

令和元年6月10日現在

機関番号：12501  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2018  
課題番号：17K16426  
研究課題名(和文) プレターゲティング法による<sup>211</sup>Atの 線治療への応用

研究課題名(英文) Pretargeting system for targeted alpha therapy using <sup>211</sup>At

## 研究代表者

鈴木 博元 (Suzuki, Hiroyuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：00707648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：<sup>211</sup>Atは標的 線治療への応用が期待されるが、薬剤開発において<sup>211</sup>Atを安定に結合できる標識法に限られることが問題となる。本研究では、まず生体内でも安定な新規<sup>211</sup>At標識法の開発を行い、その評価を行った。ネオペンチルハライドを母体とする標識法により作製した<sup>211</sup>At標識モデル化合物はin vitro, in vivoのどちらにおいても安定に存在した。本標識法を用いて、プレターゲティング用薬剤としての応用が期待できる候補薬剤を開発した。本薬剤を用いたプレターゲティング法による<sup>211</sup>Atの 線治療の実現が期待される。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

現在 線治療の有用性が世界的にも認知され、骨転移以外の癌への 線治療の応用が強く望まれている。本研究は、<sup>211</sup>Atによる 線治療に有用な戦略の一つであるプレターゲティングの実現への貢献が期待される。プレターゲティング法は多様な抗体に対して使用可能な基盤技術であり、本研究成果は様々な癌治療につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：<sup>211</sup>At is an alpha-emitting radionuclide appropriate for medical use. To expand the application of <sup>211</sup>At-labeled compounds to targeted alpha therapy, we developed neopentyl derivatives as a novel scaffold for astatination. The model neopentyl derivative radiolabeled with <sup>211</sup>At was stable both in vitro and in vivo. The results showed that the neopentyl derivatives would serve as a useful scaffold to develop <sup>211</sup>At-labeled compounds. Thus, we designed a tetrazine derivative including neopentyl astatide structure. In the preliminary study using <sup>125</sup>I, the tetrazine derivative showed biodistribution appropriate for pretargeting system. These findings indicate that the novel tetrazine derivative would be useful for pretargeting system using <sup>211</sup>At.

研究分野：放射性医薬品

キーワード：標的 線治療 アスタチン-211 プレターゲティング 放射性ヨウ素 テトラジン ネオペンチル ヨウ素-125

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

海外ではすでに高い治療効果が認められていた世界初の $\alpha$ 線放射放射性医薬品、塩化ラジウム-223 ( $^{223}\text{RaCl}_2$ ) が2016年3月、本邦においても認可された[1]。 $^{223}\text{RaCl}_2$ の適応は癌の骨転移に限定されることから、高い治療効果が実証された $\alpha$ 線治療を他の癌治療に応用するための研究に注目が集まっている。アスタチン-211 ( $^{211}\text{At}$ )はハロゲン元素であるため、癌親和性を有する分子に共有結合で標識可能である。また、 $^{211}\text{At}$ は安定同位体に壊変するまでの二通りの壊変過程、いずれにおいても $\alpha$ 壊変を一回のみ経由する。複数回 $\alpha$ 壊変する核種では、生成する子孫核種の結合特性が親核種と異なるため、子孫核種が標識母体から遊離し、正常組織に障害を与えることが懸念される。これに対して、 $^{211}\text{At}$ は子孫核種の動態制御を考慮する必要性が少ない点で薬剤開発への応用性に優れている。

抗体が持つ高い腫瘍特異性と親和性は、標的組織に $^{211}\text{At}$ を送達するための運搬体として有効であり、すでに一部は臨床試験も実施されている[2]。しかし、半減期が7.2時間と比較的短い $^{211}\text{At}$ では、抗体などの高分子よりも速やかに移行できる低分子への応用が適切である。これに対して、プレターゲティング法では、抗体を前投与し、時間経過により腫瘍細胞への集積と正常組織からのクリアランスが十分に達成された後、 $^{211}\text{At}$ 標識低分子化合物を投与する(図1)。このとき、抗体と低分子化合物のそれぞれに、互いに非常に高い反応性を示す分子を導入しておけば、その強力な結合親和性を介して、抗体が結合した腫瘍組織選択的に $^{211}\text{At}$ を送達することが可能となる。 $^{211}\text{At}$ の運搬体として使用する薬剤は低分子化合物であり、速やかに腫瘍組織に集積する。また、抗体が持つ高い腫瘍特異性と親和性を利用して腫瘍へ $^{211}\text{At}$ を集積可能であり、効果が高く、安全な治療が期待できる。以上の点から、プレターゲティング法は $^{211}\text{At}$ による $\alpha$ 線治療に非常に有効な戦略である。

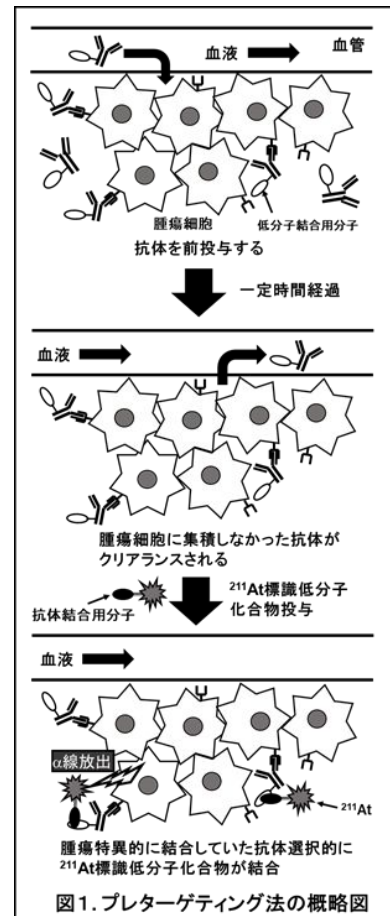


図1. プレターゲティング法の概略図

### 2. 研究の目的

$^{211}\text{At}$ によるプレターゲティングの有用性を期待して、1990年代からすでに $^{211}\text{At}$ 標識ビオチンの研究開発が実施されているが、プレターゲティングの実現には至っていない[3]。これは、これまでに開発された $^{211}\text{At}$ 標識ビオチンでは、安定性が低い[3]、または腎臓などの正常組織への集積・滞留が観察されたためである[4]。従って、安定であり、かつ正常組織への集積・滞留を示さない $^{211}\text{At}$ 標識方法を開発することができれば、プレターゲティングの実現可能性が大きく向上する。先行研究にて、 $^{211}\text{At}$ 2-アスタト-メチル-L-フェニルアラニン(2-AAMP)が生体内でも安定に存在し、かつ正常組織への集積を示さず、生体内から速やかにクリアランスされたことから、 $^{211}\text{At}$ 標識フェニルアラニン誘導体を標識母体とすることで、安定かつ正常組織への集積を示さない $^{211}\text{At}$ 標識低分子化合物を開発できる公算は高く、プレターゲティングの実現も十分に可能であると考えられた。そこで本研究では、 $^{211}\text{At}$ を用いたプレターゲティング法による $\alpha$ 線治療の実現を目的として、上述のプレターゲティング用新規 $^{211}\text{At}$ 標識薬剤を作製し、プレターゲティング法への応用性を検証する。

### 3. 研究の方法

本研究では、免疫原性の報告されているビオチン-アビジンシステムではなく、テトラジンとtrans-シクロオクテンを用いる逆電子要請型Diels-Alder反応によるプレターゲティングシステムへの $^{211}\text{At}$ の応用を計画した。本システムは近年、様々な検討が実施されており、ある程度確立した手法である。しかし、本プレターゲティングシステムを $^{211}\text{At}$ に展開する場合には、 $^{211}\text{At}$ を安定に結合し、かつプレターゲティング用薬剤の動態を損なわない $^{211}\text{At}$ 標識法がないことが問題となる。そこで、2-AAMPが生体内で安定に存在することに着目し、2-AAMPを介してテトラジンを結合した薬剤を考案した。

$^{211}\text{At}$ による評価に先立ちAtの同族元素であり、入手及び取り扱いの容易なヨウ素-125 ( $^{125}\text{I}$ )を用いて薬剤の評価を行った。2-AAMPの構造を模して $^{125}\text{I}$ 2-ヨード-メチル-L-フェニルアラニン(2-IAMP)を標識部位とし、コハク酸を介して2-IAMPのアミノ基とテトラジンから伸長したアミノ基を結合した薬剤の体内動態を検討した。しかし、体内動態がプレターゲティング用薬剤としては不相当であると考えられたため、体内動態を制御する目的で水溶性のリンカーとしてトリグルタミン酸を導入した薬剤を作製した。得られた薬剤の体内動態をリンカーなしの薬剤と比較検討した。

また、 $^{211}\text{At}$ を安定に結合できる別の標識母体として、ネオペンチル構造に着目し、標識母体

としての評価を実施した。候補化合物として、二種類の構造を設計・合成し、評価に用いた(図2)。<sup>211</sup>At 標識ネオペンチル化合物に脱アスタチンが生じる機構としては、求核置換反応によるものと、CYP による酸化代謝が考えられる。そこで、まず放射性ヨウ素標識化合物を用いて、これらの反応に対する安定性の評価を行った。生体内で代表的な求核性物質であるグルタチオン溶液中の安定性を評価した。また、CYP による代謝を評価するため、マウス及びヒト、ミクロソーム溶液中、NADPH 再生系により CYP を活性化させることで、安定性の評価を行った。また、今回評価に用いたニトロイミダゾール誘導体の中には、水酸基を有する化合物においてグルクロン酸抱合が起こるものが報告されている。そこで、ミクロソーム溶液中でグルクロン酸転移酵素を活性化した評価系も実施した。最終的に二種の化合物を正常マウスに投与し、体内動態の検討、及び尿分析を行い、生体内安定性を検討した。さらに、安定であることを認められた放射性ヨウ素標識化合物については、放射性ヨウ素を <sup>211</sup>At に変換し、同様の実験系により安定性の評価を行った。

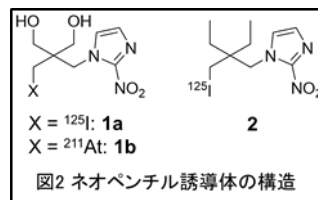
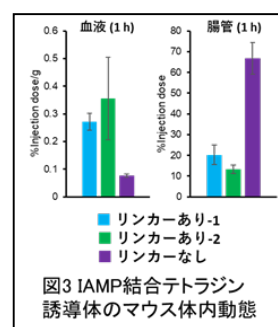


図2 ネオペンチル誘導体の構造

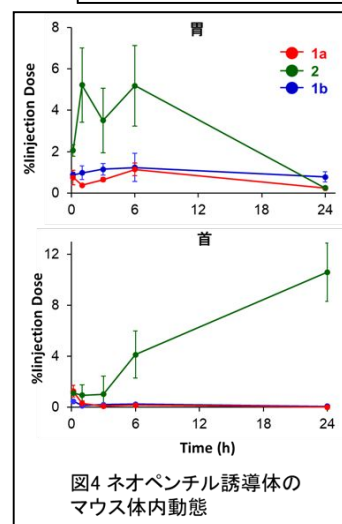
上記評価系において、ネオペンチル構造においても <sup>211</sup>At を安定に結合できることを認められたため、ネオペンチル構造を標識母体とする <sup>211</sup>At 標識テトラジン誘導体を設計し、<sup>125</sup>I 標識母体で基礎検討を実施した。

#### 4. 研究成果

2-IAMP を標識母体とするテトラジン誘導体として、コハク酸のみを介して作製した薬剤は正常マウス投与後に血液から急速に消失し、腸管に集積した。水溶性リンカーを導入した薬剤は <sup>125</sup>I 標識後、HPLC にて二本のピークが観察された。非放射性ヨウ素体を作製して質量分析を行った結果、両ピークは異性体であることが示されたが、異性体が生じた要因は不明であった。両ピークをそれぞれ単離して評価したところ、どちらの薬剤も血液クリアランスの延長、腸管などの正常組織への集積低減が観察された(図3)。以上より、トリグルタミン酸リンカーを介した薬剤は 2-IAMP を母体とするプレターゲティング用薬剤に適した体内動態を示した。

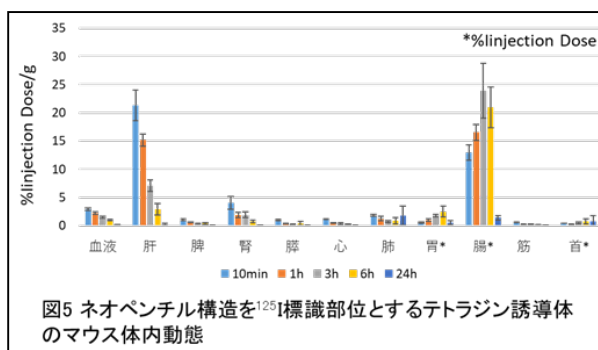


また、<sup>211</sup>At を安定に結合可能な標識母体の候補として、ネオペンチル構造の評価を行った。化合物 **1a**、**2** とも GSH 溶液中で 24 時間安定に存在したことから、ネオペンチルハライドは求核置換反応に安定であることが示された。一方で、CYP による代謝安定性は両化合物間で異なり、**1a** は非常に安定であったが、**2** は完全に代謝された。**2** の代謝物を分析したところ、代謝物中に I が観察された。**1a** はミクロソーム溶液を用いた検討によりグルクロン酸抱合を受けることが示されたが、得られたグルクロン酸抱合体もまた CYP による代謝に対して安定であった。両化合物を正常マウスに投与したところ、*in vitro* の実験結果を反映し、**1a** は I が集積することが知られている胃や甲状腺への集積が低値であった(図4)。一方で、**2** は胃や甲状腺に集積し、尿中に排泄された化学形を分析したところ、そのほとんどが I として排泄されていた。**1a** の尿分析では、I がほとんど観察されず、主な放射性代謝物はグルクロン酸抱合体であった。以上より、水酸基を二つ有するネオペンチルハライド構造は生体内で安定であることが示唆された。



そこで、**1a** の構造を <sup>211</sup>At に展開した **1b** を作製し、**1a** と同様の実験により安定性を評価した。**1b** は **1a** と同様、GSH による求核置換反応、及び CYP 代謝に対して安定であった。正常マウスに投与した場合も胃や甲状腺への集積は低値を示したことから(図4)、水酸基を二つ有するネオペンチルハライド構造は <sup>211</sup>At 誘導体に展開した場合でも生体内で安定であることが示された。

本結果を受けて、ネオペンチル構造を <sup>211</sup>At 標識母体として有するテトラジン誘導体を設計し、その先行研究として <sup>125</sup>I 標識母体を作製し、正常マウス体内動態を検討した。本薬剤はプレターゲティング薬剤として適度な血液クリアランスを示し、胃や甲状腺への集積は低値であった(図5)。本研究では、<sup>211</sup>At によるプレターゲティングで問題となっていた低分子化合物の安定性を改善可能な薬剤の導出に成功した。本研究結果によりプレターゲティング用



薬剤をはじめとする  $^{211}\text{At}$  標識低分子化合物の実用性が大きく改善されることが期待できる。今後は実際にプレターゲティングに応用することで、本薬剤の有用性を検証する予定である。

< 引用文献 >

- [1] Parker C., et al. The New England Journal of Medicine, 2013 (369) 213-223.
- [2] Zalutsky M. R., et al. Journal of Nuclear Medicine, 2008 (49) 30-38.
- [3] Catherine F., et al. Nuclear Medicine and Biology, 1998 (25) 81-88.
- [4] Wilbur D. S., et al. Bioconjugate Chemistry, 2009 (20) 591-602.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

貝塚祐太、鈴木博元、田中浩士、龍田真帆、鷺谷奈菜、佐藤由衣、上原知也、荒野泰  
新規放射性ハロゲン標識母体としてのネオペンチルハライド構造要件の検討  
日本薬学会第 138 年会、千葉(2019 年 3 月)

鷺谷奈菜、鈴木博元、田中浩士、佐藤由衣、龍田真帆、稲田慎之介、上原知也、荒野泰  
放射性ヨウ素標識薬剤の新たな標識母体としてのヨウ化アルキル  
日本薬学会第 137 年会、金沢(2018)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：放射性医薬

発明者：荒野泰、上原知也、鈴木博元、田中浩士、石岡典子、渡辺茂樹

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2018-15904 号

出願年：2018 年

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡辺 茂樹

ローマ字氏名：Watanabe Shigeki