

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713045

研究課題名(和文)PETから治療へ：腎放射活性を低減するRI標識薬剤の開発

研究課題名(英文)Engineering radiolabeled antibody fragments for enhanced tumor to kidney ratio

## 研究代表者

上原 知也(Uehara, Tomoya)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10323403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：RI標識抗体フラグメント投与時に観察される腎臓への非特異的集積を低減させるRI標識薬剤の開発を行った。RIの標識部としてPET用核種であるガリウム-68と安定な錯体を形成するNOTAを選択した。本キレート剤は治療用に用いられる銅-64/67に対しても安定な錯体を形成する。NOTAと抗体フラグメントとの間に腎刷子縁膜酵素の基質配列を導入した薬剤を用いて作製したRI標識抗体フラグメントは腫瘍への集積を損なうことなく、腎放射活性を低減することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The renal localization of radiolabeled antibody fragments is a limitation of clear target imaging and radiotherapy. Herein, we describe a strategy using a  $^{67}\text{Ga}$ -labeling reagent for antibody fragments that liberates  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-Methionine (NOTA-Met) by the action of renal brush border enzymes to reduce renal radioactivity levels. A  $^{67}\text{Ga}$ -labeled Fab fragments of anti-c-kit IgG using this labeling agent resulted in significantly lower renal radioactivity levels and clearer tumor images than those of  $^{67}\text{Ga}$ -labeled Fabs using conventional methods. This strategy and radiolabeling reagent would also be applicable for engineered antibody fragments and also considerable influence on the development of new diagnostic and therapeutic engineered antibody fragments.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：PET 治療 腎臓

### 1. 研究開始当初の背景

ガリウム-68 ( $^{68}\text{Ga}$ )はゲルマニウム-68 を親核種とするジェネレータシステムにより溶出される PET 核種であり、サイクロトロンを設置しなくても使える汎用性の高い PET 核種として期待されている。 $^{68}\text{Ga}$  の半減期は 68 分と短く、組織移行性の速やかな低分子ペプチドへの応用が期待され、実際、ソマトスタチン誘導体である DOTA-TOC を用いた  $^{68}\text{Ga}$  標識薬剤が欧米で盛んに臨床検討されている。 $^{68}\text{Ga}$  標識 DOTA-TOC の PET 画像はインジウム-111 ( $^{111}\text{In}$ )標識 DOTA-TOC の SPECT 画像に比べ明瞭であることが報告されている。一方、イットリウム-90 ( $^{90}\text{Y}$ )や銅-64, 67 ( $^{64/67}\text{Cu}$ )は細胞殺傷性の  $\beta$ 線放出核種であり、放射線内照射治療に有用である。実際、本邦でも認可薬剤として使用されているゼバリン®には  $^{90}\text{Y}$  が使用されて、高い治療効果を与えている。しかし、 $^{90}\text{Y}$  を DOTA-TOC のような低分子ペプチドに標識した場合、腎臓への非特異的集積が観察される。 $^{90}\text{Y}$  の腎臓への集積は重篤な腎障害を招き、これが治療の制限となっている。従って、腎臓への非特異的集積を低減できれば、 $^{90}\text{Y}$  による効果的な治療が可能と考えられるとともに、 $^{68}\text{Ga}$ -PET による明瞭な画像による治療計画、診断も可能となる。これまでの研究により、放射性核種(RI)標識低分子ペプチド投与時に観察される腎臓への非特異的集積のメカニズムが解明されてきた。糸球体濾過された RI 標識低分子ペプチドは腎臓近位尿管にて腎細胞に再吸収され、リソソームにて代謝を受ける。低分子ペプチドはアミノ酸へと代謝され、全身へ再分布されるが、リソソーム内で生成した放射性代謝物はリソソーム内に残存するために、腎臓に放射活性が滞留する。この問題に対し申請者らは、放射性ヨウ素標識化合物(HML)を用いて、RI 標識低分子ペプチドが腎細胞に取り込まれる前に、尿排泄性の放射性代謝物を腎臓刷子縁膜酵素の作用により低分子ペプチドから尿中へと遊離させる代謝性スパーサを導入することで腎臓への非特異的集積を低減できることを示してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では先ず始めに、 $^{68}\text{Ga}$  と速やかに安定な錯体を形成する配位子を用い、腎刷子縁膜酵素の作用により尿排泄性の放射性代謝物を遊離する標識試薬を開発する。次いで、低分子ペプチドに本薬剤を用いて標識し、HML 野薬剤設計に基づいた腎臓への集積を低減可能な標識薬剤の開発を行う。

### 3. 研究の方法

#### NOTA-Methionine (NOTA-Met)の合成

*p*-SCN-NOTA (10 mg, 0.022 mmol)を最終濃度が 10~100 mg/ml となるように 0.1 M ホウ酸緩衝 pH 9.0 に溶解し、0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で pH 8~9 に調整後、L-methionine (4.97 mg, 0.33 mmol)を加え、室温で 2 時間反

応した。分取用 RP-HPLC により精製し、化合物(12) 2.5 mg (4.2  $\mu\text{mol}$ , 19%)を白色個体として得た。

#### NOTA-MVK(Bzo)の合成

##### *N*-(Benzoyloxy)succinimide の合成

Benzoic acid (1 g, 8.20 mmol) および *N*-hydroxysuccinimide (1.04 g, 9.02 mmol)を 30 ml の乾燥 DMF に溶解し、アルゴン雰囲気下 0°C で 10 mL の乾燥 DMF に溶解した dicyclohexylcarbodiimide (1.86 g, 9.02 mmol)を滴下した。室温に戻し、12 時間攪拌後、沈殿を濾去し、溶媒を減圧留去することで *N*-(Benzoyloxy)succinimide の粗精製物 2.06 g を白色固体として得た。この化合物は少量のウレアを含むが、そのまま次の反応に用いた。

##### Fmoc-Lys(Bzo)-OH の合成

*N*-(Benzoyloxy)succinimide (27 mg, 0.25 mmol)を dichloromethane (1 mL)に溶解し、milliQ (1 mL)に溶解した Fmoc-Lys-OH  $\cdot$  HCl (50 mg, 0.25 mmol)および炭酸水素ナトリウム(20 mg, 0.50 mmol)に滴下後、室温で激しく攪拌した。24 時間攪拌後、1 N 塩酸で酸性とした後、dichloromethane (5 mL x 3)で抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、hexane: ethyl acetate : acetic acid = 1 : 2 : 0.1 を溶出溶媒とするオープンカラムクロマトグラフィーにより精製し、Fmoc-Lys(Bzo)-OH 57 mg (0.12 mmol, 49%)を得た。

##### H-Met-Val-Lys(Bzo)の合成

H-Met-Val-Lys(Bzo)は Cl-Trt(2-Cl)Resin を樹脂とした Fmoc 固相法により合成した。

##### NOTA-MetValLys(Bzo)の合成

*p*-SCN-NOTA (5.6 mg, 12.5  $\mu\text{mol}$ )を最終濃度が 10~100 mg/ml となるように 0.1 M ホウ酸緩衝 pH 9.0 に溶解し、0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で pH 8~9 に調整後、H-Met-Val-Lys(Bzo) (4.0 mg, 8.3  $\mu\text{mol}$ )を加え、室温で 2 時間反応した。分取用 RP-HPLC により精製し、NOTA-MetValLys(Bzo) 2.5 mg (2.69  $\mu\text{mol}$ , 32.4%)を白色個体として得た。

##### NOTA-MVK(Mal) の合成

##### Boc-Met-Val-Lys-OH の合成

Boc-Met-Val-Lys-OH の合成は Cl-Trt(2-Cl)Resin (195 mg, 0.313 mmol)を用いた Fmoc 固相法により合成した。

##### Boc-Met-Val-Lys(Mal)-OH の合成

Boc-Met-Val-Lys-OH (6.60 mg, 13.9  $\mu\text{mol}$ )を氷冷下で飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(100  $\mu\text{L}$ )に溶解し、NMCM (3.22 mg, 20.8  $\mu\text{mol}$ )を加えた。氷冷下 2 時間攪拌した後、5% クエン酸水溶液を加え中和した。Chloroform (5 mL x 3)で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を減圧蒸留することで、Boc-Met-Val-Lys(Mal)-OH 7.26 mg(13.1  $\mu\text{mol}$ , 94.1%)を白色結晶として得た。

##### H-Met-Val-Lys(Mal)-OH の合成

Boc-Met-Val-Lys-OH (7.26 mg, 13.1  $\mu\text{mol}$ )を 4 N HCl/ethylacetate に溶解し、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、hexane で共溶

することで、H-Met-Val-Lys(Mal)-OH の塩酸塩 5.92 mg (12.1  $\mu$ mol, 92.4%)を白色結晶として得た。

#### NOTA-Met-Val-Lys(Mal)-OH の合成

H-Met-Val-Lys(Mal)-OH の塩酸塩 (5 mg, 10.2  $\mu$ mol)を乾燥 DMF(100  $\mu$ L)に溶解し、triethylamine (6  $\mu$ L)を加えた。*p*-SCN-NOTA (7.4 mg, 16.4  $\mu$ mol)を加え、室温で2時間攪拌した後、H<sub>2</sub>O で10倍に希釈し、分取用 RP-HPLC により精製し、NOTA-Met-Val-Lys(Mal)-OH 2.8 mg (3.1  $\mu$ mol, 28.2%)を白色結晶として得た。

#### NOTA-MI-Mal の合成

##### Isoleucine methyl ester の合成

Methanol (20 mL)を-15°C に冷却し、攪拌しながら thionyl chloride (2.0 mL)を滴下した。滴下後、10分間攪拌し、isoleucine (1.0 g, 7.6 mmol)を加え、6時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、さらに diethylether (20 mL x 3)で共沸した。残渣を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL)に懸濁させ、chloroform (10 mL x 3)で抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去し、Isoleucine methyl ester 1.09 g (1.52 mmol, 98.3%)を褐色油状物として得た。

##### Boc-Met-Ile-OMe の合成

Isoleucine methyl ester (1.09 g, 7.47 mmol)、Boc-Met-OH (1.87 g, 7.47 mmol)、1-hydroxybenzotriazole (1.11 g, 8.22 mmol)を DMF (10 mL)に溶解し、氷冷下攪拌した。WSCl<sub>2</sub>·HCl (1.58 g, 8.22 mmol)を加え、10分間攪拌後、室温に戻し、18時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣を ethylacetate に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL x 3)、5% クエン酸水溶液 (10 mL x 2)で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去し、Boc-Met-Ile-OMe 2.19 g (5.51 mmol, 73.8%)を黄色油状物として得た。

##### Boc-Met-Ile-OH の合成

Boc-Met-Ile-OMe (1.54 g, 3.88 mmol)を ethanol (40 mL)に溶解し、4 N 水酸化ナトリウム水溶液(1.8 mL)を加え、室温で8時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、氷冷下、10% クエン酸水溶液を加え、pH を3.0に調整した。ethylacetate (15 mL x 3)で抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、残渣を diethylether で共沸することで、Boc-Met-Ile-OH 1.30 g (3.58 mmol, 92.3%)を白色固体として得た。

##### N-Boc-ethylenediamine の合成

Ethylenediamine (1.00 g, 16.6 mmol)を chloroform (25 mL)に溶解し、氷冷下、chloroform (25 mL)に溶解した di-tert-butyl dicarbonate (1.82 g, 8.32 mmol)を滴下し、同じ温度で1時間攪拌した。析出した物質をろ過し、ろ液を減圧留去した。残渣を chloroform : methanol : 25% アンモニア水 = 80 : 16 : 3 を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、N-Boc-ethylenediamine 1.21 g (45.5%)を無色透明の油状物質として

得た。

#### Boc-ED-Mal の合成

N-Boc-ethylenediamine (630 mg, 3.93 mmol)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に溶解し、氷冷下、NMCM (610 mg, 3.93 mmol)を加え、氷冷下6時間攪拌した。5% クエン酸水溶液を加え中和した後、chloroform (5 mL x 3)で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を減圧蒸留することで、化合物(25) 870 mg (3.625 mmol, 92.1%)を白色結晶として得た。

#### N-Maleoyl-ethylenediamine の合成

Boc-ED-Mal (1.00 g, 4.16 mmol)を 4 N HCl/ethylacetate (15 mL)に溶解し、室温で30分間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、diethylether (5 mL x 3)で共沸することで N-Maleoyl-ethylenediamine の塩酸塩 711 mg (4.02 mmol, 96.7%)を白色結晶として得た。

#### Boc-Met-Ile-ED-Mal の合成

N-Maleoyl-ethylenediamine (149 mg, 0.846 mmol)、化合物 (30) (337 mg, 0.931 mmol)、NHS (107 mg, 0.931 mmol)を dry THF に溶解し、氷冷下、Triethylamine (118  $\mu$ L)を加え10分間攪拌後、DCC (192 mg, 0.931 mmol)を加えた。1時間攪拌後、室温で18時間攪拌した。析出物をろ去し、溶媒を減圧留去後、残渣を ethylacetate に溶解した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(5 mL x 2)、5% クエン酸水溶液 (5 mL x 2)で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。有機溶媒を減圧留去し、残渣を n-hexane : ethylacetate = 1 : 1 を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し、Boc-Met-Ile-ED-Mal 102 mg (0.21 mmol, 24.9%)を白色固体として得た。

#### H<sub>2</sub>N-Met-Ile-ED-Mal の合成

Boc-Met-Ile-ED-Mal (85 mg, 0.175 mmol)を 5 mL の 4 N HCl/AcOEt に溶解し、室温で30分間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、diethyl ether (5 mL x 3)で共沸することで H<sub>2</sub>N-Met-Ile-ED-Mal の塩酸塩 50 mg (0.12 mmol, 68%)を白色結晶として得た。

#### NOTA-MI-ED-Mal の合成

H<sub>2</sub>N-Met-Ile-ED-Mal の塩酸塩 (5.1 mg, 12.1  $\mu$ mol)と *p*-SCN-NOTA (8.2mg, 18.2  $\mu$ mol)を乾燥 DMF (100  $\mu$ L)に溶解し、triethylamine (6  $\mu$ L)を加え、室温で2時間攪拌した後、H<sub>2</sub>O で10倍希釈後、分取用 RP-HPLC により精製し、NOTA-MI-ED-Mal 2 mg (2.40  $\mu$ mol, 19.8%)を白色固体として得た。

#### 非放射性 Ga 錯体の合成

##### Ga-NOTA-Met の作製

GaCl<sub>3</sub> (1.2 mg, 6.77  $\mu$ mol)を 0.25 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5, 50  $\mu$ L)に溶解し化NOTA-Met (3.0 mg, 4.51  $\mu$ mol)を加えた。室温で1時間反応後、分析用 RP-HPLC により精製し、非放射性 Ga-NOTA-Met 0.5 mg (0.83  $\mu$ mol, 18.5%)を白色固体として得た。

##### Ga-NOTA-MVK(Bzo)の作製

GaCl<sub>3</sub> (1.2 mg, 6.77  $\mu$ mol)を 0.25 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5, 50  $\mu$ L)に溶解し

NOTA-MVK(Bzo) (4.2 mg, 4.51  $\mu$ mol) を加えた。室温で 1 時間反応後、分析用 RP-HPLC により精製し、非放射性 Ga-NOTA-MVK(Bzo) 1 mg (1.0  $\mu$ mol, 22.3%) を白色固体として得た。<sup>67</sup>Ga-NOTA-Met および <sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK(Bzo) の合成

<sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> (10  $\mu$ L) を 0.25 M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 10  $\mu$ L) に混和し、室温で 5 分間静置した。NOTA-Met または NOTA-MVK(Bzo) 溶液(2 x 10<sup>-4</sup> M, 10  $\mu$ L) を混合した後、60°C で 1 時間反応することで、<sup>67</sup>Ga-NOTA-Met および <sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK(Bzo) を合成した。非放射性 Ga 錯体と RP-HPLC の保持時間が一致したことにより生成を確認した。

#### BBMVs とのインキュベート試験

BBMVs は Wistar 系雄性ラット(200-250 g) の腎臓から既報に従って作製した。BBMVs と <sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK(Bzo) のインキュベート実験は以下の方法で行った。タンパク質濃度を 10 mg/mL となるように調製した BBMVs (10  $\mu$ L) を、37°C で 10 分間プレインキュベートした。<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK(Bzo) は、RP-HPLC により過剰の配位子を除去した後、D-PBS (-) に再溶解した。<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK(Bzo) 溶液(10  $\mu$ L) を BBMVs 溶液に加え、37°C で 2 時間インキュベート後に溶液の一部を採取し、RP-TLC で分析した。また、EtOH を 40  $\mu$ L 加え、1 分間 15,000 g で遠心することでタンパク質を沈殿させた後、回収した上清を D-PBS (-) で希釈して RP-HPLC により分析した。酵素阻害剤共存下での BBMVs による代謝の評価は、同様にプレインキュベートした BBMVs (10  $\mu$ L) に各酵素阻害剤(5  $\mu$ L) を最終濃度が 1 mM になるように加え、10 分間、37°C でインキュベートした後、<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK(Bzo) 溶液(5  $\mu$ L) を加えることにより行った。阻害剤には、carboxypeptidase M の阻害剤である MGTA、renal dipeptidase の阻害剤 cilastatin、angiotensin-converting enzyme の阻害剤 captopril、neutral endopeptidase の特異的阻害剤である phosphoramidon を用いた。

Met-Val-Lys 配列のマウス血漿中安定性試験 RP-HPLC により過剰の配位子を除去後に D-PBS (-) に溶解した <sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK(Bzo) 溶液(20  $\mu$ L) を、マウス血漿(230  $\mu$ L) に加え、37°C でインキュベートした。1、6、24 時間後に各群 3 つの溶液を RP-TLC により分析することで、未変化体の放射活性の割合を算出した。

#### 二官能性キレート試薬結合 Fab の作製

抗 C-kit 抗体の Fab フラグメントは既報に従い合成した。2-iminothiolane (2-IT) によりチオール化した Fab 溶液(1.6 mg/ml, 95  $\mu$ L) に DMF に溶解した NOTA-MVK(mal) または NOTA-MI(mal) (1.25  $\mu$ L, 50 mg/mL) を加え、37°C で 1 時間反応した。反応後、十分脱気した 2 mM EDTA 含有 0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-50 Fine を用いるスピカラム法により反応溶液中の過剰

の NOTA-MVK(mal) および NOTA-MI(mal) を除去した。次いで、2 mM EDTA 含有 0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0) を用いて iodoacetamide 溶液(10 mg/mL) を調製し、これを 12.5  $\mu$ L 加えた後、37°C で 1 時間反応を行い、未反応のチオール基をアルキル化した。その後、0.25 M 酢酸緩衝液(pH 5.5) で平衡化した Sephadex G-50 Fine を用いるスピカラム法で精製した。Fab 一分子あたりに導入されたキレートの数は、反応前後に行った DPS を用いたチオール基の定量により算出した。

#### <sup>67</sup>Ga 標識 Fab の作製

<sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> (5  $\mu$ L) を 0.25 M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 5  $\mu$ L) に混和し、室温で 5 分間静置した。NOTA-MVK-Fab、NOTA-MI-Fab または NOTA-Fab 溶液(10  $\mu$ L) を混合した後、37°C で 1 時間インキュベートした。20 mM EDTA 溶液(20  $\mu$ L) を加えた後、D-PBS (-) で平衡化した Sephadex G-50 Fine を用いるスピカラム法で精製することで、<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK-Fab、<sup>67</sup>Ga-NOTA-MI-Fab および <sup>67</sup>Ga-NOTA-Fab を作製した。TLC、CAE、SE-HPLC において放射化学的収率 95% 以上を確認した。

<sup>67</sup>Ga 標識 Fab のマウス血漿中安定性の検討  
各 <sup>67</sup>Ga 標識 Fab (30  $\mu$ L) を、マウス血漿(270  $\mu$ L) に加え、37°C でインキュベートした。1、3、6、24 時間後に各群 3 つの溶液を TLC および CAE により分析することで、未変化体の放射活性の割合を算出した。

#### <sup>67</sup>Ga 標識 Fab のマウス体内動態の検討

上述の方法により調製した各 <sup>67</sup>Ga 標識 Fab を D-PBS (-) で希釈した。マウス尾静脈より、Fab 濃度を 5  $\mu$ g/100  $\mu$ L に調整した各 <sup>67</sup>Ga 標識 Fab 溶液(0.3  $\mu$ Ci/100  $\mu$ L/匹) を投与した。投与 10 分、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間後に各群 5 - 3 匹のマウスを屠殺し、血液および関心臓器を採取し、重量を測定後、オートウェルカガンマシステムにより放射活性を測定した。また、投与 6 時間、24 時間後までの糞尿を採取し、糞尿中に含まれる放射活性をオートウェルカガンマシステムにより測定した。

#### 尿中放射活性の分析

各 <sup>67</sup>Ga 標識 Fab を D-PBS (-) で希釈した。マウス尾静脈より、Fab 濃度を 5  $\mu$ g/100  $\mu$ L に調整した各 <sup>67</sup>Ga 標識 Fab 溶液(6  $\mu$ Ci/100  $\mu$ L/匹) を投与し、6 時間後までに集積した尿を 0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過した後、SE-HPLC にて化学形を分析した。また、回収した尿に 2 倍量の EtOH を加えることでタンパクを沈殿させ、15,000 g で 5 分間遠心した後上清を回収した。上清を回収した後に 66% EtOH 溶液 100  $\mu$ L (D-PBS (-) 50  $\mu$ L + EtOH 50  $\mu$ L) を用いてペレットを洗浄し、再度遠心して上清を回収する作業を 2 回繰り返し、放射活性の上清への回収率を算出した。その後、EtOH 濃度が 15% 以下になるよう上清を D-PBS (-) で希釈し、RP-HPLC による分析を行った。

#### 動物実験モデル

皮下腫瘍モデルマウスを用いた体内動態、

SPECT/CT 撮像実験には、右足大腿部に  $3 \times 10^6$  個の SY cells を移植し、4 ~ 5 週間後に腫瘍サイズが 0.4 g ~ 1.0 g に成長した BALB/c-nu/nu マウス(雄性, 8 ~ 10 週齢)を使用した。

#### SY 皮下腫瘍モデルマウス体内分布試験

各  $^{67}\text{Ga}$  標識 Fab を D-PBS (-) で希釈した。マウス尾静脈より、Fab 濃度を  $5 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  に調整した各  $^{67}\text{Ga}$  標識 Fab 溶液 ( $0.3 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ /匹) を投与した。投与 3 時間後に各群 5 匹のマウスを屠殺し、血液および開心臓器を採取、重量を測定後、オートウェルカガンマシステムにより放射活性を測定した。

#### SPECT/CT 撮像

各  $^{67}\text{Ga}$  標識 Fab を D-PBS (-) で希釈した。マウス尾静脈より、Fab 濃度を  $20 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  に調整した各  $^{67}\text{Ga}$  標識 Fab 溶液 ( $100 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ /匹) を投与した。投与 2 時間半から 3 時間半後にかけて SPECT4CT (Trifoil Imaging, Ideas) を用いて撮像を行った。撮像条件は、コリメータとして開口径 1.0 mm の 5 穴多孔ピンホールコリメータを用い、360 度収集・64 projection・60 second/projection, 回転半径は 50 mm で行った。

#### 4. 研究成果

$^{67/68}\text{Ga}$  標識低分子抗体の腎放射活性を投与早期から低減する薬剤の開発を目的として、HML の薬剤設計の  $\text{Ga}$  標識低分子抗体への応用を検討した。HML の薬剤設計においては、尿排泄性の高い放射性代謝物の選択、および腎刷子縁膜酵素の作用で目的の放射性代謝物を遊離する代謝性配列の選択が重要である。これまでの検討から、 $\text{Ga-NOTA-Met}$  が放射性代謝物として適した性質を示すことが認められている。そこで、腎刷子縁膜酵素の作用で  $\text{Ga-NOTA-Met}$  を遊離する代謝性配列の選択から標識薬剤の開発を進めた。

腎刷子縁膜には、複数の酵素の発現が知られている。これらの酵素のうち、その基質構造近隣に  $\text{Ga}$  錯体や嵩高い低分子抗体が存在した状態においても十分な基質認識性を発揮できるように、比較的幅広い基質認識性を有する neutral endopeptidase (NEP) を選出した。放射性代謝物として  $^{67/68}\text{Ga-NOTA-Met}$  を遊離するためには、メチオニンの C 末端のペプチド結合が開裂する配列が必要となる。ナトリウム利尿ペプチドの一種である hBNP-32 では、Met-Val 配列が NEP の認識を受け開裂することが報告されている。さらに、NEP は開裂する配列の C 末端側に Lys の C 末端が存在することにより、酵素認識性が上昇することも知られている。これらの知見から、放射性代謝物である  $^{67/68}\text{Ga-NOTA-Met}$  を遊離するための基質配列として、トリペプチド配列 Met-Val-Lys を選択した。Lys の  $\epsilon$  アミノ基を低分子抗体との結合部位であるマレイミドに置換し、錯体形成部位として  $\text{Ga}$  と安定な錯体を形成する NOTA を有する新規薬剤  $\text{NOTA-MVK(Mal)}$  を設計、合成した。また、

本薬剤を導入した抗 c-kit 抗体の Fab フラグメントと  $^{67}\text{Ga}$  との錯形成反応から  $^{67}\text{Ga-NOTA-MVK-Fab}$  を作製した。さらに、リソソーム代謝により  $^{67}\text{Ga-NOTA-Met}$  を遊離する代謝性配列として Met-Ile を有する  $^{67}\text{Ga-NOTA-MI-Fab}$ 、および  $p\text{-SCN-NOTA}$  を Fab のリジンアミノ基と直接結合し、 $^{67}\text{Ga}$  標識を行った  $^{67}\text{Ga-NOTA-Fab}$  を対照化合物として作製し評価を行った。

また、低分子抗体を用いた *in vivo* での評価に先立ち、抗体結合部位をベンゾイル基で置換した低分子モデル化合物  $^{67}\text{Ga-NOTA-MVK(Bzo)}$  を合成し、Met-Val-Lys 配列の *in vitro* での評価も行った。

ラットの腎細胞より作製した腎刷子縁膜小胞 BBMVs とのインキュベート実験の結果、2 時間後までに 19% が代謝を受け、 $^{67}\text{Ga-NOTA-Met}$  を遊離した。この結果は、放射性ヨウ素標識薬剤 HML と比較すると低値であった。しかし、HML と同様に腎放射活性の低減に成功した放射性レニウム標識薬剤 CpTR の検討においては、低分子モデル化合物と BBMVs とのインキュベートでは 3 時間で 10% 未満しか代謝を受けなかったにも関わらず、マウス体内動態においては腎放射活性を投与早期から低減した。これら先行研究の結果は、腎臓での再吸収過程で腎刷子縁膜酵素が標識抗体の基質部分と接近して、その開裂を促進することを示唆する。そのため、今回の結果も生体内で効果を発揮するためには十分と考えた。また、腎刷子縁膜酵素阻害剤を添加し同様の実験を行ったところ、NEP の阻害剤である phosphoramidon を添加した際に、 $^{67}\text{Ga-NOTA-Met}$  の生成が顕著に阻害された。この結果は、Met-Val-Lys 配列の代謝に薬剤設計の通り NEP が関与していることを示唆する。

また、血液中でも種々の酵素の存在が知られている。そのため、血液中で基質配列が開裂することによる腫瘍への集積低下が懸念される。そこで、基質構造への酵素の接近が容易な低分子モデル化合物  $^{67}\text{Ga-NOTA-MVK(Bzo)}$  を用いてマウス血漿中での安定性を評価した。その結果、Met-Val-Lys 配列は 24 時間後においても 90% 以上が安定に存在することを認めた。

3 種の  $^{67}\text{Ga}$  標識 Fab を実験動物へ投与後の血液クリアランスには大きな相違が観られなかった。このことは、3 種の  $^{67}\text{Ga}$  標識 Fab は投与後同程度が糸球体ろ過を受けて腎臓へ集積したことを示す。しかし、それぞれの  $^{67}\text{Ga}$  標識 Fab 投与後の腎放射活性には有意な差が認められた。 $^{67}\text{Ga-NOTA-Fab}$  は、投与後 3 時間まで腎放射活性が増加したのに対して、 $^{67}\text{Ga-NOTA-MI-Fab}$  は、投与 1 時間後まで  $^{67}\text{Ga-NOTA-Fab}$  と同様の高い腎放射活性を示したが、その後は有意に減少した。これに対して、 $^{67}\text{Ga-NOTA-MVK-Fab}$  は、投与 10 分後から  $^{67}\text{Ga-NOTA-MI-Fab}$  と比較しても有意に低値を示した。これらの結果は、

$^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MVK-Fab が腫瘍集積を損なうことなく腎放射活性の低減を投与早期から達成した初めての  $^{67}\text{Ga}$  標識低分子抗体であることを示す。さらに、小動物用 SPECT/CT を用いて画像診断薬剤としての評価を行った結果、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MI-Fab および  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-Fab と比較して  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MVK-Fab 投与後の腎放射活性は顕著に低減され、腫瘍のみを明瞭に描出することに成功した(図1)。この結果は、体内動態試験の結果と一致するものであり、NOTA-MVK-Mal が immuno-PET の診断精度を大幅に向上する新規  $^{68}\text{Ga}$  標識薬剤として有用であることを示す。

$^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MVK-Fab が投与早期から腎放射活性を低減した機序を検証するため、尿中の放射活性を分析した。尿中に排泄された放射活性の分析から、放射性代謝物として  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-Met が遊離されたことを確認した。この結果から、BBMVs 試験と同様に生体内においても尿排泄性の高い放射性代謝物  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-Met を遊離することが認められた。また、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MVK-Fab は、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MI-Fab と同一の放射性代謝物として  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-Met を遊離するにも関わらず、腎放射活性を投与早期から有意に低減したことから、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MVK-Fab はリソソーム代謝よりも早い段階で  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-Met を遊離したことが示された。

以上の結果から、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MVK-Fab の投与早期における腎放射活性の低減には、薬剤設計の通り、腎刷子縁膜酵素が関与していることが認められ、HML の薬剤設計を Ga へ展開することに成功したことが示された。また、NOTA は銅とも安定な錯体を形成することから、本薬剤は  $^{67}\text{Cu}$  や  $^{64}\text{Cu}$  を用いた放射線治療への応用も期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

T. Uehara, T. Rokugawa, M. Kinoshita, S. Nemoto, Francisco Lazaro, G. G., H. Hanaoka, Y. Arano.  $^{67/68}\text{Ga}$ -labeling agent that liberates

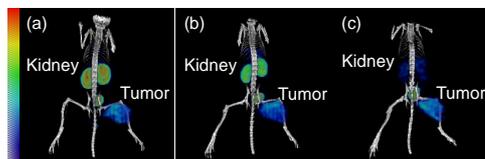


図1.  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-Fab (a)、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MI-Fab (b)、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-MVK-Fab (c)投与3時間後における SPECT/CT 撮像。

$^{67/68}\text{Ga}$ -NOTA-methionine by lysosomal proteolysis of parental low molecular weight polypeptides to reduce renal radioactivity levels. Bioconjugate Chem. 25(11) 2038-2045, 2014( 査読有)

〔学会発表〕(計8件)

1. 上原知也、横山幹、鈴木博元、荒野泰. 放

射性ガリウム標識抗体フラグメントの非特異的腎集積を低減させる標識薬剤の開発. 日本薬学会第135年会. (神奈川) 2016.3.27

2. 上原知也. 標的への集積向上を目的とした放射性ガリウム化合物の新規設計第15回放射性医薬品・画像診断薬研究会. (京都) 2015.9.12

3. 横山幹、趙天会、上原知也、荒野泰. ベンジル基のパラ位にカルボキシル基を有する新規 C-functionalized NOTA の開発. 日本薬学会第134年会. (兵庫) 2015.3.27

4. 上原知也、横山幹、趙天会、花岡宏史、荒野泰. 腎放射活性の低減を目的とする低分子ポリペプチド Ga 標識薬剤に関する基礎的研究. 第54回日本核医学会総会. 2014.11.6

5. T. Uehara, Y. Arano. A novel chemical design of Ga-67/68 labeled probes based on chelation-mediated multivalency to enhance target accumulation. International seminar on pharmaceutical science and technology 2014. (Bundung, Indonesia) 2014.9.17

6. 趙天会、上原知也、根本創紀、花岡宏史、荒野泰. 腎放射活性の低減を目的とした放射性ガリウム標識 RGD ペプチドの開発. 第13回放射性医薬品・画像診断薬研究会. (京都) 2013.12.14

7. S. Nemoto, T. Rokugawa, G.G. Francisco L, H. Hanaoka, T. Uehara, Y. Arano. A novel chemical design of Ga-67/68 labeled probes for high tumor uptake. 第23回金属の関与する生体関連反応シンポジウム. (東京) 2013.6.21

8. T. Uehara, M. Kinoshita, T. Rokugawa, Guerra Gomez Francisco Lazaro, H. Hanaoka, Y. Arano. A Ga-68-labeling reagent liberating Ga-68-NOTA-conjugated methionine from low molecular weight polypeptides in lysosomes for low renal radioactivity levels. The 20th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences. (JeJu, Korea) 2013.5.16

## 〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 放射性標識薬剤

発明者: 荒野泰、上原知也

権利者: 千葉大学

種類: 特許申請

番号: 特願 2016-38836

出願年月日: 平成 28 年 3 月 1 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 知也 (UEHARA Tomoya)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 10323403

(2) 連携研究者

花岡 宏史 (HANAOKA Hirofumi)

群馬大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 50361390