

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19446

研究課題名（和文）特定アミノ酸の選択的修飾に資する放射性金属錯体の創製

研究課題名（英文）Development of Radiometal Complexes for Selective Modification of Specific Amino Acids

研究代表者

渡邊 裕之（Watanabe, Hiroyuki）

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：40710786

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：チロシン残基の修飾を目的として、トリアザブタジエン(TBD)骨格にDOTA誘導体であるD03Aを導入した新規分子(TBD-D03A-1)を設計・合成した。次いで、モデルペプチドとしてcRGDyKを選択し、チロシン修飾およびIn-111標識について検討した。その結果、目的とする標識体である[111In]In-Tyr-TBD-D03A-1を高収率、高純度で得ることに成功した。さらに、得られた標識体は血漿中で安定であり、本標識法の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、放射性金属核種を用いたチロシン残基特異的標識法の開発に成功した。現在までに確立されている放射性金属核種を用いたアミノ酸修飾法は、リジン残基やN末端のアミノ酸残基のアミノ基をスクシンイミド基によって修飾する手法とシステイン残基のチオール基をマレイミド基によって修飾する手法の二つである。したがって、本手法の開発によって、従来に比べて多彩な分子設計が可能となり、放射性金属核種を用いたがんの診断・治療(セラノスティクス)に有効な新規薬剤の創出につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, a novel compound (TBD-D03A-1) was designed and synthesized by introducing D03A, a DOTA derivative, into a triazabutadiene (TBD) scaffold for the purpose of modifying tyrosine residues. Then, cRGDyK was selected as a model peptide, and tyrosine modification and In-111 labeling were performed. As a result, we obtained [111In]In-Tyr-TBD-D03A-1, the target labeled compound, in high radiochemical yield and with high radiochemical purity. Furthermore, it was stable in mouse plasma, suggesting the usefulness of this labeling method.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：ラジオセラノスティクス アミノ酸 ケミカルラベリング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

セラノスティクスとは診断と治療とを融合させた手法であり、シームレスな医療を実現し得る。セラノスティクスのなかでも、 $\gamma$ 線放出核種を用いた診断と $\alpha$ 線もしくは $\beta$ 線放出核種を用いた治療を組み合わせるラジオセラノスティクスは、非侵襲的に体深部を画像ができ、また高い治療効果が得られることから近年、有用な薬剤の開発研究が活発に行われている。

特定のアミノ酸残基と共有結合を形成させる手法論、すなわちケミカルラベリング法の開発は、抗体やペプチドなどの中分子などを用いたラジオセラノスティクスにおいて必要不可欠な技術である。しかしながら、現在までに確立されているのは、リジン残基やN末端のアミノ酸残基のアミノ基をスクシンイミド基によって修飾する手法とシステイン残基のチオール基をマレイミド基によって修飾する手法の二つである(図1)。スクシンイミド基を

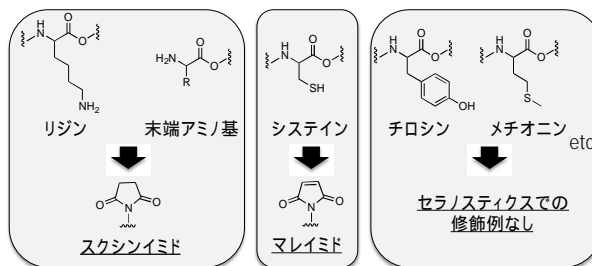


図1. セラノスティクスに用いられているケミカルラベリング法

用いてペプチドの修飾を行う場合、アミノ基が少なくとも一つは存在するため前処理の必要なく構造修飾を行うことが可能である。一方で、構造中にリジン残基を有する場合、その導入部位の特定のために、N末端もしくはリジン残基のアミノ基に保護基を導入する必要があり、また修飾後その保護基を脱離させる必要がある。また、マレイミド基を用いてペプチド修飾を行う場合、システインが含まれていないペプチドに関しては末端にシステイン残基を導入した上で修飾を行うが、システインは一般に時間経過に伴いジスルフィド結合を形成することが知られているため、その結合を切断する前処理が必要となる。また、これらアミノ基やチオール基が、抗体やペプチドの標的結合に存在するとこれらを修飾することでその結合親和性の著しい低下につながる場合がある。

近年、チロシン残基やメチオニン残基、セリン残基など様々なアミノ酸残基の特異的な修飾を可能とするケミカルラベリング法が新たに報告されているが、これらの反応を基盤とした放射性核種などの機能性分子を用いた修飾および生体応用についての報告はない。そこで、新たなアミノ酸残基を修飾可能かつセラノスティクスに有用な分子が開発できれば、多彩な分子設計が可能となると考えて本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、特定のアミノ酸残基の選択的な修飾を可能とするラジオセラノスティクスに有用な放射性標識薬剤を創製することにある。従来汎用されているこれらの修飾法に加え、それ以外の特定のアミノ酸残基を選択的かつ効率的に標識に修飾できれば、ラジオセラノスティクスに有効な新規薬剤の創出につながると考えられる。そこで本研究ではラジオセラノスティクスに有用な放射性金属錯体を基盤とした抗体やペプチドなどの中分子などの新規放射性標識用薬剤の開発を計画した。

### 3. 研究の方法

ラジオセラノスティクスにおいては主に放射性金属核種が汎用されており、主に診断用核種として陽電子断層撮像(PET)用核種である $^{68}\text{Ga}$ 、単光子断層撮像法(SPECT)用核種である $^{111}\text{In}$ 、それに対応する治療用核種として $\alpha$ 線を放出する $^{225}\text{Ac}$ や $\beta$ 線を放出する $^{177}\text{Lu}$ および $^{90}\text{Y}$ が用いられている。DOTAはこれらの核種と安定な錯体を形成することからラジオセラノスティクスにおいて汎用されている(図2)。そこで本研究では、DOTAを放射性金属核種との錯体形成部位として選択した。また、特に抗体への応用を考えた場合、タンパク質の変性を避けるため水系かつ加熱などの必要がない温和な条件で反応が進行する必要がある。

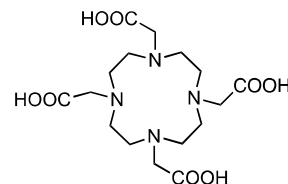


図2. DOTAの化学構造

本研究ではチロシン残基の修飾を目的として、当初水中での反応進行が報告されている sulfur-triazole exchange (SuTEx)反応(*Nat. Chem. Biol.*, 16, 150, 2020, *J. Am. Chem. Soc.*, 142, 8270, 2020)を用いた検討を実施した。しかしながら、チロシンの水酸基を修飾すること、アミノ基に対する特異性が低いことから、ジアゾニウム塩を用いたチロシン残基標識法に着目した。ジアゾニウム塩を用いたチロシン標識法は古くから用いられる手法である一方、その生成に強酸条件が必要であることや不安定であり長期保存が困難であることから汎用性に乏しい。そこでジアゾニウム塩を安定化でき、pH7~8以下の条件においてジアゾニウム塩を生成するトリアザブタジエン(TBD)骨格(*Bioconjugate. Chem.*, 32, 254, 2021)を選択し、

DOTA 誘導体である DO3A を導入した新規分子(TBD-DO3A-1)を設計・合成した。

次いで、チロシンへの TBD-DO3A-1 の修飾に関する検討、In-111 標識、さらには血漿中安定評価を行なった。また、チロシンを含有するモデルペプチドとして cRGDyK を選択し、同様の検討を行なった。

#### 4. 研究成果

##### 合成

TBD-DO3A-1 を合成した。次いでチロシン修飾に関する検討を実施した。

##### (1) チロシン

酢酸 buffer (pH 4.2) に DMSO に溶解した TBD-DO3A-1 および Ac-Tyr-NHMe を加えて、室温で終夜攪拌し、逆相 HPLC を用いて精製することで、目的とする Tyr-TBD-DO3A-1 を得た。

##### (2) モデルペプチド

Phosphate buffer (pH 8.2) に DMSO に溶解した TBD-DO3A-1 および cRGDyK を加えて、室温で 2 日間攪拌し、逆相 HPLC を用いて精製することで、目的とする cRGDyK-TBD-DO3A-1 を得た。

##### In-111 標識体合成

##### (1) チロシン

酢酸 buffer (pH 4.2) に  $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$  溶液、Tyr-TBD-DO3A-1 を加え 90 ° で 10 分間インキュベートした。次いで 5 mM EDTA 溶液を加え 1 分間インキュベートした後、逆相 HPLC を用いて精製 (MeCN/H<sub>2</sub>O = 10/90 → 50/50 (30 min), 流速: 1 mL/min) することで  $[^{111}\text{In}]\text{In-Tyr-TBD-DO3A-1}$  を放射化学的収率 73%、放射化学的純度 99% 以上で得た。

##### (2) モデルペプチド

酢酸 buffer (pH 4.2) に  $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$  溶液、cRGDyK-TBD-DO3A-1 を加え 90 ° で 20 分間インキュベートした。次いで 5 mM EDTA 溶液を加え 1 分間インキュベートした後、逆相 HPLC を用いて精製 (MeCN/H<sub>2</sub>O/TFA = 0/100/0.01 → 30/70/0.01 (60 min), 流速: 1 mL/min) することで  $[^{111}\text{In}]\text{In-cRGDyK-TBD-DO3A-1}$  を放射化学的収率 64%、放射化学的純度 99% 以上で得た。

##### 血漿中安定性評価

##### (1) チロシン

$[^{111}\text{In}]\text{In-Tyr-TBD-DO3A-1}$  をマウス血漿に加え、37°C で 4 時間インキュベートした。MeCN を加え 10,000×g で 5 分間遠心後、上清をフィルターで濾過し、H<sub>2</sub>O で希釈した後に逆相 HPLC で分析した。その結果、99% 以上が未変化体として存在した(図 3)ことから、マウス血漿中におけるジアソニウム標識の高い安定性が示された。

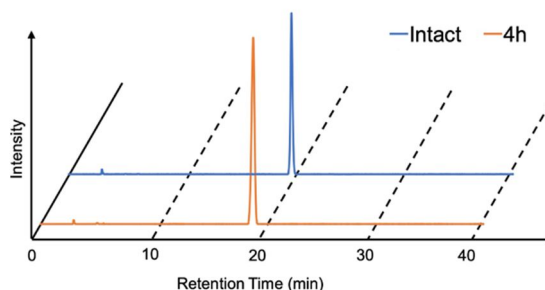


図 3.  $[^{111}\text{In}]\text{In-Tyr-TBD-DO3A-1}$  のマウス血漿中安定性評価

##### (2) モデルペプチド

$[^{111}\text{In}]\text{In-cRGDyK-TBD-DO3A-1}$  をマウス血漿に加え、37°C で 4 時間インキュベートした。MeCN を加え 10,000×g で 5 分間遠心後、上清をフィルターで濾過し、H<sub>2</sub>O で希釈した後に逆相 HPLC で分析した。その結果、インキュベート前とほぼ同一の HPLC チャートが得られた(図 4)ことから、マウス血漿中における  $[^{111}\text{In}]\text{In-cRGDyK-TBD-DO3A-1}$  の高い安定性が示された。

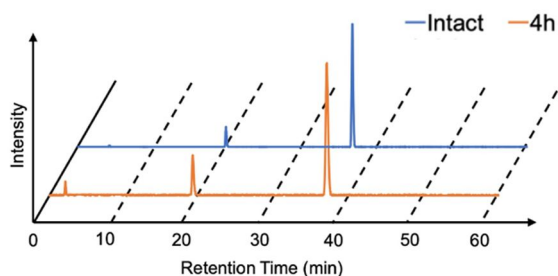


図 4.  $[^{111}\text{In}]\text{In-cRGDyK-TBD-DO3A-1}$  のマウス血漿中安定性評価

以上の結果より、TBD-DO3A-1 がチロシン特異的放射性金属標識薬剤として機能することが示された。今後様々な標的指向性分子への応用を検討することで、放射性金属核種を用いたがんの診断・治療(セラノスティクス)に有効な新規薬剤の創出につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------