.47 ± 0.05	0.33 ± 0.17

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation of three mice. ^aData are expressed as % ID.

Table 3-11. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-DOTA-c(RGDfK) into U87MG tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)				
	1	4	24	48	96
Blood	0.21 ± 0.13	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Spleen	1.7 ± 0.53	1.4 ± 0.13	1.1 ± 0.16	0.87 ± 0.10	0.72 ± 0.15
Pancreas	0.31 ± 0.08	0.25 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.03
Stomach ^a	0.36 ± 0.13	0.17 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.01
Intestine	3.6 ± 1.3	0.92 ± 0.14	0.39 ± 0.05	0.36 ± 0.13	0.21 ± 0.04
Kidney	2.5 ± 0.71	1.7 ± 0.34	0.78 ± 0.07	0.68 ± 0.07	0.44 ± 0.10
Liver	1.3 ± 0.28	1.0 ± 0.22	0.48 ± 0.11	0.41 ± 0.06	0.20 ± 0.06
Heart	0.47 ± 0.07	0.31 ± 0.07	0.17 ± 0.06	0.14 ± 0.02	0.08 ± 0.00
Lung	0.93 ± 0.41	0.59 ± 0.07	0.30 ± 0.10	0.17 ± 0.03	0.10 ± 0.06
Brain	0.10 ± 0.05	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Tumor	5.3 ± 1.2	4.7 ± 0.48	2.1 ± 0.37	1.8 ± 0.56	0.55 ± 0.18
Muscle	0.29 ± 0.07	0.17 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation of three mice. ^aData are expressed as % ID.

U87MG/PC-3 腫瘍移植モデルマウスにおけるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対するインビボ選択性評価

最も高い腫瘍集積性を示した ^{111}In -RGD-DA6 について、U87MG 腫瘍およびインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 低発現腫瘍である PC-3 腫瘍を両移植したモデルマウスを用いて、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対するインビボ選択性を評価した(**Figure 3-14, Table 3-12**).^{59, 61, 62} 投与 48 時間後において、 ^{111}In -RGD-DA6 は PC-3 腫瘍と比較して U87MG 腫瘍に有意に高い集積を示し、それぞれ 3.5 および 6.7% ID/g であった。以上より、 ^{111}In -RGD-DA6 はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 高発現腫瘍に対して選択的に集積することが示され、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤としてのインビボにおける有用性が示唆された。

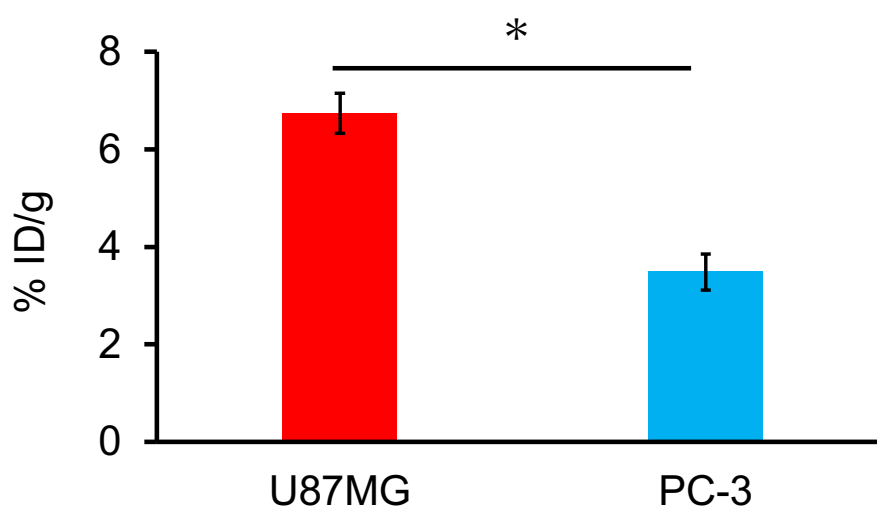


Figure 3-14. Comparison of the radioactivity in U87MG and PC-3 tumors at 48 h postinjection of ^{111}In -RGD-DA6 into U87MG and PC-3 tumor-bearing mice. * $P < 0.01$.

Table 3-12. Radioactivity of excised organs and tissues after intravenous injection of [^{111}In]In-RGD-DA6 into U87MG and PC-3 tumor-bearing mice.

Organ or tissue	Time after injection (h)
	48
Blood	5.2 ± 0.42
Spleen	4.6 ± 0.08
Pancreas	1.9 ± 0.35
Stomach ^a	0.58 ± 0.06
Intestine	1.1 ± 0.18
Kidney	4.5 ± 0.10
Liver	2.8 ± 0.30
Heart	3.1 ± 0.17
Lung	4.5 ± 0.28
Brain	0.22 ± 0.01
U87MG	6.7 ± 1.1
PC-3	3.5 ± 0.36
Muscle	1.4 ± 0.40

Data are expressed as % ID/g. Each value represents the mean $\pm$ standard deviation of four mice. ^aData are expressed as % ID.

3.5. 小括

本章では、2種類のアミノ酸リンカーの導入が PSMA 放射性薬剤の体内動態に与える影響を評価することを目的として、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA1}$ に対して D-Glu および AMBA を導入した $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ 、および導入位置を入れ替えた $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ を設計・合成した。さらに、D-Glu および AMBA を適切な配置で導入する新規リンカー技術の応用可能性を検証するため、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤 $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA6}$ を設計・合成した。アルブミン結合実験および体内放射能分布実験の結果、以下の知見が得られた。

- (1) アルブミン結合実験において、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ は $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ と比較して高いアルブミン結合性を示し、これまでに評価した ALB を有する PSMA 標的放射性薬剤の中で最も高い結合性を示した。
- (2) 体内放射能分布実験において、 $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA6}$ は $[^{111}\text{In}]\text{In-PNT-DA7}$ と比較して高い腫瘍集積を示し、従来の PSMA 標的放射性薬剤と比較して最も高い腫瘍集積を示した。
- (3) $[^{111}\text{In}]\text{In-RGD-DA6}$ は、新規リンカー技術を用いないインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤と比較して、アルブミン結合性および腫瘍集積性の両面で向上が認められた。

以上の結果より、新規リンカー技術を用いることで PSMA 標的放射性薬剤の腫瘍集積性を向上させることが可能であり、さらに本技術はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤の開発においても有用であることが示された。

結 語

本研究では、放射性薬剤のアルブミン結合性と体内動態との関係性を評価することで、アルブミンとの相互作用を利用した新規がん標的放射性薬剤の開発を行い、以下の成果を得た。

1. 第1章では、PSMA 標的放射性薬剤のアルブミン結合性と腫瘍集積性の関係性を評価するため、HSA と共有結合を形成する PSMA 標的放射性薬剤 ^{111}In -PNT-DM-HSA を設計・合成し、ALB を有する ^{111}In -PNT-DA1 およびアルブミン結合ユニットを有さない ^{111}In -PSMA-617 と比較した。PSMA 高発現腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験の結果、 ^{111}In -PNT-DA1 は他の化合物と比較して顕著な腫瘍集積を示し、ALB による可逆的なアルブミンとの相互作用が腫瘍集積性の向上に有用であることが示された。
2. 第2章では、 ^{111}In -PNT-DA1 を基盤とし、アルブミン結合性を調節する分子設計としてアミノ酸リンカーの導入に着目した。水溶性アミノ酸 D-Glu または脂溶性アミノ酸 AMBA を1つ導入したモノリンカー体(^{111}In -PNT-DA2-5)を設計・合成し、アルブミン結合性および腫瘍/腎臓比の変化を評価した結果、アミノ酸リンカーを1つ導入することで ^{111}In -PNT-DA1 の体内動態を制御可能であることが示された。
3. 第3章では、複数のアミノ酸リンカーの導入が PSMA 標的放射性薬剤の体内動態に与える影響を評価するため、 ^{111}In -PNT-DA1 に D-Glu および AMBA を導入した ^{111}In -PNT-DA6 および導入位置を入れ換えた ^{111}In -PNT-DA7 を設計・合成した。アルブミン結合性および腫瘍集積性の評価により、 ^{111}In -PNT-DA6 は ^{111}In -PNT-DA7 よりも高い値を示し、2種類のアミノ酸リンカーの配置が体内動態に影響を与えることが示唆された。また、 ^{111}In -PNT-DA6 は従来の PSMA 標的放射性薬剤と比較して最も高いアルブミン結合性および腫瘍集積性を示した。加えて、D-Glu および AMBA を適切な配置で導入する新規リンカー技術の応用可能性を検証するため、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を標的とした放射性薬剤 ^{111}In -RGD-DA6 を設計・合成した。アルブミン結合性および腫瘍集積性の評価より、 ^{111}In -RGD-DA6 は対照化合物と比較して高い値を示し、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 標的放射性薬剤の開発においても新規リンカー技術が有用であることが示された。

以上、本研究はアルブミンとの相互作用を利用した新規がん標的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のさらなる発展に向けて有益な情報を提供するものと考えられる。

引用文献

- (1) Ono, M. Radiotheranostics based on chemical control of radioactivity pharmacokinetics. *Yakugaku Zasshi*, **2024**, *144* (3), 291–297.
- (2) Ogawa, K. Development of diagnostic and therapeutic probes with controlled pharmacokinetics for use in radiotheranostics. *Chem. Pharm. Bull.*, **2019**, *67* (9), 897–903.
- (3) Lau, J.; Jacobson, O.; Niu, G.; Lin, K. S.; Bénard, F.; Chen, X. Bench to bedside: albumin binders for improved cancer radioligand therapies. *Bioconjug. Chem.*, **2019**, *30* (3), 487–502.
- (4) Brandt, M.; Cardinale, J.; Giammei, C.; Guarrochena, X.; Happl, B.; Jouini, N.; Mindt, T. L. Mini-review: Targeted radiopharmaceuticals incorporating reversible, low molecular weight albumin binders. *Nucl. Med. Biol.*, **2019**, *70*, 46–52.
- (5) Bandara, N.; Jacobson, O.; Mpoy, C.; Chen, X.; Rogers, B. E. Novel structural modification based on Evans blue dye to improve pharmacokinetics of a somatostatin-receptor-based theranostic agent. *Bioconjug. Chem.*, **2018**, *29* (7), 2448–2454.
- (6) Echigo, H.; Mishiro, K.; Munekane, M.; Fuchigami, T.; Washiyama, K.; Takahashi, K.; Kitamura, Y.; Wakabayashi, H.; Kinuya, S.; Ogawa, K. Development of probes for radiotheranostics with albumin binding moiety to increase the therapeutic effects of astatine-211 (^{211}At). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2024**, *51* (2), 412–421.
- (7) 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* (1), 124–131.
- (8) Tsuchihashi, S.; Nakashima, K.; Tarumizu, Y.; Ichikawa, H.; Jinda, H.; Watanabe, H.; Ono, M. Development of novel $^{111}\text{In}/^{225}\text{Ac}$ -labeled agent targeting PSMA for highly efficient cancer radiotheranostics. *J. Med. Chem.*, **2023**, *66* (12), 8043–8053.
- (9) Jeitner, T. M.; Babich, J. W.; Kelly, J. M. Advances in PSMA theranostics. *Transl. Oncol.*, **2022**, *22*, 101450.
- (10) Minner, S.; Wittmer, C.; Graefen, M.; Salomon, G.; Steuber, T.; Haese, A.; Huland, H.; Bokemeyer, C.; Yekebas, E.; Dierlamm, J.; Balabanov, S.; Kilic, E.; Wilczak, W.; Simon, R.; Sauter, G.; Schlomm, T. High level PSMA expression is associated with early PSA recurrence in surgically treated prostate cancer. *Prostate*, **2011**, *71* (3), 281–288.
- (11) Desgrosellier, J. S.; Cheresch, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10* (1), 9–22.
- (12) Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, **2024**, *74* (3), 229–263.

- (13) Zhao, J. L.; Antonarakis, E. S.; Cheng, H. H.; George, D. J.; Aggarwal, R.; Riedel, E.; Sumiyoshi, T.; Schonhoft, J. D.; Anderson, A.; Mao, N.; Haywood, S.; Decker, B.; Curley, T.; Abida, W.; Feng, F. Y.; Knudsen, K.; Carver, B.; Lacouture, M. E.; Wyatt, A. W.; Rathkopf, D. Phase 1b study of enzalutamide plus CC-115, a dual mTORC1/2 and DNA-PK inhibitor, in men with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *Br. J. Cancer*, **2024**, *130* (1), 53–62.
- (14) Yan, Y.; Zhuo, H.; Li, T.; Zhang, J.; Tan, M.; Chen, Y. Advancements in PSMA ligand radiolabeling for diagnosis and treatment of prostate cancer: a systematic review. *Front. Oncol.*, **2024**, *14*, 1373606.
- (15) Hennrich, U.; Eder, M. [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 (Pluvicto(TM)): The first FDA-approved radiotherapeutic for treatment of prostate cancer. *Pharmaceuticals*, **2022**, *15* (10), 1292.
- (16) Kuo, H. T.; Lin, K. S.; Zhang, Z.; Uribe, C. F.; Merckens, H.; Zhang, C.; Bénard, F. ¹⁷⁷Lu-labeled albumin-binder-conjugated PSMA-targeting agents with extremely high tumor uptake and enhanced tumor-to-kidney absorbed dose ratio. *J. Nucl. Med.*, **2021**, *62* (4), 521–527.
- (17) Wen, X.; Zhao, T.; Yang, H.; Shi, M.; Wee, X. J.; Fu, J.; Lin, M.; Zhang, Z.; Zou, M.; Green, D.; Wu, X.; Chen, X.; Zhang, J. Development of [²²⁵Ac]Ac-LNC1011 for targeted alpha-radionuclide therapy of prostate cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2025**, *52* (8), 2841–2855.
- (18) Hu, H.; Quintana, J.; Weissleder, R.; Parangi, S.; Miller, M. Deciphering albumin-directed drug delivery by imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2022**, *185*, 114237.
- (19) Yi, C.; Xie, F.; Xu, X.; Xiao, D.; Zhou, X.; Cheng, M. Guanidine-modified albumin-MMAE conjugates with enhanced endocytosis ability. *Drug Deliv.*, **2023**, *30* (1), 2219433.
- (20) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.*, **1999**, *12* (6), 439–446.
- (21) Liu, T.; Liu, C.; Ren, Y.; Guo, X.; Jiang, J.; Xie, Q.; Xia, L.; Wang, F.; Zhu, H.; Yang, Z. Development of an albumin-based PSMA probe with prolonged half-life. *Front. Mol. Biosci.*, **2020**, *7*, 585024.
- (22) Nakashima, K.; Iikuni, S.; Watanabe, H.; Ono, M. Development of a novel radiotheranostic platform with a DOTA-based trifunctional chelating agent. *Chem. Commun.*, **2021**, *57* (52), 6432–6435.
- (23) Eisenwiener, K. P.; Powell, P.; Mäcke, H. R. A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labelling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10* (18), 2133–2135.
- (24) Abiraj, K.; Jaccard, H.; Kretzschmar, 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**, *28* (28), 3248–3250.
- (25) Iikuni, S.; Tarumizu, Y.; Nakashima, K.; Higaki, Y.; Ichikawa, H.; Watanabe, H.; Ono, M. Radiotheranostics using a novel ²²⁵Ac-labeled radioligand with improved pharmacokinetics targeting prostate-specific membrane antigen. *J. Med. Chem.*, **2021**, *64* (18), 13429–13438.

- (26) Leggio, C.; Galantini, L.; Pavel, N. V. About the albumin structure in solution: cigar Expanded form *versus* heart Normal shape. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2008**, *10* (45), 6741–6750.
- (27) Baldwin, A. D.; Kiick, K. L. Tunable degradation of maleimide-thiol adducts in reducing environments. *Bioconjug. Chem.*, **2011**, *22* (10), 1946–1953.
- (28) Liu, Y.; Chen, M.; Bian, G.; Liu, J.; Song, L. Spectroscopic investigation of the interaction of the toxicant, 2-naphthylamine, with bovine serum albumin. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **2011**, *25* (6), 362–368.
- (29) Reissig, F.; Zarschler, K.; Novy, Z.; Petrik, M.; Bendova, K.; Kurfurstova, D.; Bouchal, J.; Ludik, M. C.; Brandt, F.; Kopka, K.; Khoylou, M.; Pietzsch, H. J.; Hajdich, M.; Mamat, C. Modulating the pharmacokinetic profile of Actinium-225-labeled macropa-derived radioconjugates by dual targeting of PSMA and albumin. *Theranostics*, **2022**, *12* (17), 7203–7215.
- (30) Kanazaki, K.; Sano, K.; Makino, A.; Takahashi, A.; Deguchi, J.; Ohashi, M.; Temma, T.; Ono, M.; Saji, H. Development of human serum albumin conjugated with near-infrared dye for photoacoustic tumor imaging. *J. Biomed. Opt.*, **2014**, *19* (9), 96002.
- (31) Wen, X.; Zeng, X.; Liu, J.; Zeng, X.; Zhang, Y.; Cheng, X.; Huang, J.; Li, Y.; Zhuang, R.; Zhang, X.; Guo, Z. *In vivo* comparative study of radioiodinated folate receptor targeting albumin probes for atherosclerosis plaque imaging. *Bioconjug. Chem.*, **2023**, *34* (12), 2387–2397.
- (32) Rohira, H.; Arora, A.; Kaur, P.; Chugh, A. Peptide cargo administration: current state and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2023**, *107* (10), 3153–3181.
- (33) Chen, X.; Zaro, J. L.; Shen, W. C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, *65* (10), 1357–1369.
- (34) George, R. A.; Heringa, J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng.*, **2002**, *15* (11), 871–879.
- (35) Lindeman, S. D.; Booth, O. C.; Tudi, P.; Schleinkofer, T. C.; Moss, J. N.; Kearney, N. B.; Mukkamala, R.; Thompson, L. K.; Modany, M. A.; Srinivasarao, M.; Low, P. S. FAP radioligand linker optimization improves tumor dose and tumor-to-healthy organ ratios in 4T1 syngeneic model. *J. Med. Chem.*, **2024**, *67* (14), 11827–11840.
- (36) Lee, B. S.; Kim, M. H.; Chu, S. Y.; Jung, W. J.; Jeong, H. J.; Lee, K.; Kim, H. S.; Kim, M. H.; Kil, H. S.; Han, S. J.; Lee, Y. J.; Lee, K. C.; Lim, S. M.; Chi, D. Y. Improving theranostic gallium-68/lutetium-177-labeled PSMA inhibitors with an albumin binder for prostate cancer. *Mol. Cancer. Ther.*, **2021**, *20* (12), 2410–2419.
- (37) Deberle, L. M.; Benešová, M.; Umbricht, C. A.; Borgna, F.; Büchler, M.; Zhernosekov, K.; Schibli, R.; Müller, C. Development of a new class of PSMA radioligands comprising ibuprofen as an albumin-binding entity. *Theranostics*, **2020**, *10* (4), 1678–1693.

- (38) Rousseau, E.; Lau, J.; Zhang, Z.; Uribe, C. F.; Kuo, H. T.; Zhang, C.; Zeisler, J.; Colpo, N.; Lin, K. S.; Bénard, F. Effects of adding an albumin binder chain on [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTATATE. *Nucl. Med. Biol.*, **2018**, *66*, 10–17.
- (39) 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* (11), 1841–1851.
- (40) Bene  ov  , M.; Umbricht, C. A.; Schibli, R.; M  ller, C. Albumin-binding PSMA ligands: optimization of the tissue distribution profile. *Mol. Pharm.*, **2018**, *15* (3), 934–946.
- (41) Bene  ov  , M.; Guzik, P.; Deberle, L. M.; Busslinger, S. D.; Landolt, T.; Schibli, R.; M  ller, C. Design and evaluation of novel albumin-binding folate radioconjugates: systematic approach of varying the linker entities. *Mol. Pharm.*, **2022**, *19* (3), 963–973.
- (42) Borgna, F.; Deberle, L. M.; Busslinger, S. D.; Tschan, V. J.; Walde, L. M.; Becker, A. E.; Schibli, R.; M  ller, C. Preclinical investigations to explore the difference between the diastereomers [¹⁷⁷Lu]Lu-SibuDAB and [¹⁷⁷Lu]Lu-RibuDAB toward prostate cancer therapy. *Mol. Pharm.*, **2022**, *19* (7), 2105–2114.
- (43) Nakashima, K.; Watanabe, H.; Ono, M. Development of novel trifunctional chelating agents that enhance tumor retention of radioimmunoconjugates. *J. Med. Chem.*, **2023**, *66* (18), 12812–12827.
- (44) Echigo, H.; Munekane, M.; Fuchigami, T.; Washiyama, K.; Mishiro, K.; Wakabayashi, H.; Takahashi, K.; Kinuya, S.; Ogawa, K. Optimizing the pharmacokinetics of an ²¹¹At-labeled RGD peptide with an albumin-binding moiety via the administration of an albumin-binding inhibitor. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2024**, *51* (9), 2663–2671.
- (45) Dumelin, C. E.; Tr  ssel, S.; Buller, F.; Trachsel, E.; Bootz, F.; Zhang, Y.; Mannocci, L.; Beck, S. C.; Drumea-Mirancea, M.; Seeliger, M. W.; Baltes, C.; M  ggler, 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* (17), 3196–3201.
- (46) Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T.; Otagiri, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, **2002**, *25* (6), 695–704.
- (47) Zorzi, A.; Linciano, S.; Angelini, A. Non-covalent albumin-binding ligands for extending the circulating half-life of small biotherapeutics. *Medchemcomm*, **2019**, *10* (7), 1068–1081.
- (48) Iikuni, S.; Tarumizu, Y.; Tsuchihashi, S.; Ohara, T.; Watanabe, H.; Ono, M. Synthesis and evaluation of novel ¹¹¹In-labeled picolinic acid-based radioligands containing an albumin binder for development of a radiotheranostic platform. *Mol. Pharm.*, **2022**, *19* (8), 2725–2736.
- (49) Eder, A. C.; Matthias, J.; Schäfer, M.; Schmidt, J.; Steinacker, N.; Bauder-W  st, U.; Domogalla, L. C.; Roscher, M.; Haberkorn, U.; Eder, M.; Kopka, K. A new class of PSMA-617-based hybrid molecules for preoperative imaging and intraoperative fluorescence navigation of prostate cancer. *Pharmaceuticals*, **2022**, *15* (3), 267.

- (50) Kelly, J. M.; Amor-Coarasa, A.; Ponnala, S.; Nikolopoulou, A.; Williams, C., Jr.; DiMagno, S. G.; Babich, J. W. Albumin-binding PSMA ligands: implications for expanding the therapeutic window. *J. Nucl. Med.*, **2019**, *60* (5), 656–663.
- (51) Wu, Y.; Zhang, X.; Xiong, Z.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X. microPET imaging of glioma integrin $\alpha_v\beta_3$ expression using ^{64}Cu -labeled tetrameric RGD peptide. *J. Nucl. Med.*, **2005**, *46* (10), 1707–1718.
- (52) Danhier, F.; Le Breton, A.; Pr  at V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol. Pharm.*, **2012**, *9* (11), 2961–2973.
- (53) Zhao, L.; Chen, H.; Guo, Z.; Fu, K.; Yao, L.; Fu, L.; Guo, W.; Wen, X.; Jacobson, O.; Zhang, X.; Sun, L.; Wu, H.; Lin, Q.; Chen, X. Targeted radionuclide therapy in patient-derived xenografts using ^{177}Lu -EB-RGD. *Mol. Cancer Ther.*, **2020**, *19* (10), 2034–2043.
- (54) Chen, H.; Zhao, L.; Fu, K.; Lin, Q.; Wen, X.; Jacobson, O.; Sun, L.; Wu, H.; Zhang, X.; Guo, Z.; Lin, Q.; Chen, X. Integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radionuclide therapy combined with immune checkpoint blockade immunotherapy synergistically enhances anti-tumor efficacy. *Theranostics*, **2019**, *9* (25), 7948–7960.
- (55) Chen, H.; Jacobson, O.; Niu, G.; Weiss, I. D.; Kiesewetter, D. O.; Liu, Y.; Ma, Y.; Wu, H.; Chen, X. Novel "add-on" molecule based on evans blue confers superior pharmacokinetics and transforms drugs to theranostic agents. *J. Nucl. Med.*, **2017**, *58* (4), 590–597.
- (56) Ogawa, K.; Yu, J.; Ishizaki, A.; Yokokawa, M.; Kitamura, M.; Kitamura, Y.; Shiba, K.; Odani, A. Radiogallium complex-conjugated bifunctional peptides for detecting primary cancer and bone metastases simultaneously. *Bioconjug. Chem.*, **2015**, *26* (8), 1561–1570.
- (57) Yoshimoto, M.; Ogawa, K.; Washiyama, K.; Shikano, N.; Mori, H.; Amano, R.; Kawai, K. $\alpha_v\beta_3$ Integrin-targeting radionuclide therapy and imaging with monomeric RGD peptide. *Int. J. Cancer*, **2008**, *123* (3), 709–715.
- (58) Echigo, H.; Mishiro, K.; Munekane, M.; Fuchigami, T.; Kitamura, Y.; Kinuya, S.; Ogawa, K. Development and evaluation of a theranostic probe with RGD peptide introduced platinum complex to enable tumor-specific accumulation. *Bioorg. Med. Chem.*, **2022**, *70*, 116919.
- (59) Nakano, D.; Watanabe, H.; Saito, K.; Ono, M. A novel bifunctional chelating agent for tyrosine-specific radiolabeling of peptides and proteins. *Bioconjug. Chem.*, **2024**, *35* (10), 1577–1586.
- (60) Yang, G.; Gao, H.; Luo, C.; Zhao, X.; Luo, Q.; Shi, J.; Wang, F. Palmitic acid-conjugated radiopharmaceutical for integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radionuclide therapy. *Pharmaceutics*, **2022**, *14* (7), 1327.
- (61) Shimizu, Y.; Ando, M.; Iikuni, S.; Watanabe, H.; Ono, M. Development of a hydroxamamide-based bifunctional chelating agent to prepare technetium-99m-labeled bivalent ligand probes. *Sci. Rep.*, **2021**, *11* (1), 18714.
- (62) Zhou, Y.; Kim, Y. S.; Chakraborty, S.; Shi, J.; Gao, H.; Liu, S. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled cyclic RGD peptides for noninvasive monitoring of tumor integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. *Mol. Imaging*, **2011**, *10* (5), 386–397.

学 術 雑 誌 公 表 論 文

第 1 章 前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤のアルブミン結合性と 腫瘍集積性との関係性に関する評価

Fundamental evaluation regarding the relationship between albumin-binding and tumor accumulation of PSMA-targeting radioligands.

Nobuki Kazuta, Shohei Tsuchihashi, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono.

2024 年 7 月発行 *Annals of Nuclear Medicine* 第 38 巻 574 ページ–583 ページ

DOI: 10.1007/s12149-024-01930-8 に掲載

第 2 章 アミノ酸リンカーが前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤の体内動態に与える影響の検証

Effect of linker entities on pharmacokinetics of ^{111}In -labeled prostate-specific membrane antigen-targeting ligands with an albumin binder.

Nobuki Kazuta, Kazuma Nakashima, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono.

2024 年 7 月発行 *ACS Pharmacology & Translational Science* 第 7 巻 2401 ページ–2413 ページ

DOI: 10.1021/acsptsci.4c00257 に掲載

第 3 章 新規リンカー技術を用いた前立腺特異的膜抗原標的放射性薬剤の開発とその応用

Novel radiotheranostic ligands targeting prostate-specific membrane antigen based on dual linker approach.

Nobuki Kazuta, Kazuma Nakashima, Yuta Tarumizu, Takumi Sato, Yoshifumi Maya, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono.

2025 年 1 月発行 *Molecular Pharmaceutics* 第 22 巻 377 ページ–386 ページ

DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.4c00974 に掲載

Development of novel integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radioligand for enhanced tumor accumulation.

Nobuki Kazuta, Kazuma Nakashima, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono.

2025 年 7 月発行 *ACS Medicinal Chemistry Letters* 第 16 巻 1346 ページ–1353 ページ

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.5c00231 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、多くの有益な御助言と御協力を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 渡邊 裕之 講師ならびに中島 一磨 助教に厚く御礼申し上げます。

懇切なる御指導を戴きました、飯國 慎平 博士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 尾上 遼太郎 博士、赤坂 貴浩 修士、一ノ瀬 貴允 修士、甚田 洸希 修士、山口 恵聖 修士、井川 実穂 学士、小原 嵩貴 学士、齋藤 浩輔 学士、土橋 昌平 学士、中野 大樹 学士、田中 真央 学士、長谷川 拓真 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。

本研究の一部は、沢井奨学金の支給を受けて実施されました。澤井健造氏および沢井製薬株式会社の関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

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