

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659049

研究課題名(和文) PEG化医薬品候補化合物のPETイメージング法の開発：革新的創薬を目指して

研究課題名(英文) Synthesis of PEGylated drug candidates for PET imaging

研究代表者

赤井 周司 (Akai, Shuji)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60192457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品として有望なタンパク質などの高分子化合物にPEG (Mw 5-40 kDa) を結合すると、抗原性の消失、血中安定性の向上などが期待できるため、多くの研究があるが、これらPEG化合物の体内動態を非侵襲的に解析する方法がなかった。本研究で、PEG鎖の端を蛍光物質や $^{18}\text{F}$ などで標識したPEG化ペプチドの合成法を開発した。また、本法で合成した標識PEG化ペプチドの体内動態をリアルタイムで観察することができ、本法の実用性が実証された。

研究成果の概要(英文)：The covalent attachment of poly(ethylene glycol) (PEG) with an average molecular weight (Mw) of 5-40 kDa to a drug or a therapeutic protein, called PEGylation, is a common strategy to evade the host immune system, to enhance its stability in blood, etc. In this study, we have developed a synthetic method of PEGylated peptides, possessing a fluorescent moiety at one end of the PEG chain, which enabled noninvasive whole-body trafficking of such molecules in living rats.

研究分野：医薬化学

キーワード：ポリエチレングリコール クリック化学 ペプチド PEG化医薬品 イメージング 創薬 フッ素ア  
ニオン 蛍光色素

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質などの高分子化合物を医薬品として開発する際に、平均分子量 5~40 kDa のポリエチレングリコール (PEG) で修飾する研究が盛んに行われている。毒性や免疫原性が低い PEG を高分子化合物に結合すると、抗原性や免疫原性の消失、血中安定性や水溶性の向上、血中滞留時間の延長などが期待される。すでに 10 余種の PEG 化タンパク質性医薬品や PEG 化核酸医薬品が市販されているが、過去に開発中止となった医薬品候補化合物が PEG 修飾によって従来と異なる体内動態を示す可能性もあり、PEG 修飾は医薬品開発における重要な研究分野の 1 つである。

一方、今日の創薬研究において、臨床試験段階で新薬候補化合物の約 90% が脱落している。これは動物とヒトとの種差による体内動態の違いが主要原因の 1 つになっている。この問題を解決すべく、第 Ⅲ 相臨床試験に入る前に、ヒトでの体内動態を極低用量で検証する「マイクロドーズ臨床試験」が本邦においても実施されつつある。しかし、前述した PEG 化医薬品の体内動態をリアルタイムで非侵襲的に解析する方法は未だ報告されていない。

薬物の体内動態を高感度で解析ができる有効な手段の 1 つとして、対象化合物に [18F]F を導入しポジトロン断層法 (PET) で検出する方法がある。[18F]F の半減期が 110 分と短いために、[18F]F を対象化合物に迅速に導入する合成技術が必要となる。その基礎研究として、Conti らの [18F]F-PEG (Mw 3 kDa) を結合したペプチド (*Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2004**, *31*, 1081-1089) と、著者らの [18F]F-PEG (Mw 2 kDa, 10 kDa) (*Mol. Pharmaceutics*, **2011**, *8*, 302-308; *Mol. Pharmaceutics*, **2013**, *10*, 2261-2269) (いずれも PET を用いた体内動態解析) の報告がある。これらの研究を更に進める為には、より長鎖の PEG が種々のペプチドに結合した化合物に於いて、[18F]F 導入を可能にする合成法を開発する必要があった。しかし、ペプチドは熱に不安定で、かつ多様な極性官能基を有すること、PEG 鎖が長くなるほど反応性が低下すること、フッ素アニオンの乏しい求核性などが原因して、上記の要件を満たす合成法は未だ無い。

### 2. 研究の目的

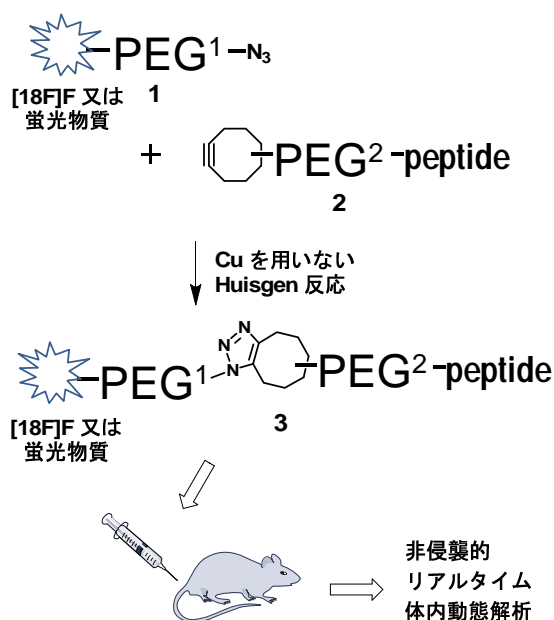
PEG 化医薬品候補化合物のマイクロドーズ臨床試験に資する、長鎖 PEG 化ペプチドの [18F]F 標識化法を開発する。

### 3. 研究の方法

長鎖 PEG は水溶性で、高極性、高分子量であるため、合成と精製のどちらも困難である。さらに、求核性が弱いフッ素アニオンを長鎖 PEG に短時間で結合するためには 80 以上に加熱する必要があることが、著者らの以前の研究 (*Mol. Pharmaceutics*, **2011**, *8*, 302-308) から分かっている。しかし、熱に不安定なペプチドが結合した PEG を加熱条件は適用できない。このジレンマを解決する方法として、クリック化学 (Huisgen 反応) を活用する合成法 (Scheme 1) を考案した。すなわち、標識部位とアジド基を各末端に有する PEG (1) と、ペプチドが結合したシクロオクチン誘導体 (2) を別々に調製し、銅触媒を用いない温和な条件下での Huisgen 反応によって、両者を短時間で連結して目的化合物 (3) を合成するというアイデアである。本法は、フッ素化による 1 の合成に高温条件が適用できること特長である。また、3 の PEG 中央部に Huisgen 反応連結部を配置することで、この連結部分が 3 の動態に及ぼす影響を軽減できる利点もある。

また、放射性同位元素 [18F]F を導入する実験は、特殊な設備を必要とするので、[18F]F の代わりに、安定同位体 [19F]F を用いて種々の予備実験を行う。同時に、より簡便に動態解析が出来るように、[18F]F の代わりに蛍光物質を結合した PEG 化医薬品候補化合物の合成も併せて検討する。

本研究では、PEG を結合するタンパク質の一例として、がん細胞親和性ペプチド RGDfC を用いて 3 の合成を行う。



Scheme 1

#### 4. 研究成果

(1) まず、通常の実験室で取り扱い容易な蛍光物質 AlexaFluor を標識化剤として用い、全長 2 kDa の PEG 化 RGDfC **3a** (peptide = RGDfC) の合成を検討した。すなわち、市販の PEG から末端にアミノ基とアジド基を有する化合物を合成し、これに AlexaFluor を結合したアジ化 PEG **1a** を合成した。また、ジベンゾアザシクロオクチンにエチニルマレイミドを介して RGDfC を結合した化合物 **2a** を合成した。次に **1a** と **2a** を室温で攪拌した。本条件下、予期した Huisgen 反応が進行し、**3a** が得ることができた。同様にして、RGDfC の代わりに長鎖アルキル基を結合した **3a'** (peptide = S-nC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>) を対照化合物として合成した。なお、両親媒性で高極性の PEG を含む全ての化合物は、取扱いや精製が極めて難しく、本研究当初は種々の課題に遭遇したが、NMR や HPLC を駆使した反応追跡、イオン交換樹脂を用いる非水系後処理等によってこれらの問題を克服することができた。

(2) 合成した **3a** と **3a'** を各々ヒト肺がん細胞を移植したラットの尾静脈から投与し、AlexaFluor の蛍光によって in vivo イメージングした。解析の結果、**3a** は **3a'** よりも、がん細胞に多く集積することがわかった。

(3) [18F]F が結合した **3** (Mw 4 kDa) 合成の基礎実験として、安定同位体[19F]F を用いて **1b** (Mw 2 kDa) と **2b** (Mw 2 kDa) の Huisgen 反応の条件を種々検討した。その結果、**1b** と

**2b** の濃度や反応温度などの条件を適宜選択することで Huisgen 反応が 10 分間で終了することがわかった。この結果から、より分子量の大きい PEG にも本法が適用できると考えている。

(4) JST の支援を受けて、上記の標識化された PEG 化医薬品候補化合物ならびにその合成法を PCT 出願した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

T. Fukuta, T. Ishii, T. Asai, G. Nakamura, Y. Takeuchi, A. Sato, Y. Agato, K. Shimizu, S. Akai, D. Fukumoto, N. Harada, H. Tsukada, A. Kawaguchi, N. Oku, Real-Time Trafficking of PEGylated Liposomes in the Rodent Focal Brain Ischemia Analyzed by Positron Emission Tomography, *Artificial Organs*, **2014**, 38, 662-666. DOI: 10.1111/aor.12350.

T. Takashima, T. Shingaki, Y. Katayama, E. Hayashinaka, Y. Wada, M. Kataoka, D. Ozaki, H. Doi, M. Suzuki, S. Ishida, K. Hatanaka, Y. Sugiyama, S. Akai, N. Oku, S. Yamashita, Y. Watanabe, *Mol. Pharmaceutics*, **2013**, 10, 2261-2269. DOI: 10.1021/mp300469m.

[学会発表](計 1 件)

澤田健太郎, 山内早人, 石田 翔, 岡本彩香, 浅井知浩, 奥 直人, 赤井周司, 長鎖 PEG を結合したがん細胞親和性ペプチドの合成とその非侵襲的体内動態解析, 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 平成 26 年 11 月 26-28 日, 兵庫県神戸市.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：[18F]F または蛍光色素で標識された  
PEG 化生物活性化合物の製造方法，ならびに  
その体内動態解析

発明者：赤井周司，奥 直人

権利者：静岡県立大学法人

種類： 特許

番号： PCT Int. Appl. WO 2014157584

出願年月日：平成 26 年 3 月 27 日

国内外の別： 国外

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b002/>

6．研究組織

(1) 研究代表者

赤井 周司 (AKAI, Shuji)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60192457

(2) 連携研究者

奥 直人 (OKU, Naoto)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10167322