金属キレート試薬

荒野 泰*

Bifunctional Chelating Agent

1. はじめに

金属イオンは蛍光試薬、MRI 造影剤として DDS 分野で利用されている。金属イオンのもう 1 つの活用方法として、放射性金属イオン(金属 RI)を用いる分子イメージングやアイソトープ治療(内用放射線治療)があげられる。分子イメージングでは、 γ 線あるいはポジトロン(陽電子)、アイソトープ治療には β 線や α 線を放出する金属 RI を利用する。標的抗原の発現状態の評価、抗体などのタンパク質やペプチドの体内動態の評価に小動物用 SPECT/CT 装置や PET/CT 装置を併用することで、生きた実験動物での計測が可能となる。本稿では、タンパク質などの金属 RI 標識に利用されるキレート試薬を概説する。

2. 放射性金属イオンによる標識反応

多くの金属 RI は、タンパク質やペプチドと直接には安定な結合を形成しない。そのため、タンパク質との結合部位と金属イオンとの錯形成部位とを分子内に併せもつ「二官能性キレート試薬」(以下、BCA と略す)を利用する。図 1 にはタンパク質結合部位にイソチオシアネート基、金属 RI との錯形成部位に DTPA、DOTA、NOTA を有する BCA を示す。BCA を用いたタンパク質の金属 RI 標識では、まず、タンパク質と BCA とが結合した conjugate を作製し、必要時に金属 RI との錯形成反応を行う。金属 RI の化学的性質に合致した配位子構造の BCA を用いれば、ほぼ定量的な収率で目的とする標識体が得られ、

標識反応後の精製を行わずに生体へ投与可能である。

3. 二官能性キレート試薬の

タンパク質結合部位

BCA の結合部位には、活性エステル基、イソチオシアネート基、マレイミド基が汎用される(図 2)。活性エステル基やイソチオシアネート基をタンパク質のリジンの遊離アミノ基と結合させる場合、反応は pH8.5 程度で行う。活性エステル基は 30 分程度の反応時間で完了するが、イソチオシアネート基では 12 時間程度の反応が要求される。活性エステル基を用いる場合は、希釈した溶液をタンパク質へ少量ずつ加えることで conjugate の均一性が向上する。

マレイミド基は、pH6 付近でチオール基と反応するが、pH の上昇に伴いアミノ基とも反応する。この場合、反応に先立ち、タンパク質のチオール化が必要である。2-イミノチオランでタンパク質のアミノ基へチオール基を導入する方法が一般的であるが、分子内に多数のジスルフィド結合を有する抗体では、メルカプトエタノールなどの還元剤によ

図 1 DTPA(左)、DOTA(中央)、NOTA(右)を錯形成部位とする二官能性キレート試薬

イソチオシアネート基はタンパク質との結合に利用される。

* Yasushi Arano
千葉大学大学院薬学研究院
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

図2 活性エステル基(左)、マレイミド基(中央)、アジド基(右)を結合部位とする DO3A誘導体

り主にヒンジ部位のジスルフィド結合を還元してチオール基を遊離させることも可能である。

最近では、クリック反応も利用されている¹⁾。DOTAと金属RIとの反応速度は室温では緩徐であるため、例えばアジド基を有するDOTA誘導体と金属RIとの錯形成反応を高温で行った後、三重結合を有する化合物を導入したタンパク質と室温で反応することで標識タンパク質が得られる。

4. 二官能性キレート試薬の

錯形成部位

金属RI標識タンパク質を生体内に投与すると、血液中で希釈され、錯体の解離が進行する。金属イオンによっては生体内に金属イオンとの結合部位を有する高分子も存在する。したがって、タンパク質の体内動態を追跡するには、置換活性の低い錯体を与える配位子を選択する必要がある。

4-1. DTPA

DTPAの骨格炭素からベンゼン環を介してタンパク質との結合部位を導入したBn-DTPA誘導体が汎用されている。さらに、Bn-DTPAの骨格炭素にメチル基あるいはシクロヘキシル基を導入した化合物は、置換不活性となり、生体内で γ 線を放出するインジウム-111(¹¹¹In)と安定な錯体を与える。Bn-DTPAは

極めて柔軟な構造であるため、錯形成反応も短時間で完了する。

4-2. DOTA

DOTAのカルボン酸の1つをタンパク質結合部位に変換したDO3A、あるいは骨格炭素からベンゼン環を介してタンパク質との結合部位を導入したBn-DOTA誘導体を用いられる。DOTAは¹¹¹Inの他に β 線を放出するルテチウム-177やイットリウム-90、さらには α 線を放出するアクチニウム-225と置換不活性な錯体を形成する。その反面、これらの金属RIとDOTAとの反応は極めて緩徐である。そのため、1分子のタンパク質に導入するDOTA誘導体数の増加、クリック反応の利用、標識反応後の未反応金属RIの除去などが必要とされることもある。

4-3. NOTA

DOTAと同じ大環状ポリアミノポリカルボン酸配位子であり、 γ 線あるいは陽電子を放出するガリウム-67/68(^{67/68}Ga)イオンと置換不活性な錯体を形成する。GaイオンとNOTAとの錯形成反応は室温でも速やかに進行する。デフエロキサミン(DFO)も^{67/68}Ga標識に汎用されてきたが、生体内における安定性はNOTAが優れる。

4-4. その他

陽電子を放出する⁶⁴Cuを用いた

タンパク質やペプチド標識も望まれている。しかし、血液中のアルブミンやセルロプラスミンがCu²⁺との結合部位を有すること、細胞内では1価に還元を受けて錯体から遊離することから、現在も探索段階である。最近、大環状ポリアミノカルボン酸TETAに分子内架橋構造を施した誘導体が、これまでに比べて安定な⁶⁴Cu錯体を与えることが報告された²⁾。テクネチウム-99m(^{99m}Tc)はジェネレータより入手が可能であり、核医学診断でもっとも多く使われている。^{99m}Tcのタンパク質標識に適したBCAは数多く報告されているが、どれも市販されていない。半減期の長い陽電子放出核種の⁸⁹Zrは、抗体などの生体内半減期の長いタンパク質の体内動態の追跡に注目を集めている。現在は、DFOが使用されているが、DFOが6座配位子であるのに対して⁸⁹Zrは8配位を必要とするため、⁸⁹Zr-DFO錯体の生体内安定性は十分とはいえない。現在、8座配位子の開発が進められている³⁾。

5. おわりに

金属RIを用いた分子イメージング研究に汎用されるBCAを紹介した。金属RI標識タンパク質やペプチドは、これらが集積した細胞のリソソームで代謝を受けると、生成する放射性代謝物の性質により、リソソームでの滞留性が異なる。一般に、

金属RI標識タンパク質は放射性ヨウ素標識タンパク質に比べて集積部位で長時間放射活性が残存する傾向にある。しかし、これは放射性金属RIとBCAが生成する放射性代謝物の性質に規定され、その組み合わせで組織滞留性は大きく異なることに留意する必要がある。本稿で取り上げ

たBCAは、米国Macrocylics社、フランスCheMatech社、韓国FutureChem社が、すべてまたはその一部を製造しており、日本国内の取り扱い業者を通して入手できる。また、注文量が多ければ国内のメーカーに依頼合成をして入手する手段もある。

文献

- 1) Kumar A., *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 26, 782-789 (2015)
- 2) Pandya D.N., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 57, 7231-7243 (2014)
- 3) Adams C.J., *et al.*, *Mol. Pharmceutics*, 14, 2831-2842 (2017)