

分子イメージングや内照射治療への応用を目的とする  
新規二官能性キレート試薬の開発に関する研究

2013 年

鈴木 博元



## 目次

緒言.....	3
第一章 二官能性 ODTA の合成とその基礎的評価.....	8
1-1. 方法.....	9
1. 試薬および機器.....	9
2. 合成.....	9
3. <sup>111</sup> In 標識.....	19
4. <sup>111</sup> In-C-ODTA および <sup>111</sup> In-C-DOTA の安定性の評価.....	20
5. <sup>111</sup> In-C-ODTA のマウス体内動態の検討および尿中の化学形の分析.....	20
1-2. 結果.....	20
1. 合成.....	20
2. <sup>111</sup> In 標識.....	21
3. <sup>111</sup> In-C-ODTA および <sup>111</sup> In-C-DOTA の安定性の評価.....	21
4. <sup>111</sup> In-C-ODTA のマウス体内動態の検討および尿中の化学形の分析.....	22
1-3. 考察.....	25
1-4. 小括.....	27
第二章 結合部位としてカルボキシル基を有する二官能性キレート試薬の合成法の開発と その応用.....	28
2-1 方法.....	28
1. 試薬および機器.....	28
2. 合成.....	29
3. <sup>111</sup> In 標識.....	43
4. <sup>111</sup> I-BCD-G および <sup>111</sup> I-BCD-GG のマウス体内動態の検討.....	43
5. BBMVs によるインキュベーション実験.....	44
6. <sup>111</sup> In 標識 Fab の作製.....	45
7. <sup>111</sup> In 標識 Fab の安定性の検討.....	46
8. <sup>111</sup> In 標識 Fab のマウス体内動態の検討.....	46
2-2. 結果.....	46
1. 合成.....	46
2. <sup>111</sup> I 標識.....	47
3. <sup>111</sup> I-BCD-G および <sup>111</sup> I-BCD-GG のマウス体内動態の検討.....	47
4. BBMVs によるインキュベーション実験.....	50

5. $^{111}\text{In}$ 標識 Fab の作製 .....	52
6. $^{111}\text{In}$ 標識 Fab の安定性の検討 .....	52
7. $^{111}\text{In}$ 標識 Fab のマウス体内動態の検討 .....	53
2-3. 考察 .....	55
2-4. 小括 .....	58
総括 .....	59
参考文献 .....	60
論文目録 .....	68
主査および副査名簿 .....	68
謝辞 .....	69

## 【緒言】

現在、腫瘍の分子イメージング、内照射治療を目的とする放射性薬剤の開発研究が進められており、腫瘍に選択的に放射活性を送達するために、抗体やペプチドなどの様々な標的指向性分子が利用されている(1, 2)。腫瘍に選択的に放射活性を送達することで、分子イメージング薬剤においては高コントラストな画像が得られ、また内照射治療薬剤では標的部位選択的に高線量を照射可能となり、高い治療効果が期待できる。

放射性薬剤に使用される放射性核種には、放出する放射線の物理学的性質や経済性、汎用性などの点から、金属 RI の使用が望ましい。しかし、金属 RI による標識では、直接金属 RI を標的指向性分子と安定に結合させることが困難である。このため、標的指向性分子に金属 RI と安定に錯体を形成する薬剤を導入する方法が用いられている。このとき使用する薬剤は、分子内に標的指向性分子との結合部位と安定な金属 RI 錯体を形成するキレート部位を併せもち、二官能性キレート試薬とよばれている。これまでに様々な金属 RI に適した配位子構造を持つ二官能性キレート試薬が開発されてきた。

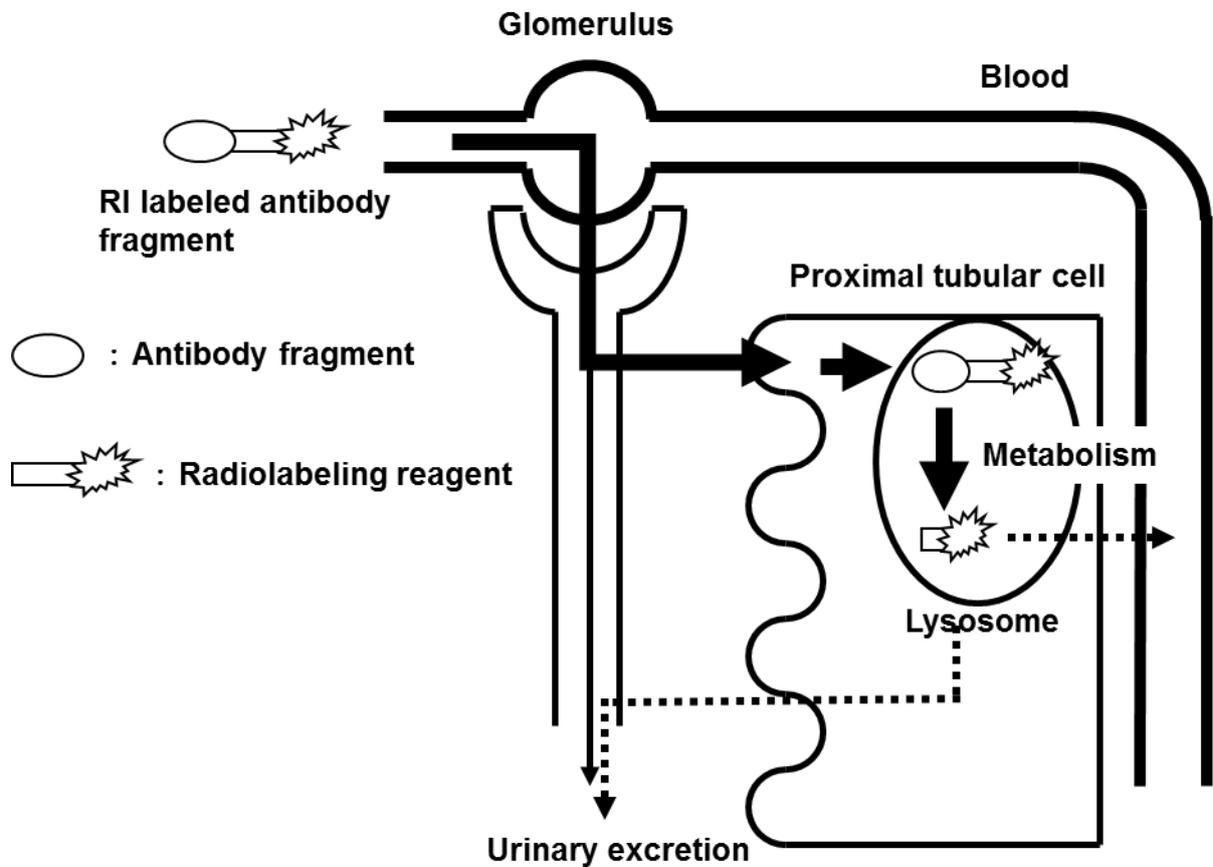
標的指向性分子の金属 RI 標識体を作製する場合、事前に二官能性キレート試薬を標的指向性分子と結合させた conjugate を作製する。そして、必要時に金属 RI を conjugate に加えることで、金属 RI 標識体を容易に調製することが可能である。このとき、極微量の金属 RI が短時間のうちに定量的に錯体を形成できるように、通常金属 RI に対して大過剰の conjugate 存在下で反応を行い、未精製のまま反応液を生体内に投与する。このため、投与試料中には大過剰の非標識体が混在しており、これらが標識体の標的分子への結合と競合する可能性がある。比放射能の高い標識体を作製することで、このような競合は低減可能である。実際にこれまでの検討で、比放射能の低下とともに標的部位への集積が減少する例が報告されている(3-5)。このため、二官能性キレート試薬には、低濃度においても高収率で金属錯体を与えるキレート部位が必要となる。さらに、生体内での金属 RI の解離は画像診断精度や副作用に直結するため、生体内で安定な金属錯体を与える性質も必要となる。

このような二官能性キレート試薬を用いた薬剤の代表例の一つに、インジウム-111 ( $^{111}\text{In}$ )およびイットリウム-90 ( $^{90}\text{Y}$ )標識抗 CD20 抗体、Zevalin が挙げられる。Zevalin は低悪性度 B 細胞性非ホジキンリンパ腫ならびにマントル細胞リンパ種を適応とした分子標的の内照射治療薬である。Zevalin で使用する金属 RI、 $^{111}\text{In}$  および  $^{90}\text{Y}$  は化学的に類似した性質を示し、どちらも Zevalin のキレート形成部位と生体内で安定な錯体を形成する(6)。 $^{111}\text{In}$  は半減期 67.3 時間、分子イメージングに適した 171、245 keV の  $\gamma$  線を放出するため、画像診断に有用である。 $^{90}\text{Y}$  は最大エネルギー 2.28 MeV の  $\beta$  線を放出し、また適度な半減期 64.1

時間を有することから、がんの治療に有効である。このような金属 RI の性質を利用して、Zevalin では治療に先立ち  $^{111}\text{In}$ -Zevalin を投与することで、骨髄などの正常組織に異常な集積がないことを確認した後、 $^{90}\text{Y}$ -Zevalin を用いた治療を行う(7)。 $^{90}\text{Y}$ -Zevalin では、抗原と結合した細胞からの放射線が、抗原を発現していない近傍のがん細胞をも照射できる (cross-fire 効果) (8)。このため、化学療法や抗 CD-20 キメラ型モノクローナル抗体薬(Rituxan) に対し抵抗性を獲得した腫瘍に対しても高い奏効率を示すことが報告されている(9, 10)。

一方、IgG 抗体を母体とする Zevalin では、血液クリアランスや組織移行の遅延による骨髄被ばくと腫瘍組織内での不均一な分布が認められることから(11)、これらの問題の改善は、より有効で安全な薬剤の開発につながる。抗体 Fab フラグメントを始めとする低分子化抗体は IgG 抗体に比べて、速やかな血液クリアランスと標的組織への移行を示す。また、標的組織内で速やかに、かつ均一に分布する。このため、骨髄被ばくの低減や効果の増強が期待され、これらを用いたがんの分子イメージング薬剤や内照射治療薬剤への応用が進められている(12, 13)。しかしその一方で、低分子化抗体は、投与早期から腎臓への非特異的な集積と滞留を示し、分子イメージングの妨げになるだけでなく、治療への応用に大きな制約を与える(14, 15)。

RI 標識抗体フラグメント投与時に観察される腎臓での放射性物質の滞留原因は、これまでの多くの検討により明らかにされている。一般に腎臓において糸球体ろ過を受ける分子サイズは 60-70 kDa 以下の分子量である。従って、IgG 抗体(150 kDa)は糸球体ろ過を受けないが、Fab (50 kDa)や single-chain Fv (25 kDa)などの RI 標識抗体フラグメントは生体内に投与後、糸球体ろ過を受ける。糸球体ろ過された RI 標識抗体フラグメントは管腔側から近位尿細管細胞に取り込まれ、リソソームに運搬、代謝される。このとき生成する放射性代謝物の多くがリソソーム内に残留することにより、腎臓で放射活性が長時間にわたって滞留する(16, 17) (Figure 1)。



**Figure 1.** The retention mechanism of radioactivity in the kidneys following administration of radiolabeled antibody fragments

このような背景のもと、3'-iodohippuryl-*N*<sup>c</sup>-maleoyl-L-lysine (HML)が開発された(18)。HMLは腎刷子縁膜酵素により分子内の Gly-Lys 配列が開裂し、近位尿細管細胞に取り込まれる前に、放射性代謝物として尿排泄性の高いメタヨード馬尿酸(18, 19)を遊離する。こうした機序により、放射性ヨウ素標識 HML 結合 Fab ( $[^{125/131}\text{I}]\text{HML-IT-Fab}$ )のマウス体内動態は、放射性ヨウ素を直接標識した Fab ( $[^{125}\text{I}]\text{Fab}$ )と比較して、腫瘍への集積を損なうことなく、投与早期から腎臓への放射性物質の集積を大きく低減することに成功した(20, 21) (Figure 2)。

放射性ヨウ素を用いる HML で達成された成果を  $^{111}\text{In}$  や  $^{90}\text{Y}$  などの金属 RI に展開できれば、腫瘍の核医学診断や治療に大きく貢献することが期待される。しかし、これらの金属 RI で標識した抗体フラグメントやペプチドから、リソソーム代謝により生成する放射性代謝物は高い細胞内滞留性を示す(22, 23)。このため、金属 RI 標識抗体フラグメントに用いる標識薬剤には腎細胞に取り込まれる前に、効率よく基質が開裂する性質が必要となる。

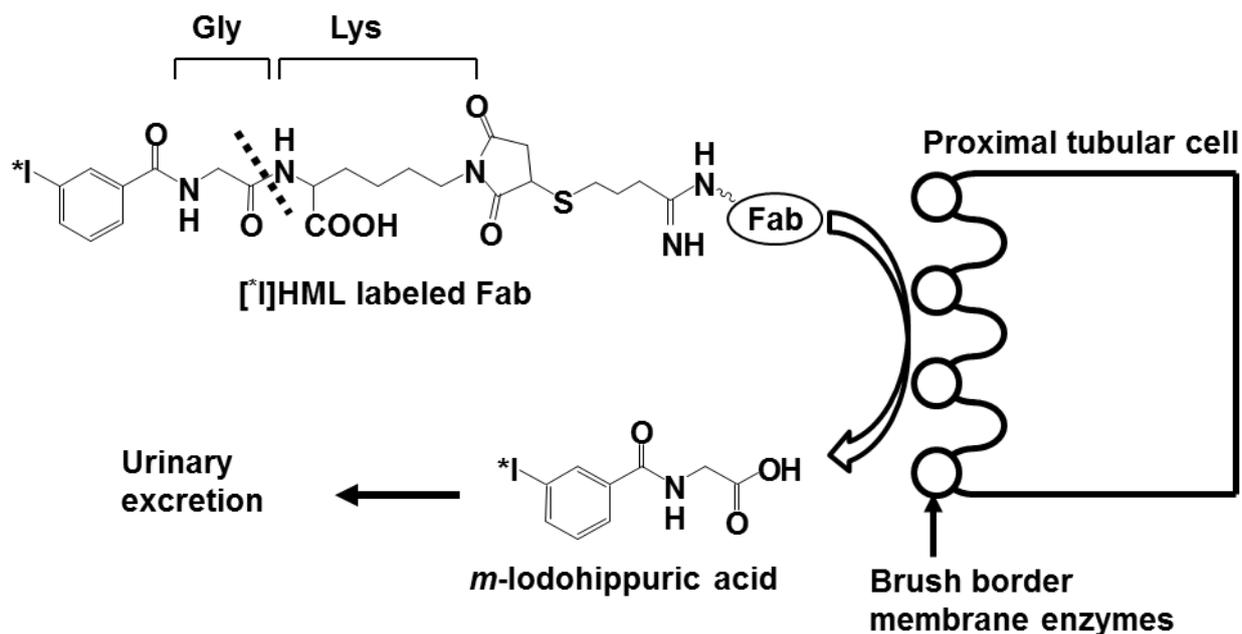
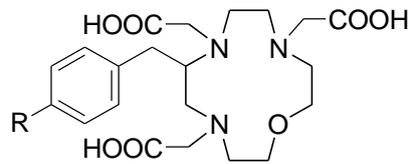


Figure 2. Chemical design of HML

本薬剤設計を金属 RI へ展開するうえでは、従来の二官能性キレート試薬の薬剤設計である低濃度においても高収率で安定な錯体を与えるキレート部位と抗体フラグメントと結合する部位に加え、刷子縁膜酵素により尿排泄性の高い放射性代謝物を遊離する酵素認識部位を有する二官能性キレート試薬の作製が必要となる。

本研究では、本邦で認可を受けている  $^{90}\text{Y}$  を用いた内照射治療薬剤への応用を視野に入れて、使用する放射性核種に  $^{111}\text{In}$  を選択した。そして、腎放射活性を低減する  $^{111}\text{In}$  標識抗体フラグメント薬剤の開発に向けて、その母体となる新規二官能性キレート試薬の開発を行った。

第一章では、低濃度においても高収率で安定な錯体を与えるキレート部位の検討を行った。キレート構造の候補としては、1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane- $N,N',N''$ -triacetic acid (ODTA) を選択した。ODTA は  $\text{In}$  と安定性の高い錯体を形成することが報告されているが、その錯形成能について詳細な検討はなされていない(24)。また、ODTA を母体とする二官能性キレート試薬の合成法は報告されていない。そこで第一章では、ODTA を母体とする二官能性キレート試薬(C-ODTA, Fig. 3)の合成法を開発し、 $^{111}\text{In}$  標識薬剤としての評価を行った。



**Figure 3. Structure of C-ODTA**

腎刷子縁膜酵素の作用で尿排泄性の高い放射性代謝物を与える薬剤設計では、腎臓において生成した放射性代謝物が遊離した後、速やかに尿中に排泄される性質が必要となる。そこで、放射性代謝物を尿排泄性の高い馬尿酸の誘導体とすることで優れた尿排泄性が得られると考え、馬尿酸のパラ位にキレート部位を導入する構造を放射性代謝物として考案した。本放射性代謝物作製にあたっては、ベンジル基のパラ位にカルボキシル基を有する二官能性キレート試薬が必要となるが、このような二官能性キレート試薬の開発例は報告されていない。

以上から、第二章では本薬剤設計の母体としてベンジル基のパラ位にカルボキシル基を有する新規二官能性キレート試薬の合成方法を開発した。さらに、本キレート試薬に、抗体フラグメントとの結合部位および酵素認識部位を導入することでHMLの薬剤設計への応用を試みた。

これらの結果について以下に詳述する。

## 【第一章 二官能性 ODTA の合成とその基礎的評価】

二官能性キレート試薬のキレート形成部位には、生体内で安定な金属錯体を与えると同時に、低配位子濃度でも速やかに錯形成できる性質が必要となる。 $^{111}\text{In}$  や  $^{90}\text{Y}$  の標識に用いられる二官能性キレート試薬の母体配位子には polyazamacrocycle と非環状配位子の 2 種類が存在する。1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-tetraacetic acid (DOTA) を始めとする polyazamacrocycle は  $^{111}\text{In}$  や  $^{90}\text{Y}$  と速度論的に非常に安定な錯体を形成する一方(25, 26)、錯形成速度が緩徐である(27, 28)。Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA) や diethylenetriamine-*N,N,N',N'',N'''*-pentaacetic acid (DTPA) などの非環状配位子は温和な条件においても高い放射化学的収率で金属錯体を与え、DTPA が Y と錯形成する速度は Y-DOTA の錯形成速度のおよそ 1600 倍速いと報告されている(29)。しかし、その錯体の安定性は DOTA に比べて低い(26)。以上の背景から、DOTA の錯形成速度を改善できる polyazamacrocycle の開発が望まれており、その開発研究が行われている(30-32)。

ODTA は DOTA よりも安定度定数の高い  $^{111}\text{In}$  錯体を与えることを報告されていながら ( $^{111}\text{In}$ -ODTA;  $\log K_{\text{ML}} = 25.48$ ,  $^{111}\text{In}$ -DOTA;  $\log K_{\text{ML}} = 23.9$ )、金属 RI との錯形成反応について詳細な検討はされていない。DOTA の錯形成反応では、2 種類のジプロトン化された中間体が形成される。まず 4 つの酢酸基が金属と配位する。次いで、速やかに 4 つの窒素原子のうちの 2 つが配位する。このときに生じる中間体の安定性が比較的高いことが、続く錯形成反応の進行が緩徐となる原因であると考えられている。これに対して、酢酸基を 3 つ有する polyazamacrocycle では、DOTA と比較して酢酸基が減少することで、中間体の安定性が損なわれるため、DOTA と比較して放射化学的収率を改善することが期待される(30, 33)。そこで、ODTA を母体とする二官能性キレート試薬前駆体(C-ODTA, Figure 4)を合成し、 $^{111}\text{In}$  との錯形成反応や作製した錯体の安定性の評価を行った。また、対照には DOTA の二官能性キレート試薬前駆体(C-DOTA, Figure 4)を用いた。

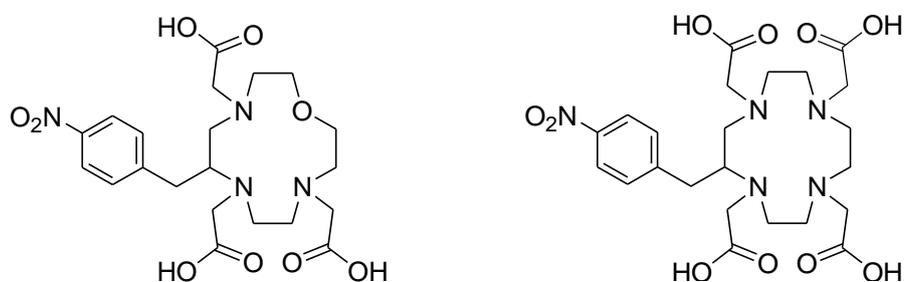


Figure 4. Structures of C-ODTA (left) and C-DOTA (right)

## 1-1. 方法

### 1. 試薬および機器

C-DOTA は、ベンジル基パラ位にイソチオシアネート基を有する二官能性キレート試薬の合成前駆体であり、パラ位にニトロ基を有する構造を合成し、用いた。<sup>1</sup>H 核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H-NMR)は JEOL JNM-ALPHA 400 spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)を用いて測定した。FAB-MS および ESI-MS はそれぞれ JEOL JMS-AX500 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)、Agilent 6130 Series Quadrupole LC/MS spectrometer (Agilent technologies, Tokyo, Japan)を用いて測定した。融点測定は MP-500D (Yanaco, Kyoto, Japan)を用いて測定した。試薬はすべて特級試薬をそのまま用いた。元素分析は PE-2400 (Perkin-Elmer, Tokyo, Japan)を用いて測定した。<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (74 MBq/mL) は日本メジフィジックスより購入した。放射化学的収率は、シリカゲルプレート (TLC aluminium sheets Silica gel 60, MERCK, Tokyo, Japan) を用い、methanol:水=3:7 の展開溶媒にて 10 cm 展開したものを 5 mm ずつ切断し、それぞれの画分の放射活性をオートウェルガンマシステム (WIZARD3, PerkinElmer, Tokyo, Japan) で測定した。HPLC による分析では、HITACHI Ltd. (Tokyo, Japan) のポンプ (L-7100) と UV detector (L-7405) を使用し、さらに  $\gamma$  線検出器 (Gabi Star, raytest Straubenhardt, Germany) を接続して用いた。分析用カラムには Unison US-C18 (Imtakt, Kyoto, Japan) を用い、移動相には A 相に 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/水、B 相に 0.1% TFA/methanol を使用した。0-20 分で A 相 100%、B 相 0% から A 相 70%、B 相 30% まで変化させる直線 gradient 法により流速 1 mL/min で分析した。実験動物は Japan SLC (Hamamatsu, Japan)より購入した ddY 系雄性マウス (SPF, 6-week-old)を用いた。

## 2. 合成

### *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-2,2'-oxybis(ethylamine) (1).

化合物(1)は以前に報告された方法を一部変更することで合成した(34)。

2,2'-Oxybis(ethylamine) (10.0 mL, 94.1 mmol)を methanol (1000 mL)に溶解し、氷冷した溶液に tetrahydrofuran (THF, 300 mL)に溶解した di-*tert*-butyl dicarbonate ((Boc)<sub>2</sub>O, 10.3 g, 47.0 mmol) を 1 時間かけて滴下した。滴下終了後、室温で 24 時間攪拌し、溶媒を減圧留去した。残渣を 1 N NaOH (200 mL)で溶解した後、chloroform (300 mL x 3)で抽出した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、溶媒を減圧留去することで、化合物(1) (6.88 g, 71.5%)を無色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.39 (9H, s, *Boc*), 2.79-2.82 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3.24-3.28 (2H, dd, CH<sub>2</sub>), 3.41-3.43 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3.44-3.47 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 5.00 (1H, d, NH). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 205, found: 205.

### *N*-Trifluoroacetyl-4-nitro-*L*-phenylalanine (2).

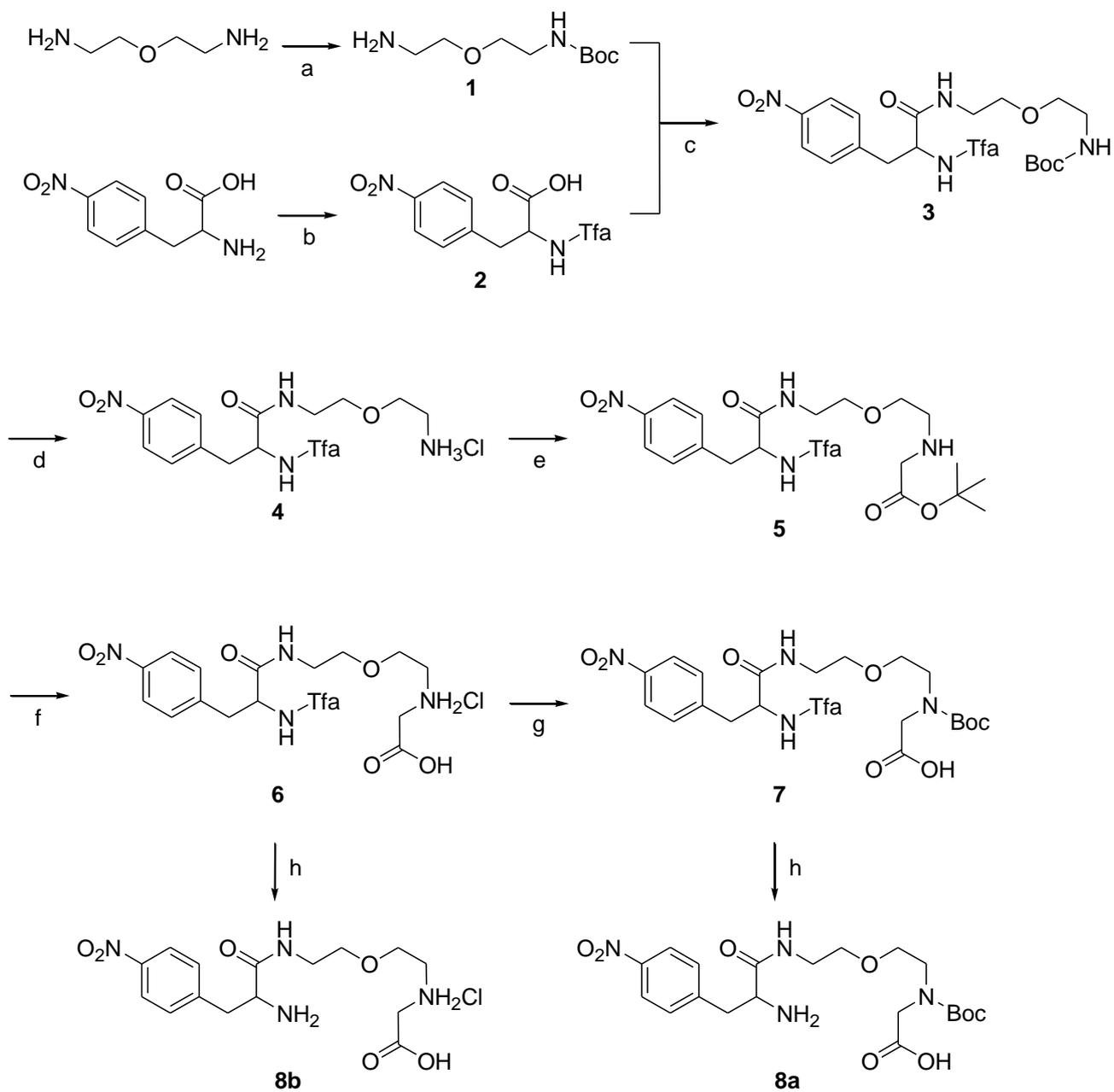
4-Nitro-L-phenylalanine (5.26 g, 25.0 mmol)を TFA (50 mL)に溶解し、60 °C に加熱した溶液に trifluoroacetic anhydride ((Tfa)<sub>2</sub>O, 8.90 mL, 63.0 mmol)と TFA (20 mL)の混液を 2 時間かけて滴下した。滴下終了後、室温に戻して 15 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し toluene で共沸した。残渣を 5% NaHCO<sub>3</sub> (100 mL)に溶解し、chloroform (50 mL x 3)で洗浄した。水層に 10% citric acid (100 mL)を加えて pH を 3 とし、ethyl acetate (300 ml x 3)で抽出した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、溶媒を減圧留去することで化合物(2) (6.27 g, 81.7%)を淡黄色結晶として得た。mp 139-140 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.27-3.31, 3.42-3.48 (2H, dq, CH<sub>2</sub>), 4.93-4.96, (1H, dd, CH), 6.77-6.78 (1H, d, NH), 7.30-7.33 (2H, d, aromatic), 8.17-8.19 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M-Na): m/z 305, found: 305. Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>·0.2 H<sub>2</sub>O: C, 42.65; H, 3.06; N, 9.04. Found: C, 42.57; H, 2.89; N, 8.80.

**(S)-1-(tert-Butyloxycarbonyl)-10-trifluoroacetyl-9-(4-nitrobenzyl)-8-oxo-1,7,10-triaza-4-oxadecane (3).**

化合物(2) (1.41 g, 4.61 mmol)を THF (20 mL)に溶解し、窒素雰囲気下、-15 °C に冷却した後、N-methylmorpholine (NMM, 0.51 mL, 4.61 mmol)を滴下し、続いて isobutylchloroformate (IBCF, 0.61 mL, 4.61 mmol)を滴下した。5 分後に、THF (10 mL)に溶解した化合物(1) (0.857 g, 4.19 mmol)を滴下した。反応液を-15 °C で 30 分間攪拌した後、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、ethyl acetate (50 mL)に再溶解し、5% NaHCO<sub>3</sub> (30 mL x 2)、5% citric acid (30 mL x 3)、sat. NaCl (30 mL x 1)で洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol=100:1 を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することで化合物(3) (1.67 g, 80.6%)を淡黄色結晶として得た。mp 128-129 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.44 (9H, s, Boc), 3.17-3.51 (10H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 4.76-4.78 (1H, dd, CH), 6.89 (1H, d, NH), 7.35-7.37 (2H, d, aromatic), 8.14-8.16 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+Na)<sup>+</sup>: m/z 515, found: 515. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub>: C, 48.78; H, 5.53; N, 11.38. Found: C, 48.46; H, 5.30; N, 11.21.

**(S)-10-Trifluoroacetyl-9-(4-nitrobenzyl)-8-oxo-1,7,10-triaza-4-oxadecane hydrochloride (4).**

化合物(3) (1.52 g, 3.09 mmol)を 4 M HCl/ethyl acetate (15 mL)に溶解し、1 時間攪拌した。反応終了後、結晶をろ取り、diethyl ether で洗浄した。得られた結晶を減圧乾燥することで化合物(4) (1.30 g, 98.4%)を白色結晶として得た。mp 211-212 °C. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): δ 2.96-2.99 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3.07-3.36 (6H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 3.47-3.49 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 4.51-4.55 (1H, t, CH), 7.31-7.34 (2H, d, aromatic), 8.04-8.06 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 393, found: 393. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>·1.4 HCl: C, 40.63; H, 4.64; N, 12.64. Found: C, 40.80; H, 4.52; N, 12.62.



**Scheme 1.** Synthetic procedure for the linear precursors of C-ODTA. Reagents and conditions: (a)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ , methanol, THF, 72%; (b)  $(\text{Tfa})_2\text{O}$ , TFA, 82%; (c) IBCF, NMM, THF, 81%; (d) 4 M HCl/ethyl acetate, 98%; (e) *tert*-butyl bromoacetate, TEA, DMF, 53%; (f) 4 M HCl/ethyl acetate, 93%; (g)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ , TEA, DMF, 79%; (h) 25%  $\text{NH}_3$  aq.

***tert*-Butyl (S)-12-trifluoroacetyl-11-(4-nitrobenzyl)-10-oxo-3,9,12-triaza-6-oxadodecanate (5).**

化合物(4) (5.63 g, 13.1 mmol)を *N,N*-dimethylformamide (DMF, 30 mL)に溶解し、triethylamine (TEA, 2.75 mL, 19.7 mmol)を加えた。溶液を氷冷し、窒素雰囲気下で *tert*-butyl bromoacetate (1.93 mL, 13.1 mmol)を滴下し、室温に戻して24時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣を ethyl acetate (50 mL)に溶解して、5% NaHCO<sub>3</sub> (20 mL × 3)、sat.NaCl (5 mL × 1)で洗浄した。無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol=60:1 を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することで化合物(5) (3.53 g, 53.1%)を淡黄色結晶として得た。mp 55-58 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.42 (9H, s, *t*Bu), 2.85-2.88 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.13-3.18, 3.30-3.36 (2H, dq, CH<sub>2</sub>), 3.41-3.58 (8H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 4.85-4.87 (1H, dd, CH), 7.38-7.40 (2H, d, aromatic), 7.55 (1H, s, NH), 8.12-8.14 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 507, found: 507. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 48.09; H, 5.96; N, 10.68. Found: C, 48.06; H, 5.74; N, 10.44.

**(S)-12-Trifluoroacetyl-11-(4-nitrobenzyl)-10-oxo-3,9,12-triaza-6-oxadodecanoic acid hydrochloride (6).**

化合物(5) (3.43 g, 6.77mmol)を 4 M HCl/ethyl acetate (30 mL)に溶解し、3時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、diethyl ether で共沸することで化合物(6) (3.07 g, 93.0%)を白色結晶として得た。mp 188-189 °C. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): δ 3.03-3.36 (10H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 3.51-3.55 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.51-4.55 (1H, t, CH), 7.31-7.33 (2H, d, aromatic), 8.03-8.06 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M-H)<sup>-</sup>: m/z 449, found: 449. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub>·HCl: C, 41.94; H, 4.55; N, 11.51. Found: C, 41.88; H, 4.58; N, 11.28.

**(S)-3-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-12-trifluoroacetyl-11-(4-nitrobenzyl)-10-oxo-3,9,12-triaza-6-oxadodecanoic acid (7).**

化合物(6) (3.07 g, 6.31 mmol)を DMF (20 mL)に溶解し、さらに TEA (1.32 mL, 9.46 mmol)を加えた。氷冷下、DMF (10 mL)に溶解した(Boc)<sub>2</sub>O (1.71 g, 7.84 mmol)を滴下し、その後室温に戻して3時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去して得られた残渣を ethyl acetate (40 mL)に再溶解し、5% citric acid (20 mL × 3)で洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol=20:1 を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーにより精製すること化合物(7) (2.73 g, 78.6%)を黄色結晶として得た。mp 70-71 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.45 (9H, s, *Boc*), 3.11-3.73 (10H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 3.81-3.87, 4.09-4.16 (2H, dq, CH<sub>2</sub>), 5.06-5.18 (1H, m, CH), 7.39-7.42 (2H, d, aromatic), 7.69-7.71, 7.91-7.93 (1H, dd, NH),

8.13-8.15 (2H, d, *aromatic*). ESI-MS (M+Na)<sup>+</sup>: m/z 573, found: 573. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>F<sub>3</sub>·0.2 H<sub>2</sub>O: C, 47.69; H, 5.35; N, 10.11. Found: C, 47.79; H, 5.43; N, 9.74.

***N*-Trifluoroacetyl-2,2'-oxybis(ethylamine) hydrochloride (9).**

2,2'-Oxybis(ethylamine) (2.30 mL, 21.6 mmol)を chloroform (23 mL)に溶解し、氷冷下、chloroform (20 mL)に溶解した ethyl trifluoroacetate (2.58 mL, 21.6 mmol)を滴下した。滴下終了後、室温で一晩攪拌し溶媒を減圧留去した。残渣に 6 N HCl (10 mL) を加えた後、溶媒を減圧留去して白色結晶を得た。白色結晶に acetonitrile (5 mL)を加えて懸濁させた後、不溶物をろ去した。ろ液を減圧留去することで化合物(10) (4.16 g, 83.7%)を白色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 3.07-3.09 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3.46-3.49 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3.59-3.61 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3.64-3.67 (2H, t, CH<sub>2</sub>). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 201, found: 201.

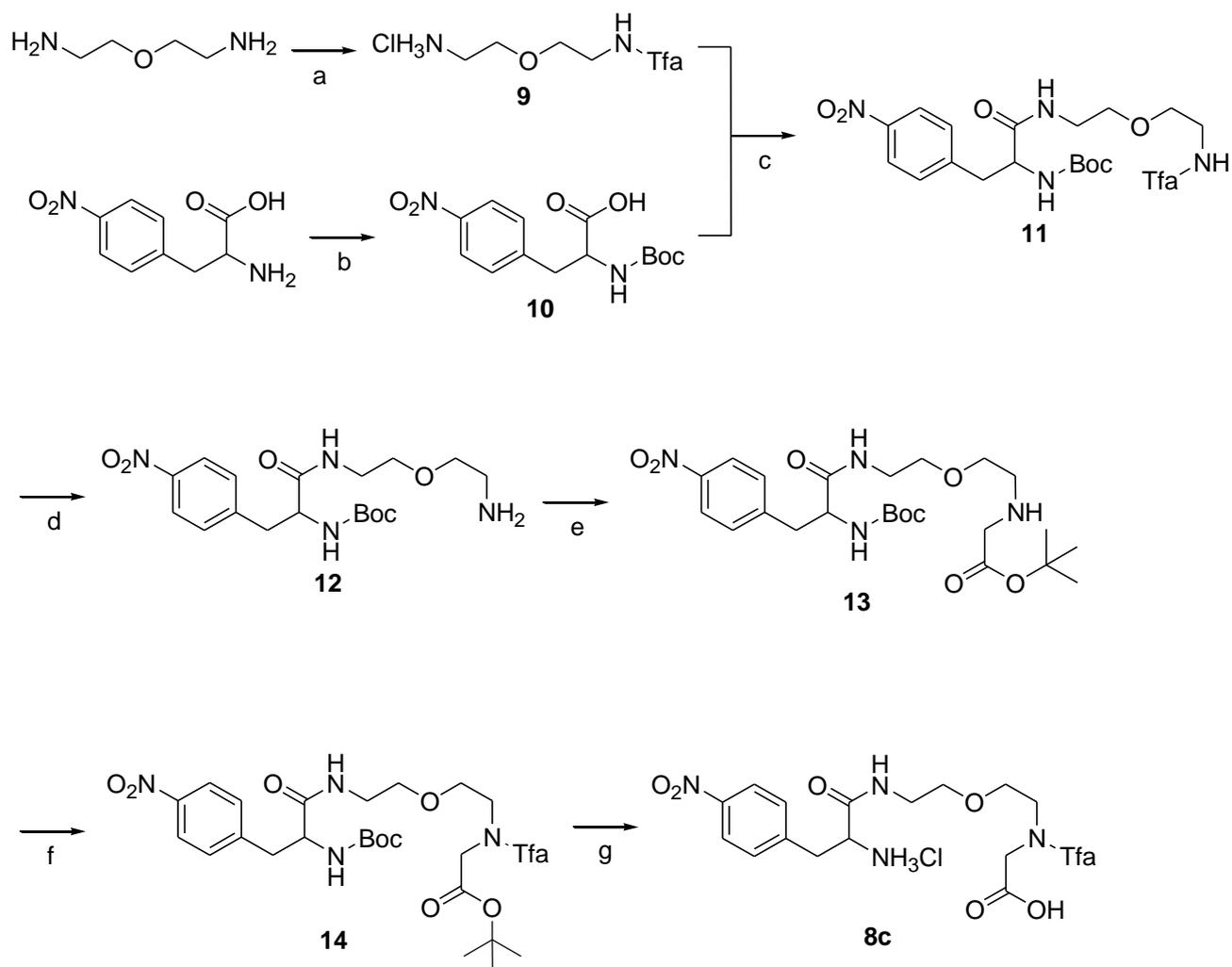
***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-4-nitro-*L*-phenylalanine (10).**

1 N NaOH (50 mL)と acetonitrile (25 mL)の混液に溶解した 4-nitro-*L*-phenylalanine (5.16 g, 24.5 mmol)の溶液を氷冷した後、acetonitrile (25 mL)に溶解した(Boc)<sub>2</sub>O (8.03 g, 36.8 mmol)を滴下した。滴下終了後、溶液を室温に戻し、一晩攪拌した。Acetonitrile を減圧留去した後、hexane (50 mL x 3)で洗浄した。水層を 10% citric acid (50 mL)で pH 3 とし、ethyl acetate (50 mL x 3)で抽出した。無水 MgSO<sub>4</sub> を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(10) (6.85 g, 90.0%)を白色結晶として得た。mp 106-107 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.29 (3H, s, *Boc*), 1.40 (6H, s, *Boc*), 3.03-3.17, 3.26-3.35 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.43-4.44, 4.63-4.65 (1H, dd, CH), 5.00-5.02, 6.87-6.89 (1H, d, NH), 7.35-7.37 (2H, d, *aromatic*), 8.15-8.17 (2H, d, *aromatic*). FAB-MS (M+Na)<sup>+</sup>: m/z 333, found: 333.

**(*S*)-10-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-1-trifluoroacetyl-9-(4-nitrobenzyl)-8-oxo-1,7,10-triaza-4-oxadecane (11).**

化合物(10) (5.47 g, 17.6 mmol) を THF (50 mL)に溶解し、窒素雰囲気下、-15 °C に冷却した後、NMM (1.94 mL, 17.6 mmol) を滴下し、続いて IBCF (2.31 mL, 17.6 mmol)を滴下した。5分後に、化合物(9) (4.16 g, 17.6 mmol)と NMM (1.94 mL, 26.4 mmol)の THF 溶液(40 mL)を滴下した。反応液を-15 °C で 30 分間攪拌した後、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、ethyl acetate (50 mL)に再溶解し、5% NaHCO<sub>3</sub> (30 mL x 3)、5% citric acid (30 mL x 2)、さらに sat.NaCl (30 mL x 1)で洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol =50:1 を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーに

より精製することで化合物(**11**) (6.82 g, 78.8%)を淡黄色結晶として得た。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.37 (9H, s, *Boc*), 3.04-3.09, 3.21-3.27 (2H, dq,  $\text{CH}_2$ ), 3.41-3.63 (8H, overlapped,  $\text{CH}_2$ ), 4.29-4.32 (1H, dd,  $\text{CH}$ ), 4.98, 6.39 (1H, d,  $\text{NH}$ ), 7.36-7.38 (2H, d, *aromatic*), 8.13-8.15 (2H, d, *aromatic*).



**Scheme 2.** Synthetic procedure for the linear precursor of C-ODTA. Reagents and conditions: (a) ethyl trifluoroacetate, chloroform, 84%; (b)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ , 1 *N* NaOH, acetonitrile, 90%; (c) IBCF, NMM, THF, 79%; (d) 25%  $\text{NH}_3$  aq, methanol, 80%; (e) *tert*-butyl bromoacetate,  $\text{NaHCO}_3$ , acetonitrile, 27%; (f)  $(\text{Tfa})_2\text{O}$ , DIEA, chloroform, 57%; (g) 4 M HCl/ethyl acetate.

**(S)-10-(tert-Butyloxycarbonyl)-9-(4-nitrobenzyl)-8-oxo-1,7,10-triaza-4-oxadecane (12).**

化合物(11) (6.82 g, 13.8 mmol)を methanol (25 mL)に溶解し、25% NH<sub>3</sub> 水溶液 (15 mL)を加えて室温で 24 時間攪拌した。さらに 25% NH<sub>3</sub> 水溶液(10 mL)を加えて 48 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣を 5% citric acid (100 mL)で溶解し、chloroform (50 mL x 3)で洗浄した。その後、水層に 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 mL)を加え、chloroform (50 mL x 3)で抽出した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、溶媒を減圧留去することで化合物(12) (4.40 g, 80.1%)を淡桃色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.37 (9H, s, *Boc*), 2.78-2.80 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3.03-3.45 (8H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 4.37-4.39 (1H, dd, CH), 5.23, 6.91 (1H, d, NH), 7.36-7.38 (2H, d, *aromatic*), 8.12-8.14 (2H, d, *aromatic*).

**tert-Butyl**

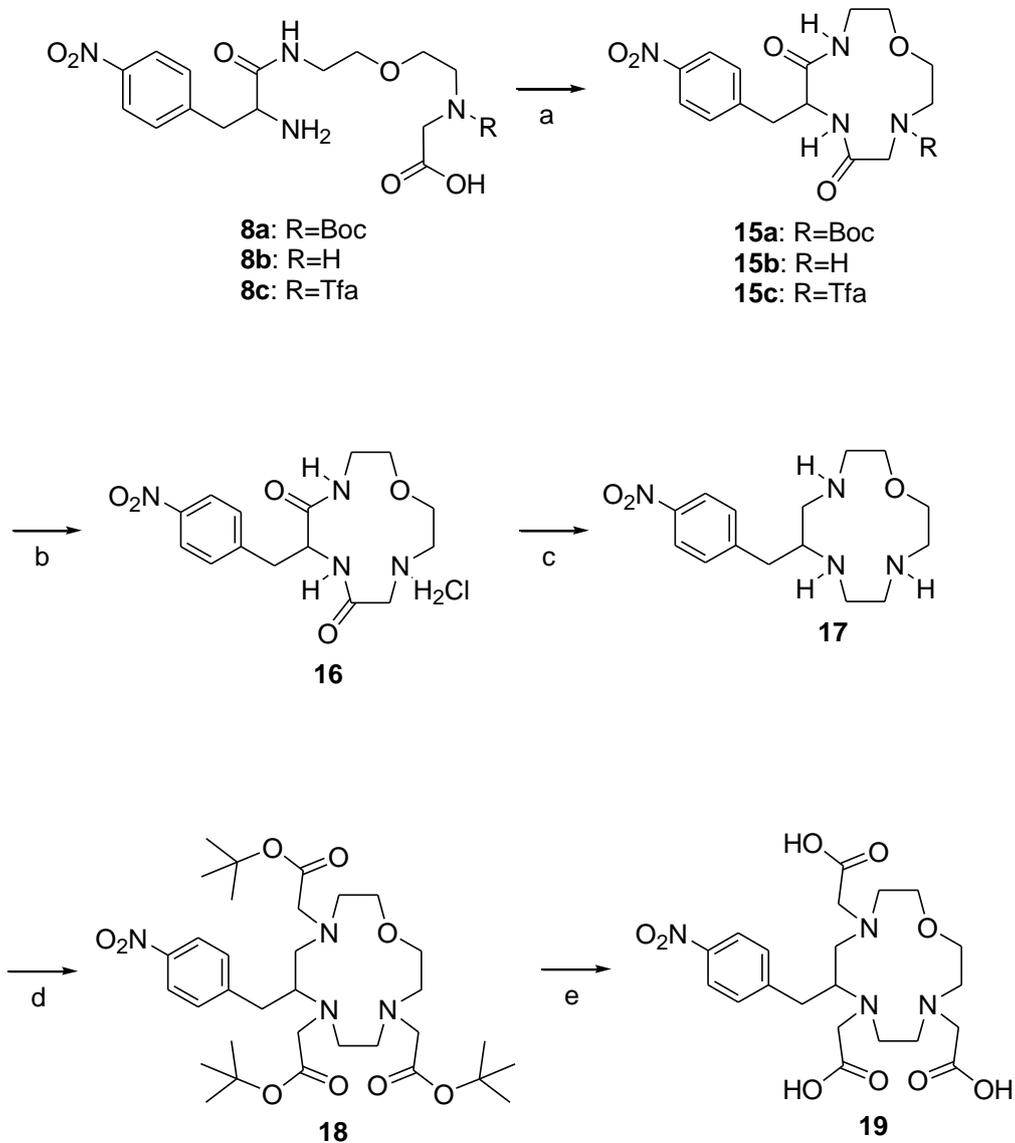
**(S)-12-(tert-butyloxycarbonyl)-11-(4-nitrobenzyl)-10-oxo-3,9,12-triaza-6-oxadodecanate (13).**

化合物(12) (1.60 g, 4.04 mmol)を acetonitrile (20 mL)に溶解し、NaHCO<sub>3</sub> (340 mg, 4.04 mmol)を加えた。窒素雰囲気下、懸濁液を氷冷し、*tert*-butyl bromoacetate (593 μL, 4.04 mmol) を滴下した。滴下終了後、反応液を 24 時間還流した。反応終了後、不溶物をろ去し、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform (50 mL)に溶解し、5% citric acid (30 mL x 3), sat.NaHCO<sub>3</sub> (30 mL x 1)で洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol:25% NH<sub>3</sub> 水溶液=60:1:0.1 を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製することで化合物(13) (534 mg, 26.5%)を赤褐色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.35 (9H, s, *Bu*), 1.44 (9H, s, *Boc*), 2.70-2.74 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3.02-3.51 (10H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 4.42-4.45 (1H, dd, CH), 5.41, 6.82 (1H, d, NH), 7.38-7.40 (2H, d, *aromatic*), 8.11-8.13 (2H, d, *aromatic*).

**tert-Butyl**

**(S)-12-(tert-butyloxycarbonyl)-3-trifluoroacetyl-11-(4-nitrobenzyl)-10-oxo-3,9,12-triaza-6-oxadodecanate (14).**

化合物(13) (190 mg, 0.373 mmol) を chloroform (10 mL)に溶解し、*N,N*-diisopropylethylamine (DIEA, 292 μL, 1.68 mmol)を加えて氷冷した後、chloroform (5 mL)に溶解した(Tfa)<sub>2</sub>O (237 μL, 4.5 mmol)を滴下した。滴下終了後、室温で 24 時間攪拌した。その後、溶液を 5% citric acid (30 mL x 3)で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した。溶媒を減圧留去した後、残渣を chloroform:methanol=120:1 を溶出溶媒とするフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いて精製することで化合物(14) (129 mg, 57.1%)を黄色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.36



**Scheme 3.** Synthetic procedure for C-ODTA. Reagents and conditions: (a) HATU, HOAt, DIEA, DMF, **15a** 74%, **15b** N.D., **15c** 48%; (b) 4 M HCl/ethyl acetate, 85%; (c) i. 1 M  $\text{BH}_3$ -THF/THF; ii. sat. HCl/methanol, 26%; (d) *tert*-butyl bromoacetate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , acetonitrile, 43%; (e) 10% anisole/TFA, 42%.

(9H, s, *t*Bu), 1.45 (9H, s, *Boc*), 3.01-3.06, 3.23-3.29 (2H, dq,  $CH_2$ ), 3.41-3.65 (8H, overlapped,  $CH_2$ ), 4.08-4.12 (1H, dd,  $CH$ ), 5.14, 6.43 (1H, d, *NH*), 7.37-7.39 (2H, d, *aromatic*), 8.13-8.15 (2H, d, *aromatic*). ESI-MS ( $M+Na$ )<sup>+</sup>: *m/z* 629, found: 629.

**(S)-10-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-6-(4-nitrobenzyl)-5,8-dioxo-4,7,10-triaza-1-oxacyclododecane (15a).**

化合物(7) (2.12 g, 3.85 mmol)を methanol (1 mL)に溶解し、25%  $NH_3$  水溶液(20 mL)を加え、室温で6時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた結晶(8a, *Boc-linear*)を DMF (35 mL)に溶解し、10 mL のガスタイトシリンジに充填した。*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU, 2.23 mg, 5.87 mmol)も DMF (35 mL)に溶解して同様にシリンジに充填した。また、三頸フラスコに DMF (1500 mL)に溶解した DIEA (2.80 mL, 16.1 mmol) と 7-aza-1-hydroxybenzotriazole (HOAt, 810 mg, 5.95 mmol)の溶液に、2つのシリンジからシリンジポンプを用いて0.9 mL/h で低速同時滴下した。滴下終了後、20時間室温で攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を ethyl acetate (250 mL)に溶解し、5%  $NaHCO_3$  (100 mL x 3)で洗浄した。無水  $MgSO_4$  で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol =30:1 を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製することにより化合物(15a) (1.24 g, 73.5%)を白色結晶として得た。mp 102-103 °C. <sup>1</sup>H NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.41 (9H, s, *Boc*), 2.98-3.65 (10H, overlapped,  $CH_2$ ), 3.89-3.94 (1H, m,  $CH_2$ ), 4.39-4.43 (1H, d,  $CH_2$ ), 4.57-4.63 (1H, dd,  $CH$ ), 6.61 (1H, m, *NH*), 7.41-7.43 (2H, d, *aromatic*), 7.73-7.75 (1H, d, *NH*), 8.14-8.16 (2H, d, *aromatic*). ESI-MS ( $M+Na$ )<sup>+</sup>: *m/z* 459, found: 459. Calcd for  $C_{20}H_{28}N_4O$ : C, 55.04; H, 6.47; N, 12.84. Found: C, 54.71; H, 6.56; N, 12.50.

**(S)-5,8-Dioxo-6-(4-nitrobenzyl)-1-oxa-4,7,10-triaza-cyclododecane (15b).**

化合物(13) (6.7 mg, 0.013 mmol)を 4 M HCl/ethyl acetate (3 mL)に溶解し、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた白色結晶を diethyl ether で洗浄し、減圧乾燥することで脱保護体(8b, *H-linear*)を得た。化合物(8b)および HATU (15.0 mg, 0.039 mmol)をそれぞれ DMF (4 mL)に溶解し、10 mL のガスタイトシリンジに充填した。また、DMF (10 mL)に溶解した DIEA (14  $\mu$ L, 0.079 mmol) と HOAt (5.4 mg, 0.039 mmol) に対して、化合物(15a)の合成と同様の操作で分子内環化反応を行ったが、目的物の生成は確認されなかった。

**(S)-10-Trifluoroacetyl-5,8-dioxo-6-(4-nitrobenzyl)-1-oxa-4,7,10-triaza-cyclododecane (15c).**

化合物(14) (109 mg, 0.180 mmol)を 4 M HCl/ethyl acetate (5 mL)に溶解し、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた白色結晶を diethyl ether で洗浄し、減圧乾燥することで脱保護体(8c, Tfa-linear)を得た。化合物(8c)および HATU (104 mg, 0.274 mmol)をそれぞれ DMF (5 mL)に溶解し、10 mL のガスタイトシリンジに充填した。また、DMF (60 mL)に溶解した DIEA (125 mL, 0.717 mmol)と HOAt (37.1 mg, 0.272 mmol)に対して、化合物(15a)の合成と同様の操作で分子内環化反応を行った。溶媒を減圧留去して得られた残渣を ethyl acetate (250 mL)に溶解し、5% NaHCO<sub>3</sub> (100 mL x 3)で洗浄した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol=20:1 を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製することにより化合物(15c) (37.4 mg, 48.3%)を白色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 3.02-4.38 (13H, overlapped, CH<sub>2</sub>, CH), 7.24 (1H, m, NH), 7.49-7.54 (2H, m, aromatic), 8.13-8.17 (2H, m, aromatic), 8.31-8.34, 8.58-8.60 (1H, m, NH). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 433, found: 433.

**(S)-5,8-Dioxo-6-(4-nitrobenzyl)-1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane (16).**

化合物(15a) (1.23 g, 2.83 mmol)を 4 M HCl/ethyl acetate (10 mL)に溶解し、室温で 3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を水(10 mL)に溶解した後、1 N NaOH を加えて pH を 11 として、ethyl acetate (80 mL x 3)で抽出した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた結晶を diethyl ether で洗浄し、減圧乾燥することで化合物(16) (0.899 g, 85.2%)を白色結晶として得た。mp 231-232 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 2.58 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 2.69-2.73 (1H, d, CH<sub>2</sub>), 2.95-3.01 (1H, dd, CH<sub>2</sub>), 3.07-3.31 (6H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 3.33-3.53 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.35-4.40 (1H, m, CH), 7.50-7.52 (2H, d, aromatic), 7.65-7.68 (1H, dd, NH), 8.13-8.15 (2H, d, aromatic), 8.32-8.34 (1H, d, NH). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 337, found: 337. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>·0.25 H<sub>2</sub>O: C, 52.86; H, 6.06; N, 16.44. Found: C, 53.25; H, 6.08; N, 16.05.

**(S)-6-(4-Nitrobenzyl)-4,7,10-triaza-1-oxacyclododecane (17).**

化合物(16) (870 mg, 2.33 mmol)を THF (10 mL)に懸濁し、窒素雰囲気下、氷冷した後、1 M BH<sub>3</sub>-THF 錯体の THF 溶液(29.5mL, 29.5 mmol) を緩徐に加えた。氷冷下 1 時間攪拌し、その後 24 時間還流した。還流後、再び反応液を氷冷し、methanol (15 mL)を滴下した。1 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、再び methanol (30 mL)を加えて減圧留去した。残渣に HCl を飽和させた methanol (5 mL)を加えて 6 時間還流した。反応液を氷冷し、1 N NaOH (30 mL)を加えた後、chloroform (30 mL x 3)で抽出した。無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol:25% NH<sub>3</sub> 水溶液 = 12:4:1 を溶出溶媒とする中圧カラムシリ

カゲルクロマトグラフィーにより精製することで化合物(17) (184 mg, 25.5%)を赤褐色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 2.39-3.02 (11H, overlapped, CH, CH<sub>2</sub>), 3.46-3.52 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.56-3.63 (2H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 7.31-7.33 (2H, d, aromatic), 8.11-8.13 (2H, d, aromatic).

**Tris(*tert*-butyl) (S)-6-(4-nitrobenzyl)-4,7,10-triaza-1-oxacyclododecane-*N,N',N''*-triacetate (18).**

化合物(17) (184 mg, 0.595 mmol)を acetonitrile (5 mL)に溶解し、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (189 mg, 1.79 mmol)を加え、窒素雰囲気下、氷冷した後、*tert*-butyl bromoacetate (262 μL, 1.79 mmol)を滴下した。室温で24時間攪拌した後、反応液をろ過し、ろ液を減圧留去した。残渣を sat. NaHCO<sub>3</sub> (10 mL)と sat. NaCl (4 mL)の混液に懸濁し、chloroform (20 mL x 3)で抽出した。無水 MgSO<sub>4</sub>で乾燥した後、溶媒を減圧留去した。残渣を chloroform:methanol:25% NH<sub>3</sub>水溶液 = 120:10:1 を溶出溶媒とする中圧カラムシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することで化合物 (18) (165 mg, 42.5%)を赤褐色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.36 (9H, s, *t*Bu), 1.40 (9H, s, *t*Bu), 1.44 (9H, s, *t*Bu), 2.27-3.59 (23H, overlapped, CH, CH<sub>2</sub>), 7.42-7.44 (2H, d, aromatic), 8.08-8.10 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 651, found: 651. Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>: C, 60.90; H, 8.36; N, 8.50. Found: C, 60.54; H, 8.50; N, 8.22.

**(S)-6-(4-Nitrobenzyl)-4,7,10-triaza-1-oxacyclododecane -*N,N',N''*-triacetic acid (19, C-ODTA).**

化合物(18) (54.7 mg, 0.253 mmol)を 10% anisole/TFA (2 mL)に溶解し、室温で6時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、diethyl ether (3 mL)を加えることで結晶化させた後、結晶をろ取り、減圧乾燥することで化合物(19) (28.9 mg, 41.7%)を淡黄色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 2.64-4.07 (23H, overlapped, CH, CH<sub>2</sub>), 7.36-7.38 (2H, d, aromatic), 8.07-8.09 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 483, found: 483. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>·1.5H<sub>2</sub>O·2CF<sub>3</sub>COOH: C, 40.71; H, 4.78; N, 7.60. Found: C, 40.81; H, 4.58; N, 7.66.

### **3. <sup>111</sup>In 標識**

#### **<sup>111</sup>In 標識**

<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (10 μL)を 1 M 酢酸緩衝液(pH 4.5, 15 μL)に混和し、室温で5分間静置した。0.1 M 酢酸緩衝液(pH 4.5)を用いて、20 μM に調整した C-ODTA または C-DOTA 溶液(25 μL)を混合した後、37 °C で1時間インキュベートした。

同様に、<sup>111</sup>InCl (10 μL)を 1 M 酢酸緩衝液(pH 3.0, 15 μL)に混和し、室温で5分間静置した。0.1 M 酢酸緩衝液(pH 3.0)を用いて、2 または 20 μM に調整した C-ODTA または C-DOTA 溶液(25 μL)を混合した後、100 °C で10分間インキュベートした。

どちらの場合も、溶液から 2  $\mu\text{L}$  採取し、TLC にて分析することで放射化学的収率を算出した。

#### 非放射性 In 錯体の合成

1 M 酢酸緩衝液(pH 4.5, 15  $\mu\text{L}$ )を用いて、 $\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  溶液(2 mM, 50  $\mu\text{L}$ )を調製した。0.1 M 酢酸緩衝液(pH 4.5)を用いて、2 mM に調整した C-ODTA 溶液(50  $\mu\text{L}$ )を混合した後、100  $^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベートした。逆相 HPLC により目的とする  $^{111}\text{In}$  錯体を含む画分を集め、質量分析を行った。ESI-MS (M+H) $^+$ : m/z 595.1, found: 595.1.

#### 4. $^{111}\text{In}$ -C-ODTA および $^{111}\text{In}$ -C-DOTA の安定性の評価

$^{111}\text{In}$ -C-ODTA および  $^{111}\text{In}$ -C-DOTA は逆相 HPLC により未反応の配位子を除去した。目的とする  $^{111}\text{In}$  錯体を含む画分を集め、溶媒を減圧留去した。残渣を 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 7.4)に溶解した溶液(150  $\mu\text{L}$ )を、0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 7.4)に溶解した apo-transferrin(aTf)溶液(30.0 mg/225  $\mu\text{L}$  または 3.0 mg/225  $\mu\text{L}$ )に加えた。溶液を 37  $^\circ\text{C}$  でインキュベートし、1, 6, 24, 72, 120 時間後に、溶液から 5-10  $\mu\text{L}$  採取し、TLC にて分析した。

#### 5. $^{111}\text{In}$ -C-ODTA のマウス体内動態の検討および尿中の化学形の分析

$^{111}\text{In}$ -C-ODTA を逆相 HPLC により未反応の配位子を除去するとともに、2つのピークをそれぞれ単離した。目的とする  $^{111}\text{In}$  錯体を含む画分を集め、溶媒を減圧留去した。残渣をリン酸緩衝生理食塩水(1 mM, pH 7.4)に溶解した。マウス尾静脈より、各  $^{111}\text{In}$  錯体溶液(0.3  $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}/\text{匹}$ )を投与した。投与 1, 6, 24 時間後に各群 5 匹のマウスを屠殺し、関心臓器を採取、重量を測定後、オートウェルガンマシステムにより放射活性を測定した。また、投与 24 時間後までに排泄された糞尿を採取し、糞尿中に含まれる放射活性をオートウェルガンマシステムにより測定した。

尿中に排泄された放射活性の化学形の分析では、同様の方法により調製した各  $^{111}\text{In}$  錯体溶液(5  $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}/\text{匹}$ )をマウス尾静脈より投与した。投与 6 時間後までに排泄された尿を採取し、10 kDa のろ過膜で限外ろ過した後、逆相 HPLC で分析した。

### 1-2. 結果

#### 1. 合成

Polyazamacrocycle 合成法では環化反応が鍵反応となる。本合成法では、*p*-nitrophenylalanine を出発物質として stepwise に linear 体を合成した後、分子内環化反応を行うことで環状中間

体を作製した。まず  $\alpha$ -アミノ基を保護した *p*-nitrophenylalanine に、別途合成した 2,2'-oxybis(ethylamine)のモノ保護体を縮合した。次いで、1位のアミノ保護基を脱保護後、*tert*-butyl bromoacetate を用いたアルキル化反応により linear 前駆体を作製し、脱保護およびそれに続く保護基の導入により、Boc-linear、H-linear、Tfa-linear をそれぞれ合成した(Schemes 1, 2)。3種の linear 体を用いて環化反応を行った場合、Boc-linear で最も収率良く環化反応が進行した(74%)。一方、H-linear を用いた反応では、環状中間体の生成が確認できず、また Tfa-linear における収率は 48%であった。作製した環状中間体は  $\text{BH}_3$  還元後、*tert*-butyl bromoacetate により酢酸基を導入し、最終的に脱保護することで、目的とする C-ODTA を総収率 0.71%にて合成した(Scheme 3)。

## 2. $^{111}\text{In}$ 標識

C-ODTA を  $^{111}\text{In}$  標識した後、逆相 HPLC により分析したところ、保持時間 11.1 分 (complex A)と 11.4 分 (complex B)に二つのピークが観察された(Figure 5-A)。どちらのピークとも単離した後、HPLC により再分析したところ、それぞれ単一のピークとして確認され、安定に存在することが示された。また、非放射性 In を用いて作製した錯体についても二つのピークが観察された(Figure 5-B)。それぞれのピークを逆相 HPLC により単離した後、質量分析を行ったところ、どちらの錯体も目的物の分子量と一致した。

C-ODTA の  $^{111}\text{In}$  標識における配位子濃度を 1 または 10  $\mu\text{M}$  の濃度で検討した。温度は抗体などのタンパク質標識を想定した 37  $^\circ\text{C}$  および低分子ペプチドなどの標識を考慮した 100  $^\circ\text{C}$  の二つの条件を用い、対照として広く使用されている二官能性 polyazamacrocycle である C-DOTA を使用した。この結果、C-ODTA および C-DOTA の 37  $^\circ\text{C}$ 、10  $\mu\text{M}$  の配位子濃度における放射化学的収率はそれぞれ  $57.5\pm 0.7\%$ 、 $75.9\pm 2.5\%$ であった(Table 1)。一方、100  $^\circ\text{C}$  において、C-ODTA は 1  $\mu\text{M}$  の濃度でも放射化学的収率 95%以上であったのに対し、同じ濃度で C-DOTA の放射化学的収率は  $22.8\pm 8.0\%$ と低い値を示した。

## 3. $^{111}\text{In}$ -C-ODTA および $^{111}\text{In}$ -C-DOTA の安定性の評価

作製した  $^{111}\text{In}$ -C-ODTA を  $^{111}\text{In}$  と強い錯形性能を有する血清タンパク質である aTf 溶液中でインキュベートしたところ、120 時間後、いずれの aTf 濃度においても 95%以上安定に存在し、 $^{111}\text{In}$ -C-DOTA 同様  $^{111}\text{In}$ -C-ODTA の安定性が高いことが示された(Table 2)。

#### 4. $^{111}\text{In}$ -C-ODTA のマウス体内動態の検討および尿中の化学形の分析

$^{111}\text{In}$ -C-ODTA の 2 種類の化学形、complex A および complex B をそれぞれ正常マウスに投与したところ、どちらの錯体も速やかに血中から消失した(Table 3)。また、いずれの臓器においても放射活性は低く、放射活性の大部分は尿中へと排泄された。肝臓中の放射活性において、僅かに相違が確認され、complex B では complex A よりも高い放射活性が観察された。投与 6 時間後までに尿中に排泄された放射活性の化学形を逆相 HPLC にて分析したところ、それぞれの錯体は単一のピークを示し、生体内において、その化学形を維持することが示された(Figure 5-C)。

	C-ODTA		C-DOTA		
Temperature (°C)	37	100	37	100	
Ligand concentrations ( $\mu\text{M}$ )	10	1	10	1	10
Radiochemical yield (%)	$57.5 \pm 0.73$	$96.4 \pm 1.60$	$75.9 \pm 2.48$	$22.8 \pm 7.99$	$96.1 \pm 0.46$

**Table 1.** Radiochemical yields of C-ODTA and C-DOTA

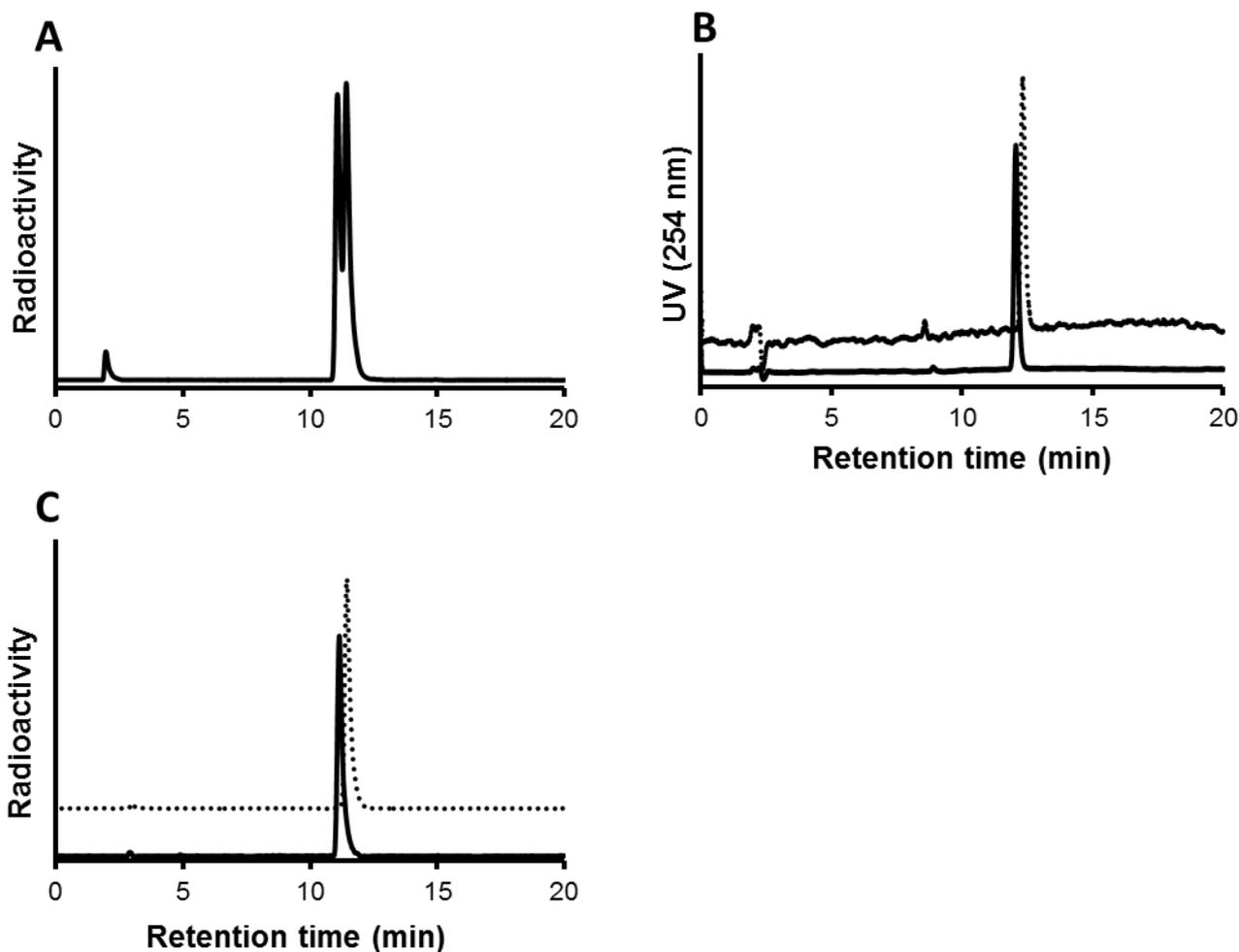
	Percent of intact radiolabeled complex			
	aTf (0.1 mM)		aTf (1.0 mM)	
	C-ODTA	C-DOTA	C-ODTA	C-DOTA
1 h	$98.3 \pm 0.70$	$98.4 \pm 0.59$	$98.3 \pm 0.24$	$98.5 \pm 0.22$
6 h	$98.5 \pm 0.49$	$98.2 \pm 0.32$	$98.7 \pm 0.29$	$98.0 \pm 0.19$
24 h	$98.4 \pm 0.19$	$98.1 \pm 0.14$	$98.1 \pm 0.42$	$98.0 \pm 0.25$
72 h	$98.0 \pm 0.25$	$98.0 \pm 0.21$	$98.8 \pm 0.36$	$97.3 \pm 0.19$
120 h	$97.4 \pm 1.05$	$97.8 \pm 0.20$	$97.8 \pm 0.43$	$95.7 \pm 0.81$

**Table 2.** Stability of  $^{111}\text{In}$ -C-ODTA and  $^{111}\text{In}$ -C-DOTA against aTf

	Time after injection		
	1 h	6 h	24 h
Complex A			
Blood	0.12 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Liver	0.22 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Spleen	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02
Kidney	3.01 ± 1.36	0.80 ± 0.09	0.30 ± 0.04
Pancreas	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Heart	0.07 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Lung	0.17 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Bone	0.12 ± 0.09	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.02
Stomach <sup>b</sup>	0.03 ± 0.01	0.13 ± 0.12	0.29 ± 0.24
Intestine <sup>b</sup>	1.07 ± 0.09	0.90 ± 0.57	2.09 ± 1.43
Urine <sup>b</sup>			86.4 ± 2.29
Feces <sup>b</sup>			1.71 ± 1.00
Complex B			
Blood	0.15 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Liver	1.42 ± 0.23	0.60 ± 0.12	0.28 ± 0.08
Spleen	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.02 ± 0.02
Kidney	4.11 ± 1.60	1.33 ± 0.22	0.32 ± 0.15
Pancreas	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Heart	0.07 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Lung	0.21 ± 0.08	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Bone	0.15 ± 0.07	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Stomach <sup>b</sup>	0.09 ± 0.05	0.29 ± 0.35	0.42 ± 0.26
Intestine <sup>b</sup>	2.40 ± 0.54	2.76 ± 1.53	1.59 ± 0.64
Urine <sup>b</sup>			83.0 ± 6.25
Feces <sup>b</sup>			3.76 ± 1.93

**Table 3.** Biodistribution of radioactivity after intravenous injection of <sup>111</sup>In-C-ODTA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Tissue radioactivity is expressed as percent of injected dose per gram of wet tissue. Results are expressed as means (SD) of five animals each point. <sup>b</sup> Expressed as percent of injected dose per tissue.



**Figure 5.** HPLC profiles of  $^{111}\text{In}$ -C-ODTA (A), isolated each complex of non-radioactive In-C-ODTA (B) and urine samples collected for 6 h postinjection of  $^{111}\text{In}$ -C-ODTA (C).  $^{111}\text{In}$ -C-ODTA exhibited two radioactivity peaks at retention times of 11.1 min (complex A) and 11.4 min (complex B). Each complex of non-radioactive In-C-ODTA was separated by HPLC and analyzed by mass spectrometry. When isolated each complex was injected to mice, both complex A and complex B were excreted in the urine intact.

### 1-3. 考察

ODTA を母体とする二官能性キレート試薬は *p*-nitrophenylalanine を出発物質として linear 体を作製し、環化反応を経由することで作製した。Polyazamacrocycle 合成法では環化反応が鍵反応であり、これまでに様々な環化反応が報告されている。

Mcmurry らは、ペプチド結合を形成させることで、環状 amide を得るペプチド法を考案し、C-DOTA を得ている(35)。この場合の環化反応では、2 種類の化合物を同時に反応させており、さらに、反応させる 2 つの化合物の N 原子数が互いに[3+1]および[2+2]となる反応をそれぞれ行っている。両反応はともに鎖長の異なる Boc 保護ジ活性エステルと反応させ、[3+1]の反応では 44%収率、[2+2]の反応では 40%収率で環状中間体が合成されている。

Mishra らは、Mcmurry らと同様の diamine を用いて、[2+2]の反応を行い、C-DOTA を得ている(36)。この方法では、ペプチド法による環化反応原料の調製を行った後、dibromide と diamine を反応させることで環化反応を行っている。この場合の環化反応収率は 40%である。

Renn らは stepwise にペプチド法を用いて linear 構造体を合成し、還元反応を行った後、環化反応を行い、C-DOTA を合成している(37)。この合成法における環化反応は 58%収率で行われており、報告されている合成法において最も高収率の環化反応である。しかし、この合成法では、linear 構造体を得るまでの工程数が多く、特に tosyl 基の導入のとき、収率が 26%と低値であるため、総収率が低い。さらに、tosyl 基の導入後、脱 tosyl 反応後および bromoacetic acid による反応後の 3 つの工程で逆相 HPLC による煩雑な精製操作を伴う。

これら既存の polyazamacrocycle 合成法から、収率に最も影響を与える工程である環化反応の収率向上に注目し、新規合成法を検討した。そこで、最も高収率で環化反応を得ている Renn らの合成法から、stepwise に linear 構造体を合成した後、環化反応を行う合成法を選択した。Mcmurry らは、2 つの化合物を一度に反応させることで、環状 triamide 体の合成を行った。この反応では、まず片方の活性エステルがアミノ基と反応することで linear 構造体が生成し、次いでもう一方の反応部位が分子内で選択的に反応することで環化反応が成立すると考えられる。通常環化反応では、副反応である分子間反応の進行を防ぐために、高度希釈条件での反応が望まれる。実際、この反応においても 7.5 mM の希釈条件で反応が行われている。しかし、反応の第一段階は一方の出発物質ともう一方が 1:1 で反応する通常の縮合反応であることから、本合成法では one pot で反応最適条件の相反する 2 つの反応を同時に行うところに収率低下の問題があると考えた。Renn らの合成収率を考えあわせると、stepwise に linear 体を合成、単離した後、適切な条件で環化反応を行う方法が、環化反応収率の向上に有用と考えた。

次いで、環化反応の収率向上を目的として、環化反応を行う際に最適な linear 体の構造を検討した。候補 linear 体は 2 級アミンの保護基を変更することで作製し(Schemes 1, 2)、Boc 基または Tfa 基を有する linear 体、および保護基をもたない linear 体の 3 種類を検討に用いた(Scheme 3)。その結果、linear 体の二級アミンに保護基が存在しない場合には反応は進行せず、導入する保護基が嵩高い程、高い収率が得られた。これはおそらく、嵩高い保護基の存在により、カルボン酸が反応部位であるアミノ基に近接する方向に曲げられたことによると推察される。溶液中に存在する未反応の linear 体の濃度をできる限り低減させて環化反応を行うことを意図して、出発物質である linear 体溶液および HATU 溶液をシリンジポンプを用いて溶媒中に低速同時注入した。以上の検討より、Boc 保護 linear を用いることで本環化反応は 74% の高収率で目的とする環状中間体を与えた。本環化反応は C-DOTA 合成にも応用可能であることを認めており、他の二官能性 polyazamacrocycle の 12 員環を作製する際に有用である。

通常、抗体に結合させた二官能性キレート試薬を標識する際は、タンパク質濃度 1 mg/mL で行われる(17)。したがって、抗体フラグメントを標識する薬剤は配位子濃度 20  $\mu\text{M}$  以下で標識できることが求められる。しかし、タンパク質標識を想定した 37  $^{\circ}\text{C}$  における標識反応において、C-ODTA は C-DOTA 同様、10  $\mu\text{M}$  では十分な放射化学的収率が得られなかった(Table 1)。一方、100  $^{\circ}\text{C}$  では 1  $\mu\text{M}$  の低配位子濃度でも放射化学的収率 95% 以上であった。同条件下、C-DOTA の放射化学的収率は 25% 以下であったことから、C-ODTA を用いることで、より比放射能の高い低分子ペプチド標識体が作製可能であると考えられる。

作製した C-ODTA は  $^{111}\text{In}$  標識反応後、逆相 HPLC による分析で二つのピークを示した(Figure 5-A)。このような現象は他の二官能性 polyazamacrocycle でも観察されており(38, 39)、異性体の生成に由来する。C-DOTA の金属錯体では、4 つの N 原子が金属の上部に配位し、4 つの酢酸基が N 原子の反対側である底部から配位する。このとき、C-DOTA の金属錯体は square antiprism コンフォメーションまたは twisted square antiprism コンフォメーションの 2 種類の配置をとる。そして、この 2 つの異性体は HPLC で分析することで異なるピークとして溶出されることが報告されている(38)。さらに、C-DOTA 以外の polyazamacrocycle の Cu 錯体においても、同様の現象が観察されている(39)。これは、他の polyazamacrocycle においても C-DOTA 同様、複数の N 原子が上部に配位し、また複数の酢酸基が底部より配位することで、2 種類のコンフォメーションを形成するためであると考えられる。非放射性 In を用いて作製したそれぞれの錯体が、どちらも質量分析の結果、目的とする In-C-ODTA の分子量と一致したことから、互いに異なる異性体が生じたことが示唆される。

得られた  $^{111}\text{In}$  錯体の安定性は aTf 溶液中においてインキュベートすることで評価した。Tf は鉄運搬タンパク質であり、鉄非結合 Tf である aTf は血中総 Tf の 2/3 に当たる。aTf は鉄以外の金属に対しても強い結合能を有しており、 $^{111}\text{In}$  錯体の安定性が低い場合、aTf との配位子交換反応により  $^{111}\text{In}$  は aTf に配位する。正常成人における血清中の aTf 濃度は 0.02-0.04 mM であるが、本検討では 0.1 および 1 mM の大過剰の aTf 濃度においても  $^{111}\text{In}$ -C-ODTA は安定に存在した(Table 2)。

$^{111}\text{In}$ -C-ODTA の 2 種類の化学形 complex A および complex B を HPLC によりそれぞれ単離した後、正常マウスに投与したところ、いずれの臓器においても放射活性は低値を示した(Table 3)。肝臓における放射活性に僅かに相違が確認され、complex B の放射活性が complex A よりも高値であった。これは脂溶性の差に起因すると考えられ、HPLC の保持時間に相關する。しかし、どちらの錯体も血液中から速やかに消失し、放射活性の大部分は尿中へと速やかに排泄された。さらに、排泄された尿中の放射活性の化学形を分析したところ、いずれの錯体もその化学形を維持したまま尿中へと排泄されたことを認めた(Figure 5-C)。以上の結果から、新規二官能性キレート試薬 C-ODTA は高い比放射能での低分子ペプチド標識体を作製できる可能性を認めた。

近年、合成ソマトスタチン誘導体を用いた腫瘍イメージングやペプチド受容体内照射治療(PRRT)が臨床応用されている(22, 40-42)。さらに、他の標的指向性ペプチドを利用した分子イメージングや内照射治療の研究も盛んに行われている(1, 43, 44)。標識体の調製後、大過剰の非標識配位子が混在する反応液は未精製のまま投与する。このため、標識体の標的分子への結合が非標識配位子により競合することを防ぐために、比放射能の高い標識体の作製が望ましい。本研究で作製した C-ODTA は高い比放射能で低分子ペプチド標識体を作製できる可能性をもつことから、分子イメージングや内照射治療薬剤の開発研究への応用が期待される。

#### 1-4. 小括

本研究では、高収率環化反応を経由した C-ODTA や C-DOTA の簡便な合成法を開発した。本高収率環化反応は今後さらなる二官能性キレート試薬の開発研究への応用が期待される。C-ODTA は非常に安定な  $^{111}\text{In}$  錯体を与えた。C-ODTA はタンパク質標識への応用性は低いが、高比放射能の  $^{111}\text{In}$  標識ペプチド作製に有用な二官能性キレート試薬であることが示された。

## 【第二章 結合部位としてカルボキシル基を有する二官能性キレート試薬の合成法の開発とその応用】

二官能性キレート試薬の配位子には、温和な条件でも高い放射化学的収率で  $^{111}\text{In}$  や  $^{90}\text{Y}$  錯体を与え、さらに生体内においても安定な錯体を維持することが必要である。第一章の結果等を考え、配位子の構造として、DTPA 誘導体、*N*-[(*R*)-2-Aminoethyl]-*trans*-(*S,S*)-Cyclohexane-1,2-diamine-*N,N',N'',N'''*-pentaacetic acid (CHX-DTPA) を選択した(45, 46)。市販されている CHX-DTPA はタンパク質などとの結合部位として、骨格炭素から伸長したベンジル基のパラ位にアミノ基またはイソチオシアネート基を有している。しかし、本研究では、腎臓において遊離する放射性代謝物として、尿排泄性の高い馬尿酸様構造を設計したことから、ベンジル基のパラ位にカルボキシル基を有する新規二官能性キレート試薬が必要である。このため、既存の CHX-DTPA 合成法(47)を基に目的とする新規二官能性キレート試薬 *p*-COOH-Bn-CHX-DTPA を合成した。本二官能性キレート試薬は HML の薬剤設計以外にも応用性が高く、今後の分子プローブの開発研究への応用が期待される。

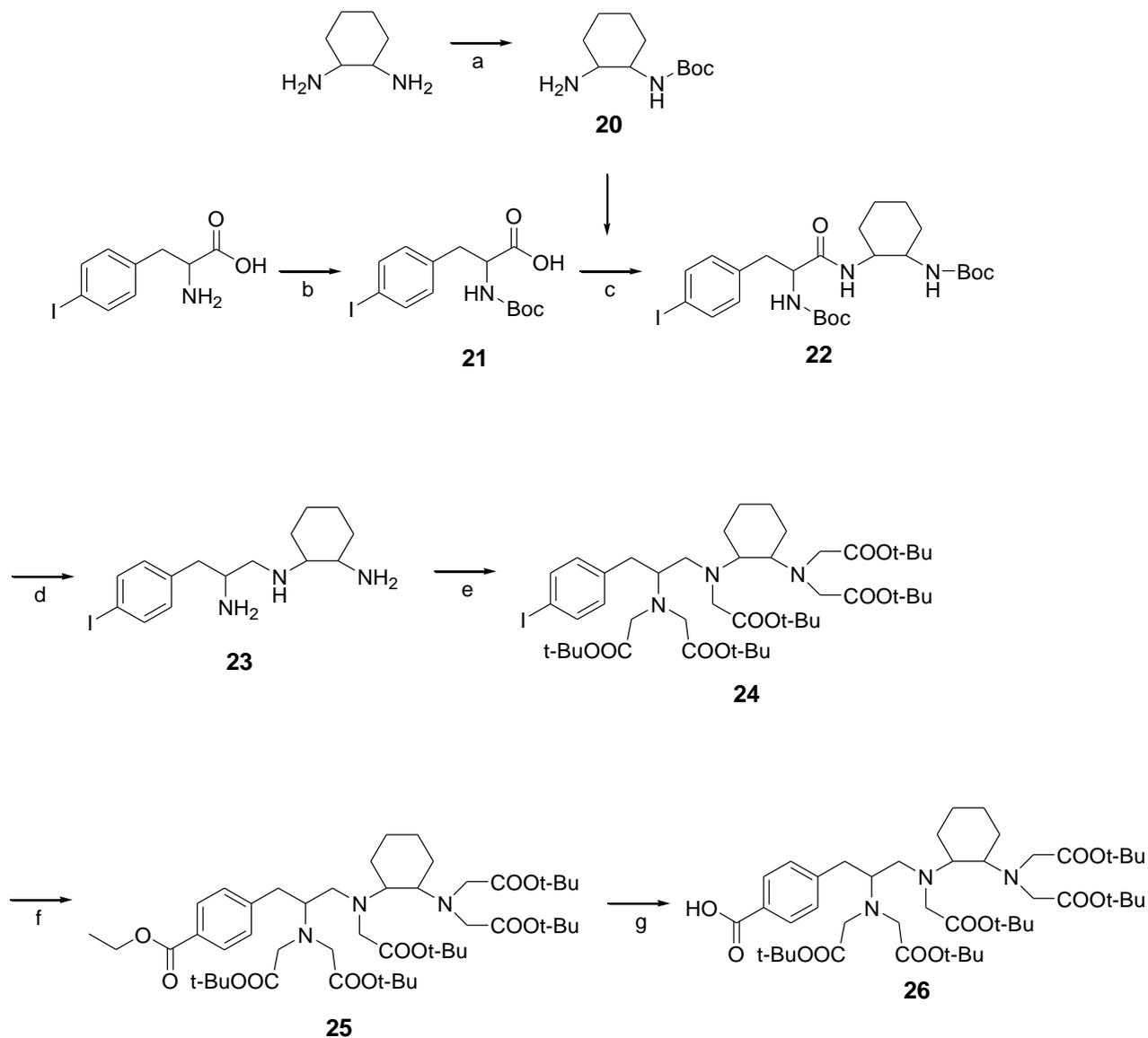
本研究では新規二官能性キレート試薬 *p*-COOH-Bn-CHX-DTPA に、刷子縁膜酵素により尿排泄性の高い放射性代謝物を遊離する酵素認識部位を導入し、HML の薬剤設計への応用を試みた。

### 2-1 方法

#### 1. 試薬および機器

第一章で使用した試薬、機器について、必要なものは同様に使用した。放射化学的収率は、シリカゲルプレート (TLC aluminium sheets Silica gel 60, MERCK) を用い、methanol:10% ammonium acetate=8:2 の展開溶媒にて 10 cm 展開したものを 5 mm ずつ切断し、それぞれの画分の放射活性をオートウェルガンマシステム (WIZARD3, PerkinElmer) で測定した。HPLC の分析用カラムには Unison US-C18 (Imtakt) を用いた。移動相として A 相に 5 mM acetic acid-ammonium acetate buffer (pH 5.5)、B 相に methanol を使用した。0-40 分で A 相 100%、B 相 0% から A 相 0%、B 相 100% まで変化させる直線 gradient 法により流速 1 mL/min で分析した(system A)。または、移動相として A 相に 0.05 M acetic acid-sodium acetate buffer (pH 5.5)、B 相に methanol を使用した。0-40 分で A 相 100%、B 相 0% から A 相 0%、B 相 100% まで変化させる直線 gradient 法により流速 1 mL/min で分析した(system B)。

## 2. 合成



**Scheme 4.** Synthetic procedure for *p*-COOH-Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>. Reagents and conditions: (a) (Boc)<sub>2</sub>O, methanol, THF, 62%; (b) (Boc)<sub>2</sub>O, 1 N NaOH, acetonitrile, 80%; (c) EDC, HOBT, DIEA, DMF, 85%; (d) i. 4 M HCl/ethyl acetate; ii. 1 M BH<sub>3</sub>-THF/THF; iii. conc. HCl, 89%; (e) *tert*-butyl bromoacetate, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 52%; (f) Pd(OAc)<sub>2</sub>, dppf, TEA, ethanol, CO(g), DMF, 73%; (g) 1 N NaOH, acetone, quant..

***N-tert-Butyloxycarbonyl-(S,S)-1,2-cyclohexanediamine (20).***

(*S,S*)-1,2-Cyclohexanediamine (5.00 g, 43.8 mmol)を methanol (600 mL)に溶解し、氷冷下、THF (300 mL)に溶解した(Boc)<sub>2</sub>O (4.78 g, 21.9 mmol)を 14 時間かけて滴下した。滴下終了後、室温に戻し、24 時間攪拌を行った。溶媒を減圧留去した後、残渣に 5% citric acid (150 mL)を加えた後、chloroform (100 mL x 3)で洗浄を行った。次いで、溶液に 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mL)を加えて塩基性とした後、chloroform (150 mL x 3)により抽出した。有機層に MgSO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(**20**) (2.88 g, 61.5%)を白色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.05-1.29 (4H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 1.42 (9H, s, Boc), 1.66-1.69 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.92-1.98 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.26-2.32 (1H, m, CH), 3.09-3.12 (1H, m, CH), 4.42 (1H, s, NH).

***N-tert-Butyloxycarbonyl-L-p-iodophenylalanine (21).***

L-*p*-Iodophenylalanine (3.00 g, 10.3 mmol)を 1 N NaOH (25 mL)と acetonitrile (10 mL)の混液に溶解し、氷冷下、acetonitrile (15 mL)に溶解した(Boc)<sub>2</sub>O (3.37 g, 15.5 mmol)を滴下した。室温に戻し、3 時間攪拌した。Acetonitrile を減圧留去して得られた水溶液を hexane (20 mL x 3)で洗浄した後、5% citric acid (30 mL)を加え、ethyl acetate (30 mL x 3)で抽出した。有機層に MgSO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた結晶を減圧乾燥することで化合物(**21**) (3.20 g, 79.5%)を白色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.29 (3H, s, Boc), 1.41 (6H, s, Boc), 2.97-3.03, 3.10-3.15 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.56-4.58, 4.90-4.92 (1H, dd, CH), 4.34-4.36, 6.49-6.51 (1H, d, NH), 6.91-6.93 (2H, d, aromatic), 7.61-7.63 (2H, d, aromatic).

***N-(S,S)-trans-2-tert-Butyloxycarbonylamino-cyclohexyl-N-tert-butylloxycarbonyl-L-p-iodophenylalanine amide (22).***

化合物(**20**) 0.986 g (4.60 mmol)、化合物(**21**) (1.80 g, 4.60 mmol)、1-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt, 0.775 g, 5.06 mmol)、DIEA (1.20 mL, 6.90 mmol)を DMF (20 mL)に溶解し、氷冷下、1-ethyl-3-(3-dimethylamino)propylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 0.970 g, 5.06 mmol)を加えた。室温に戻し、4 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を chloroform (150 mL)に溶解し、5% NaHCO<sub>3</sub> (70 mL x 3)、5% citric acid (70 mL x 3)、sat. NaCl (70 mL x 1)の順に洗浄した。有機層に MgSO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた結晶を ethyl acetate (50 mL)で洗浄し、減圧乾燥することで化合物(**22**) (2.30 g, 85.1%)を白色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.08-1.30 (4H, m, CH<sub>2</sub>) 1.36 (18H, s, Boc), 1.68-1.71 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.00-2.06 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.86-3.04 (2H, dq, CH<sub>2</sub>), 3.30-3.33 (1H, m, CH), 3.50-3.53 (1H, m, CH), 4.27 (1H, m, NH), 4.68-4.70 (1H, d, CH), 4.95 (1H, m, NH), 6.47-6.48 (1H, d, NH), 6.88-6.90 (2H,

d, aromatic), 7.57-7.59 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+Na)<sup>+</sup>: m/z 610.2, found: 610.2.

***N*-[(*S*)-2-Amino-3-(*p*-iodophenyl)propyl]-*trans*-(*S,S*)-cyclohexane-1,2-diamine (23).**

化合物(22) (2.24 g, 3.81 mmol)を 4 M HCl/ethyl acetate (30 mL)に溶解し、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を diethyl ether で洗浄し、白色結晶を得た。本結晶を THF (15 mL)に懸濁し、窒素雰囲気下、氷冷した後、1 M BH<sub>3</sub>-THF 錯体の THF 溶液(38.1mL, 38.1 mmol)を緩徐に加えた。氷冷下 1 時間攪拌し、次いで 24 時間還流した。還流後、再び反応液を氷冷し、methanol (40 mL)を加えた。1 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、残渣に再度 methanol (40 mL)を加え、溶媒を減圧留去した。残渣に濃塩酸(30 mL)を加え、室温で 22 時間攪拌した後、30 分間還流した。反応液を氷冷し、12.5 N NaOH (30 mL)を緩徐に加えた後、chloroform (50 mL x 3)により抽出した。有機層に MgSO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣を chloroform/methanol/25% NH<sub>3</sub>水溶液=30:5:1 を溶出溶媒とするフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製することで化合物(23) (1.26 g, 88.8%)を黄色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.84-1.20 (4H, m, CH<sub>2</sub>) 1.59-1.65 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.79-1.82 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.91-1.93 (1H, m, CH), 1.95-1.97 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.25-2.67 (5H, overlapped, CH, CH<sub>2</sub>), 2.95-2.99 (1H, m, CH), 6.88-6.90 (2H, d, aromatic), 7.53-7.55 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 374.1, found: 374.1.

**Pentakis(*tert*-butyl)**

***N*-[(*S*)-2-amino-3-(*p*-iodophenyl)propyl]-*trans*-(*S,S*)-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N,N',N''N'''*-pentaacetate (24).**

化合物(23) (0.563 g, 1.26 mmol)を DMF (5 mL)に溶解し、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.34 g, 12.6 mmol)を加えた。窒素雰囲気下、氷冷した後、*tert*-butyl bromoacetate (0.980 mL, 6.68 mmol)を滴下した。室温に戻し、24 時間反応した。溶媒を減圧留去した後、残渣に sat. NaHCO<sub>3</sub> (15 mL)および sat. NaCl (5 mL)を加え、chloroform (20 mL x 3)で抽出した。有機層に MgSO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣を hexane:ethyl acetate=6:1 を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製することで化合物(24) (0.620 g, 52.1%)を黄色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.83-1.11 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.41 (47H, overlapped, CH<sub>2</sub>, <sup>t</sup>Bu), 1.78-1.82 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.35-3.02 (7H, overlapped, CH, CH<sub>2</sub>), 2.95-2.99 (1H, m, CH), 3.26-3.56 (10H, m, CH<sub>2</sub>), 7.02-7.04 (2H, d, aromatic), 7.51-7.53 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 944.5, found: 944.6.

**Pentakis(*tert*-butyl)**

***N*-[(*S*)-2-amino-3-(*p*-ethoxycarbonylphenyl)propyl]-*trans*-(*S,S*)-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N,N*’,*N’’*,*N’’*’-pentaacetate (25).**

化合物(24) (278 mg, 0.295 mmol)を DMF (1.5 mL)に溶解し、Pd(OAc)<sub>2</sub> (6.6 mg, 0.0295 mmol)、1,1’-bis(diphenylphosphino)ferrocene (dppf、24.5 mg, 0.0442 mmol)、TEA (123 μL, 0.884 mmol)、ethanol (344 μL, 5.90 mmol)を加えた。一酸化炭素雰囲気下、80 °C で 18 時間還流した。溶媒を減圧留去した後、残渣に ethyl acetate (20 mL)を加え、不溶物をろ去した。ろ液を 5% NaHCO<sub>3</sub> (10 mL x 3)で洗浄し、有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣を hexane:ethyl acetate=4:1 を溶出溶媒とするフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製することで化合物(25) (191 mg, 72.8%)を黄色油状物として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.84-1.07 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.40 (48H, overlapped, CH<sub>3</sub>, <sup>*t*</sup>Bu) 1.55-1.63 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.73-1.77 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.33-3.11 (7H, overlapped, CH, CH<sub>2</sub>), 3.24-3.56 (10H, m, CH<sub>2</sub>), 4.30-4.34 (2H, q, CH<sub>2</sub>), 7.30-7.32 (2H, d, aromatic), 7.88-7.90 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 890.6, found: 890.6.

**Pentakis(*tert*-butyl)**

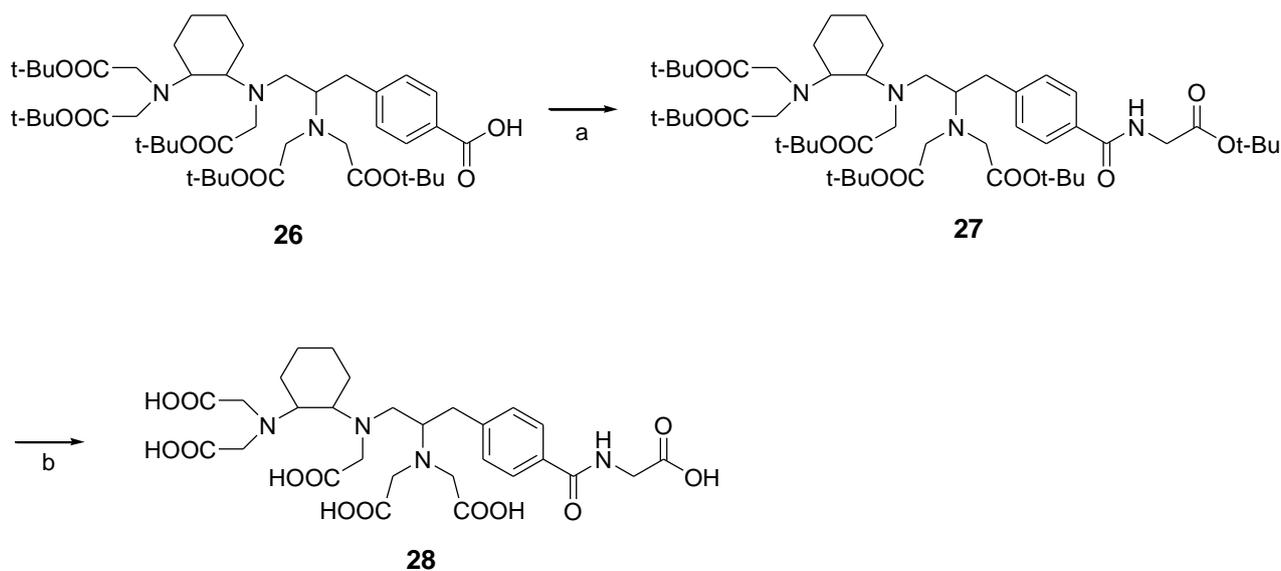
***N*-[(*S*)-2-amino-3-(*p*-hydroxycarbonylphenyl)propyl]-*trans*-(*S,S*)-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N,N*’,*N’’*,*N’’*’-pentaacetate (26, *p*-COOH-Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>).**

化合物(25) (145 mg, 0.163 mmol)を acetone (1 mL)に溶解した後、1 N NaOH (1 mL)を加えて室温で3時間攪拌した。溶液から acetone を減圧留去した後、5% citric acid (5 mL)を加え、ethyl acetate (5 mL x 3)により抽出した。有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(26) (165 mg, quant.)を黄色油状物として得た。NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.79-1.15 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.41 (45H, s, <sup>*t*</sup>Bu) 1.55-1.72 (4H, overlapped, CH<sub>2</sub>), 2.60-3.87 (17H, overlapped, CH, CH<sub>2</sub>), 7.16-7.34 (2H, m, aromatic), 7.91-7.93 (2H, d, aromatic). ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 862.5, found: 862.5.

**Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>-Gly-O(*t*-Bu) (27).**

化合物(26) (22.7 mg, 0.0263 mmol)、glycine *tert*-butyl ester (6.6 mg, 0.0395 mmol)および HOBt (6.1 mg, 0.0395 mmol)を DMF (1 mL)に懸濁した後、TEA (7.3 μL, 0.0527 mmol)を加え、氷冷した後、EDC (7.6 mg, 0.0395 mmol)を加えた。室温に戻し、3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を ethyl acetate (5 mL)に溶解し、5% citric acid (3 mL x 3)、5% NaHCO<sub>3</sub> (3 mL x 3)、sat. NaCl (3 mL x 1)の順に洗浄した。有機層に MgSO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧

留去することで化合物(**27**) (21.5 mg, 83.7%)を黄色油状物として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 975.6, found: 975.6.



**Scheme 5.** Synthetic procedure for BCD-G. Reagents and conditions: (a) glycine *tert*-butyl ester hydrochloride, EDC, HOBT, TEA, DMF, 84%; (b) 10% anisole/TFA, 72%.

#### Bn-CHX-DTPA-Gly-OH (**28**, BCD-G).

化合物(**27**) (21.5 mg, 0.0220 mmol)を 10% anisole/TFA (3 mL)に溶解し、室温で 3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、diethylether (3 mL)を加えることで結晶化させた。結晶をろ取り、diethylether で洗浄し、減圧乾燥することで化合物(**28**)の TFA 塩(15.6 mg, 72.2%)を淡黄色結晶として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 639.2, found: 639.3.



ことで化合物(29) (7.36 g, quant.)を白色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 2.82 (4H, s, CH<sub>2</sub>), 4.33 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5.13 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5.27 (1H, d, NH), 7.30-7.35 (5H, m, aromatic).

#### **N-Benzylloxycarbonylglycylglycine tert-butyl ester (30).**

Glycine tert-butyl ester hydrochloride (164 mg, 0.980 mmol)をDMF (3 mL)に懸濁し、DIEA (227 μL, 1.31 mmol)を加えた。化合物(29) (200 mg, 0.653 mmol)を懸濁液に加え、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を ethyl acetate (10 mL)に溶解し、5% NaHCO<sub>3</sub> (5 mL x 3)、5% citric acid (5 mL x 3)、sat. NaCl (5 mL x 1)の順に洗浄した。有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(30) (209 mg, 99.3%)を白色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.45 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 3.88-3.92 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 5.11 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5.49-5.57 (1H, d, NH), 6.51-6.58 (1H, d, NH), 7.30-7.35 (5H, m, aromatic).

#### **Glycylglycine tert-butyl ester (31).**

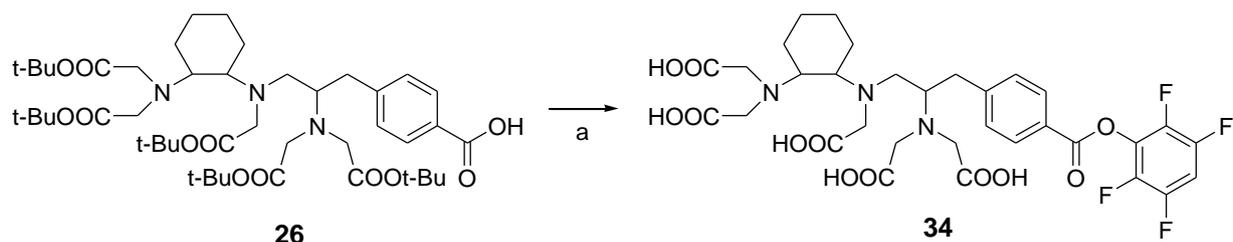
化合物(30) (200 mg, 0.620 mmol)を10% 水/methanol (3.0 mL)に溶解した後、10%Pd/C (10 mg)を加えた。水素雰囲気下、室温で5時間攪拌した。溶液をろ過した後、溶媒を減圧留去し、acetonitrile で共沸することで化合物(31) (134 mg, quant.)を白色結晶として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.47 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 3.71 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 3.91 (2H, s, CH<sub>2</sub>).

#### **Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>-Gly-Gly-O(*t*-Bu) (32).**

化合物(26) (10 mg, 0.0116 mmol)、化合物(31) (4.4 mg, 0.0232 mmol)および HOBt (3.5 mg, 0.0232 mmol) をDMF (1 mL)に懸濁した後、TEA (4.9 μL, 0.0348 mmol)を加えた溶液に氷冷下、EDC (4.4 mg, 0.0232 mmol)を加えた。室温に戻し、3時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣を ethyl acetate (5 mL)に溶解した後、5% citric acid (3 mL x 3)、5% NaHCO<sub>3</sub> (3 mL x 3)、sat. NaCl (3 mL x 1)の順に洗浄した。有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(32) (11.3 mg, 94.4%)を黄色油状物として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1032.6, found: 1032.7.

#### **Bn-CHX-DTPA-Gly-Gly-OH (33, BCD-GG).**

化合物(32) (11.3 mg, 0.0109 mmol)を10% anisole/TFA (3 mL)に溶解し、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、diethylether (3 mL) を加えることで結晶化させた。結晶をろ取り、diethylether で洗浄し、減圧乾燥することで化合物(33)の TFA 塩(3.2 mg, 25.2%)を淡黄色結晶として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 696.3, found: 696.2.



**Scheme 7.** Synthetic procedure for BCD-TFP. Reagents and conditions: (a) i. 2,3,5,6-tetrafluorophenol, EDC, TEA, DMF; ii. 10% anisole/TFA, 45%.

**Bn-CHX-DTPA-Gly 2,3,5,6-tetrafluorophenol ester (34, BCD-TFP).**

化合物(26) (68.2 mg, 0.0791 mmol)および 2,3,5,6-tetrafluorophenol (19.7 mg, 0.119 mmol)を DMF (2 mL)に溶解し、TEA (22.1  $\mu$ L, 0.158 mmol)を加えた。溶液を氷冷し、EDC (22.7 mg, 0.119 mmol)を加えた後、室温に戻し 3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、ethyl acetate (5 mL)に溶解し、sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (3 mL  $\times$  3)で洗浄し、有機層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えて乾燥した。その後、溶媒を減圧留去して得られた残渣に 10% anisole/TFA (3 mL)を加え、4 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、diethylether(5 mL)を加えることで結晶化させた。結晶をろ取り、diethylether で洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(34)の TFA 塩(38.3 mg, 45.2%)を淡黄色結晶として得た。ESI-MS ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: m/z 730.2, found: 730.2.

**H-Lys(Boc)-Trt(2-Cl)Resin (35).**

Cl-Trt(2-Cl)Resin (100 mg, 0.160 mmol)を出発物質として、Fmoc-Lys(Boc)-OH (75 mg, 0.160 mmol)および DIEA (111 $\mu$ L, 0.64 mmol)を dichloromethane (2 mL)中 1.5 時間反応させた。Methanol (0.4 mL)および DIEA (111 $\mu$ L, 0.64 mmol)を加えて反応を停止した。樹脂を DMF 次いで、dichloromethane で洗浄した。樹脂を乾燥させた後、Meienhofer らの方法(48)に従い、piperidine 処理の際に生成する *N*-(9-fluorenylmethyl)piperidine の  $A_{301}$ における吸光度を測定することにより Fmoc-Lys(Boc)-OH の樹脂への導入量を定量した(0.64 mmol/g)。20% piperidine/DMF (3mL)を加え、20 分間室温で攪拌することで、化合物(35)を作製した。樹脂の一部を採取して Kaiser test(49)を行い、 $N^{\alpha}$ -Fmoc 基の脱保護を確認した。

#### **H-Gly-Phe-Lys(Boc)-Trt(2-Cl)Resin (36).**

化合物(35) (35.9 mg, 0.023 mmol)を出発物質として、Fmoc 固相合成法により 2.5 等量の Fmoc-Phe-OH (22.3 mg, 0.058 mmol)、*N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC, 9.0  $\mu$ L, 0.058 mmol)、HOBt (8.8 mg, 0.058 mmol) を DMF (1 mL) 中、室温で 2 時間攪拌した。樹脂の一部を採取して Kaiser test を行うことで、縮合反応の終了を確認した後、20% piperidine/DMF (3mL)を加え、20 分間室温で攪拌した。樹脂の一部を採取して Kaiser test を行い、*N*<sup>α</sup>-Fmoc 基の脱保護を確認した。さらに、保護アミノ酸に Fmoc-Gly-OH を用いて同様の操作を行うことで、化合物(36)を作製した。

#### **Bn-CHX-DTPA-Gly-Phe-Lys(Boc)-OH (37, BCD-GFK(Boc)).**

化合物(36)に対して、化合物(34) (31.4 mg, 0.036 mmol)、DIEA (38  $\mu$ L, 0.22 mmol)を DMF (1 mL) 中、室温で一晩攪拌した。樹脂の一部を採取して Kaiser test を行うことで、縮合反応の終了を確認した後、acetic acid:2,2,2-trifluoroethanol (TFE):dichloromethane=3:1:6 (2 mL)の混液中室温で 2 時間攪拌した。樹脂をろ去した後、ろ液を減圧留去して得られた残渣に diethylether (3 mL) を加えることで結晶化させた。結晶をろ取り、diethylether で洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(37)の酢酸塩(9.7mg, 35.4%)を淡黄色結晶として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z1014.5, found: 1014.5.

#### **H-Gly-Phe-Leu-Lys(Boc)-Trt(2-Cl)Resin (38).**

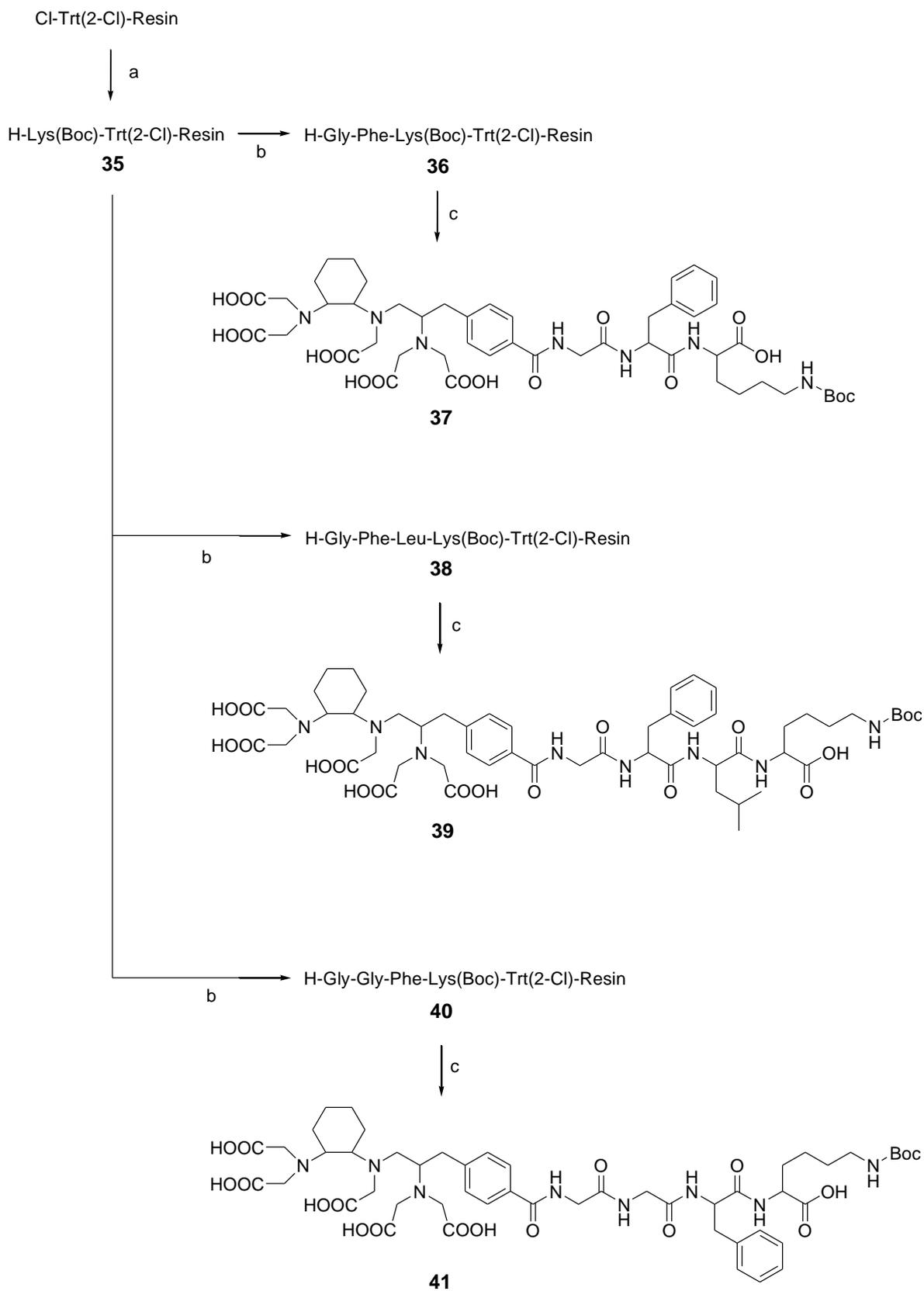
化合物(35) (30 mg, 0.019 mmol)を出発物質として、保護アミノ酸を順次 Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH と変えて、化合物(36)と同様の操作を行うことで、化合物(38)を作製した。

#### **Bn-CHX-DTPA-Gly-Phe-Leu-Lys(Boc)-OH (39, BCD-GFLK(Boc)).**

化合物(38)に対して、化合物(37)の合成と同様の操作を行うことで化合物(39)の酢酸塩 (17.4 mg, 70.0%)を淡黄色結晶として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1127.5, found: 1127.5.

#### **H-Gly-Gly-Phe-Lys(Boc)-Trt(2-Cl)Resin (40).**

化合物(35) (30 mg, 0.019 mmol)を出発物質として、保護アミノ酸を順次 Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH と変えて、化合物(36)の合成と同様の操作を行うことで、化合物(40)を作製した。



**Scheme 8.** Synthetic procedure for the low molecular weight derivatives. Reagents and conditions: (a) i. Fmoc-Lys(Boc)-OH, DIEA, dichloromethane; ii. DIEA, methanol, iii. 20% piperidine/DMF; (b) Fmoc solid-phase elongation; (c) i. BCD-TFP, DIEA, DMF; ii. acetic acid:TFE:dichloromethane=3:1:6, **37**, 35%, **39**, 70%, **41**, 50%.

#### **Bn-CHX-DTPA-Gly-Gly-Phe-Lys(Boc)-OH (41, BCD-GGFK(Boc)).**

化合物(40)に対して、化合物(37)の合成と同様の操作を行うことで化合物(41)の酢酸塩(11.9 mg, 50.1%)を淡黄色結晶として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1071.5, found: 1071.5.

#### **H-Lys(Z)-Trt(2-Cl)Resin (42).**

Trt(2-Cl)Resin (60 mg, 0.096 mmol)を出発物質として、Fmoc-Lys(Z)-OH (48.2 mg, 0.096 mmol)および DIEA (67 μL, 0.384 mmol)を dichloromethane (2 mL)中 1.5 時間反応させた。Methanol (0.4 mL)および DIEA (67 μL, 0.384 mmol)を加えて反応を停止した。化合物(35)と同様の方法で Fmoc-Lys(Z)-OH の樹脂への導入量を定量した(0.61 mmol/g)。20% piperidine/DMF (3mL)を加え、20 分間室温で攪拌することで、化合物(42)を作製した。樹脂の一部を採取して Kaiser test を行い、N<sup>α</sup>-Fmoc 基の脱保護を確認した。

#### **H-Gly-Phe-Lys(Z)-Trt(2-Cl)Resin (43).**

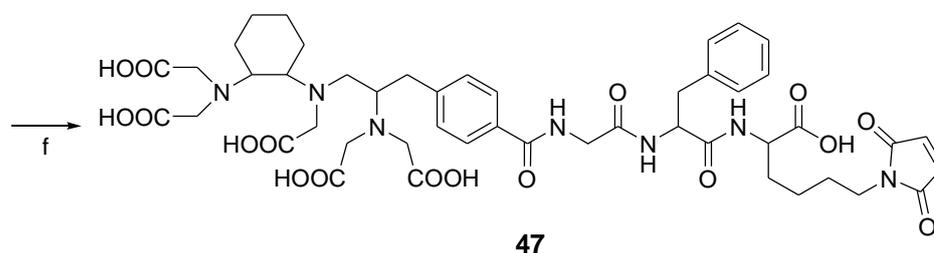
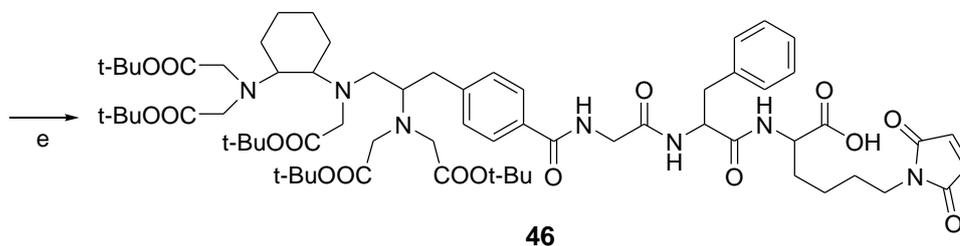
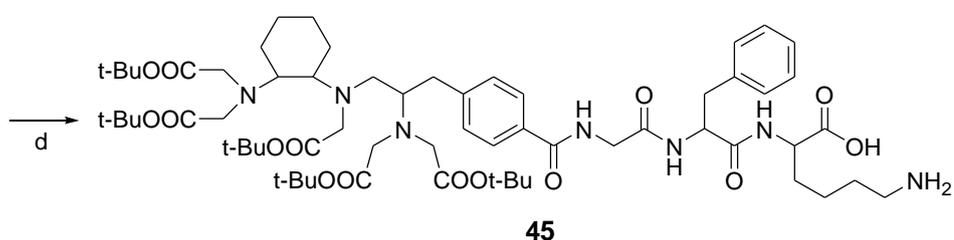
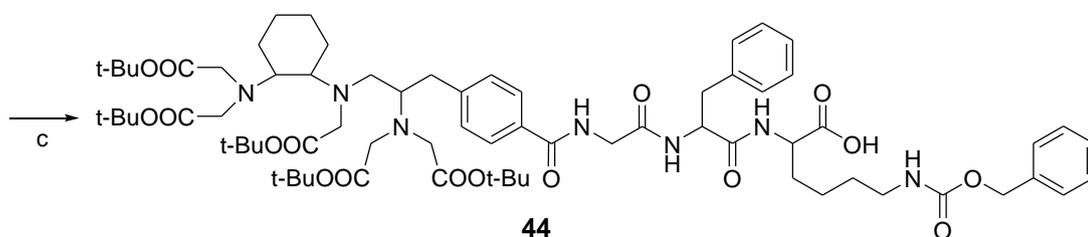
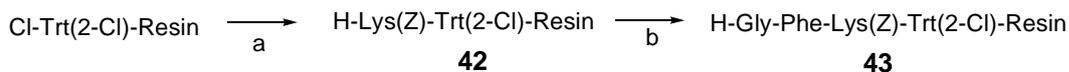
化合物(42)を出発物質として、化合物(36)と同様の操作を行うことで、化合物(43)を作製した。

#### **Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>-Gly-Phe-Lys(Z)-OH (44).**

化合物(43) (122 mg, 0.0742 mmol)に対して、化合物(26) (75.4 mg, 0.0875 mmol)、DIC (156 μL, 1.00 mmol)、HOBt (154 mg, 1.00 mmol) を DMF (1 mL) 中、室温で 2 時間攪拌した。樹脂の一部を採取して Kaiser test を行うことで、縮合反応の終了を確認した後、acetic acid:TFE:dichloromethane=3:1:6 (3 mL)の混液中室温で 2 時間攪拌した。樹脂をろ去した後、ろ液を減圧留去して得られた残渣を ethyl acetate(5 mL)に溶解し、水(5 mL)で洗浄した。水層をさらに ethyl acetate (5 mL x 2)で抽出し、集めた有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去することで化合物(44) (97.0 mg, 98.3%)を黄色油状物として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1328.8, found: 1328.8.

#### **Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>-Gly-Phe-Lys-OH (45).**

化合物(44) (97.0 mg, 0.0730 mmol)を 10% 水/methanol (5 mL)に溶解し、10% Pd/C (25 mg)を加えた。水素雰囲気下、室温で 6 時間攪拌した後、ろ過して溶媒を減圧留去することで化合物(45) (78.0 mg, 91.3%)を黄色油状物として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1194.7, found: 1194.7.



**Scheme 9.** Synthetic procedure for BCD-GFK(mal). Reagents and conditions: (a) i. Fmoc-Lys(Z)-OH, DIEA, dichloromethane; ii. DIEA, methanol, iii. 20% piperidine/DMF; (b) Fmoc solid-phase elongation; (c) i. *p*-COOH-Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>, DIC, HOBT, DMF; ii. acetic acid:TFE:dichloromethane=3:1:6, 98%; (d) 10%Pd/C, H<sub>2</sub>(g), 10% water/methanol, 91%; (e) NMCM, sat. NaHCO<sub>3</sub>, acetone, 42%; (f) 10% anisole/TFA, 38%.

**Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>-Gly-Phe-Lys(mal)-OH (46).**

*N*-Methoxycarbonylmaleimide (NMCM)は Keller らの方法に従って合成した(50)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.98 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 6.85 (2H, s, CH).

化合物(45) (78.0 mg, 0.0653 mmol)を acetone (3 mL)に溶解し、sat. NaHCO<sub>3</sub> (3 mL)を加えた。溶液を氷冷した後、NMCM (30.4 mg, 0.196 mmol)を加え、氷冷下 30 分間攪拌し、さらに室温に戻して 1 時間攪拌した。溶液を氷冷した後、5% citric acid を加えて酸性とし、ethyl acetate (10 mL x 3)で抽出した。有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて乾燥した後、溶媒を減圧留去して得られた残渣を ethyl acetate (0.2 mL)に溶解し、diethyl ether (5 mL) を加えることで結晶化させた。結晶をろ取り、diethylether で洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(46) (34.7 mg, 41.7%)を淡黄色結晶として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1274.7, found: 1274.7.

**Bn-CHX-DTPA-Gly-Phe-Lys(mal)-OH (47, BCD-GFK(mal)).**

化合物(46) (34.7 mg, 0.0272 mmol)に 10% anisole/TFA (2 mL)を加え、24 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、diethylether を加えることで結晶化させた。結晶をろ取り、diethylether で洗浄した後、減圧乾燥することで化合物(47)の TFA 塩(13.9 mg, 38.3%)を淡黄色結晶として得た。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 994.4, found: 994.4.

**H-Gly-Gly-Phe-Lys(Z)-Trt(2-Cl)Resin (48).**

化合物(42)を出発物質として、化合物(38)と同様の操作を行うことで、化合物(48)を作製した。

**Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>-Gly-Gly-Phe-Lys(Z)-OH (49).**

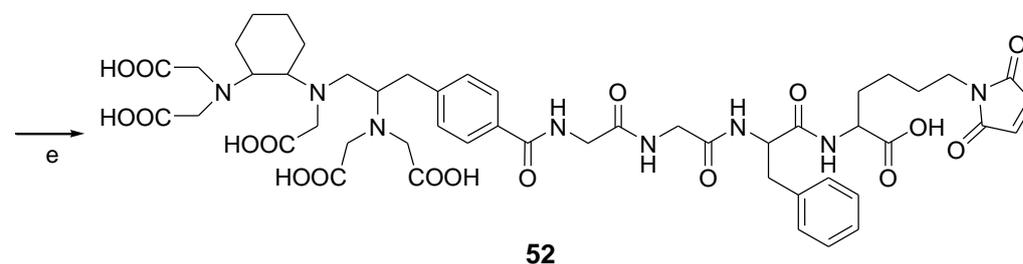
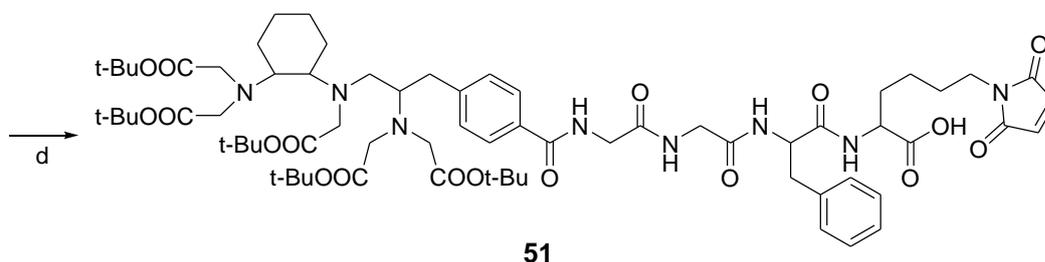
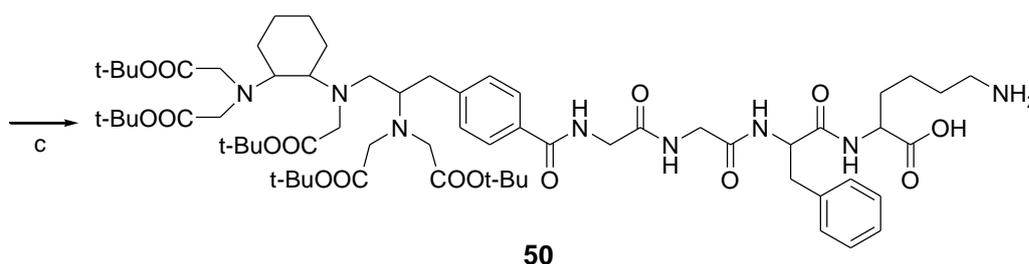
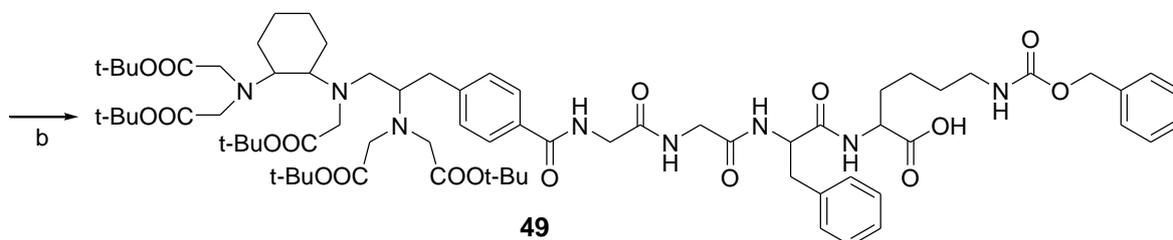
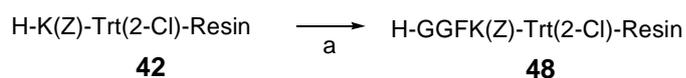
化合物(48) (60 mg, 0.0365 mmol)を出発物質として、化合物(44)と同様の操作を行うことで、化合物(49) (34.7mg, 68.5%)を作製した。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1385.8, found: 1385.8.

**Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>-Gly-Gly-Phe-Lys-OH (50).**

化合物(49) (34.7 mg, 0.0250 mmol)を出発物質として、化合物(45)と同様の操作を行うことで、化合物(50) (27.4 mg, 87.4%)を作製した。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1251.7, found: 1251.7.

**Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>-Gly-Gly-Phe-Lys(mal)-OH (51).**

化合物(50) (27.4 mg, 0.0219 mmol)を出発物質として、化合物(46)と同様の操作を行うことで、化合物(51) (24.1 mg, 72.4%)を作製した。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1331.7, found: 1331.7.



**Scheme 10.** Synthetic procedure for BCD-GGFK(mal). Reagents and conditions: (a) Fmoc solid-phase elongation; (b) i. *p*-COOH-Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub>, DIC, HOBt, DMF; ii. acetic acid:TFE:dichloromethane=3:1:6, 69%; (c) 10% Pd/C, H<sub>2</sub>(g), 10% water/methanol, 87%; (d) NMCM, sat. NaHCO<sub>3</sub>, acetone, 72%; (e) 10% anisole/TFA, 42%.

### **Bn-CHX-DTPA-Gly-Gly-Phe-Lys(mal)-OH (52, BCD-GGFK(mal)).**

化合物(51) (24.1 mg, 0.0181 mmol)を出発物質として、化合物(47)と同様の操作を行うことで、化合物(52)の TFA 塩(10.5mg, 41.6%)を作製した。ESI-MS (M+H)<sup>+</sup>: m/z 1051.4, found: 1051.4.

### **3. <sup>111</sup>In 標識**

#### **<sup>111</sup>In 標識**

##### **(i) BCD-G**

<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (10 μL)を 1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 15 μL)に混和し、室温で 5 分間静置した。0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5)を用いて、0.2、0.6、1.4、2、6 μM に調整した BCD-G 溶液(25 μL)を混合した後、37 °C で 1 時間インキュベートした。また、<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (10 μL)を pH 4.5、5、5.5、6、6.5 の 1 M 酢酸緩衝液(15 μL)に混和し、室温で 5 分間静置した。pH 4.5、5、5.5、6、6.5 の 0.1 M 酢酸緩衝液を用いて、2 μM に調整した BCD-G 溶液(25 μL)を混合した後、37 °C で 1 時間インキュベートした。溶液から 2 μL 採取し、TLC にて分析することで放射化学的収率を算出した。

##### **(ii) BCD-GG**

<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (10 μL)を 1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 15 μL)に混和し、室温で 5 分間静置した。0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5)を用いて、6 μM に調整した BCD-GG 溶液(25 μL)を混合した後、37 °C で 1 時間インキュベートした。溶液から 2 μL 採取し、TLC にて分析することで放射化学的収率を算出した。

##### **(iii)低分子モデル化合物**

<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (10 μL)を 1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 15 μL)に混和し、室温で 5 分間静置した。0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5)を用いて、20 μM に調整した各標識前駆体溶液(25 μL)を混合した後、37 °C で 1 時間インキュベートした。溶液から 2 μL 採取し、TLC にて分析することで放射化学的収率を算出した。

### **4. <sup>111</sup>I-BCD-G および <sup>111</sup>I-BCD-GG のマウス体内動態の検討**

<sup>111</sup>In-BCD-G および <sup>111</sup>In-BCD-GG を最終濃度 3 μM で調製した溶液にリン酸緩衝生理食塩水(1 mM, pH 7.4)を加えた。マウス尾静脈より、各 <sup>111</sup>I 錯体溶液(0.3 μCi/100 μL/匹)を投与した。投与 10、30 分、1、3、6 時間後に各群 4-5 匹のマウスを屠殺し、関心臓器を採取、重

量を測定後、オートウェル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ガンマシステムにより測定した。

## **5. BBMVs によるインキュベート実験**

### **BBMVs の調製**

BBMVs は Wistar 系雄性ラット (200-250 g) の腎臓から Hori らの方法に従って作製した (51)。全ての操作は氷上で行った。皮質に重量で 4-5 倍の 300 mM mannitol、および 5 mM ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) を含む 12 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.1) を加え、Polytron homogenizer で 2 分間ホモジナイズし、同じ緩衝液で希釈することで 10 %ホモジネートとした。次いで、蒸留水で 2 倍に希釈した後、最終濃度が 10 mM となるよう、1.0 M に調製した  $MgCl_2$  水溶液を加え、15 分間放置した。その後、ホモジネートを 1,900 g で遠心し、上清をさらに 30 分間 24,000 g で遠心した。沈殿を皮質重量の 20 倍に相当する 150 mM mannitol、および 2.5 mM ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) を含む 6 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.1) に再懸濁し、テフロンホモジナイザー (1,000 rpm, 10 strokes) によりホモジナイズした。次いで、最終濃度が 10 mM となるように 1.0 M  $MgCl_2$  水溶液を加え、懸濁液を 15 分間放置し、その後、ホモジネートを 1,900 g で遠心し、上清をさらに 30 分間 24,000 g で遠心した。得られた沈殿を皮質重量の 10 倍に相当する 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、再度テフロンホモジナイザー (1,000 rpm, 10 strokes) によりホモジナイズした。次いで、ホモジネートを 30 分間 24,000 g で遠心し、BBMVs を沈殿として得た。次いで、BBMVs の沈殿を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁し、0.4 x 19 mm の針に 10 回通すことで小胞の大きさを一定にした。インキュベート実験にはタンパク質濃度が 10 mg/mL となるように希釈して用いた。調製した BBMVs について、リソソームマーカー酵素である  $\beta$ -galactosidase 活性を *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galacto- pyranoside を用いて測定することにより、リソソーム酵素の混入を評価した(52)。また、 $\gamma$ -glutamyl transferase、aminopeptidase の活性を、Glossmann ら(53)、Kramers ら(54)の方法に従い、L- $\gamma$ -glutamyl- *p*-nitroanilide、L-leucine-*p*-nitroanilide を用いて測定した。

### **BBMVs によるインキュベート実験**

BBMVs と 3 種の  $^{111}In$  標識低分子モデル基質  $^{111}In$ -BCD-GFK(Boc)、 $^{111}In$ -BCD-GFLK(Boc)、 $^{111}In$ -BCD-GGFK(Boc)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BBMV(20 µL)を、37 °Cで10分間プレインキュベートした。その後、逆相HPLC(system A)によって過剰の配位子を除去してPBSに溶解した<sup>111</sup>In標識低分子モデル基質溶液(20 µL)を加え、37 °Cでインキュベートし、30分、1時間、2時間後に溶液の一部を採取してTLCで分析した。また、インキュベート2時間後に10 kDaのろ過膜で限外ろ過し、逆相HPLC(system B)により分析した。

## 6. <sup>111</sup>In 標識 Fab の作製

### Fab の作製

NuB2 (12 mg)を10 mM Na<sub>2</sub>EDTA および80 mM cysteine を含む20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0, 6.5 mL)に溶解し、Immobilized ficin (Thermo Scientific, Yokohama, Japan) のスラリー(3.5 mL)を加え、37°Cで8時間インキュベートした。反応終了後、200 x g で5分間遠心し、上清を30 kDaのろ過膜を用いて1 mLまで濃縮した。その後、0.1 M リン酸緩衝液(4 mL x 4)で緩衝液を交換し、Fabを得た。得られたFabは、0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.8)を溶出溶媒とした流速1.0 mL/minで溶出するSE-HPLCにより生成を確認し、A<sub>280</sub>を測定することで濃度を算出した。

### IT-Fab の作製

十分脱気した2 mM EDTA 含有0.16 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) を用いてFab溶液(200 µL, 2.0 mg/mL)を調製し、同じ緩衝液に溶解した2-iminothiolane (2-IT) (7.2 µL, 1.0 mg/mL)を加え、室温で静かに30分間攪拌した。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нкаラム法(55)により反応溶液中の過剰の2-ITを除去した。Fab一分子あたりに導入されたチオール基の数は、2,2'-dipyridyl disulfide (DPS) を用いて測定した(56)。

### BCD-GFK-Fab および BCD-GGFK-Fab の作製

2-ITによりチオール化したFab溶液(100 µL)にDMFに溶解したBCD-GFK(mal)またはBCD-GGFK(mal) (12.5 mg/mL)を1 µL加え、室温で4時間反応した。次いで、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14.8 µL加えた後、室温で30分間反応を行い、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нкаラム法で精製した。

### <sup>111</sup>In 標識 Fab の作製

$^{111}\text{InCl}_3$  (10  $\mu\text{L}$ )を 0.25 M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 10  $\mu\text{L}$ )に混和し、室温で 5 分間静置した。BCD-GFK-Fab または BCD-GGFK-Fab 溶液(20  $\mu\text{L}$ )を混合した後、37 °C で 1 時間インキュベートした。最終濃度が 10 mM となる EDTA を加えた後、0.1 M リン緩衝液(pH 7.0)で平衡化した Sephadex G-50 Fine を用いるスピнкаラム法で精製することで、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GFK-Fab および  $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK-Fab を作製した。

## 7. $^{111}\text{In}$ 標識 Fab の安定性の検討

$^{111}\text{In}$ -BCD-GFK-Fab および  $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK-Fab 溶液(30  $\mu\text{L}$ )を、マウス血漿(270  $\mu\text{L}$ ) に加え、37 °C でインキュベートした。24 時間後、各群 3 つの溶液を 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。

## 8. $^{111}\text{In}$ 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  $^{111}\text{In}$ -BCD-GFK-Fab および  $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK-Fab をリン酸緩衝生理食塩水(1 mM, pH 7.4)を用いて希釈した。マウス尾静脈より、未修飾 Fab 濃度を 20  $\mu\text{g}/100$   $\mu\text{L}$  に調整した各  $^{111}\text{I}$  標識 Fab 溶液(0.3  $\mu\text{Ci}/100$   $\mu\text{L}/匹$ )を投与した。投与 10、30 分、1、3、6、24 時間後に各群 5 匹のマウスを屠殺し、関心臓器を採取、重量を測定後、オートウェルガンマシステムにより放射活性を測定した。また、投与 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ガンマシステムにより測定した。

## 2-2. 結果

### 1. 合成

本合成法では、*p*-iodophenylalanine を出発物質として既存の合成法に従い、Bn-CHX-DTPA の配位子基本骨格を *t*-Bu 保護体として作製した(Scheme 4)。その後、Pd 触媒を用いた cross-coupling 反応によりヨード基をカルボン酸のエチルエステル体へと変換した。本反応収率は 73%であった。最終的にエチルエステルを脱保護することで、目的とするベンジル基パラ位にカルボキシル基を有し、DTPA の 5 分子の酢酸基が *tert*-butyl ester で保護された *p*-COOH-Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub> を総収率 29%で合成した。さらに、*p*-COOH-Bn-CHX-DTPA (*t*-Bu)<sub>5</sub> を glycine *tert*-butyl ester と縮合後、脱保護することで、馬尿酸誘導體 BCD-G を作製した(Scheme 5)。また、glycylglycine *tert*-butyl ester と縮合後、脱保護することで、BCD-GG を作製した(Scheme 6)。

種々のペプチドスパーサー配列を有する低分子モデル化合物は Fmoc-Lys(Boc)-OH を結合させた樹脂に対して、それぞれ Fmoc 固相合成法によりペプチド配列を伸長し、別途合成し

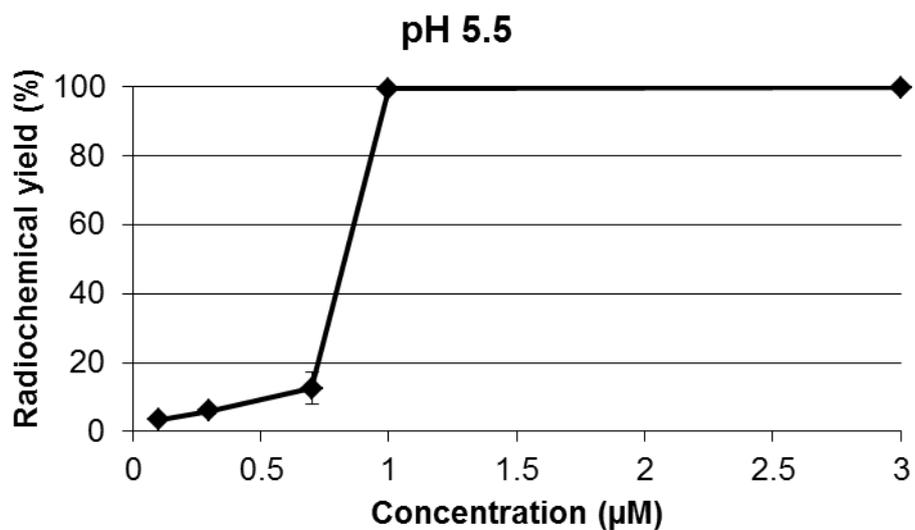
た新規二官能性キレート試薬の活性エステル(Scheme 7)を反応させ、最終的に脱樹脂することで作製した(Scheme 8)。また、抗体標識薬剤は Fmoc-Lys(Z)-OH を結合させた樹脂に対して、同様に Fmoc 固相合成法によりペプチド配列を伸長し、新規二官能性キレート試薬を反応させた。脱樹脂後、Lys 側鎖 Z 基を脱保護することで遊離したアミノ基に対して NMCM を反応させることで、抗体との結合に利用するマレイミド基を導入し、目的とする酵素認識部位を有する二官能性キレート試薬を合成した(Schemes 9, 10)。

## **2. <sup>111</sup>I 標識**

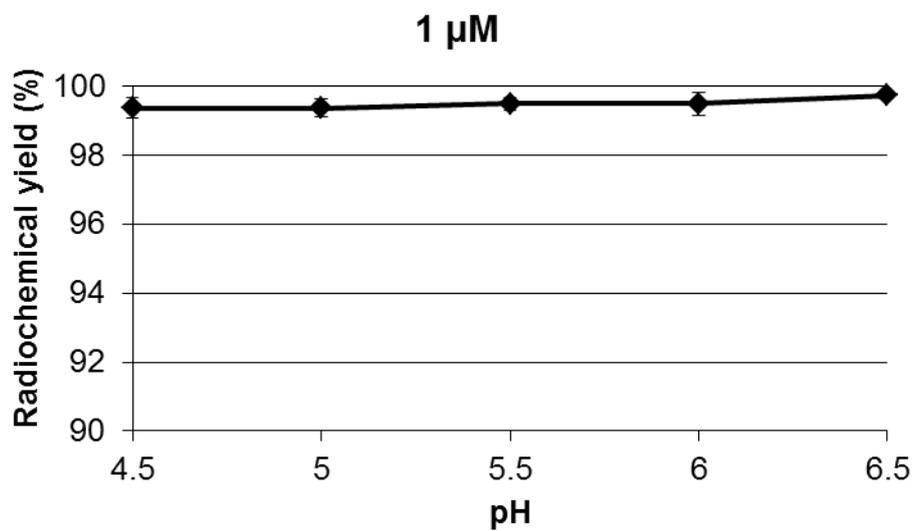
BCD-G は 37 °C、1 時間で、1 μM の低配位子濃度においても、放射化学的収率 99% 以上で <sup>111</sup>In 錯体を与えた。さらに、同配位子濃度において pH 4.5-6.5 の範囲でいずれも放射化学的収率 99% 以上で標識可能であった(Figures 6, 7)。

## **3. <sup>111</sup>I-BCD-G および <sup>111</sup>I-BCD-GG のマウス体内動態の検討**

<sup>111</sup>In-BCD-G および <sup>111</sup>In-BCD-GG を正常マウスに投与したところ、どちらも放射活性は血中から速やかに消失し、投与 1 時間後における放射活性は <sup>111</sup>In-BCD-G および <sup>111</sup>In-BCD-GG、それぞれ 0.12±0.06%ID/g、0.08±0.02%ID/g であった(Table 4)。また、腎臓における放射活性は投与 10 分後では 12.47±2.36%ID/g、13.24±5.84%ID/g であったが、投与 1 時間後には 1.49±0.38%ID/g、1.36±0.26%ID/g まで減少した。また、投与 6 時間後までに尿中へ排泄された放射活性は <sup>111</sup>In-BCD-G、<sup>111</sup>In-BCD-GG それぞれ 80.2±20.4%ID、81.0±2.2%ID であった。



**Figure 6.** Radiochemical yields of <sup>111</sup>In-BCD-G at different ligand concentration.



**Figure 7.** Radiochemical yields of <sup>111</sup>In-BCD-G at different pH conditions.

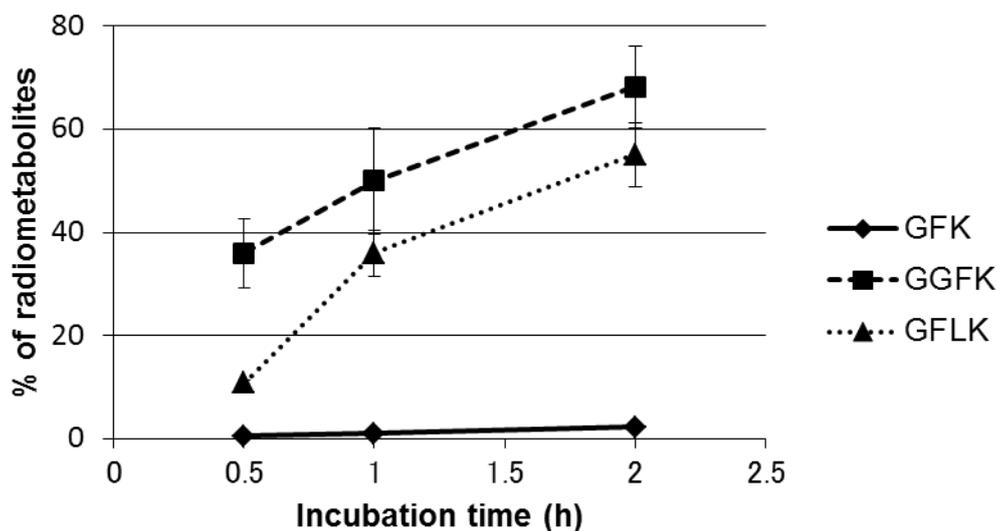
	Time after injection				
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
<sup>111</sup> In-BCD-G					
Blood	2.50±0.27	0.61±0.14	0.12±0.06	0.01±0.00	0.01±0.00
Liver	1.32±0.08	0.48±0.11	0.16±0.03	0.10±0.11	0.06±0.02
Spleen	0.67±0.11	0.17±0.06	0.08±0.02	0.04±0.06	0.01±0.04
Kidney	12.47±2.36	2.97±0.30	1.49±0.38	0.68±0.06	0.56±0.04
Pancreas	0.78±0.11	0.22±0.05	0.12±0.08	0.04±0.04	0.03±0.01
Heart	0.94±0.13	0.26±0.13	0.12±0.08	0.03±0.02	0.01±0.01
Lung	2.11±0.15	0.56±0.14	0.20±0.02	0.16±0.24	0.02±0.01
Stomach <sup>b</sup>	0.26±0.03	0.10±0.01	1.04±0.46	0.19±0.15	0.36±0.29
Intestine <sup>b</sup>	2.30±0.26	3.15±0.76	4.82±0.99	3.38±0.54	5.65±5.66
Urine <sup>b</sup>					80.21±20.4
Feces <sup>b</sup>					3.21±2.04
<sup>111</sup> In-BCD-GG					
Blood	2.69±0.42	0.59±0.10	0.08±0.02	0.01±0.01	0.01±0.00
Liver	4.16±0.51	2.82±0.34	1.05±0.40	0.31±0.16	0.22±0.20
Spleen	0.55±0.06	0.17±0.04	0.03±0.01	0.03±0.02	0.01±0.01
Kidney	13.24±5.84	4.10±1.25	1.36±0.26	0.82±0.28	0.57±0.11
Pancreas	0.79±0.23	0.23±0.06	0.05±0.02	0.03±0.03	0.01±0.01
Heart	0.85±0.13	0.24±0.03	0.05±0.02	0.02±0.02	0.06±0.00
Lung	1.96±0.33	0.52±0.04	0.12±0.04	0.03±0.01	0.06±0.06
Stomach <sup>b</sup>	0.55±0.14	0.25±0.12	0.14±0.08	0.27±0.37	0.07±0.07
Intestine <sup>b</sup>	2.88±0.37	4.47±0.39	7.17±1.14	9.67±1.42	8.72±2.80
Urine <sup>b</sup>					81.02±2.25
Feces <sup>b</sup>					0.61±0.87

**Table 4.** Biodistribution of radioactivity after intravenous injection of <sup>111</sup>In-BCD-G and <sup>111</sup>In-BCD-GG<sup>a, a</sup>. Tissue radioactivity is expressed as percent of injected dose per gram of wet tissue. Results are expressed as means (SD) of four animals each point. <sup>b</sup> Expressed as percent of injected dose per tissue.

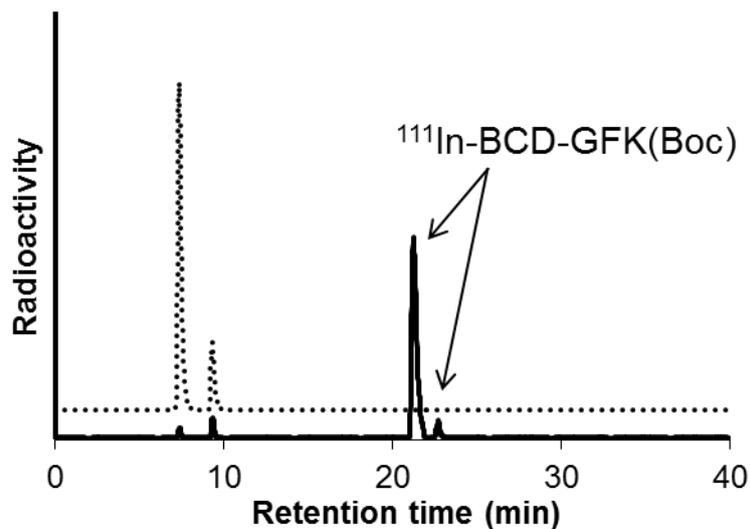
#### 4. BBMVs によるインキュベーション実験

低分子モデル化合物を BBMVs とインキュベートした結果、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GFK(Boc)は刷子縁膜酵素による認識性は低く、逆相 HPLC による分析において、 $^{111}\text{In}$ -BCD-G を僅かに遊離することが示された(Figure 9)。また、 $^{111}\text{In}$ -BCD-G の生成割合はインキュベート 2 時間後においても、 $2.3\pm 0.6\%$ であった(Figure 8)。

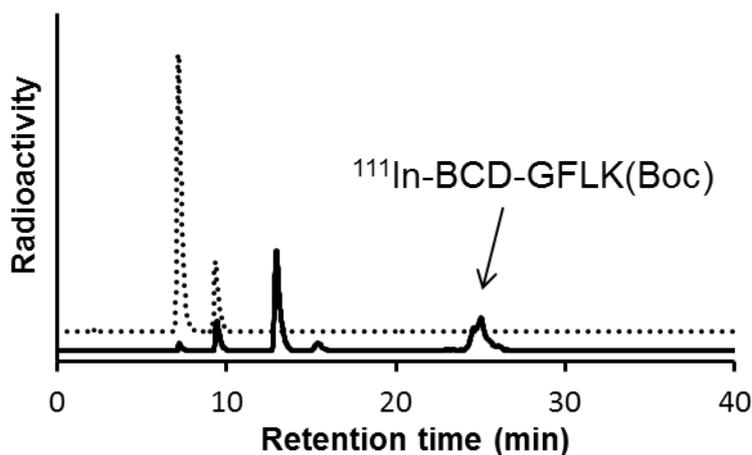
一方、テトラペプチド配列を導入することで酵素認識性は大きく向上した。 $^{111}\text{In}$ -BCD-GFLK(Boc)、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK(Boc)はそれぞれ、インキュベート 2 時間後における放射性代謝物の生成割合は  $55.1\pm 6.2\%$ 、 $68.2\pm 2.1\%$  (Figure 8)であった。また遊離した放射性代謝物は、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GFLK(Boc)が  $^{111}\text{In}$ -BCD-G を含む 2 種類の放射性代謝物を与えたのに対し(Figure 10)、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK(Boc)は単一の放射性代謝物として、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GG を与えた(Figure 11)。



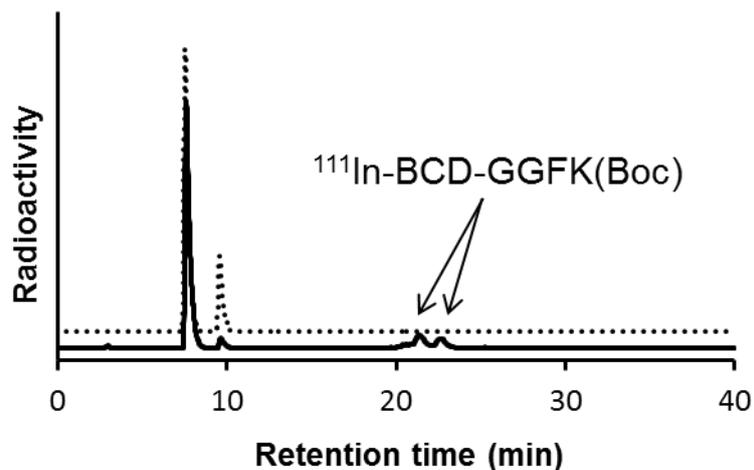
**Figure 8.** The amount of radiometabolites liberated from  $^{111}\text{In}$  labeled low molecular weight derivatives after incubation with BBMVs for 0.5, 1, 2 h at  $37^\circ\text{C}$ .



**Figure 9.** HPLC profiles of the solution of  $^{111}\text{In-BCD-GFK(Boc)}$  after incubation with BBMV for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  (solid line) and  $^{111}\text{In-BCD-G}$  (dotted line).  $^{111}\text{In-BCD-G}$  was slightly liberated from  $^{111}\text{In-BCD-GFK(Boc)}$ .



**Figure 10.** HPLC profiles of the solution of  $^{111}\text{In-BCD-GFLK(Boc)}$  after incubation with BBMV for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  (solid line) and  $^{111}\text{In-BCD-G}$  (dotted line).  $^{111}\text{In-BCD-G}$  was slightly liberated from  $^{111}\text{In-BCD-GFLK(Boc)}$  and another radiometabolite was liberated as a main radiometabolite.



**Figure 11.** HPLC profiles of the solution of  $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK(Boc) after incubation with BBMVs for 2 h at 37 °C (solid line) and  $^{111}\text{In}$ -BCD-GG (dotted line).  $^{111}\text{In}$ -BCD-GG was liberated from  $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK(Boc).

### 5. $^{111}\text{In}$ 標識 Fab の作製

2-IT によりチオール化した Fab (1.02-1.26 SH/Fab) と BCD-GFK(mal) および BCD-GGFK(mal)をそれぞれ反応させることにより BCD-GFK-Fab、BCD-GGFK-Fab を作製した。キレートの前後に求めたチオール基の数より、BCD-GFK-Fab および BCD-GGFK-Fab における抗体一分子あたりの各キレートの平均結合数はそれぞれ 0.65、0.50 個であった。BCD-GFK-Fab および BCD-GGFK-Fab を抗体濃度(1 mg/mL)で  $^{111}\text{In}$  標識したところ、放射化学的収率はそれぞれ>95%、52%であった。

### 6. $^{111}\text{In}$ 標識 Fab の安定性の検討

$^{111}\text{In}$ -BCD-GFK-Fab および  $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK-Fab をマウス血漿中においてインキュベートしたところ、インキュベート 24 時間後までの未変化体の割合はそれぞれ 99.0±0.2%、98.9±0.2%であった。

## 7. <sup>111</sup>In 標識 Fab のマウス体内動態の検討

<sup>111</sup>In-BCD-GGFK-Fab は <sup>111</sup>In-BCD-GFK-Fab と比較して、同様の血液クリアランスを示した一方で、投与早期から腎臓の放射活性を低減した(Table 5)。腎臓における放射活性は投与 10 分後において、<sup>111</sup>In-BCD-GFK-Fab、<sup>111</sup>In-BCD-GGFK-Fab、それぞれ  $32.65 \pm 2.94\% \text{ID/g}$ 、 $18.26 \pm 2.57\% \text{ID/g}$  であり、また <sup>111</sup>In-BCD-GFK-Fab が最大値を示した 6 時間後では、それぞれ  $82.29 \pm 15.86\% \text{ID/g}$ 、 $60.85 \pm 3.23\% \text{ID/g}$  であった。

	Time after injection					
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h	24 h
<sup>111</sup> In-BCD-GFK-Fab						
Blood	24.61±2.22	13.75±1.19	8.45±0.27	2.67±0.02	1.49±0.17	0.17±0.07
Liver	4.58±0.76	3.32±0.97	2.55±0.22	1.71±0.17	1.68±0.27	1.08±0.22
Spleen	3.22±0.31	3.09±0.97	1.76±0.22	1.17±0.17	1.06±0.22	0.56±0.26
Kidney	32.65±2.94	60.38±8.36	79.06±8.73	82.19±10.04	82.29±15.86	41.12±16.85
Pancreas	1.14±0.14	1.24±0.31	1.32±0.05	1.10±0.07	1.01±0.27	0.34±0.07
Heart	5.58±0.70	4.49±1.60	3.75±0.40	1.64±0.21	1.29±0.18	0.38±0.09
Lung	12.68±2.21	7.53±2.07	5.70±1.13	2.40±0.26	1.63±0.21	0.41±0.12
Stomach <sup>b</sup>	0.32±0.04	0.40±0.03	0.44±0.05	0.73±0.71	0.49±0.18	0.31±0.18
Intestine <sup>b</sup>	2.60±0.17	3.33±0.48	3.11±0.29	2.71±0.39	3.50±0.69	1.55±0.37
Muscle	0.76±0.16	0.99±0.33	1.15±0.34	0.81±0.14	0.62±0.13	0.17±0.04
Bone	2.80±0.17	3.82±3.68	2.20±0.29	1.42±0.18	1.02±0.13	0.53±0.10
Urine <sup>b</sup>						61.07±3.19
Feces <sup>b</sup>						2.69±1.37
<sup>111</sup> In-BCD-GGFK-Fab						
Blood	25.14±1.81	15.36±1.26	9.67±1.09	3.84±0.49	1.63±0.30	0.12±0.02
Liver	4.44±0.38	3.28±0.34	2.91±0.40	2.06±0.24	2.07±0.27	1.28±0.19
Spleen	3.48±0.30	2.56±0.36	2.01±0.26	1.55±0.49	1.10±0.11	0.50±0.05
Kidney	18.26±2.57	36.95±5.20	41.52±6.25	61.47±10.91	60.85±3.23	23.63±8.50
Pancreas	0.98±0.08	1.05±0.15	1.12±0.11	1.02±0.14	0.82±0.09	0.28±0.06
Heart	4.70±0.51	4.03±0.62	3.30±0.28	1.79±0.19	1.01±0.07	0.31±0.06
Lung	12.77±3.10	9.35±2.11	6.54±0.96	2.89±0.73	1.39±0.28	0.34±0.04
Stomach <sup>b</sup>	0.39±0.06	0.51±0.07	0.55±0.10	0.49±0.12	0.38±0.07	0.27±0.17
Intestine <sup>b</sup>	2.48±0.24	3.41±0.50	3.70±0.40	3.24±0.40	3.47±0.28	3.59±2.29
Muscle	0.66±0.11	0.75±0.08	0.76±0.10	0.68±0.10	0.56±0.04	0.12±0.02
Bone	2.31±0.16	2.29±0.44	1.83±0.22	1.77±0.43	1.42±0.25	1.22±0.19
Urine <sup>b</sup>						52.97±7.88
Feces <sup>b</sup>						3.47±1.13

**Table 5.** Biodistribution of radioactivity after intravenous injection of <sup>111</sup>In-BCD-GFK-Fab and <sup>111</sup>In-BCD-GGFK-Fab<sup>a</sup>. <sup>a</sup> Tissue radioactivity is expressed as percent of injected dose per gram of wet tissue. Results are expressed as means (SD) of five animals each point. <sup>b</sup> Expressed as percent of injected dose per tissue.

### 2-3. 考察

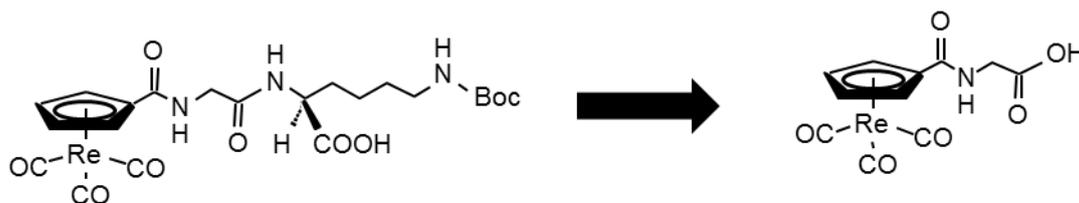
本研究では、*p*-iodophenylalanine を出発物質として、ベンジル基パラ位にカルボキシル基を有する二官能性キレート試薬の合成法を開発した。ベンジル基パラ位にタンパク質などの結合部位としてアミノ基またはイソチオシアネート基を有する二官能性キレート試薬は *p*-nitrophenylalanine を出発物質として、二官能性キレート試薬の母体骨格を合成した後、最終的にニトロ基をアミノ基に還元することで作製し、イソチオシアネート基はその後さらに thiophosgene をアミノ基に作用させることで作製する(35, 47, 57, 58)。本合成法では、出発物質を *p*-iodophenylalanine に変更し、従来の合成法同様、二官能性キレート試薬の母体骨格を合成した後、最終的に cross-coupling 反応を行うことで、カルボキシル基を導入することが可能である。このため、これまで報告されている様々な二官能性キレート試薬の合成に広く応用が可能であると考えられる。

Fmoc 固相合成法により低分子ペプチド標識体を作製する場合、アミノ基に対して二官能性キレート試薬を反応させる必要があるため、結合部位としてアミノ基を有する二官能性キレート試薬を直接利用することができない。このため、コハク酸無水物やグルタル酸無水物を介して、固相合成に応用した例が一部報告されている(59, 60)。また、イソチオシアネート基を用いてチオウレア結合により二官能性キレート試薬を導入した場合、ペプチド側鎖の脱保護には強酸条件が必要となることが多く、Edmann 分解が懸念されるため、応用は困難である(59)。このため、通常 Fmoc 固相合成法に利用する二官能性キレート試薬は、錯形成に関与するカルボキシル基の一つをアミノ基との結合に利用する(61)。この場合、錯体の安定性は低下する(30, 62)。カルボキシル基を有する本キレート試薬は固相合成に直接応用可能であり、かつ錯体部分の安定性を維持することが可能であるため、低分子ペプチド標識体作製を始めとして、今後さらなる応用が期待される。

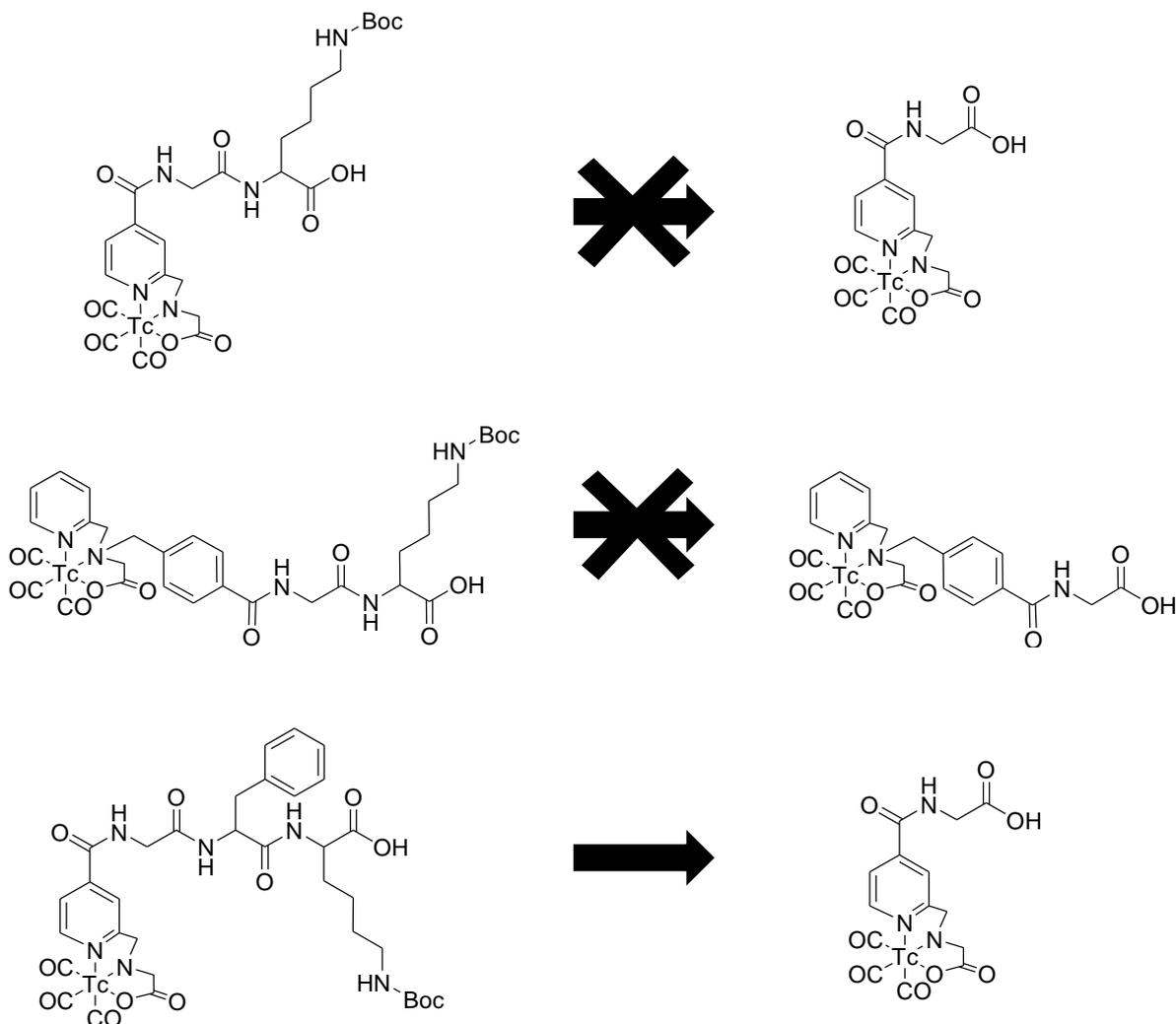
腎集積を低減可能な抗体標識薬剤の作製に向けて、*p*-COOH-Bn-CHX-DTPA(*t*-Bu)<sub>5</sub> を用いて馬尿酸誘導体 BCD-G を合成し、標識条件を検討した。結果、抗体標識を考慮した 37 °C、1 時間、pH 4.5-6.5 の範囲における条件いずれにおいても、1 μM の低配位子濃度で BCD-G は放射化学的収率 99%以上で <sup>111</sup>In 錯体を与えた(Figures 6, 7)。この結果から、CHX-DTPA を基本とする二官能性キレート試薬は比放射能の高い標識抗体作製に有用であることが確認された。また、<sup>111</sup>In-BCD-G は正常マウスに投与した際、腎臓から速やかに放射活性が消失し、その大部分は尿中へと排泄されたことから、腎臓において生成する放射性代謝物として適した性質を有すると考えられる(Table 4)。

設計した放射性代謝物の尿排泄性が確認されたことから、次いで刷子縁膜酵素の認識を受けるペプチド配列の探索を行った。これまで、標識薬剤を誘導体化した低分子モデル化

化合物と腎刷子縁膜小胞(BBMVs)を用いた実験系が、腎刷子縁膜酵素によって認識される基質を探索する方法として適していることが報告されている(63)。そこで本研究では、この実験系を用いて、作製した  $^{111}\text{In}$  標識低分子モデル化合物について腎刷子縁膜酵素による認識性を検討した。



**Figure 12.** Chemical design of  $^{188}\text{Re}$ -CpTR complexes for brush border strategy.



**Figure 13.** Chemical designs of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonyl complexes for brush border strategy.

レニウム-188 ( $^{188}\text{Re}$ )の有機金属錯体 cyclopentadienyltricarbonylrhenium (CpTR)を用いた以前の検討では、適切な配位子を選択することで、HML の薬剤設計を金属 RI に展開できることを認めた(64) (Figure 12)。しかしながら、CpTR を用いた薬剤は標識反応後の精製や煩雑な標識操作が必要となる。そこで、HML の薬剤設計をより簡便な操作で標識可能な有機金属 tricarbonyl 錯体へ展開する目的で、2-picolylamine-*N*-acetic acid を配位子とするテクネチウム-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )の tricarbonyl 錯体を用いて、さらなる検討が行われた(Figure 13)。本検討では、GK 配列を導入した場合には酵素認識を受けなかった。その一方で、トリペプチド配列 GFK が刷子縁膜酵素とりわけ neutral endopeptidase (NEP) (65, 66)の優れた基質であることを認めた。

そこで本研究では、GFK 配列を第一選択として用いた。そして、抗体との結合に利用する Lys 側鎖のアミノ基に保護基を導入することで、低分子モデル化合物を作製した。本検討に用いた低分子モデル化合物  $^{111}\text{In}$ -BCD-GFK(Boc)は刷子縁膜酵素による認識を受けることで、期待した通り  $^{111}\text{In}$ -BCD-G を遊離したが、その生成量は僅かであった(Figures 8, 9)。この原因の一つとして、構造的に嵩高いキレート構造が結合したことで、酵素認識が阻害されたと考えた。そこで、より酵素認識性を向上させるため、テトラペプチド配列を用いて検討を行った。

Enkephalin は NEP の優れた基質であり、Leu-enkephalin (YGGFL)および Met-enkephalin (YGGFM)の 2 種類が存在する。どちらもその GF 間のペプチド結合が NEP による認識を受けることで開裂するが、Met-enkephalin は C 末に修飾を加えることで、その認識性が著しく減少するのに対し、Leu-enkephalin は C 末の修飾による認識性の減少は Met-enkephalin と比較して少ない(67, 68)。そこで、Leu-enkephalin の C 末側のトリペプチド配列 GFL に、抗体との結合に利用する Lys を結合させて、GFLK 配列を有する BCD-GFLK(Boc)を作製した。しかし、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GFLK(Boc)を BBMVs とインキュベートした場合においても、 $^{111}\text{In}$ -BCD-G の生成量は低く、さらに異なる放射性代謝物が主たる代謝物として生成した(Figure 10)。このことから、嵩高いキレート構造の結合により基質配列部である GF の認識が阻害されたことが示唆され、 $^{111}\text{In}$ -BCD-G を高率に遊離することは困難と考えられた。さらに、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GFLK(Boc)における主たる放射性代謝物は GF 間以外のペプチド結合が開裂した結果であると推察されたことから、テトラペプチド配列を用いることで、認識部位から錯体構造を遠ざけることによる酵素認識性の向上効果が得られると考えた。

以上より、enkephalin のトリペプチド配列 GGF に Lys を結合させて、BCD-GGFK(Boc)を作製した。BBMVs とのインキュベート実験から、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK(Boc)は刷子縁膜酵素の良好な基質であることを認め、また  $^{111}\text{In}$ -BCD-GG を期待した通り単一の放射性代謝物とし

て遊離した(Figure 8, 11)。そこで、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GG を作製し、正常マウスに投与したところ、 $^{111}\text{In}$ -BCD-G と同様に高い尿排泄性を有することが確認されたことから(Table 4)、GGFK 配列を用いて HML の薬剤設計への応用を試みた。

$^{111}\text{In}$  標識 Fab は酵素認識性が低かった GFK 配列と良好な基質であった GGFK 配列を用いて 2 種類作製した。 $^{111}\text{In}$ -BCD-GFK-Fab および  $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK-Fab、いずれの  $^{111}\text{In}$  標識 Fab ともマウス血漿中にて安定に存在し、血漿中に存在する酵素による基質部分の開裂は観察されなかった。 $^{111}\text{In}$  標識 Fab をマウスに投与した場合、血液クリアランスは同様であったのに対し、腎臓における放射活性については、投与早期から  $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK-Fab は  $^{111}\text{In}$ -BCD-GFK-Fab より低値を示した(Table 5)。両者の腎放射活性の相違は刷子縁膜酵素の認識の相違を反映した結果と考えられる。以上より、刷子縁膜酵素の認識を受ける基質配列を導入することで、 $^{111}\text{In}$  標識 Fab においても腎集積を低減できる可能性を認めた。

#### 2-4. 小括

標的指向性分子との結合部位としてカルボキシル基を有する新規二官能性キレート試薬を開発した。放射性代謝物として設計した  $^{111}\text{In}$ -BCD-G および  $^{111}\text{In}$ -BCD-GG は高い尿排泄性を示した。 $^{111}\text{In}$ -BCD-GFK(Boc)は酵素認識が低かった一方で、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GGFK(Boc)は刷子縁膜酵素の優れた基質であり、 $^{111}\text{In}$ -BCD-GG を単一の放射性代謝物として遊離した。*In vivo* の検討において、刷子縁膜酵素の優れた基質である GGFK 配列を導入することで、腎臓における放射活性が低減したことが示唆された。

## 【総括】

本研究では C-ODTA や C-DOTA の簡便な合成法を確立した。C-ODTA は高比放射能の  $^{111}\text{In}$  標識低分子ペプチド作製に有用な二官能性キレート試薬であることを明らかにした。また、配位子の骨格炭素からベンジル基を介してタンパク質結合部位を導入した二官能性キレート試薬の開発において、タンパク質との結合部位にカルボン酸を有する化合物の合成方法を確立した。本薬剤は、HML の薬剤設計への応用のみならず固相合成を利用した様々なペプチド性標識プローブの開発に有用と考えられる。BBMV<sub>s</sub> を用いた *in vitro* の実験において良好な基質配列を導入することで、*in vivo* においても腎刷子縁膜酵素の作用で Fab から放射性代謝物を遊離して腎臓の放射活性が低減することを認め、 $^{111}\text{In}$  標識 Fab においても腎臓における放射活性を低減できることを示唆する。

以上、本研究成果は金属 RI を用いた分子イメージング薬剤や内照射治療薬剤の開発に有用な知見を与える。

## 【参考文献】

- (1) Laverman, P., Sosabowski, J. K., Boerman, O. C., and Oyen, W. J. (2012) Radiolabelled peptides for oncological diagnosis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 39 Suppl 1, S78-92.
- (2) Pillay, V., Gan, H. K., and Scott, A. M. (2011) Antibodies in oncology. *New Biotechnology* 28, 518-529.
- (3) Bernhardt, P., Kölby, L., Johanson, V., Nilsson, O., Ahlman, H., and Forssell-Aronsson, E. (2003) Biodistribution of <sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe1-octreotide in tumor-bearing nude mice: Influence of amount injected and route of administration. *Nuclear Medicine and Biology* 30, 253-260.
- (4) Breeman, W. A. P., Kwekkeboom, D. J., Kooij, P. P. M., Bakker, W. H., Holland, L. J., Visser, T. J., Ensing, G. J., Lamberts, S. W. J., and Krenning, E. P. (1995) Effect of dose and specific activity on tissue distribution of indium-111-pentetreotide in rats. *Journal of Nuclear Medicine* 36, 623-627.
- (5) Tolmachev, V., Wällberg, H., Sandström, M., Hansson, M., Wennborg, A., and Orlova, A. (2011) Optimal specific radioactivity of anti-HER2 Affibody molecules enables discrimination between xenografts with high and low HER2 expression levels. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 38, 531-539.
- (6) Camera, L., Kinuya, S., Garmestani, K., Brechbiel, M. W., Wu, C., Pai, L. H., McMurry, T. J., Gansow, O. A., Pastan, I., Paik, C. H., and Carrasquillo, J. A. (1994) Comparative biodistribution of indium- and yttrium-labeled B3 monoclonal antibody conjugated to either 2-(p-SCN-Bz)-6-methyl-DTPA (1B4M-DTPA) or 2-(p-SCN-Bz)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (2B-DOTA). *European Journal of Nuclear Medicine* 21, 640-646.
- (7) Conti, P. S., White, C., Pieslor, P., Molina, A., Aussie, J., and Foster, P. (2005) The role of imaging with <sup>111</sup>In-ibritumomab tiuxetan in the ibritumomab tiuxetan (Zevalin) regimen: Results from a Zevalin Imaging Registry. *Journal of Nuclear Medicine* 46, 1812-1818.
- (8) White, C. A. (2004) Radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: Focus on <sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®). *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology* 4, 305-316.
- (9) Witzig, T. E., Gordon, L. I., Cabanillas, F., Czuczman, M. S., Emmanouilides, C.,

- Joyce, R., Pohlman, B. L., Bartlett, N. L., Wiseman, G. A., Padre, N., Grillo-López, A. J., Multani, P., and White, C. A. (2002) Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 20, 2453-2463.
- (10) Witzig, T. E., Flinn, I. W., Gordon, L. I., Emmanouilides, C., Czuczman, M. S., Saleh, M. N., Cripe, L., Wiseman, G., Olejnik, T., Multani, P. S., and White, C. A. (2002) Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 20, 3262-3269.
- (11) Wiseman, G. A., Kornmehl, E., Leigh, B., Erwin, W. D., Podoloff, D. A., Spies, S., Sparks, R. B., Stabin, M. G., Witzig, T., and White, C. A. (2003) Radiation dosimetry results and safety correlations from <sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: Combined data from 4 clinical trials. *Journal of Nuclear Medicine* 44, 465-474.
- (12) Fujimori, K., Covell, D. G., Fletcher, J. E., and Weinstein, J. N. (1989) Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab in tumors. *Cancer Research* 49, 5656-5663.
- (13) Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M., and Schlom, J. (1992) Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Research* 52, 3402-3408.
- (14) Behr, T. M., Becker, W. S., Bair, H. J., Klein, M. W., Stuhler, C. M., Cidlinsky, K. P., Wittekind, C. W., Scheele, J. R., and Wolf, F. G. (1995) Comparison of complete versus fragmented technetium-99m-labeled anti-CEA monoclonal antibodies for immunoscintigraphy in colorectal cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 36, 430-441.
- (15) Choi, C. W., Lang, L., Lee, J. T., Webber, K. O., Yoo, T. M., Chang, H. K., Le, N., Jagoda, E., Paik, C. H., Pastan, I., Eckelman, W. C., and Carrasquillo, J. A. (1995) Biodistribution of <sup>18</sup>F- and <sup>125</sup>I-labeled anti-Tac disulfide-stabilized Fv fragments in nude mice with interleukin 2α receptor-positive tumor xenografts. *Cancer Research* 55, 5323-5329.
- (16) Arano, Y. (1998) Strategies to reduce renal radioactivity levels of antibody fragments.

- Quarterly Journal of Nuclear Medicine* 42, 262-270.
- (17) Schott, M. E., Milenic, D. E., Yokota, T., Whitlow, M., Wood, J. F., Fordyce, W. A., Cheng, R. C., and Schlom, J. (1992) Differential metabolic patterns of iodinated versus radiometal chelated anticarcinoma single-chain Fv molecules. *Cancer Research* 52, 6413-6417.
- (18) Wakisaka, K., Arano, Y., Uezono, T., Akizawa, H., Ono, M., Kawai, K., Ohomomo, Y., Nakayama, M., and Saji, H. (1997) A novel radioiodination reagent for protein radiopharmaceuticals with L-lysine as a plasma-stable metabolizable linkage to liberate m-iodohippuric acid after lysosomal proteolysis. *Journal of Medicinal Chemistry* 40, 2643-2652.
- (19) Arano, Y., Wakisaka, K., Ohmomo, Y., Uezono, T., Mukai, T., Motonari, H., Shiono, H., Sakahara, H., Konishi, J., Tanaka, C., and Yokoyama, A. (1994) Maleimidoethyl 3-(tri-n-butylstannyl)hippurate: A useful radioiodination reagent for protein radiopharmaceuticals to enhance target selective radioactivity localization. *Journal of Medicinal Chemistry* 37, 2609-2618.
- (20) Arano, Y., Fujioka, Y., Akizawa, H., Ono, M., Uehara, T., Wakisaka, K., Nakayama, M., Sakahara, H., Konishi, J., and Saji, H. (1999) Chemical design of radiolabeled antibody fragments for low renal radioactivity levels. *Cancer Research* 59, 128-134.
- (21) Fujioka, Y., Arano, Y., Ono, M., Uehara, T., Ogawa, K., Namba, S., Saga, T., Nakamoto, Y., Mukai, T., Konishi, J., and Saji, H. (2001) Renal metabolism of 3'-iodohippuryl N<sup>ε</sup>-maleoyl-L-lysine (HML)-conjugated fab fragments. *Bioconjugate Chemistry* 12, 178-185.
- (22) Akizawa, H., Arano, Y., Uezono, T., Ono, M., Fujioka, Y., Uehara, T., Yokoyama, A., Akaji, K., Kiso, Y., Koizumi, M., and Saji, H. (1998) Renal metabolism of <sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe 1-octreotide in vivo. *Bioconjugate Chemistry* 9, 662-670.
- (23) Tsai, S. W., Li, L., Williams, L. E., Anderson, A. L., Raubitschek, A. A., and Shively, J. E. (2001) Metabolism and renal clearance of <sup>111</sup>In-labeled DOTA-conjugated antibody fragments. *Bioconjugate Chemistry* 12, 264-270.
- (24) Delgado, R., Quintino, S., Teixeira, M., and Zhang, A. (1997) Metal complexes of a 12-membered tetraaza macrocycle containing pyridine and N-carboxymethyl groups. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 55-63.
- (25) Meares, C. F., Moi, M. K., Diril, H., Kukis, D. L., McCall, M. J., Deshpande, S. V.,

- DeNardo, S. J., Snook, D., and Epenetos, A. A. (1990) Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy. *British Journal of Cancer* 62, 21-26.
- (26) Moi, M. K., Meares, C. F., and DeNardo, S. J. (1988) The peptide way to macrocyclic bifunctional chelating agents: Synthesis of 2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''* tetraacetic acid and study of its yttrium(III) complex. *Journal of the American Chemical Society* 110, 6266-6267.
- (27) Lewis, M. R., Raubitschek, A., and Shively, J. E. (1994) A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjugate Chemistry* 5, 565-576.
- (28) Jang, Y. H., Blanco, M., Dasgupta, S., Keire, D. A., Shively, J. E., and Goddard Iii, W. A. (1999) Mechanism and energetics for complexation of <sup>90</sup>Y with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), a model for cancer radioimmunotherapy. *Journal of the American Chemical Society* 121, 6142-6151.
- (29) Kodama, M., Koike, T., Mahatma, A. B., and Kimura, E. (1991) Thermodynamic and kinetic studies of lanthanide complexes of 1,4,7,10,13-pentaaazacyclopentadecane-*N,N',N'',N''',N''''*-pentaacetic acid and 1,4,7,10,13,16-hexaaazacyclooctadecane-*N,N',N'',N''',N''''*-hexaacetic acid. *Inorganic Chemistry* 30, 1270-1273.
- (30) Tircsó, G., Benyó, E. T., Suh, E. H., Jurek, P., Kiefer, G. E., Sherry, A. D., and Kovács, Z. (2009) (S)-5-(p-nitrobenzyl)-PCTA, a promising bifunctional ligand with advantageous metal ion complexation kinetics. *Bioconjugate Chemistry* 20, 565-575.
- (31) Chong, H. S., Milenic, D. E., Garmestani, K., Brady, E. D., Arora, H., Pfiester, C., and Brechbiel, M. W. (2006) In vitro and in vivo evaluation of novel ligands for radioimmunotherapy. *Nuclear Medicine and Biology* 33, 459-467.
- (32) Chong, H. S., Ma, X., Le, T., Kwamena, B., Milenic, D. E., Brady, E. D., Song, H. A., and Brechbiel, M. W. (2008) Rational design and generation of a bimodal bifunctional ligand for antibody-targeted radiation cancer therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 118-125.
- (33) Szilágyi, E., Tóth, E., Kovács, Z., Platzek, J., Radüchel, B., and Brücher, E. (2000) Equilibria and formation kinetics of some cyclen derivative complexes of lanthanides.

- Inorganica Chimica Acta* 298, 226-234.
- (34) Herges, R., Dikmans, A., Jana, U., Köhler, F., Jones, P. G., Dix, I., Fricke, T., and König, B. (2002) Design of a neutral macrocyclic ionophore: Synthesis and binding properties for nitrate and bromide anions. *European Journal of Organic Chemistry*, 3004-3014.
- (35) McMurry, T. J., Brechbiel, M., Kumar, K., and Gansow, O. A. (1992) Convenient synthesis of bifunctional tetraaza macrocycles. *Bioconjugate Chem.* 3, 108-117.
- (36) Mishra, A. K., Gestin, J. F., Benoist, E., Faivre-Chauvet, A., and Chatal, J. F. (1996) Simplified synthesis of the bifunctional chelating agent 2-(4-aminobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N,N,N',N''*-tetraacetic acid. *New J. Chem.* 20, 585-588.
- (37) Renn, O., and Meares, C. F. (1992) Large-scale synthesis of the bifunctional chelating agent 2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N,N,N',N''*-tetraacetic acid, and the determination of its enantiomeric purity by chiral chromatography. *Bioconjugate Chem.* 3, 563-569.
- (38) Schlesinger, J., Koezle, I., Bergmann, R., Tamburini, S., Bolzati, C., Tisato, F., Noll, B., Klusmann, S., Vonhoff, S., Wuest, F., Pictzsch, H. J., and Steinbach, J. (2008) An <sup>86</sup>Y-labeled mirror-image oligonucleotide: Influence of Y-DOTA isomers on the biodistribution in rats. *Bioconjug Chem* 19, 928-939.
- (39) Ferreira, C. L., Yapp, D. T., Lamsa, E., Gleave, M., Bensimon, C., Jurek, P., and Kiefer, G. E. (2008) Evaluation of novel bifunctional chelates for the development of Cu-64-based radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol* 35, 875-882.
- (40) McCarthy, K. E., Woltering, E. A., and Anthony, L. B. (2000) In situ radiotherapy with <sup>111</sup>In-pentetreotide: State of the art and perspectives. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine* 44, 88-95.
- (41) Otte, A., Herrmann, R., Heppeler, A., Behe, M., Jermann, E., Powell, P., Maecke, H. R., and Muller, J. (1999) Yttrium-90 DOTATOC: First clinical results. *European Journal of Nuclear Medicine* 26, 1439-1447.
- (42) Forrer, F., Uusijärvi, H., Storch, D., Maecke, H. R., and Mueller-Brand, J. (2005) Treatment with <sup>177</sup>Lu-DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with <sup>90</sup>Y-DOTATOC. *J. Nucl. Med.* 46, 1310-1316.

- (43) Gaertner, F. C., Kessler, H., Wester, H. J., Schwaiger, M., and Beer, A. J. (2012) Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 39 Suppl 1, S126-138.
- (44) Miao, Y., and Quinn, T. P. (2008) Peptide-targeted radionuclide therapy for melanoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 67, 213-228.
- (45) Camera, L., Kinuya, S., Garmestani, K., Pai, L. H., Brechbiel, M. W., Gansow, O. A., Paik, C. H., Pastan, I., and Carrasquillo, J. A. (1993) Evaluation of a new DTPA-derivative chelator: Comparative biodistribution and imaging studies of <sup>111</sup>In-labeled B3 monoclonal antibody in athymic mice bearing human epidermoid carcinoma xenografts. *Nuclear Medicine and Biology* 20, 955-962.
- (46) Camera, L., Kinuya, S., Garmestani, K., Wu, C., Brechbiel, M. W., Pai, L. H., McMurry, T. J., Gansow, O. A., Pastan, I., Paik, C. H., and Carrasquillo, J. A. (1994) Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *Journal of Nuclear Medicine* 35, 882-889.
- (47) Wu, C., Kobayashi, H., Sun, B., Yoo, T. M., Paik, C. H., Gansow, O. A., Carrasquillo, J. A., Pastan, I., and Brechbiel, M. W. (1997) Stereochemical influence on the stability of radio-metal complexes in vivo. Synthesis and evaluation of the four stereoisomers of 2-(p- nitrobenzyl)-trans-CyDTPA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 5, 1925-1934.
- (48) Meienhofer, J., Waki, M., Heimer, E. P., Lambros, T. J., Makofske, R. C., and Chang, C. D. (1979) Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* 13, 35-42.
- (49) Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., and Cook, P. I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* 34, 595-598.
- (50) Keller, O., and Rudinger, J. (1975) Preparation and some properties of maleimido acids and maleoyl derivatives of peptides. *Helvetica Chimica Acta* 58, 531-541.
- (51) Hori, R., Tomita, Y., Katsura, T., Yasuhara, M., Inui, K. I., and Takano, M. (1993) Transport of bestatin in rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochemical Pharmacology* 45, 1763-1768.

- (52) Wallner, S. J., and Walker, J. E. (1975) Glycosidases in Cell Wall-degrading Extracts of Ripening Tomato Fruits. *Plant Physiol* 55, 94-8.
- (53) Glossmann, H., and Neville Jr, D. M. (1972)  $\gamma$ -Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters* 19, 340-344.
- (54) Kramers, M. T. C., and Robinson, G. B. (1979) Studies on the structure of the rabbit kidney brush border. *European Journal of Biochemistry* 99, 345-351.
- (55) Meares, C. F., McCall, M. J., Reardan, D. T., Goodwin, D. A., Diamanti, C. I., and McTigue, M. (1984) Conjugation of antibodies with bifunctional chelating agents: Isothiocyanate and bromoacetamide reagents, methods of analysis, and subsequent addition of metal ions. *Analytical Biochemistry* 142, 68-78.
- (56) Grassetti, D. R., and Murray Jr, J. F. (1967) Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 119, 41-49.
- (57) Brechbiel, M. W., Gansow, O. A., Atcher, R. W., Schlom, J., Esteban, J., Simpson, D. E., and Colcher, D. (1986) Synthesis of 1-(p-isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. Antibody labeling and tumor-imaging studies. *Inorganic Chemistry* 25, 2772-2781.
- (58) Cummins, C. H., Rutter Jr, E. W., and Fordyce, W. A. (1991) A convenient synthesis of bifunctional chelating agents based on diethylenetriaminepentaacetic acid and their coordination chemistry with yttrium(III). *Bioconjugate Chem.* 2, 180-186.
- (59) Clifford, T., Boswell, C. A., Biddlecombe, G. B., Lewis, J. S., and Brechbiel, M. W. (2006) Validation of a novel CHX-A'' derivative suitable for peptide conjugation: Small animal PET/CT imaging using yttrium-86-CHX-A'' - octreotide. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 4297-4304.
- (60) Wei, L., Zhang, X., Gallazzi, F., Miao, Y., Jin, X., Brechbiel, M. W., Xu, H., Clifford, T., Welch, M. J., Lewis, J. S., and Quinn, T. P. (2009) Melanoma imaging using  $^{111}\text{In}$ -,  $^{86}\text{Y}$ - and  $^{68}\text{Ga}$ -labeled CHX-A''-Re(Arg 11)CCMSH. *Nuclear Medicine and Biology* 36, 345-354.
- (61) Arano, Y., Akizawa, H., Uezono, T., Akaji, K., Ono, M., Funakoshi, S., Koizumi, M., Yokoyama, A., Kiso, Y., and Saji, H. (1997) Conventional and high-yield synthesis of DTPA-conjugated peptides: Application of a monoreactive DTPA to DTPA-D-Phe 1-octreotide synthesis. *Bioconjugate Chemistry* 8, 442-446.
- (62) Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J., and Lauffer, R. B. (1999) Gadolinium(III)

- chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews* 99, 2293-2352.
- (63) Fujioka, Y., Satake, S., Uehara, T., Mukai, T., Akizawa, H., Ogawa, K., Saji, H., Endo, K., and Arano, Y. (2005) In vitro system to estimate renal brush border enzyme-mediated cleavage of peptide linkages for designing radiolabeled antibody fragments of low renal radioactivity levels. *Bioconjugate Chemistry* 16, 1610-1616.
- (64) Uehara, T., Koike, M., Nakata, H., Hanaoka, H., Iida, Y., Hashimoto, K., Akizawa, H., Endo, K., and Arano, Y. (2007) Design, synthesis, and evaluation of [<sup>188</sup>Re]organorhenium- labeled antibody fragments with renal enzyme-cleavable linkage for low renal radioactivity levels. *Bioconjugate Chemistry* 18, 190-198.
- (65) Kerr, M. A., and Kenny, A. J. (1974) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochemical Journal* 137, 477-488.
- (66) Malfroy, B., and Schwartz, J. C. (1984) Enkephalinase from rat kidney. Purification, characterization, and study of substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* 259, 14365-14370.
- (67) Lian, W., Wu, D., Konings, W. N., Mierau, I., and Hersh, L. B. (1996) Heterologous expression and characterization of recombinant *Lactococcus lactis* neutral endopeptidase (neprilysin). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 333, 121-126.
- (68) Carvalho, K. M., Boileau, G., Camargo, A. C. M., and Juliano, L. (1996) A highly selective assay for neutral endopeptidase based on the cleavage of a fluorogenic substrate related to Leu-enkephalin. *Analytical Biochemistry* 237, 167-173.

## 【論文目録】

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Hiroyuki Suzuki, Ayaka Kanai, Tomoya Uehara, Guerra Gomez Francisco L., Hirofumi Hanaoka and Yasushi Arano. Facile synthesis and evaluation of C-functionalized benzyl-1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane-*N,N',N''*-triacetic acid as chelating agent for <sup>111</sup>In-labeled polypeptide. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20 (2), 978-984.

## 【主査および副査名簿】

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 工学博士 根矢 三郎

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 戸井田 敏彦

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 理学博士 石橋 正己

## 【謝辞】

本研究を行うにあたり、終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 荒野 泰 教授に深甚なる謝意を表します。

同時に本研究において懇切なる御指導、御教示を頂きました千葉大学大学院薬学研究院 上原 知也 准教授、花岡 宏史 助教、故 平良 優一郎 助教に深く感謝の意を表します。

学位論文審査において貴重な御指導と御助言をいただいた千葉大学大学院薬学研究院 根矢 三郎 教授、戸井田 敏彦 教授、石橋 正己 教授に御礼申し上げます。

共に実験を進め、御協力を戴きました金井 彩香 学士に深く感謝致します。また、研究を進めるにあたり、多くの有益な御助言、御協力を頂きました鈴木 千恵 学士、金城 真美 学士、金沢 直樹 学士、Guerra Gomez Francisco Lazaro 修士、そして多くの時間を割いて頂き討論に参加して頂いた分子画像薬品学研究室の学生の皆様に心から感謝致します。

本研究における化合物の合成について御指導頂きました千葉大学大学院薬学研究院 根本 哲宏 准教授に謹んで御礼申し上げます。

放射性核種を用いた実験を行うに際し、放射性核種および施設管理に対し多大な御協力を戴きました千葉大学大学院薬学研究院 熊谷 宏 特任准教授、鈴木 弘行 助教、鈴木 扶美子 先生に心より感謝致します。

最後に、長い学生生活を温かく見守ってくれた家族、友人に深く感謝します。