

がんの質的診断を目指した Erythropoietin-producing hepatocellular  
receptor A2 標的単光子放射型コンピュータ断層撮影用  
分子イメージングプローブの開発研究

2022 年度

古川 武典

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社より許可を得ている。

Takenori Furukawa, Hiroyuki Kimura, Hanae Torimoto, Yusuke Yagi, Hidekazu Kawashima, Kenji Arimitsu, Hiroyuki Yasui. A putative single-photon emission CT imaging tracer for erythropoietin-producing hepatocellular A2 receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. [第1章、第2章]

## 目次

### 略語表

序論.....	1
第一章 EphA2 の発現量を反映した 抗 EphA2 抗体 SPECT イメージングプローブの開発 .....	6
第一節 緒言.....	6
第二節 がん細胞における EphA2 発現の確認.....	6
第三節 抗体への DTPA 及び natIn の導入、導入した抗体の EphA2 結合性の評価.....	7
第四節 抗体の In-111 標識.....	9
第五節 細胞取り込み実験.....	10
第六節 U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた評価.....	12
第二章 EphA2 の ATP 結合部位を標的とした 低分子 SPECT イメージングプローブの開発..	16
第一節 緒言.....	16
第二節 低分子化合物を母核としたイメージングプローブの設計 .....	16
第三節 ALW-II-41-27 及び ETB の合成、キナーゼアッセイを用いた阻害活性性能評価 .....	20
第四節 ETB の放射性ヨウ素標識化及び <sup>123</sup> I]ETB を用いた血漿安定性試験.....	22
第五節 細胞取り込み実験.....	23
第六節 U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた評価.....	25
結論.....	27
実験項.....	29
第一章の方法.....	29
第二章の方法、NMR、MS スペクトル .....	33
引用文献.....	52
謝辞.....	56

## 略語

ADP : adenosine diphosphate

ATP : adenosine triphosphate

ARG : autoradiography

BSA : bovine serum albumin

BnDTPA-EphA2-230-1 : benzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-EphA2-230-1

CUR : cellular uptake ratio

CT : computed tomography

DTPA : diethylenetriamine pentaacetic acid

DIPEA : *N, N*-diisopropylethylamine

DMAP : 4-dimethylaminopyridine

DMSO : dimethyl sulfoxide

DTT : dithiothreitol

ESI-MS : electrospray ionization mass spectrometry

Eph : erythropoietin-producing hepatocellular

Ephrin : erythropoietin-producing hepatocellular ligand

EphA2 : erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

FBS : fetal bovine serum

<sup>18</sup>F-FDG : <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose

GPI : glycosylphosphatidylinositol

HATU : 2-(7-aza-1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate

HPLC : high performance liquid chromatography

HRMS : high-resolution mass spectra

HRP : horseradish peroxidase

ICP-MS : inductively coupled plasma mass spectrometry

LBD : ligand binding domain

MALDI-TOF-MS : matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry

MES : 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid

MOE : molecular operating environment

natIn : natural Indium

NMR : nuclear magnetic resonance

PE : phycoerythrin

% ID : percentage of injected dose

% ID/g : percentage of injected dose per gram of tissue

PBS : phosphate-buffered saline

PET : positron emission tomography

*p*-SCN-BnDTPA : *s*-2-(4-Isothiocyantobenzyl)-diethylenetriamine pentaacetic acid

RI : radioisotope

SD : standard deviation

SPECT : single photon emission computed tomography

THF : tetrahydrofuran

TLC : thin-layer chromatography

UV : ultra violet

## 序論

悪性新生物(がん)は日本における死亡率の第一位であり、さらにその死亡率は年々増加の一途をたどっていることから、がんの治療は日本の医療における最大の課題となっている<sup>1</sup>(Figure 1)。

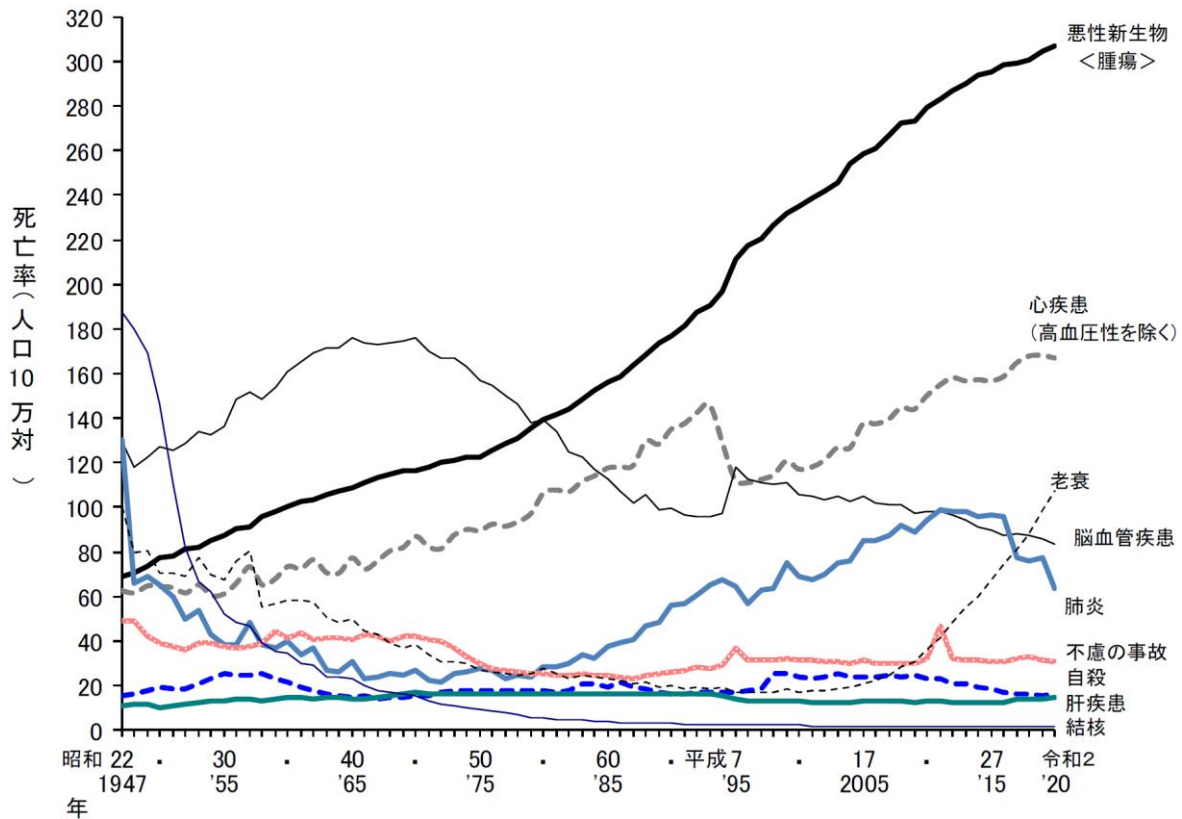


Figure 1 Annual changes in mortality rate per 100,000 population by major cause of death in Japan<sup>1</sup>

一方でがんの早期発見と早期治療により死亡率を改善できることが知られているため、がんの早期診断が可能となる新たながんの診断用医薬品の開発が求められている。新たながんの診断用医薬品の開発を行うにあたって、がん細胞を特異的に検出するためにがん細胞と正常細胞の相違点を特異的に検出できる診断用医薬品の開発が必要である。がん細胞は正常細胞とは異なり細胞の増殖が無秩序に行われることが知られている<sup>2</sup>。この異常な増殖に関係するのが、過剰な糖やアミノ酸などの細胞の増殖に必要な栄養分の取り込みの増加と細胞の増殖に関わるタンパク質及び酵素の増加である<sup>2</sup>。これらの正常細胞との相違点を特異的に検出することができれば、がんの診断に用いることが可能となる。また、検査の感度や特異性の観点から核医学検査が他の検査方法よりも優れているため、核医学検査に用いることのできる診断用医薬品の開発が進められている。実際のがん細胞における異常な糖の取り込みを可視化することが可能な薬剤として<sup>18</sup>F-FDGが臨床現場でも広く用いられている<sup>3</sup>。<sup>18</sup>F-FDGはがん細胞に多く取り込まれ、リン酸化される。しかし、リン酸化された<sup>18</sup>F-FDGを代

謝する酵素が少ないため、がん細胞にリン酸化された  $^{18}\text{F}$ -FDG が蓄積する。この現象はメタボリックトラッピングと呼ばれており、エネルギー産生の激しい腫瘍に多くの  $^{18}\text{F}$ -FDG が蓄積する<sup>4</sup>。一方で多くの正常細胞には  $^{18}\text{F}$ -FDG が集積はするが蓄積しないため、 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET を用いてがんを検出することが可能であり、臨床現場においてがんの診断に役立てられている。しかし、 $^{18}\text{F}$ -FDG には課題も存在する。がん細胞の中には糖の取り込みが少ないがん細胞も存在しており、実際に  $^{18}\text{F}$ -FDG を用いたがんの診断において 1/3 にあたる症例で  $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込みが少ないがんが確認されている<sup>4</sup>。加えて解糖系の活発な臓器である脳や  $^{18}\text{F}$ -FDG の排泄経路である腎臓や膀胱には高い集積が検出される。また、炎症部位には生理作用として糖が集積することも知られている。これらのがん非特異的な集積は腫瘍とのコントラストを低下させ、診断結果に偽陽性または偽陰性の可能性を生じさせる原因となっている<sup>4</sup>。したがって、新規のがんの診断用医薬品には、がんに特異的に集積する特徴を有することが求められる。

そこで著者は、前述したがん細胞において過剰に発現しているタンパク質や酵素に注目した。これらを標的にしたイメージングプローブであれば、がん細胞と正常細胞の間で集積量の差が生じるため、がん細胞と正常細胞とのコントラストの高い画像を得ることが可能となる。そこで標的とするタンパク質や酵素を検討するにあたって、日本において承認された分子標的薬の治療標的を参考にした。2022年1月までにがんや腫瘍に対する有効性が承認された分子標的薬 77 のうち、細胞膜表面に発現しているタンパク質を標的としている分子標的薬は 50 (65.2%) と細胞内、血液中のタンパク質や酵素を標的にした薬剤よりも多いことが明らかとなった<sup>5</sup>。加えて、細胞膜上に発現しているタンパク質は標的部位が細胞外に露出している部位から細胞内に存在する部位など、複数箇所存在するため、複数のイメージングプローブを用いて評価することが可能になる。したがって、本研究においても細胞膜に発現しているタンパク質を標的とするイメージングプローブの開発を行うことにした。

著者は細胞膜に発現しているタンパク質の中でも新たな標的分子として EphA2 に着目した。EphA2 は Eph 受容体のサブタイプの一つである。Eph 受容体は 1987 年にエリスロポエチン産生肝細胞癌細胞株からの v-fps 相同配列のスクリーニングで発見され<sup>6</sup>、その後の研究によって膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼであることが判明し、現在までに 14 のサブタイプが哺乳類において報告されている<sup>7</sup> (Figure 2)。

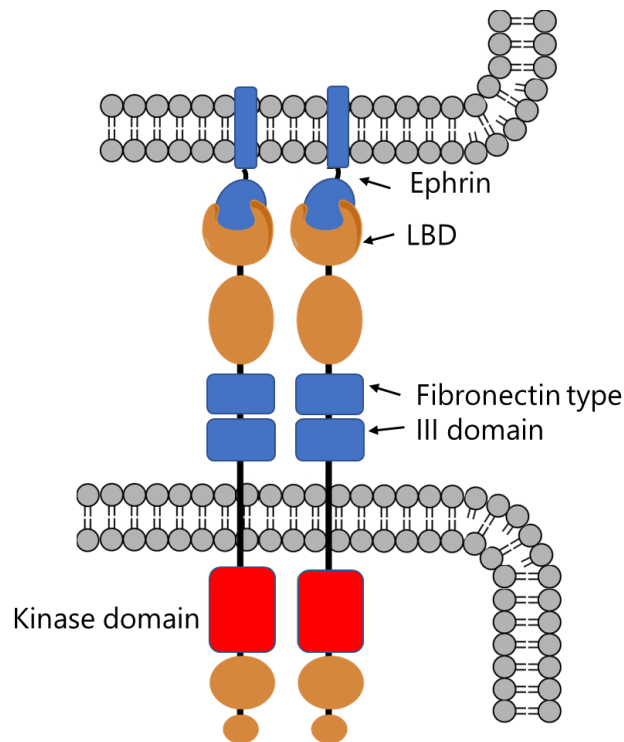


Figure 2 Schematic diagram of the Eph receptor and ephrin <sup>7</sup>

Eph 受容体は哺乳類で確認されているチロシンキナーゼのうち 25%を占めており、チロシンキナーゼの中で最も種類が多い。Eph 受容体のリガンドは Ephrin と呼ばれ A 型が 5、B 型が 3 のサブタイプに分類されている <sup>8</sup>。A 型は GPI 結合を介して膜に結合しており、B 型はリガンドそのものが膜貫通型のタンパク質である <sup>8</sup>。Eph 受容体は受容体に結合する Ephrin のタイプに合わせて A、B の二つのサブタイプに分類される。Eph 受容体とそのリガンドである Ephrin はともに細胞膜上に存在するため、この二つは細胞同士が接触することにより結合することが可能になる。また、結合した後に受容体、リガンドともにシグナルを発生させることも明らかになっている <sup>9,10</sup>。しかし、リガンドが発するシグナルによって細胞にどのような影響があるかについては報告例が少なく、詳細は明らかになっていない。一方で Eph 受容体は Ephrin と結合することで Eph 受容体がリン酸化され、細胞の増殖や遊走を制御することが報告されている <sup>11,12</sup>。Eph 受容体は神経細胞や肝臓、膵臓などで発現していることが報告されており <sup>13-15</sup>、神経細胞ではシナプスの軸索の延長において重要な役割を担っていることが報告されている <sup>13</sup>。また、肝臓では肝炎ウイルスなどの一部のウイルスが Eph 受容体を介して細胞に侵入し感染することが分かっている <sup>14</sup>。さらに膵臓では Eph 受容体がインスリンの分泌に関与していることも報告されている <sup>15</sup>。一方、がん細胞においてはリガンドである Ephrin の発現量が減少し、一部の Eph 受容体の発現量が増加していることが知られており、がん細胞の増殖や転移、浸潤などの機能を亢進させることが報告されている <sup>16,17</sup>。加えて、Eph 受容体は前立腺がん <sup>18</sup>、肺がん <sup>19</sup>、食道がん <sup>20</sup>、グリオーマ <sup>21</sup>、卵巣がん <sup>22</sup>、膵がん <sup>23</sup>、乳がん <sup>24</sup> などの多様ながんで発現量が確認されており、現在もがんとの関係性が



研究されている。筆者はその中でも、EphA2に着目した。EphA2は先述の全てのがんにおいて過剰発現していることが報告されており<sup>25-28</sup>、他にも多数の固形がん由来のがん細胞に過剰発現していることが確認されている。特に注目すべき点はEphA2が、がんの悪性度に関わっている可能性が示唆されている点である。実際に乳がん細胞の検体を用いてEphA2の発現量を確認した結果、良性の細胞と比較して悪性度の高い細胞ではより多くのEphA2の発現が確認されている<sup>29</sup>。さらにEphA2を発現していない乳がん細胞にEphA2を形質導入した結果、免疫不全マウスへのがん細胞の生着率が增加する結果も示された<sup>30</sup>。加えて臨床現場において乳がん及び肺癌の患者において、EphA2の発現が生存率に関与していることが報告されている<sup>31,32</sup>。

EphA2が多く発現しているがんは予後不良でかつ生存率も低いため、現在EphA2を標的としたイメージングプローブ及び治療薬の開発が進められている。EphA2の治療薬の開発状況について、種類や標的部位、臨床試験の有無についてまとめた結果をTable 1に示す<sup>33</sup>。EphA2の細胞外ドメインを標的とするペプチドや抗体、細胞内のキナーゼドメインに存在するATP結合部位を阻害する低分子化合物、他にもCAR-T cellやワクチンの開発も行われており、臨床試験も進められている。

Table 1 Categorize therapeutics by type, target site, and clinical trial.

Name	Type	Target site	Clinical trial
DS-8895a	Antibody	Fibronectin domain	Completed
SHM16	Antibody	LBD	
Ephrin	Peptide	LBD	
Ephrin-Fc	Peptide	LBD	
BT5528	Peptide	LBD	Ongoing
Dasatinib	Kinase inhibitor	Kinase domain	
ALW-II-41-27	Kinase inhibitor	Kinase domain	
MEDI-547	Kinase inhibitor	Kinase domain	Terminated
CAR-T cell	CAR-T cell		Ongoing
Vaccine	Vaccine		Active, not recruiting

また、イメージングプローブの開発も行われている。ペプチドを母核とした最初のEphA2の標的イメージングプローブはMudd Geら<sup>34</sup>によって報告されている。他にもCu-64及びZr-89で標識されたEphA2に対する抗体もイメージングプローブとして報告されている<sup>35,36</sup>。しかし、これらのイメージングプローブでは腫瘍と周辺組織とのコントラストが低く、腫瘍を明瞭に可視化できていない、あるいは可視化するために時間がかかるといった問題点があり、イメージングプローブとして十分な性能を満たしていないことが明らかとなっている。加えて、細胞内のキナーゼドメインに存在するATP結合部位を標的としたイメージングプローブは未だ報告されていない。そこで筆者はEphA2を標的とする新たなSPECTイメージ

ングプローブを開発することを目的として研究を行うこととし、加えて、イメージングプローブの評価結果を基に EphA2 ががんの質的診断に応用可能であるかを評価した。

筆者がイメージングプローブの標識に SPECT 核種を選択したのは、SPECT 核種の方が今後の診断等への応用が比較的容易であると考えたためである。PET 核種の多くはサイクロトロンを用いて製造されている。病院などの院内サイクロトロンを稼働して PET 核種を製造するには PET 測定装置だけを稼働させる施設よりも厳しい基準をクリアする必要があるため、導入できる施設に限られる。しかし PET 核種は半減期の短いものが多く、製造及び供給体制が整っている  $^{18}\text{F}$ -FDG の他、Ga-68 などのジェネレータで入手できるもの以外は全て施設で放射性同位元素の製造から行わなければならないため、院内サイクロトロンを有していない施設では実施できる PET 検査の種類が大きく制限される。一方で SPECT 核種は PET 核種よりも比較的半減期が長いため、輸送により SPECT 核種を入手することが可能である。その結果、SPECT 撮像装置の方が PET 撮像装置よりも設置台数、設置施設ともに多く、臨床現場における利便性が高いことから臨床応用へのハードルが PET よりも低いことが予想される。

第 1 章では抗 EphA2 抗体を用いたイメージングプローブを開発し、評価した。EphA2 に対して特異的に結合する抗体である EphA2-230-1 を In-111 により標識した。標識後、EphA2 の発現量の異なる二種類のがん細胞 (U87MG、HT1080) を用いて細胞への取り込みを評価した。その後、U87MG 細胞移植モデルマウスを用いて体内分布実験及び SPECT/CT 撮像を行い、イメージングプローブとしての有用性を評価した結果を報告する。

第 2 章では低分子化合物のイメージングプローブを設計、合成し、その有用性を評価した。低分子化合物の設計には計算化学を用いて行い、設計した化合物と EphA2 とのドッキングシミュレーションを行った。実際に合成した低分子化合物は EphA2 キナーゼアッセイを行い、EphA2 キナーゼの阻害活性を評価した。次に、低分子化合物を I-123 により標識し、U87MG 細胞を用いて細胞取り込み実験及び U87MG 細胞移植モデルマウスを用いて体内分布実験及び SPECT/CT 撮像を行い、イメージングプローブとしての有用性を評価した結果を報告する。

## 第一章

### EphA2 の発現量を反映した

#### 抗 EphA2 抗体 SPECT イメージングプローブの開発

##### 第一節 緒言

EphA2 は多くの固形がんで発現していることが知られており、がん細胞における EphA2 の発現量ががんの悪性度に比例していることが報告されている。加えて EphA2 の発現が多いほどがん患者の予後が不良であることから EphA2 の標的とするイメージングプローブが EphA2 の検出だけでなく、EphA2 の発現量の比較が可能であればがんの診断だけでなくがんの性状の評価を行うことが可能になると考えられる。よって第一章では、抗 EphA2 抗体を母核としたイメージングプローブを開発し、このイメージングプローブががん細胞における EphA2 の発現量を反映したイメージングプローブとして利用可能であるかを評価することとした。

##### 第二節 がん細胞における EphA2 発現の確認

先ずがん細胞における EphA2 の発現の確認し、実験に用いるがん細胞を選択した。本研究室で保有しているがん細胞の内、悪性度が高いと思われるがん細胞を用いて EphA2 の発現をウエスタンブロットにて確認した結果、神経膠腫由来の U87MG 細胞、肉腫由来の HT1080 細胞、乳がん由来の MDA-MB-231 細胞全てにおいて、EphA2 の発現が確認できた (Figure 3)。加えてこれらのがん細胞を免疫不全モデルマウスに投与して作製した腫瘍塊においても EphA2 の発現を確認できた。また、ウエスタンブロッティングの結果から、EphA2/ $\beta$  アクチン比は各がん細胞において差があることが明らかとなったが、がん細胞の由来が異なり、比較が困難であるため、EphA2 の発現量とがん細胞の悪性度との関連性は不明である。そこで、これらのがん細胞の内、EphA2 の研究に多く用いられている U87MG 細胞を用いて今後の評価を行った<sup>35,37,38</sup>。

細胞	U87MG (グリオーマ)	HT1080 (肉腫)	MDA-MB-231 (乳がん)
EphA2 (130 kDa)			
βアクチン (42 kDa)			
EphA2/βアクチン比	1.15	1.30	0.94

---

腫瘍塊	U87MG	HT1080	MDA-MB-231
EphA2 (130 kDa)			
βアクチン (42 kDa)			
EphA2/βアクチン比	0.89	1.02	0.82

Figure 3 Expression of EphA2 receptor. EphA2 receptor expression in U87MG, HT1080 and MDA-MB-231 cells and tumor xenograft tissues.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

イメージングプローブの母核となる抗 EphA2 抗体は、共同研究者である東洋大学の加藤和則教授が保有している抗体ライブラリーの内、EphA2 に対して特異的に結合することが報告されている EphA2-230-1 を用いることとした<sup>39</sup>。また抗体を母核としたイメージングプローブを設計するために用いる放射性同位元素を検討した。これまでの報告では PET 核種として Cu-64 や Zr-89、SPECT 核種として Ga-67 や In-111、I-125 といった核種を用いた研究が進められている。本研究ではこれらの内、SPECT 核種である In-111 を利用することとした。抗体を In-111 で標識するためには、抗体に配位子である DTPA を導入する必要がある。この配位子を交換することにより、In-111 だけでなく既にソマトスタチン受容体陽性の神経内分泌腫瘍の治療に用いられている Lu-177<sup>40</sup> の導入も可能であるため、今回の研究結果がイメージングだけではなく、治療の研究への応用も期待できる。しかしながら、抗体に配位子を導入することは、抗体の標的への結合性に影響があることが報告されている<sup>35</sup>。したがって、抗 EphA2 抗体に DTPA 及び natIn を導入し、DTPA の導入数や natIn の導入率を確認すると同時に EphA2 への結合性を評価することとした。

### 第三節 抗体への DTPA 及び natIn の導入、導入した抗体の EphA2 結合性の評価

抗体への DTPA の導入は 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.5) で行い、反応終了後にゲルろ過カラムである PD-10 を用いて未反応の DTPA と反応後の抗体を分離、精製した。反応前と反応後の抗体の分子量を MALDI-TOF-MS を用いて測定し、その結果から抗体に DTPA が導入されているかを確認した (Figure 4)。その結果、反応前の抗体の分子量が 147351.4、反応後の抗体の分子量が 154670.7 となり、DTPA が抗体に導入できている結果が得られた。また分子量の差から抗体一分子あたりに DTPA が平均で何分子導入されているかを計算した結果、抗体一分子につき、DTPA が 13.4 分子導入されていることが明らかとなった。

次に BnDTPA-EphA2-230-1 に natIn を導入した。natIn は 0.1 M MES (pH 5.5) 条件下で反応させ、反応後は Amicon Ultra 0.5 mL, Ultracel-100K を用いて精製した。EphA2-230-1、

BnDTPA-EphA2-230-1 及び natIn と反応させた BnDTPA-EphA2-230-1 を ICP-MS を用いて抗体に含まれる natIn の濃度を測定した。その測定結果を Table 2 に示す。EphA2-230-1 及び BnDTPA-EphA2-230-1 では natIn が存在していないことが示された一方で natIn を反応させた BnDTPA-EphA2-230-1 では natIn 濃度が 1.5 ng/mL となり、BnDTPA-EphA2-230-1 への natIn の導入が確認できた。また先ほどの MALDI-TOF-MS の結果から、抗体に導入された DTPA すべてに natIn が導入されたと仮定した場合の natIn の理論濃度が 1.56 ng/mL と算出された。測定結果から導入率を算出すると 96.2% となり、ほぼ全ての DTPA に natIn が導入できていることが明らかとなった。

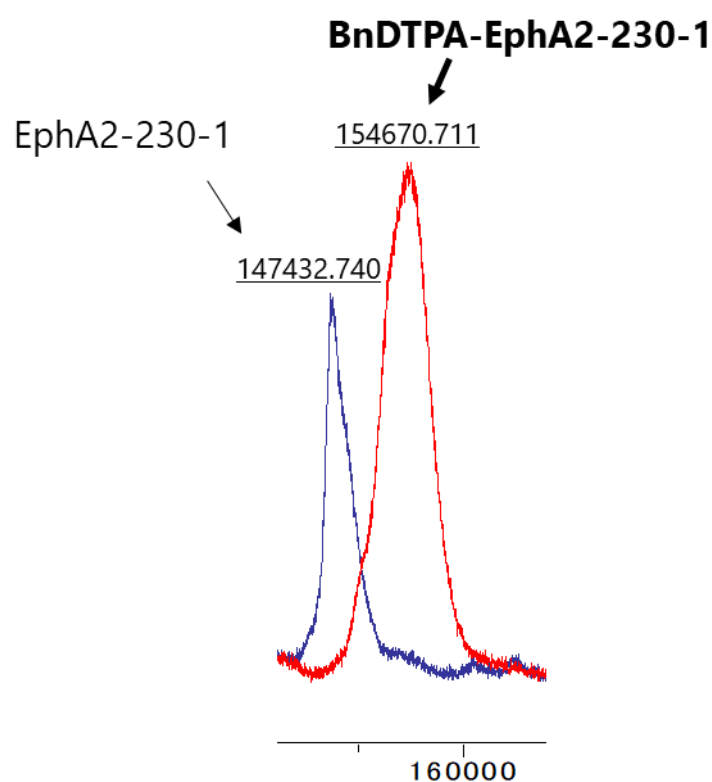


Figure 4 Molecular weights of EphA2-230-1 and BnDTPA-EphA2-230-1 were determined by MALDI-TOF-MS.

Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure S1

Table 2 Concentration of natIn in EphA2-230-1, BnDTPA-EphA2-230-1 and natIn-BnDTPA-EphA2-230-1

Sample	Concentration of natIn (ng/mL)
EphA2-230-1	N.D.
BnDTPA-EphA2-230-1	N.D.
natIn-BnDTPA-EphA2-230-1	1.5

続いて EphA2-230-1、BnDTPA-EphA2-230-1 及び natIn-BnDTPA-EphA2-230-1 を用いて EphA2 への結合性を評価した。EphA2 が発現している U87MG 細胞に各抗体を反応させ、そこに二次抗体として PE を結合させた goat anti-mouse IgG を反応させた。反応後の U87MG 細胞を含む溶液を、FACS Caliber を用いて蛍光強度を測定し、その平均強度と各サンプルの濃度をプロットした結果を Figure 5 に示す。この結果を GraphPad Prism 6 を用いて解析し、解離定数を算出すると EphA2-230-1=128.9 nM, BnDTPA-EphA2-230-1=401.8 nM, natIn-BnDTPA-EphA2-230-1=529.5 nM となり、EphA2-230-1 の EphA2 に対する結合性と比較して BnDTPA-EphA2-230-1 及び natIn-BnDTPA-EphA2-230-1 の EphA2 に対する結合性は若干減少しているが結合性を十分有していることが明らかとなった。したがって、BnDTPA-EphA2-230-1 を用いて更なる検討を進めることとした。

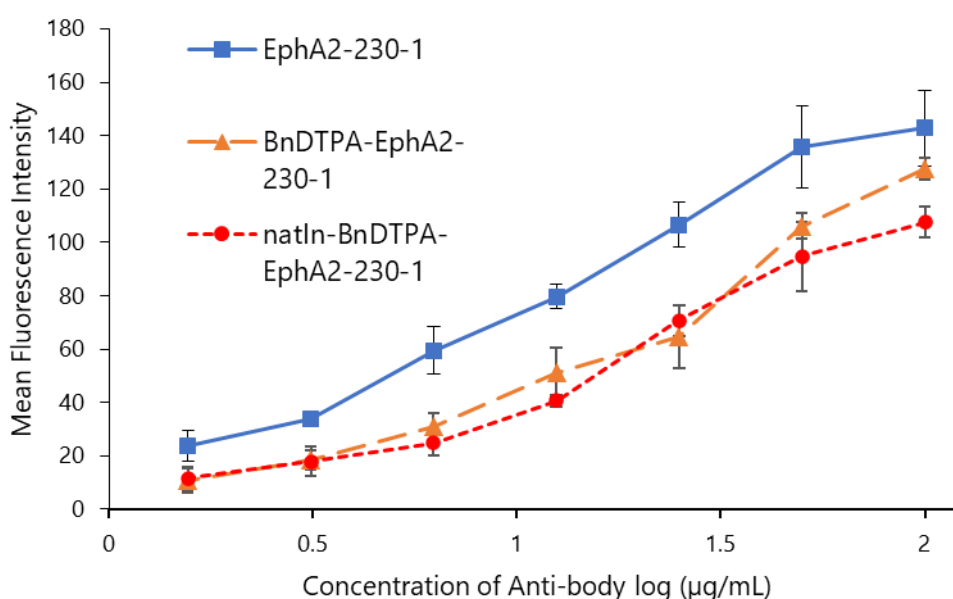


Figure 5 EphA2-230-1, BnDTPA-EphA2-230-1, and natIn-BnDTPA-EphA2-230-1 were found to bind at similar levels to EphA2 in U87MG cells.

Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure 1

#### 第四節 抗体の In-111 標識

natIn-BnDTPA-EphA2-230-1 が EphA2 に対する結合性を維持していることが明らかとなったため、BnDTPA-EphA2-230-1 の In-111 標識を行った (Figure 6)。EphA2-230-1 への DTPA の導入は先述した通りに行い、その後 [111In]InCl<sub>3</sub> を反応させた。反応後、Amicon Ultra 0.5 mL, Ultracel-100K を用いて精製後、キュリーメータを用いて放射能を測定し、放射化学的収率を算出した。また、生成物を silica-TLC に滴下し、展開溶媒に EDTA 飽和 MES buffer を用いて展開後、ARG の結果より放射化学的純度を算出した (Figure 7)。その結果、放射化学的収率は 85.1% (n=2)、放射化学的純度は 98.5% となった。

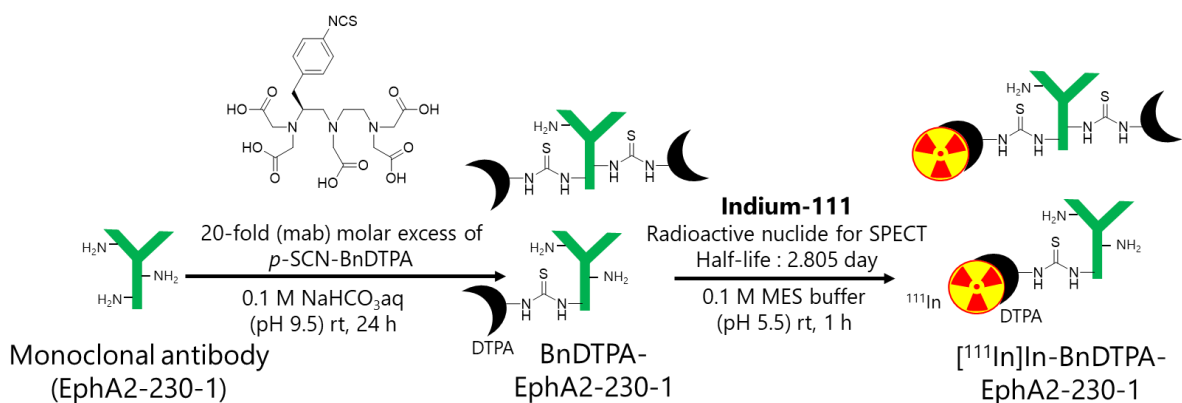


Figure 6 Scheme of the labeling of [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1.

Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure 2

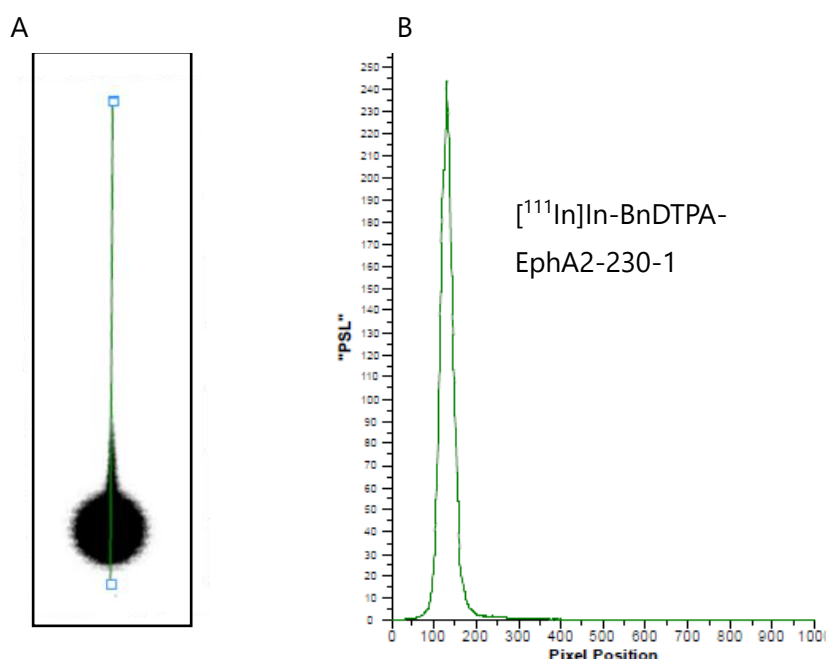


Figure 7 Analysis of [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1. Imaging data of TLC of [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (A) and TLC analysis of [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (B).

Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure S2

#### 第五節 細胞取り込み実験

細胞取り込み実験は U87MG 細胞を用いて行った。<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 を 1 well 当たり 3.7 kBq 添加した。評価群としてがん細胞全体の取り込みを評価する uptake 群、がん細胞への内在化を評価する internalization 群、<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の EphA2 非特異的な経路による取り込みを評価する blocking 群を設定し、uptake、internalization 群は<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 添加後より、1、2、4、24 時間後、blocking 群は 1、2、4 時間後の取り込み量を評価した。blocking 群においては、予備実験を行った際に 24 時間処置することで細胞が一部剥離することが判明しているため、今回の実験では評価を行わなかった。結果を Figure 8 に示す。評価値として、細胞溶解液内の放射エネルギーを回収した溶液に含まれる総放射

エネルギーで除した値に 1 well ごとのタンパク質量で除した値である CUR%/mg protein で表している。この結果から uptake、internalization 群において、U87MG 細胞における [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の取り込みは時間依存的に増加し、加えて内在化率は 24 時間時点で 54.8%であった。一方で blocking 群において、[<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の U87MG 細胞への取り込みの減少が確認された (反応 4 時間後で 90.9%の減少)。細胞への取り込みの結果から、U87MG 細胞における [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の取り込みは EphA2 特異的に行われていることが明らかとなった。

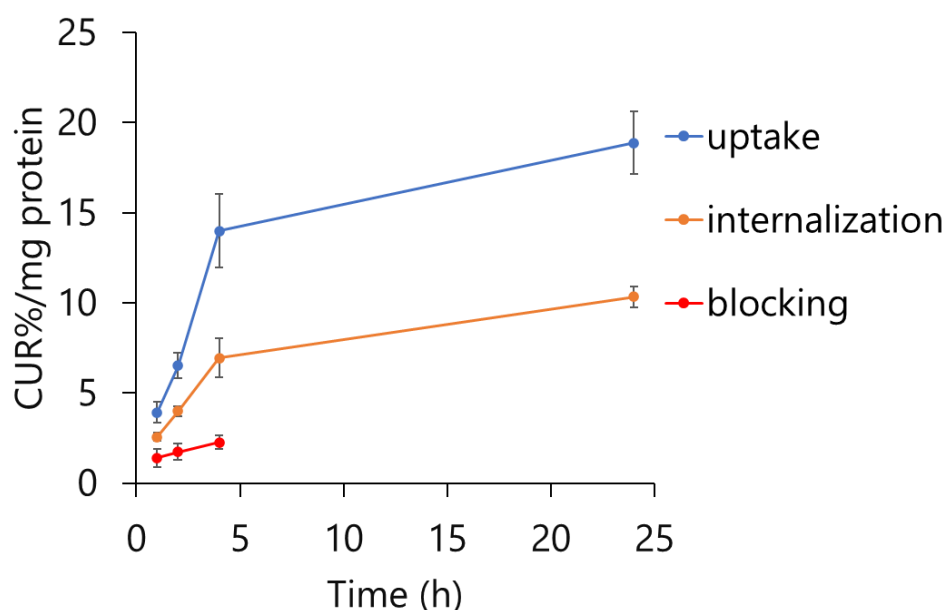


Figure 8 Results of cell-binding assay. [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (3.7 kBq/0.4 μg) was incubated with U87MG cells at 37 °C for various time periods. In the internalization group, the U87MG cells were washed with acid buffer (0.2 M CH<sub>3</sub>COOH, 0.5 M NaCl). In the blocking group, [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 and non-labeled EphA2-230-1 (6.25 μg) were incubated with U87MG cells.

Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure 3

また、U87MG 細胞よりも EphA2 の発現量の多い HT1080 細胞 (Figure 4) に [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 を添加して細胞取り込み実験を行い、U87MG 細胞における [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の集積量の結果と比較した (Figure 9)。その結果、U87MG 細胞よりも HT1080 細胞において、細胞への [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の取り込み量が多かったことから、[<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 は EphA2 の発現量を反映してがん細胞に取り込まれている可能性が示唆された。



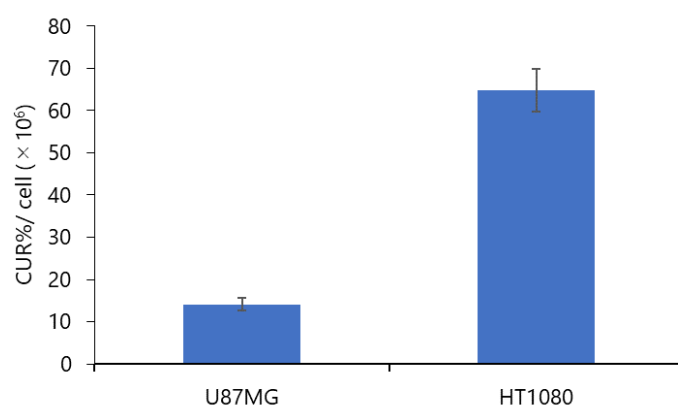


Figure 9 Comparison of results of cell-binding assay in U87MG and HT1080 cells.

#### 第六節 U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた評価

U87MG 細胞移植モデルマウスを用いて体内分布実験を行った。 $[^{111}\text{In}]\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}$  (37 kBq/1.2  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{L}$  生理食塩水) を尾静脈から投与し、投与 24, 48, 72 時間後に解剖した。解剖後にそれぞれの臓器、組織の重量を測定し、その後、ガンマカウンターを用いて放射エネルギーを測定した。測定結果は投与した放射エネルギーにおける臓器ごとの放射エネルギーの割合を臓器重量で割った値である % ID/g で表しており、その結果を Figure 10 に示す。腫瘍への集積が確認でき、投与 72 時間後では  $14.6 \pm 3.2\%$  ID/g に達した。他の臓器では肝臓 (投与 72 時間後で  $9.0 \pm 1.3\%$  ID/g)、脾臓 (投与 72 時間後で  $3.5 \pm 0.5\%$  ID/g)、肺 (投与 72 時間後で  $4.3 \pm 0.4\%$  ID/g) などにも集積が見られている。これは抗体を母核としたほかのイメージングプローブにもみられる特徴である<sup>29,30</sup>。また、SPECT 撮像において、明瞭な画像を得るための指標として腫瘍対血液比、腫瘍対筋肉比が用いられている。特に抗体は血液中への滞留が多く、腫瘍対血液比が低い場合はがんと周辺組織のコントラストが低くなり、明瞭な画像が得られないことが示唆されている。そこで本実験における腫瘍対血液比を算出した結果を Table 3 に示す。その結果、投与 72 時間後では腫瘍対血液比が 1.7 と良好な値を示した。この値と既報の  $^{111}\text{In-CHX-A}''\text{-DTPA-DS-8895a}$  の腫瘍対血液比の結果と比較すると、 $[^{111}\text{In}]\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}$  の方が投与早期により明瞭な SPECT 画像を得られる可能性が示唆された<sup>30</sup>。加えて腫瘍対筋肉比も投与 72 時間後で 19.2 とこちらも良好な値が得られた。

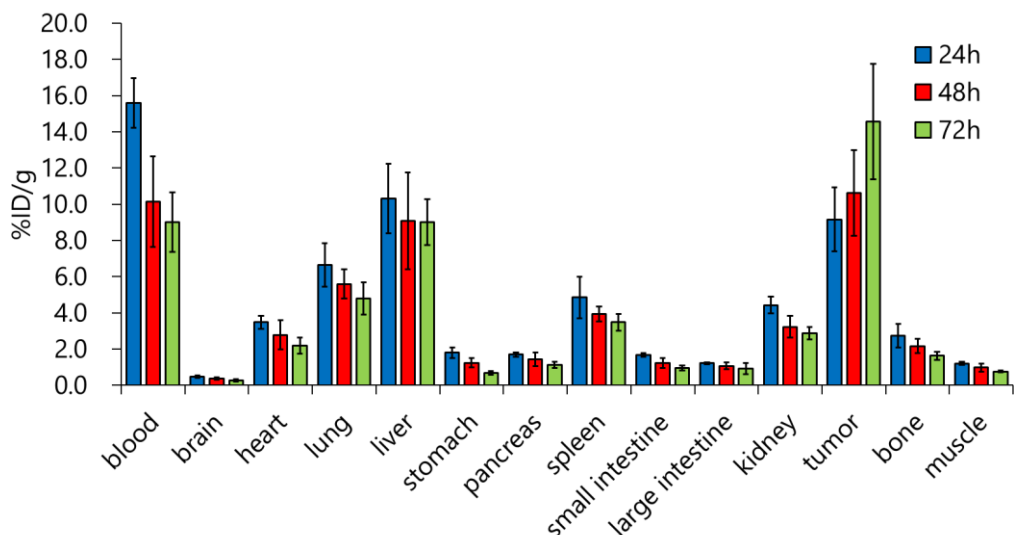


Figure 10 Biodistribution results in U87MG tumor-bearing mice. Biodistribution of [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 in U87MG tumor-bearing mice 24, 48, and 72 h after injection in normal tissues and tumor. Data are represented as the mean ± SD; n=4.

Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure 4

Table 3 Tumor-to-blood and tumor-to-muscle ratios in biodistribution.

Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Table 1

Ratio	Time after injection (h)		
	24	48	72
Tumor-to-blood	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.6
Tumor-to-muscle	7.6 ± 1.3	11.0 ± 1.1	19.2 ± 4.6

加えて、前述した組織、臓器への[<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の集積が EphA2 特異的な集積であるかを評価するために阻害剤を用いて体内分布実験を行った。コントロール群は[<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 のみを投与し、blocking 群は[<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 投与 24 時間前に阻害剤として EphA2-230-1 を一匹当たり 10 mg/kg 投与した。両群とも投与 72 時間後に解剖した。それ以降の操作は体内分布実験と同様に行った。結果を Figure 11 に示す。尾静脈投与 72 時間後の腫瘍における[<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の集積はコントロール群と比べて blocking 群で減少している結果が示された (control: 14.6 ± 3.2% ID/g, blocking: 6.3 ± 2.5% ID/g)。腫瘍対血液比、腫瘍対筋肉比も同様に減少していることから腫瘍における[<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の集積は EphA2 の発現を反映していることが明らかとなった。(腫瘍対血液比、コントロール : 1.7 ± 0.6、blocking: 0.6 ± 0.1、腫瘍対筋肉比、コントロール : 19.2 ± 4.6、blocking: 6.8 ± 1.2, Figure 12)。一方で他の臓器において、コントロール群と blocking 群との間に差は見られなかった。

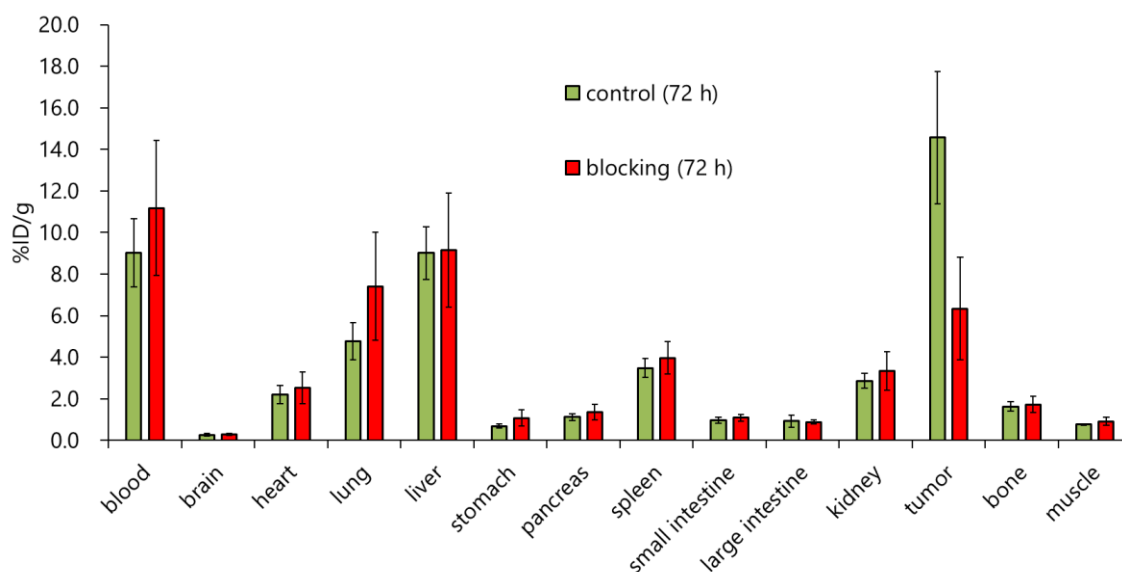


Figure 11 Biodistribution result in U87MG tumor-bearing mice. Biodistribution results of [ $^{111}\text{In}$ ]In-BnDTPA-EphA2-230-1 in U87MG tumor-bearing mice under control and blocking conditions using non-labeled EphA2-230-1 72 h after injection. [ $^{111}\text{In}$ ]In-BnDTPA-EphA2-230-1 uptake in normal tissues and tumors. Data are represented as the mean  $\pm$  SD; n = 4. Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure S3

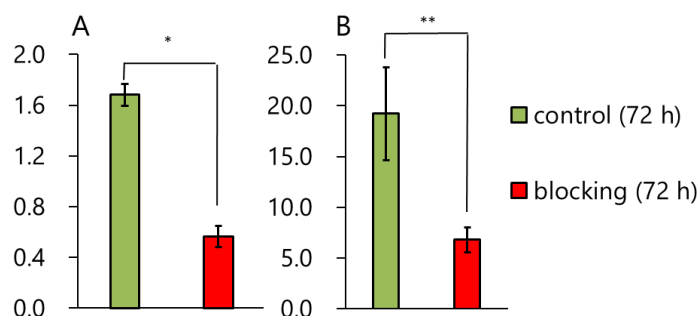


Figure 12 Tumor-to-blood ratio (A) and tumor-to-muscle ratio (B) in control and blocking groups. Data are represented as the mean  $\pm$  SD; n = 4. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  by Student's t-test. Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure 5

最後に U87MG 細胞移植モデルマウスに [ $^{111}\text{In}$ ]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (7.2 MBq/114  $\mu\text{g}$ /120  $\mu\text{L}$  生理食塩水) を尾静脈から投与し、投与 72 時間後に SPECT/CT 撮像を行った (Figure 13A, B)。結果は SPECT と CT の結果を重ね合わせて表示している。右大腿部の腫瘍に [ $^{111}\text{In}$ ]In-BnDTPA-EphA2-230-1 が集積しており、腫瘍の明瞭な可視化に成功した。また、比較として既報の [ $^{111}\text{In}$ ]In-CHX-A'-DTPA-DS-8895a の結果を Figure 13C に示す。この SPECT 撮像の結果からも腫瘍と周辺組織とのコントラストは [ $^{111}\text{In}$ ]In-BnDTPA-EphA2-230-1 の方が優れていることが明らかとなった。

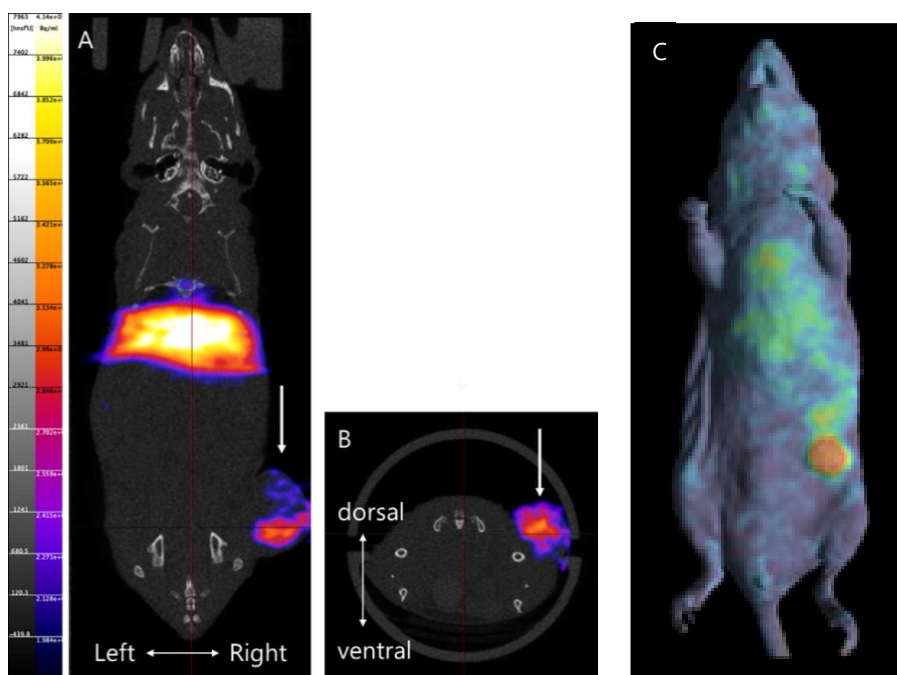


Figure 13 SPECT imaging of tumor-bearing mouse. Representative [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 SPECT/CT imaging in U87MG tumor-bearing mouse 72 h after injection. Dorsal view (A) and caudal view (B) and <sup>111</sup>In-CHX-A''-DTPA-DS-8895a SPECT/MR imaging in MDA-MB-231 tumor-bearing mouse 7 d after injection (C). The tumor is indicated by the arrows. Furukawa T., et al., *ACS Omega*. **2023**, 8, 7030–7035. Figure 6

Figure 13C is taken from the following paper. Permission to reprint the article has been obtained from the publisher. Burvenich, I. J. G. et al, Molecular imaging and quantitation of EphA2 expression in xenograft models with <sup>89</sup>Zr-DS-8895a. *J. Nucl. Med.* **2016**, 57, 974–980.

## 第二章

### EphA2 の ATP 結合部位を標的とした

#### 低分子 SPECT イメージングプローブの開発

##### 第一節 緒言

第一章では抗 EphA2 抗体を母核としたイメージングプローブが、がん細胞における EphA2 の発現量を検出できる結果が得られた。しかし、EphA2 抗体が検出しているのは EphA2 の発現量であり、受容体の機能に関しては評価することは困難である。一方で EphA2 のキナーゼドメインを標的とするイメージングプローブであれば EphA2 の機能面での評価が可能になると考え、EphA2 のキナーゼドメインに存在する ATP 結合部位を標的とするイメージングプローブの開発を検討した。EphA2 のキナーゼドメインに存在する ATP 結合部位を標的とするにあたって、イメージングプローブが細胞膜を透過する必要がある。そこで筆者は、細胞膜の透過性を考慮して低分子化合物を母核としたイメージングプローブの開発を検討することとした。

##### 第二節 低分子化合物を母核としたイメージングプローブの設計

低分子化合物を母核としたイメージングプローブを開発するにあたって、リード化合物をすでに EphA2 キナーゼに対して阻害活性を有することが報告されている低分子化合物の中から選択することとした。その化合物の名前及び構造を Figure 14 に示す<sup>41-43</sup>。筆者はこの中でも EphA2 キナーゼに対して高い阻害活性 (IC<sub>50</sub> 値 : 11 nM)<sup>41</sup> を示し、がん細胞の増殖の抑制及び抗腫瘍効果が報告されている ALW-II-41-27 をリード化合物として選択した<sup>44,45</sup>。加えて、低分子化合物への放射性ヨウ素の導入を検討した。放射性ヨウ素の導入を決定した理由としては、放射性金属核種を導入するには配位子を低分子化合物に導入する必要がある。その場合、標的分子との相互作用への影響が大きく、低分子化合物の設計に大きな制限を生じることが予想される。加えて、細胞膜を透過するにあたって、低分子化合物の脂溶性をある程度維持しなければならないため、水溶性の高い配位子を導入することで化合物全体の水溶性が向上することは今回の場合望ましくない。一方で放射性ヨウ素は嵩高い原子であるため、こちらも標的分子との立体障害を考慮しなければならないが、標的分子との相互作用への影響を検証することは容易である。加えてヨウ素を導入した低分子化合物は脂溶性が増加する傾向にある。脂溶性の高い低分子化合物は細胞膜の透過性も良好であるため、ヨウ素の導入は本研究の低分子化合物のイメージングプローブの設計の目的に合致している。また、ヨウ素も RI として I-123 が診断用、I-131 が治療用の核種として臨床現場で使用されているため、第一章と同様に開発したイメージングプローブが診断と治療の両方に応用が可能である。したがって、放射性ヨウ素を導入した新規化合物の設計を検討した。本研究において、放射性

ヨウ素を導入した新規化合物を設計するにあたって、最初に EphA2 と ALW-II-41-27 のドッキングシミュレーションを行い、EphA2 との相互作用を推定し、その結果を基に新規化合物の設計を行った。

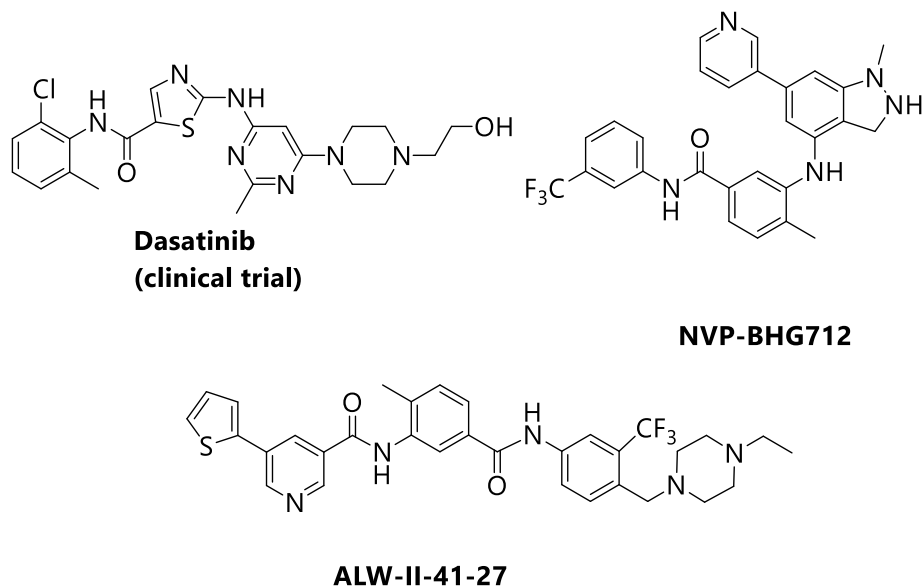


Figure 14 Chemical structures of previously reported EphA2 receptor inhibitors.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure 1

ドッキングシミュレーションには MOE<sup>46</sup>を用い、EphA2 の結晶構造は Protein Data Bank から ID 番号 : 5NKI<sup>47</sup> のデータを MOE に読み込み、タンパク質において不足している部分を補う structure preparation、水分子を追加する protonate 3D、リガンドとの結合に不要なタンパク質の配列及び水分子を固定する tether 操作を行った後にドッキングシミュレーションを行った。ドッキングシミュレーションは 5NKI において EphA2 と結合しているリガンドである *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-((3-(methylsulfonyl)-5-morpholinophenyl)amino)thiazole-5-carboxamide (Figure 15) の位置に ALW-II-41-27 を当てはめて行い、結果を目視で確認した。ドッキングシミュレーションにより導き出された結果を 3D 及び 2D で表した結果を Figure 16 に示す。2D の結果から、EphA2 の 695 番目のメチオニンと ALW-II-41-27 のピリジン構造の窒素原子が水素結合を形成している結果が得られた。一方で ALW-II-41-27 のチオフェン基が EphA2 との間に相互作用を形成していない結果が得られた。

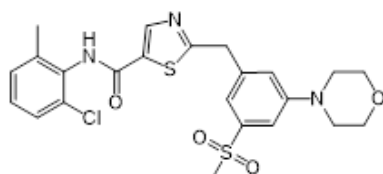


Figure 15 Chemical structure of *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-((3-(methylsulfonyl)-5-morpholinophenyl)amino)thiazole-5-carboxamide.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure S1

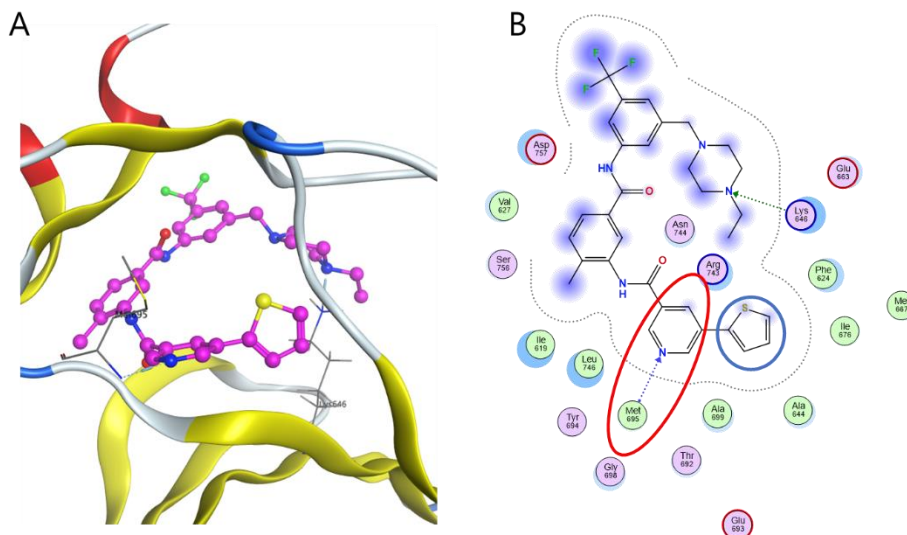


Figure 16 3D (A) and (B) 2D results of docking simulations of EphA2 and ALW-II-41-27.

そこで筆者は、ALW-II-41-27 のチオフェン基とヨウ素を交換した新規化合物の設計を検討した。前述した通り、ヨウ素は嵩高い原子であるため、標的分子である EphA2 との間に立体障害を生じないかを確認する必要がある。そこでチオフェン基とヨウ素の分子表面を比較した (Figure 17)。

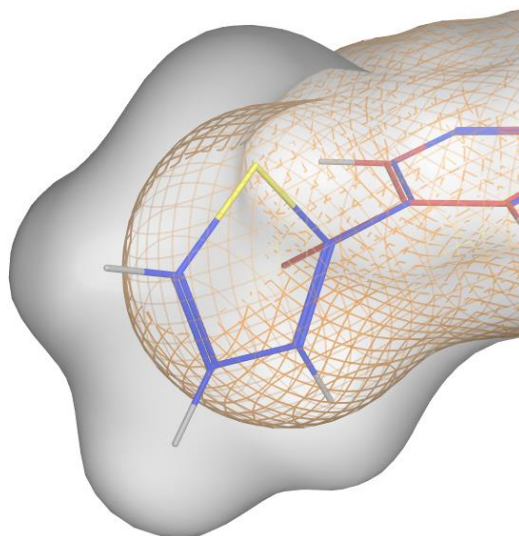


Figure 17 Comparison between molecular surface of ALW-II-41-27 (grey) and ETB (yellow).

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure S2

その結果、ヨウ素の方がチオフェンよりも分子表面が少ない結果が得られたことからヨウ素を導入することにより立体障害が生じる可能性は低いと考え、ALW-II-41-27 のチオフェン基をヨウ素に変換した *N*-(5-((4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-iodonicotinamide (ETB) を設計した。加えて、ETB のエチルピペラジン構

造をモルホリン構造に変換することで化合物の水溶性の改善を目的とした EFT-1、及び EFT-1 とヨウ素の位置を変えることで EphA2 との相互作用の変化の確認を目的とした EFT-2 の三つの新規化合物を設計した。新規化合物の構造を Figure 18 に示す。

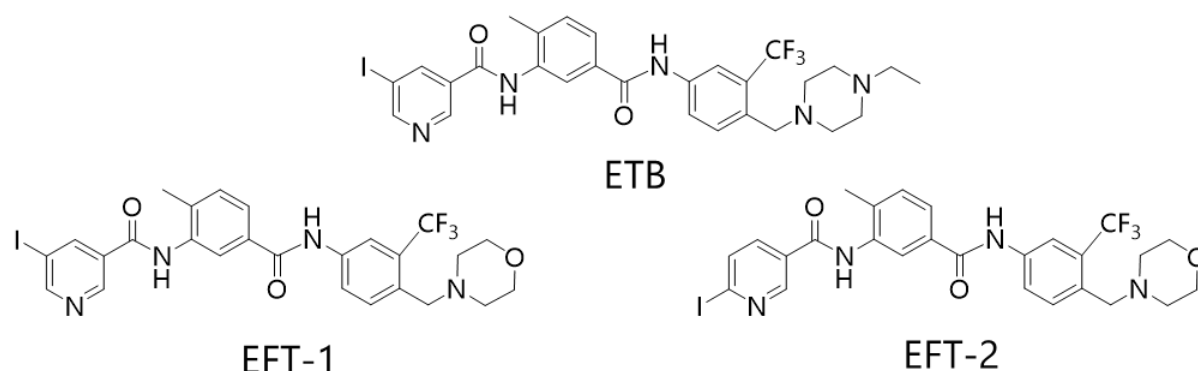


Figure 18 Chemical structures of ETB, EFT-1, EFT-2.

これらの新規化合物と ALW-II-41-27 について再度ドッキングシミュレーションを行い EphA2 との親和性を評価した。その結果を Table 4 に示す。S 値は  $\Delta G$  と同じ値であり、値が小さければ、EphA2 との親和性が高いことを表している。この結果から、新規化合物の内、ETB が最も EphA2 との親和性が高いことが明らかとなった。また、EphA2 と ALW-II-41-27 及び ETB の結合様式を比較した結果を Figure 19 に示す。この結果から ALW-II-41-27 と ETB が EphA2 に対して同様の結合様式を示すことが明らかとなった。

Table 4 Names and structures of compounds subjected to docking simulation with EphA2, and results of stability evaluation of each compound with EphA2.

化合物の名称及び構造	S値 ( $\Delta G$ )
ALW-II-41-27 	-8.41
ETB 	-7.75
EFT-1 	-7.43
EFT-2 	-6.57



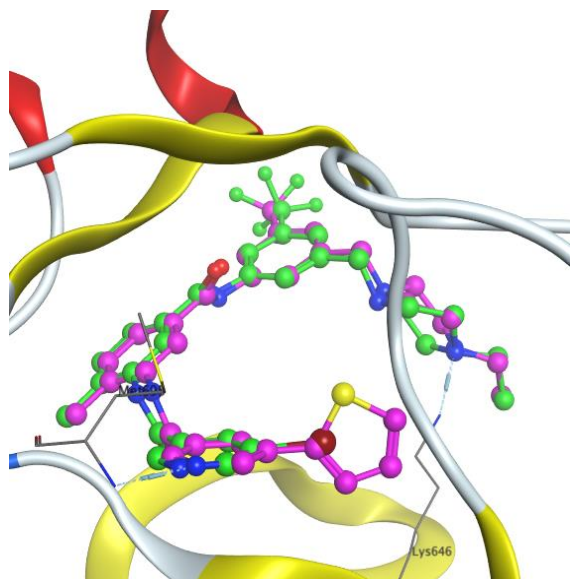


Figure 19 Comparison of binding modes of EphA2 with ALW-II-41-27 (purple) and ETB (green).

### 第三節 ALW-II-41-27 及び ETB の合成、キナーゼアッセイを用いた阻害活性評価

キナーゼアッセイに用いるために ALW-II-41-27 及び ETB を合成した。合成スキームを Figure 20 に示す。ALW-II-41-27 及び ETB は参考文献<sup>48-50</sup>にて報告されている方法で合成した。水素化ジイソブチルアルミニウムによる 4-amino-2-(trifluoromethyl)benzotrile の還元、続いて 1-ethylpiperazine による還元的アミノ化により、化合物 2 を得た。化合物 2 と 4-methyl-3-nitrobenzoic acid を反応させて化合物 3 を得た。化合物 3 のニトロ基を還元して化合物 4 を得た。その後、化合物 4 と 5-thiophen-2-yl nicotinic acid あるいは 5-iodo nicotinic acid による反応により、ALW-II-41-27 と ETB をそれぞれ合成した。全ての化合物は <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 測定及び HRMS 測定を行い、目的の化合物であることを確認した。

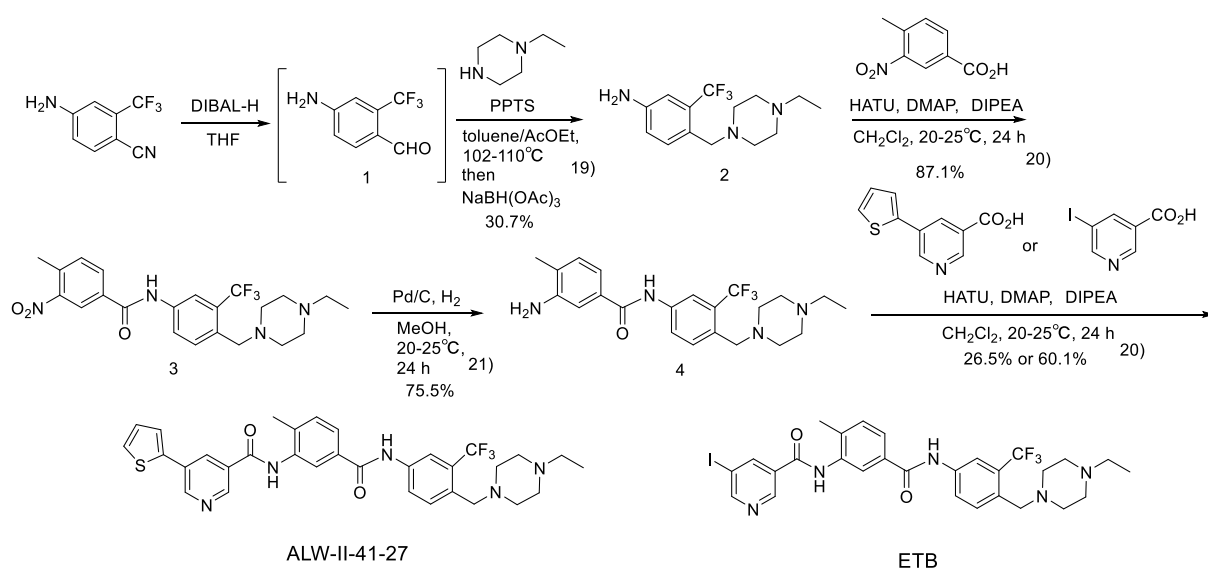


Figure 20 Synthetic schemes of ALW-II-41-27 and ETB.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure 3

合成した ALW-II-41-27 及び ETB を用いて EphA2 キナーゼ阻害活性評価を行った。実験は Promega 社の ADP-Glo™ キナーゼ阻害アッセイを使用して評価した。Figure 21 に示すように、ETB は ALW-II-41-27 と同程度の EphA2 キナーゼ阻害活性を有することが明らかとなった (IC<sub>50</sub> 値: ALW-II-41-27、67.2 ± 18.9 nM; ETB、90.2 ± 18.9 nM)。

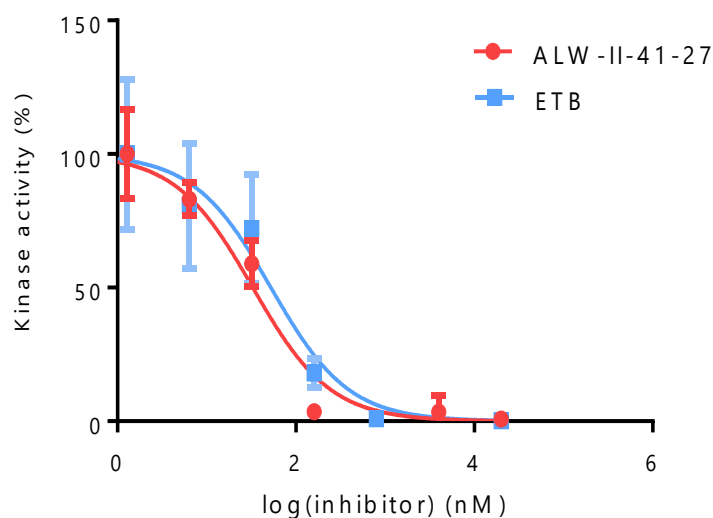
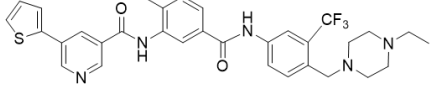
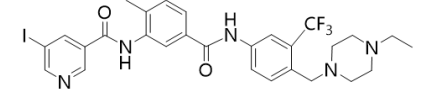


Figure 21 Dose-dependent inhibition of EphA2 receptor kinase using ALW-II-41-27 and ETB.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure 4

また、今回のドッキングシミュレーションの結果が妥当なものであるかを評価するため、ALW-II-41-27 及び ETB について、EphA2 との親和性の結果とキナーゼ阻害活性評価の結果を比較した (Table 5)。その結果、EphA2 との親和性の結果とキナーゼ阻害活性評価の結果に相関関係があることが明らかとなったことから、今回のドッキングシミュレーションの条件は妥当なものであり、今後のプローブ開発に応用できる可能性が示唆された。

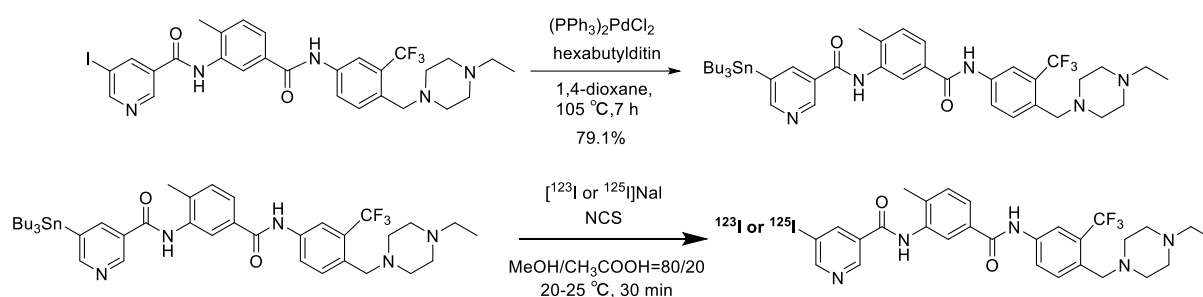
Table 5 Comparison of ALW-II-41-27 and ETB docking simulation results and evaluation of kinase inhibitory activity.

化合物の名称と構造	EphA2との親和性 ( $\Delta G$ ) (kcal/mol)	IC <sub>50</sub> 値 (nM)
ALW-II-41-27 	-8.41	67.2 ± 18.9
ETB 	-7.75	90.2 ± 18.9

#### 第四節 ETBの放射性ヨウ素標識化及び $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$ を用いた血漿安定性試験

ETBがEphA2キナーゼに対して阻害活性を有することが明らかとなったため、ETBの放射性ヨウ素標識(I-123、I-125)を行った。放射性同位元素を用いた反応においては放射性同位元素の濃度が通常の合成と比較して極微量であるため、通常の合成法では十分な収率を達成できない。そこで筆者は、共同研究者である木村寛之氏らによって報告された、スズ前駆体からのスズヨウ素交換反応を用いた放射性ヨウ素標識を検討した<sup>51</sup>。初めにETBのヨウ素を下に示す反応式に従ってトリブチルスズに変換することでスズ前駆体を合成し、その後 $[^{123/125}\text{I}]\text{ヨウ化ナトリウム}$ と酸化剤を用いたヨード脱スタニル化反応を経て放射性ヨウ素標識を行った(Figure 22A)。反応液を、HPLCを用いて分取、精製を行い、分取液をキュリーメータで放射能を測定し、放射化学的収率を算出した。加えて、精製後の化合物を再度HPLCで分析し、放射化学的純度を算出した(Figure 22B)。放射化学的収率として、 $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$ は $70.2 \pm 1.8\%$ 、 $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$ は $30.1 \pm 5.0\%$ で合成に成功し、両化合物とも高い放射化学的純度(>99%)で得られた。この後、 $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$ は細胞取り込み実験と体内分布実験に用い、 $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$ は*in vitro*の血漿安定性試験とSPECT/CT撮像に用いた。

A



B

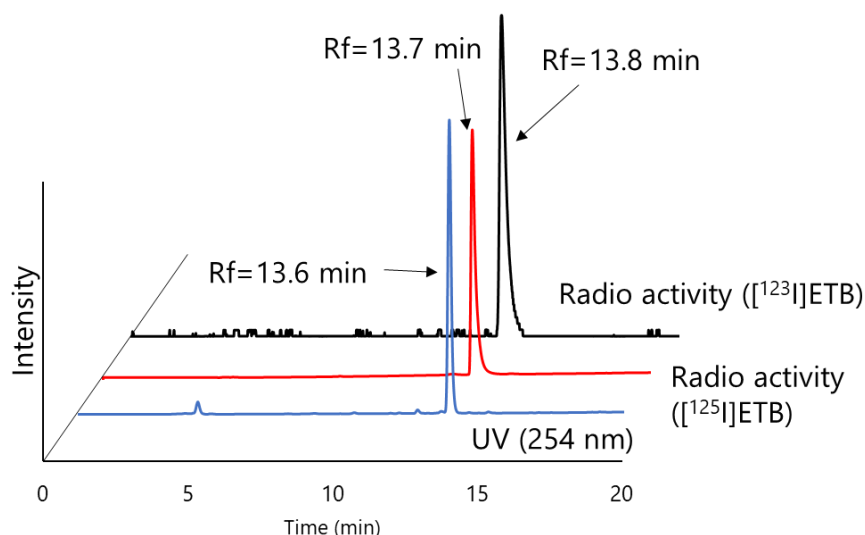


Figure 22 Radiosynthesis scheme and HPLC analysis. (A) Synthesis scheme of labeling precursor and  $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  or  $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  and (B) HPLC analysis of nonradioactive ETB (UV),  $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  (radioactivity), and  $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  (radioactivity).

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure 3, 5, S23

また、 $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  を用いてマウス血漿中における安定性を評価した。 $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  をマウス血漿と混合して  $37\text{ }^\circ\text{C}$  で反応させ、反応後にアセトニトリルと混合して遠心分離を行い、その上清を radio-TLC で展開し、ARG にて評価した (Figure 23)。その結果、反応 4 時間後で  $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  が血漿中に  $94.5 \pm 1.5\%$  残存している結果が得られた。したがって、 $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  はマウス血漿において 4 時間後まで安定であることが明らかとなった。

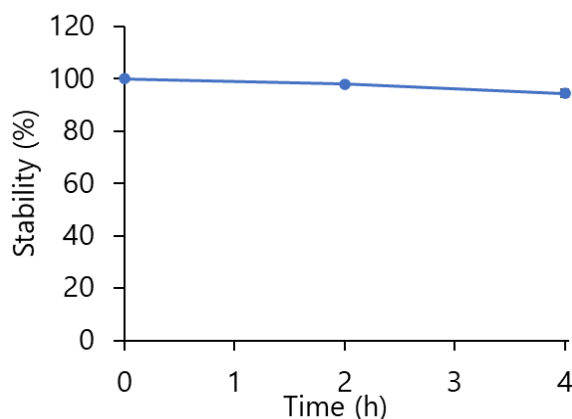


Figure 23 Stability of  $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  in mouse plasma. Data are represented as mean  $\pm$  SD; n = 4.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure S24

#### 第五節 細胞取り込み実験

細胞取り込み実験を行うにあたって、阻害剤として ALW-II-41-27 を用いることを検討した。ALW-II-41-27 は前述のとおり、抗腫瘍効果を有する化合物であるため、細胞への影響を考慮しなければならない。したがって、U87MG 細胞に実際に ALW-II-41-27 を添加して反応させ、反応後の細胞の様子を観察した (Figure 24)。U87MG 細胞の状態を観察すると ALW-II-41-27 を加えていないコントロール群と比べて  $0.1\ \mu\text{M}$  の ALW-II-41-27 を添加した群では U87MG 細胞の形態に大きな変化は見られないが、 $1\ \mu\text{M}$  の ALW-II-41-27 を添加した群では U87MG 細胞の形態が丸く変化し、ALW-II-41-27 による U87MG 細胞への影響が観察できた。したがって、細胞取り込み実験には U87MG 細胞への影響を考慮して ALW-II-41-27 を  $0.1\ \mu\text{M}$  の濃度で添加して評価することとした。

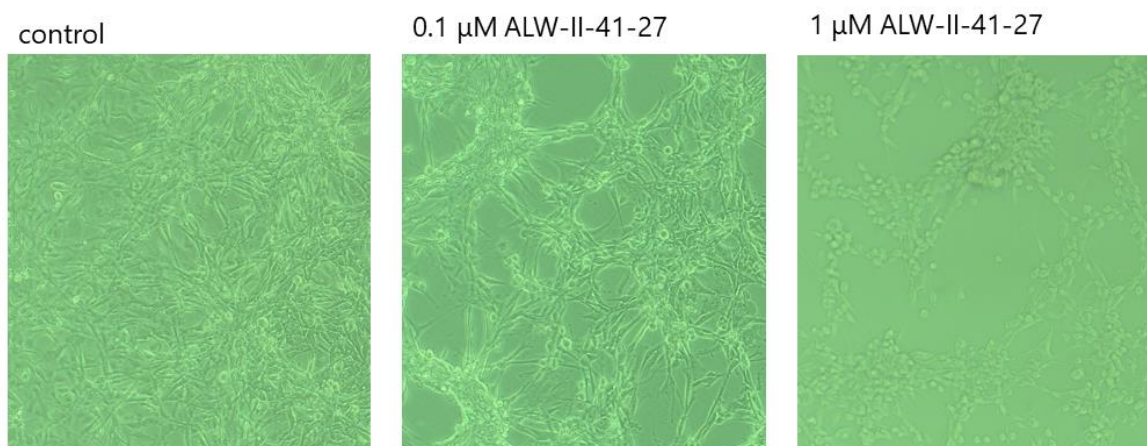


Figure 24 Appearance of U87MG cells after adding ALW-II-41-27 at various concentrations and reacting for 3 h.

細胞取り込み実験は U87MG 細胞を用い、 $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  を 1 well 当たり 3.7 kBq 添加した。評価群としてがん細胞全体の取り込みを評価する uptake 群、 $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  が EphA2 のキナーゼドメインに存在している ATP 結合部位を認識しているかを評価するために阻害剤として ALW-II-41-27 (0.1  $\mu\text{M}$ ) を添加した blocking 群を設定し、評価した。結果を Figure 25 に示す。評価値として第一章と同様に CUR%/mg protein で表した。この結果から反応 60、120 分群で共に uptake 群と比較して blocking 群の値が有意に減少している結果が得られた ( $p < 0.05$  by Student's t-test.) ことから、 $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  が EphA2 のキナーゼドメインに存在している ATP 結合部位を認識して結合している可能性が示唆された。しかし、blocking 群における取り込み量の減少率は十分とは言えない。これは先の検討において U87MG 細胞への影響を最小限にするために ALW-II-41-27 の濃度を低く設定したため、阻害効果が十分にかかっていないためと考えられる。

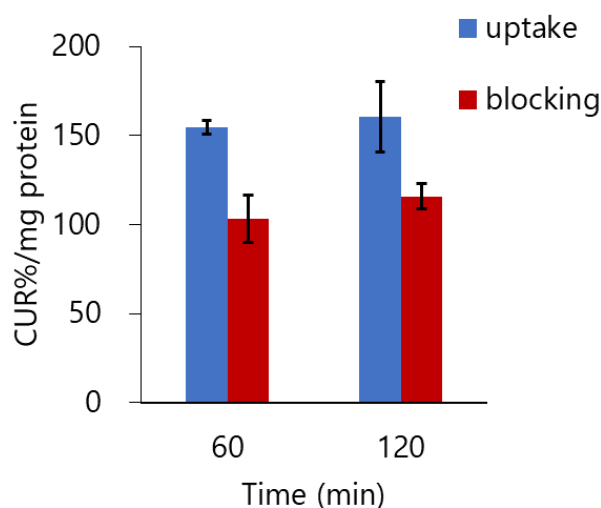


Figure 25 Cell-binding assay.  $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  CUR%/mg protein in U87MG cells. Data are represented as mean  $\pm$  SD;  $n = 5$ . \*:  $p < 0.05$  by Student's t-test.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure 7

## 第六節 U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた評価

[<sup>125</sup>I]ETB (37 kBq/100 μL Tween80 0.1%含有生理食塩水) の静脈内投与後の U87MG 担癌マウスにおける [<sup>125</sup>I]ETB 体内分布実験を実施した。U87MG 担癌マウスの組織における [<sup>125</sup>I]ETB の集積を、% ID/g として Figure 26 に示す。腫瘍における [<sup>125</sup>I]ETB の集積は、尾静脈投与 240 分後で  $2.2 \pm 0.3\%$  ID/g に達したのに対し、血液及び心臓、筋肉において、 [<sup>125</sup>I]ETB の集積はほとんど見られなかった。腎臓における高い集積が観察されたが (投与 60 分後で 27.3% ID/g)、排泄により時間とともに減少した (投与 240 分後で 18.3% ID/g)。一方で、 [<sup>125</sup>I]ETB の肝臓への高い集積・滞留も確認された。この高い集積の原因として、序論でも述べた通り、肝臓においては EphA2 の発現が確認されているため、 [<sup>125</sup>I]ETB が肝臓の EphA2 に結合し、集積が高くなっている、あるいは [<sup>125</sup>I]ETB は脂溶性が高いため、肝臓に集積しやすいなどの理由が考えられるが詳しい原因は不明である。また、大腸への [<sup>125</sup>I]ETB の集積は投与 30、60 分後では少ないが投与 240 分後では 27.1% ID/g に達している。これは [<sup>125</sup>I]ETB が肝臓に集積して胆汁排泄を経て大腸に移行しているものと推測される。一方で甲状腺における放射線量は、すべての時点でごく少量であるため (<0.1% ID)、*in vivo* での放射化学的安定性が示された。この結果はマウス血漿の安定性結果と一致した。また、Table 6 において、投与後の各時点の腫瘍対血液比と腫瘍対筋肉比を示す。腫瘍対血液比が投与 240 分後で 11.7、及び腫瘍対筋肉比が投与 240 分後で 4.2 とどちらも 2 以上であった。これらの結果は SPECT 撮像において、腫瘍と周辺臓器の間に高いコントラストの画像が得られることを示唆している。したがって、 [<sup>123</sup>I]ETB を投与して SPECT 撮像を行った場合、腫瘍が明瞭に描出できる可能性が示唆された。

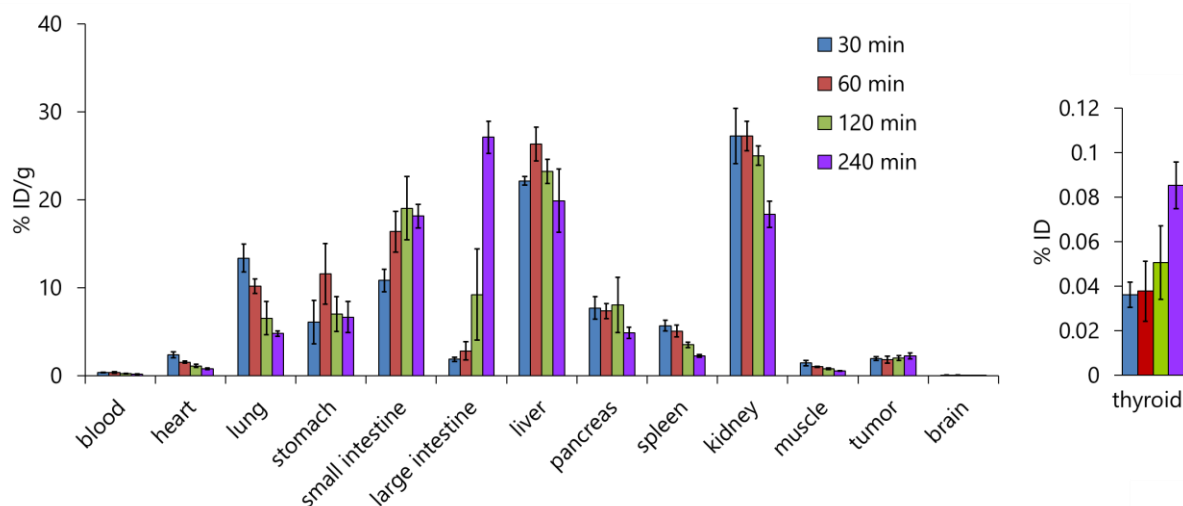


Figure 26 Biodistribution data in U87MG tumor-bearing mice. *Ex vivo* biodistribution of [<sup>125</sup>I]ETB in U87MG tumor-bearing mice at 30, 60, 120, and 240 min after injection. [<sup>125</sup>I]ETB uptake in normal tissues and tumor. Data are represented as mean  $\pm$  SD; n = 5.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure 8

Table 6 Tumor-to-Blood and Tumor-to-Muscle ratios in U87MG tumor-bearing mice. Tumor-to-Blood and Tumor-to-Muscle ratios of [<sup>125</sup>I]ETB in U87MG tumor-bearing mice after injection.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Table 1

	Time after injection (min)			
	30	60	120	240
Tumor-to-Blood	5.6 ± 0.8	5.6 ± 1.1	8.4 ± 1.4	11.7 ± 1.3
Tumor-to-Muscle	1.4 ± 0.3	1.8 ± 0.3	2.6 ± 0.4	4.2 ± 0.8

最後に[<sup>123</sup>I]ETB を U87MG 細胞移植モデルマウスに投与して SPECT/CT 撮像を行った。  
[<sup>123</sup>I]ETB (33.6 MBq/140 μL) を U87MG 細胞移植モデルマウスに静脈内投与し、投与 205 分後からイソフルランを使用した麻酔下で 5 分間の CT スキャンを実行し、その後 60 分間の SPECT スキャンを実行した。Figure 27 に示すように、右大腿部の U87MG 腫瘍の明瞭な視覚化を達成した。

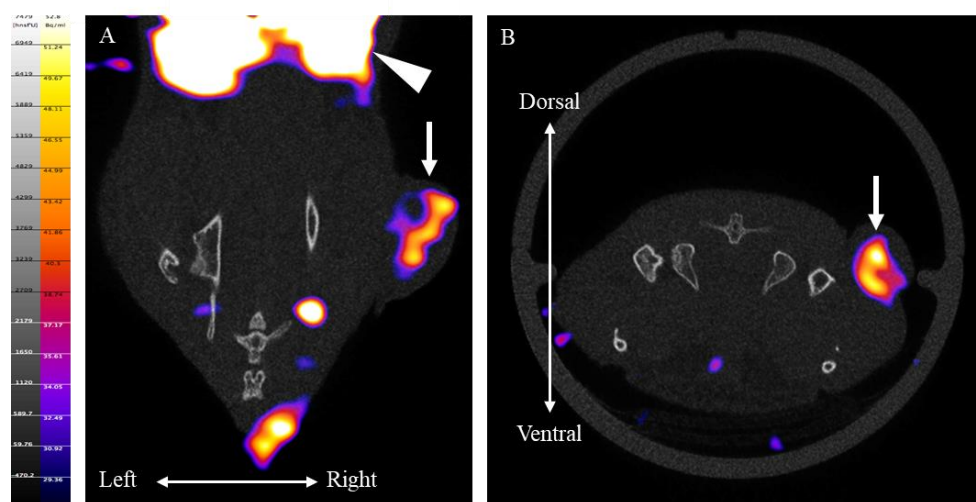


Figure 27 SPECT imaging of U87MG tumor-bearing mouse. Representative [<sup>123</sup>I]ETB SPECT/CT imaging in tumor-bearing mouse at 205 min after injection: (A) dorsal view and (B) caudal view image. Tumor (arrow) and the kidney (arrowhead) are shown.

Furukawa T., et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1238–1244. Figure 9

## 結論

筆者は EphA2 を標的とするイメージングプローブの開発を目的として研究を行った。まず本研究の成果及び考察を以下に要約する。

第一章では抗 EphA2 抗体である EphA2-230-1 を用いたイメージングプローブの開発を行った。EphA2-230-1 に DTPA を導入し、その後に In-111 を用いて標識を行った。 $[^{111}\text{In}]\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}$  を用いてがん細胞における取り込みを評価した結果、 $[^{111}\text{In}]\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}$  ががん細胞に EphA2 特異的に取り込まれ、かつ $[^{111}\text{In}]\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}$  の集積量ががん細胞における EphA2 の発現量を反映していることが明らかとなった。加えて、U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた実験では腫瘍に $[^{111}\text{In}]\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}$  が集積し、かつ腫瘍対血液比が既報の抗 EphA2 抗体である DS-8895a を用いたイメージングプローブである  $^{111}\text{In-CHX-A}^{\text{TM}}\text{-DTPA-DS-8895a}$  よりも優れている結果が得られた。また、SPECT/CT 撮像の結果では腫瘍の明瞭な可視化を達成できた。以上の結果から $[^{111}\text{In}]\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}$  は EphA2 の発現量を反映したイメージングプローブとしての有用性が示唆された。今後は、抗体に導入する配位子の数や種類及び放射性金属を変更することで抗体と EphA2 との結合性の変化に関して検証を継続し、標識の条件や生体内での動態の最適化を検討する必要がある。また、今回使用した EphA2-230-1 はマウス抗体であるため、臨床で使用するためには抗体のヒト化に向けた検討も必要になると考えている。

第二章では EphA2 のキナーゼドメインに存在する ATP 結合部位を標的とする低分子イメージングプローブの開発を行った。EphA2 と ALW-II-41-27 のドッキングシミュレーションを行うことで EphA2 との相互作用を推定し、その結果を基にして低分子化合物を設計することで新規化合物である ETB を見出した。ETB はキナーゼ阻害活性性能評価から ALW-II-41-27 と同等の阻害活性性能を持つことが明らかとなった。加えて ALW-II-41-27 と ETB のドッキングシミュレーションによる EphA2 との親和性の結果とキナーゼ阻害活性性能評価の結果に相関性が見られたことから、今回のドッキングシミュレーションのテンプレートは今後のプローブ合成にも応用できる可能性が示唆された。続いて ETB の放射性ヨウ素標識を行い、高純度の $[^{123/125}\text{I}]\text{ETB}$  の合成に成功し、続けて行った血漿安定性試験において、 $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  が安定であることが示された。U87MG 細胞を用いた細胞取り込み実験において、 $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  はがん細胞に取り込まれ、かつ阻害剤である ALW-II-41-27 を共投与した結果、有意に取り込み量が減少したことから、 $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  が U87MG 細胞においても EphA2 のキナーゼドメインに存在する ATP 結合部位を認識している可能性が示唆された。また、U87MG 細胞移植モデルマウスを用いて体内分布実験を行い、 $[^{125}\text{I}]\text{ETB}$  が腫瘍に集積し、かつ腫瘍対血液比及び腫瘍対筋肉比が良好である結果が得られた。最後に $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  を U87MG 細胞移植モデルマウスに投与して SPECT/CT 撮像を行った結果、腫瘍の明瞭な可視化に成功した。以上の結果から、 $[^{123}\text{I}]\text{ETB}$  は EphA2 のキナーゼドメインに存在する ATP 結合部位を標的とするイメージング



プローブとして基礎的な性質を有していることが示唆された。しかし、ETB は ALW-II-41-27 のチオフェン基をヨウ素に変換した化合物であるため、EphA2 以外の Eph 受容体に対する選択性は変化している可能性があるが、これについての詳細な分析は行っていない。そのため、腫瘍において、EphA2 以外の生体分子に結合している可能性がある。したがって、ETB の EphA2 への選択性については今後検証しなければならない課題である。

以上の結果から、EphA2 はがん細胞の性状を表す指標として、今後、がんの質的診断に応用可能であることを示した。加えて、本研究における実験結果が今後のプローブの開発を含めた創薬研究に応用できるものと期待している。

## 実験項

### 第一章の方法

#### Experimental procedures

Mouse monoclonal antibody against human EphA2 termed EphA2-230-1 was provided by co-author Kazunori Kato. Additionally, *p*-SCN-Bn-DTPA was purchased from Macrocyclics, Inc. (Plano, TX, USA), and MES was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). [<sup>111</sup>In]InCl<sub>3</sub> was purchased from Nihon Medi-Physics Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Most chemicals were purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI) (Tokyo, Japan), Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan), and Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) and used without further purification.

#### Western blotting analysis

Cells and tumor tissues were homogenized in lysis buffer and the supernatant collected by centrifuging at 10,000×*g* at 4 °C for 10 min. Samples were diluted and mixed with NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fisher Scientific), heated at 70 °C for 10 min. Samples were separated electrophoretically with 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ precast gel at 200 V and transferred to polyvinylidene difluoride membrane. After washing, samples were blocked with Blocking one (Nacalai Tesque Inc.). Membranes were incubated with different primary antibodies overnight at 4 °C and then incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Antigen-antibody complexes were visualized using Western Lightning® Plus-ECL (Millipore, Massachusetts, USA). EphA2 receptor rabbit mAb (1:1000), and Beta-actin Rabbit mAb (1:1000) were purchased from Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA) and goat anti-rabbit-IgG H&L (HRP) (1:5000) was purchased from Abcam (Cambridge, UK).

#### DTPA conjugates and In incorporation into antibodies

EphA2-230-1 (200 μg) was diluted in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.5, 30 μL), then added to a 20-fold molar excess of *p*-SCN-Bn-DTPA diluted in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.5, 30 μL), and mixed at room temperature for 24 h. The reaction mixture was then purified by gel filtration chromatography using PD-10 (GE healthcare, Little Chalfont, UK), and the appropriate fractions were collected and concentrated using a centrifugal filter (Amicon® Ultra 2.0 mL, Ultracel®-100K, Merck, Darmstadt, Germany). We observed the reaction progress using MALDI-TOF-MS. 3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (TCI) was saturated with 0.1% trifluoroacetic acid solution/acetonitrile (1:1). The antibody was dissolved in this aqueous solution and measured. BnDTPA-EphA2-230-1 (100 μg) was diluted in 0.1 M MES (pH 5.5, 100 μL), then added to InCl<sub>3</sub> (0.3 mg) diluted in 0.1 M MES (pH 5.5, 50 μL), and mixed at room temperature for 1 h. The reaction mixture was then purified and

concentrated using a centrifugal filter (Amicon<sup>®</sup> Ultra 0.5 mL, Ultracel<sup>®</sup>-100K). We observed the reaction progress using ICP-MS.

### **Flow cytometry measurement of binding affinity for EphA2**

The reactivity of EphA2-230-1, BnDTPA-EphA2-230-1, and natIn-BnDTPA-EphA2-230-1 to EphA2 on the cancer cell surface was determined using flow cytometry. Approximately  $1 \times 10^5$  U87MG cells were incubated with various concentrations (1.6-100  $\mu\text{g/ml}$ ) of antibody in 20  $\mu\text{l}$  of PBS (pH 7.4) with 2% FBS (staining buffer) for 60 min on ice. The cells were then washed and stained with PE-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for 30 min on ice. The cell suspension was washed three times with PBS and then analyzed using a FACS Calibur flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA). Equilibrium dissociation constants were calculated using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### **Radiolabeling**

BnDTPA-EphA2-230-1 (100  $\mu\text{g}$ ) was diluted in 0.1 M MES buffer (pH=5.5, 200  $\mu\text{L}$ ) and then added to [<sup>111</sup>In]InCl<sub>3</sub> (6.1 MBq) and mixed at room temperature for 1 h. After the reaction, the reaction mixture was concentrated and purified using a centrifugal filter (Amicon<sup>®</sup> Ultra 0.5 mL, Ultracel<sup>®</sup>-100K). Purified [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 was analyzed using Radio-TLC (25 Aluminum TLC silica gel 60 F254, Merck) with saturated EDTA MES solution. ARG was carried out using a Typhoon FLA 9500 BGR (GE healthcare).

### **Cell culture**

The U87MG glioma cell line was obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (London, UK). The cells were grown in Eagle's minimal essential medium (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine (Nacalai Tesque Inc.), 1 mM pyruvic acid (Nacalai Tesque Inc.), non-essential amino acid (Nacalai Tesque Inc.), and penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque Inc.). The cells were cultured under 5% CO<sub>2</sub> and 95% ambient air at 37 °C.

### **Cell-binding study**

Uptake of [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1

The U87MG cells (approximately  $5 \times 10^4$ /well) were seeded in a 24-well cell culture plate (Corning, Corning, NY, USA) containing growth medium and incubated at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> until 80% confluence was achieved. The medium was aspirated and replaced with 1.5 mL of FBS-free medium. After 10 min, the cells were treated with [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (3.7 kBq/0.4  $\mu\text{g}$ ). After 1, 2, 4, and 24 h of additional incubation, the radioactive medium was aspirated, and the plate was washed twice with 0.5 mL of cold PBS. After washing, the cellular fraction was lysed with 0.1 M NaOH, and

the protein concentration was calculated using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Radioactivity counts containing radioactive medium and PBS were designated as  $C_{out}$ , and radioactivity counts of the lysis solution and PBS were defined as  $C_{in}$ . The radioactivity of each fraction was measured using a  $\gamma$ -counter (1480 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). CUR was calculated using the formula  $C_{in}/(C_{in} + C_{out})$ .

#### **Internalization of [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1**

The procedure of cell culture was the same as that described above. The medium was aspirated and replaced with 1.5 mL of FBS-free medium. After 10 min, the cells were treated with [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (3.7 kBq/0.4  $\mu$ g). After 1, 2, 4, and 24 h of additional incubation, the radioactive medium was aspirated, and the plate was washed twice with 0.5 mL of cold PBS. After washing, the cells were washed three times with acidic buffer (0.2 M CH<sub>3</sub>COOH, 0.5 M NaCl). Finally, the cellular fraction was lysed with 0.1 M NaOH, and the protein concentration was calculated using a BCA Protein Assay Kit. The radioactivity was defined, measured, and calculated as described in the previous sections.

#### **Blocking of [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1**

The procedure of cell culture was the same as that described above. The medium was aspirated and replaced with 1.0 mL FBS-free medium followed by 0.5 mL FBS-free medium with unlabeled EphA2-230-1 (6.25  $\mu$ g) to determine nonspecific binding. After 10 min, the cells were cotreated with [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (3.7 kBq/0.4  $\mu$ g) and EphA2-230-1 (6.25  $\mu$ g). After 1, 2, and 4 h of additional incubation, the radioactive medium was aspirated, and the plate was washed twice with 0.5 mL of cold PBS. After washing, the cellular fraction was lysed with 0.1 M NaOH, and the protein concentration was calculated using a BCA Protein Assay Kit. The radioactivity was defined, measured, and calculated as described in the previous sections.

#### **Comparison cell uptake results with U87MG and HT1080 cells**

The U87MG and HT1080 cells (approximately  $5 \times 10^4$ /well) were seeded in a 24-well cell culture plate (Corning) containing growth medium and incubated at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> until 80% confluence was achieved. The medium was aspirated and replaced with 1.5 mL of FBS-free medium. After 10 min, the cells were treated with [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (3.7 kBq/0.07  $\mu$ g). After 24 h of additional incubation, the radioactive medium was aspirated, and the plate was washed twice with 0.5 mL of cold PBS. After washing, the number of cells in each well was determined. Radioactivity counts containing radioactive medium and PBS were designated as  $C_{out}$ , and radioactivity counts of the cells were defined as  $C_{in}$ . The radioactivity was measured and calculated as described in the previous sections.

### **Animal model**

The animal studies were approved by the Bioscience Research Center at Kyoto Pharmaceutical University and performed according to the Guidelines for Animal Experimentation. Five-week-old male BALB/c Slc-nu/nu mice were obtained from Japan SLC (Shizuoka, Japan). For each mouse,  $2 \times 10^6$  U87MG glioblastoma cells in 100  $\mu$ L PBS were inoculated subcutaneously into the right thigh. The tumor reached an approximate volume of 100 mm<sup>3</sup> after 28–35 days. The mice were then used for biodistribution study and SPECT/CT imaging.

### **Biodistribution**

Biodistribution study was conducted in U87MG tumor-bearing mice. [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (37 kBq/1.2  $\mu$ g/100  $\mu$ L saline) was administered to the mice intravenously through the tail vein. At 24, 48, and 72 h after administration, the mice were euthanized by exsanguination. The blood, brain, heart, lung, liver, pancreas, spleen, kidneys, stomach, intestines (small and large), skeletal muscles, bones, and tumors were removed for analysis. The tissue samples were weighed, and radioactivity was determined. Tissue radioactivity levels were expressed as % ID/g.

### **Blocking biodistribution**

Blocking biodistribution study was conducted in U87MG tumor-bearing mice. [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 (37 kBq/1.2  $\mu$ g/100  $\mu$ L saline) was administered to the mice intravenously through the tail vein. For biodistribution under EphA2 blocking conditions, 10 mg/kg of EphA2-230-1 in 100  $\mu$ L saline was injected intravenously 24 h before the radiotracer injection. At 72 h after tracer administration, the mice were euthanized by exsanguination. The blood, brain, heart, lung, liver, pancreas, spleen, kidneys, stomach, intestines (small and large), skeletal muscle, bone, and tumor were removed for analysis. The tissue samples were weighed, and radioactivity was determined. The tissue radioactivity levels were expressed as described in the previous section.

### **SPECT/CT**

For the bolus injection study, tumor-bearing mice were intravenously injected with 7.2 MBq/114  $\mu$ g [<sup>111</sup>In]In-BnDTPA-EphA2-230-1 in 120  $\mu$ L of saline. SPECT/CT images were obtained using X-CUBE and  $\gamma$ -CUBE scanners. The mice were anesthetized using isoflurane/O<sub>2</sub> (5% for induction, 2.5% for maintenance), and their body temperature was kept constant with an integrated heating circuit. At 72 h after administration, CT imaging was performed for 5 min, and SPECT imaging was performed for 60 min after CT imaging. The SPECT images were acquired using a helical-orbit scan with linear-stage motion and step-and-shoot camera motion. A multi-lofthole collimator (GPmouse, 48 loftholes) was mounted in a heptagonal SPECT system, and the following parameters were used: [<sup>111</sup>In]In energy window (26 keV +/- 10%, 171 keV +/- 10%, and 245 keV +/- 10%), 237 projections, 18° angle increment with a 1 mm bed step, and 60 min acquisition time. SPECT projection data were reconstructed using a 3D maximum likelihood-expectation maximization algorithm (3 iterations) at an

isotropic voxel size of 250  $\mu\text{m}$ . CT images were subsequently acquired using a helical scan with the following acquisition parameters: X-ray source setting of 50 kVp/100  $\mu\text{A}$ , 480 projections, 1.4 spiral pitch, and 1 min acquisition time. CT projections were reconstructed using an ISRA algorithm that yielded a 0.2 mm  $\times$  0.2 mm  $\times$  0.2 mm voxel size and 200  $\times$  220  $\times$  469 image volume. Image analysis was performed using the VivoQuant software (version 4.0 patch1, inviCRO, LLC, Boston, MA, USA).

## Statistics

Student's t-test was performed for blocking distribution using XLSTAT (Addinsoft, New York, NY, USA). The data points represent the mean of at least triplicate measurements with error bars corresponding to the SD.

## 第二章の方法、NMR、MS スペクトル

### General

Most chemicals were purchased from Tokyo Chemical Industry Co., LTD. (Tokyo, Japan), Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan) and Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan), and used without further purification. Synthetic compounds were purified using Smart Flash EPCLC W-Prep 2XY (YAMAZEN, Tokyo, Japan). Analytical and preparative HPLC was performed using a Shimadzu LD-20AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) solvent delivery system at a flow rate of 3.0 mL/min with SPD-20A (Shimadzu Corporation) UV detector (254, 220 nm) and  $\gamma$ -survey meter TCS-172 (ALOKA, Mitaka, Japan) RI detector. A Cosmosil 5C18-AR-II column (10  $\times$  150 mm, Nacalai Tesque Inc.) was used for reverse phase HPLC. Conditions for HPLC are defined as water: methanol with 0.1% trifluoroacetic acid = initiated from 50:50, gradually adjusted to 10:90 (over 20 min), and followed by 10:90. Molecular weight was analyzed by Agilent LC/MS 6130B (Agilent Technologies, California, USA). HRMS were obtained on LCMS-IT-TOF (Shimadzu). Chemical shifts for  $^1\text{H}$ -NMR, acquired at JEOL ECS400ss (JEOL, Tokyo, Japan) and Ascend<sup>TM</sup> 500 (Bruker, Massachusetts, USA) are given in ppm downfield from tetramethylsilane. For  $^{13}\text{C}$ -NMR, the spectra were acquired at Ascend<sup>TM</sup> 500 (Bruker) calibrated according to the respective solvent. (77.00 ppm for  $\text{CDCl}_3$  and 39.51 ppm for DMSO). Because the half-life is long and handling is easy, I-125 was used for the biodistribution studies instead of I-123. Sodium [ $^{125}\text{I}$ ]iodide ( $\text{Na}[^{125}\text{I}]\text{I}$ ) (carrier free) solution was purchased from MP Bio Japan K.K and sodium [ $^{123}\text{I}$ ]iodide ( $\text{Na}[^{123}\text{I}]\text{I}$ ) solution was purchased from FUJIFILM Toyama Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). In cell binding assay and biodistribution experiment, 1480 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) was used.

### Docking simulation and creating molecule surface using MOE

The binding poses of ALW-II-41-27 in the ATP binding site of EphA2 receptor were predicted by MOE (Chemical Computing Group, Montreal, Canada). The crystal structure of EphA2 receptor with *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-((3-(methylsulfonyl)-5-morpholinophenyl)amino)thiazole-5-

carboxamide was retrieved from the Protein Data Bank ID: 5NKI<sup>38</sup> and prepared using the Quickprep in MOE to remove non amino acid molecules, add hydrogen atoms, and assign the protonation states for the polar residues. The scoring grid was generated by enclosing the residues 10 Å around *N*-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-((3-(methylsulfonyl)-5-morpholinophenyl)amino)thiazole-5-carboxamide in the binding site. The docking simulation was performed in refinement mode and the top ranked pose by GBVI/WSA  $\Delta G$  of each inhibitor was retained for visual analysis of interactions.

$$\Delta G \approx c + \alpha \left[ \frac{2}{3} (\Delta E_{coul} + \Delta E_{sol}) + \Delta E_{vdw} + \beta \Delta SA_{weighted} \right]$$

Formalism S1. Formalism of  $\Delta G$

### Chemical experiment procedure

#### 4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)aniline (2)

A round-bottomed flask charged with 4-amino-2-(trifluoromethyl) benzonitrile (1.11 g, 6 mmol) underwent three cycles of vacuum/filling with N<sub>2</sub> gas. Dry THF (10 mL) was added into the flask, and then a solution of diisobutylaluminum hydride (15 mL, 1.0 M in toluene) was added dropwise over 20 min at 20-25 °C. Upon complete addition, the resulting solution was stirred for an additional 30 min. After the reaction was complete, the mixture was cooled to -10 °C and methanol (1.8 mL) was carefully added. Then the mixture was stirred for an additional 120 min at 20-25 °C and an aqueous saturated Rochelle salt solution was added dropwise. After the quench was complete, the mixture was stirred for 10 min. The resultant reaction mixture was extracted with chloroform, and organic layer was concentrated *in vacuo*.

To a solution of 4-amino-2-trifluoromethylbenzaldehyde (1.13 g, 6 mmol) in ethyl acetate (35 mL) was added 1 M hydrochloric acid (20 mL), and the mixture was stirred rapidly at 20-25 °C for 5 min. An aqueous solution of sodium hydroxide (1 M, 15 mL) was charged to the mixture and stirred for additional 5 min. The organic layer was separated, washed with brine (20 mL). To the solution was added 1-ethylpiperazine (3.3 mL, 30 mmol), pyridinium *p*-toluenesulfonate (151 mg, 0.6 mmol), and toluene (15 mL). The mixture was heated at 102–110 °C with Dean–Stark apparatus for azeotropic dehydration. When 15 mL of distillate was removed, anhydrous ethyl acetate (15 mL) was charged to the reaction mixture. This operation was repeated until total 45 mL of azeotropic mixture. The mixture was cooled to 50 °C, and sodium triacetoxyborohydride (2.54 g, 12 mmol) was added in portions at 50–60 °C. The reaction mixture was cooled to 10–15 °C and quenched with water (25 mL) over 10 min while maintaining the batch temperature below 20 °C. The resultant reaction mixture was extracted with chloroform, and organic layer was washed with water (2 × 25 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (inject: Silica gel L, column: Silica gel L, YAMAZEN) using methanol in chloroform to give **2** as a white solid (793 mg, 30.7% yield). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 2.4 and 8.4 Hz, 1H), 3.77 (br, 2H), 3.53 (s, 2H), 2.51 (br, 8H), 2.44 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H),

1.09 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  145.01, 131.88, 129.46 (q,  $J = 29.4$  Hz), 126.73, 124.33 (q,  $J = 274.8$  Hz), 117.75, 112.05 (q,  $J = 6.5$  Hz), 57.80, 52.85 (2C), 52.81 (2C), 52.24, 11.84. MS (ESI $^+$ )  $m/z$  : 288.2 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) (calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3$  : 287.2).

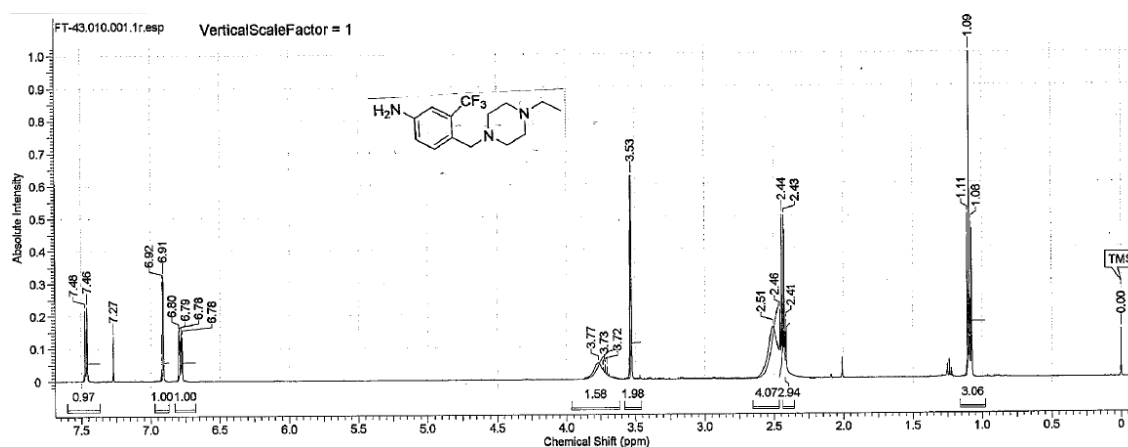


Figure S1.  $^1\text{H-NMR}$  spectra (500 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of 4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)aniline

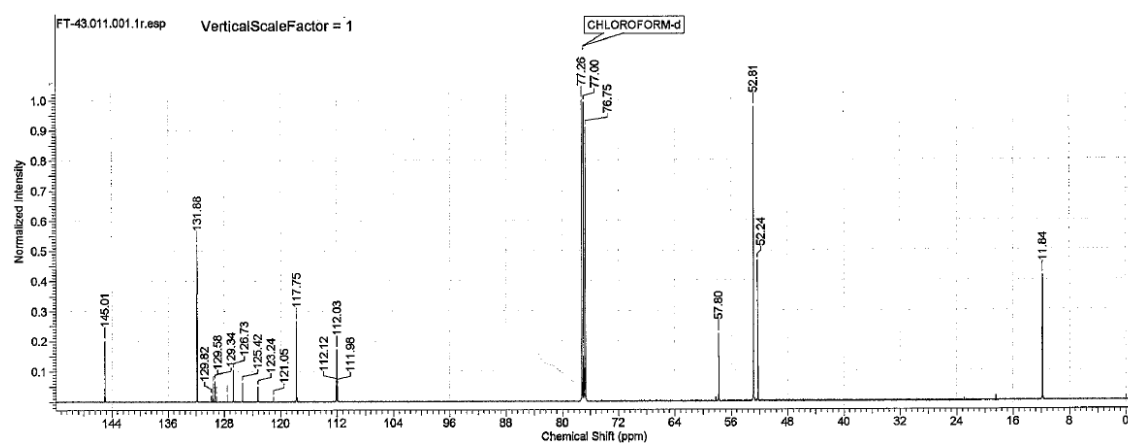


Figure S2.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra (126 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of 4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)aniline



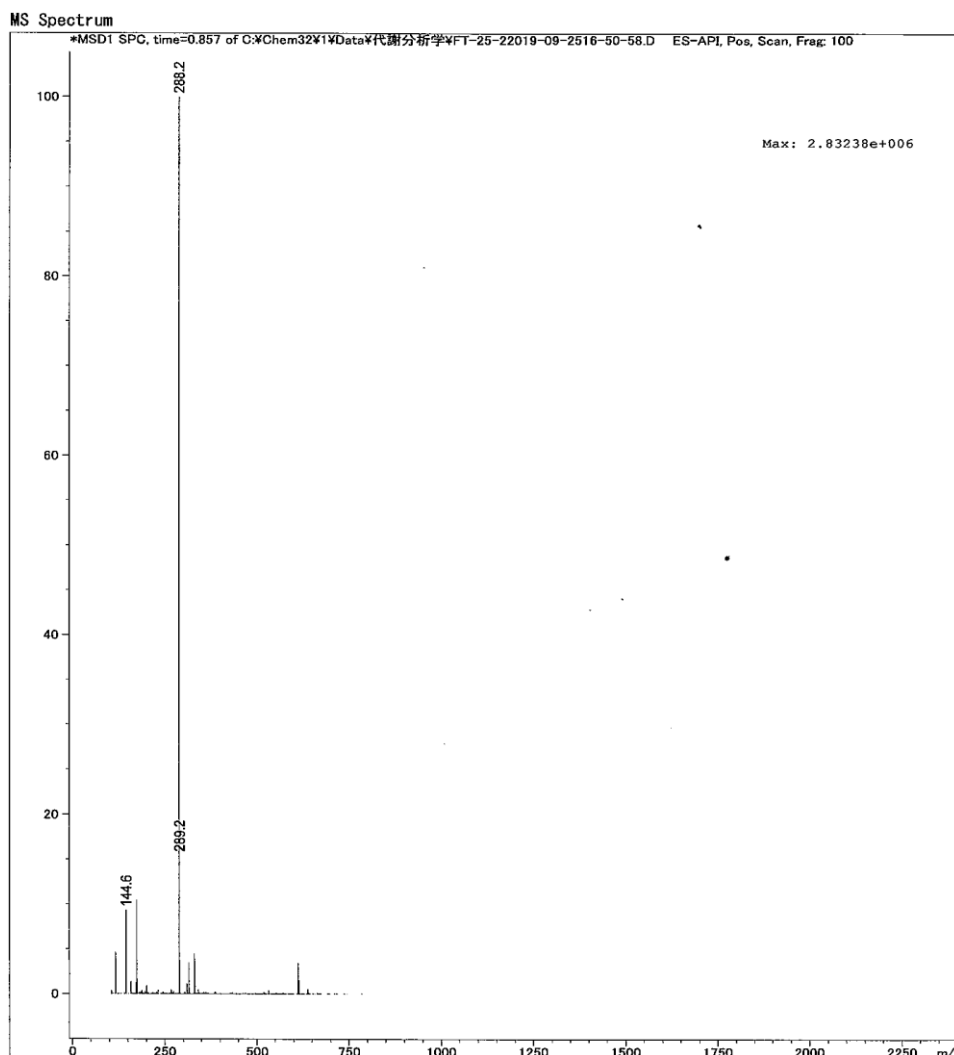


Figure S3. Mass spectra of 4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)aniline

*N*-4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methyl-3-nitrobenzamide (**3**)

Compound **2** (144 mg, 0.5 mmol) was dissolved with dichloromethane (3 mL), and to the solution was added 4-methyl-3-nitro benzoic acid (109 mg, 0.6 mmol), HATU (228 mg, 0.6 mmol), DMAP (7.3 mg, 0.06 mmol) and DIPEA (0.26 mL, 1.5 mmol). The mixture underwent three cycles of vacuum/filling with N<sub>2</sub> gas and stirred at 20-25 °C for 24 h. The resultant reaction mixture was extracted with chloroform, and organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (inject: Silica gel L, column: Silica gel L, YAMAZEN) using methanol in chloroform to give **3** as a white solid (196 mg, 87.1% yield). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.60 (br, 1H), 8.49 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 1.9 and 8.0 Hz, 1H), 7.89-7.88 (m, 2H), 7.75 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.62 (s, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.54 (br, 8H), 2.47 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.11 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.63, 148.85, 137.71, 136.15, 134.14, 133.52, 133.35, 131.78, 131.32, 129.15 (q, *J* = 30.4 Hz), 123.90 (q, *J* = 274.0 Hz), 123.62, 123.22, 117.95 (q, *J* = 6.5 Hz), 57.70, 52.86 (2C), 52.76 (2C), 52.26, 20.59, 11.81. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* : 451.2 ([M+H<sup>+</sup>]) (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> : 450.2).

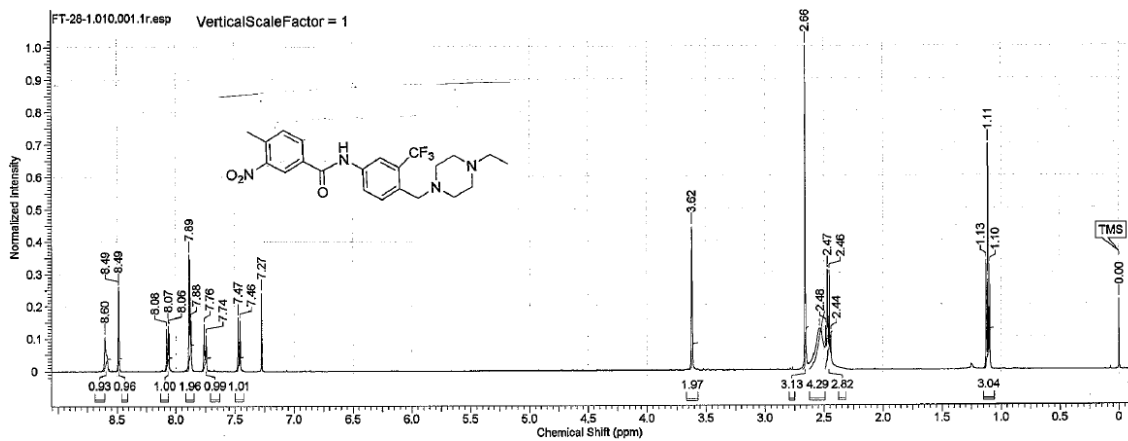


Figure S4.  $^1\text{H-NMR}$  spectra (500 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of *N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methyl-3-nitrobenzamide

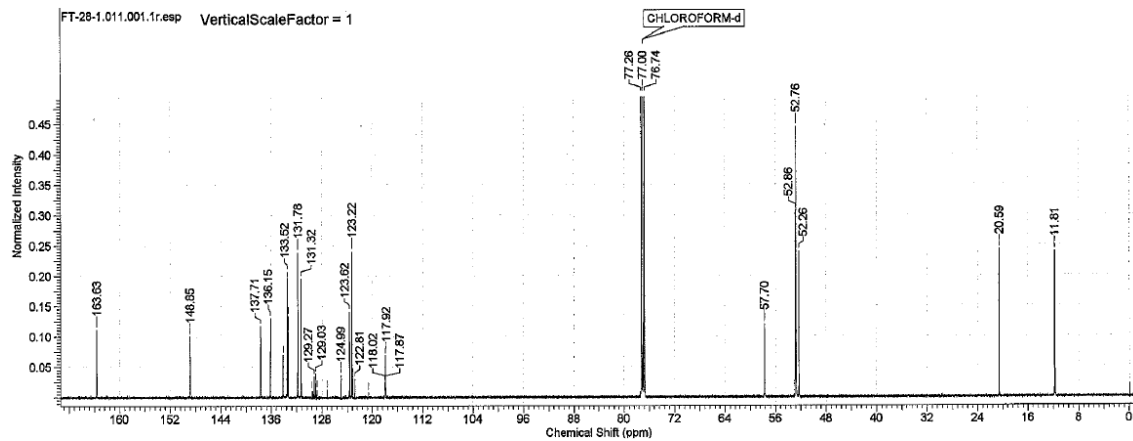


Figure S5.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra (126 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of *N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methyl-3-nitrobenzamide

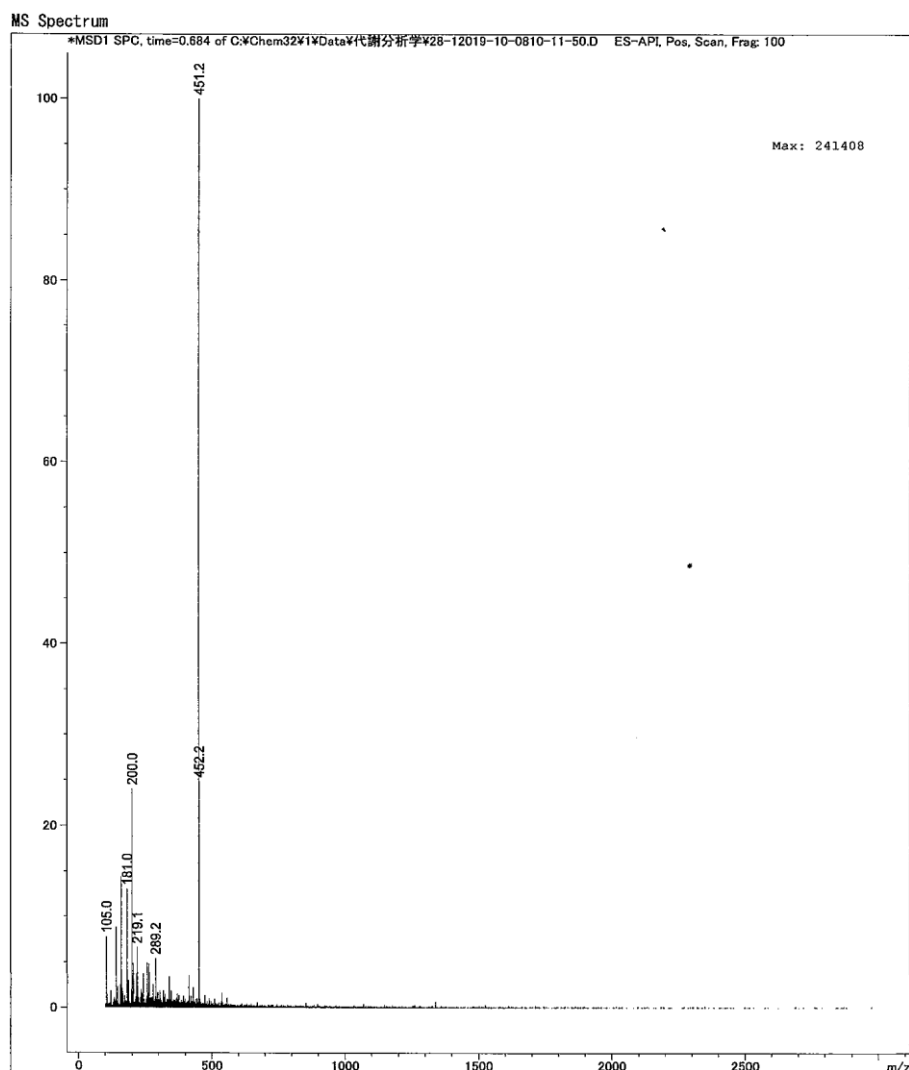


Figure S6. Mass spectra of *N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methyl-3-nitrobenzamide

3-amino-*N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamide (**4**)

Compound **3** (140 mg, 0.311 mmol) was dissolved methanol (5.6 mL), and palladium on activated carbon (15.1 mg) were added. The mixture underwent three cycles of vacuum/filling with H<sub>2</sub> and stirred at 20-25 °C for 24 h. The reaction mixture was filtered using Hyflo Super-Cel<sup>®</sup> (Wako), and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (inject: Silica gel L, column: Silica gel L, YAMAZEN) using methanol in chloroform to give **4** as a white solid (98.7 mg, 75.5% yield). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.88-7.83 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 1.7 and 7.6 Hz, 1H), 3.79 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 2.59 (br, 8H), 2.53 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.15 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.11, 145.12, 136.94, 133.10, 132.95, 131.31, 130.57, 129.10 (q, *J* = 30.3 Hz), 126.60, 124.01 (q, *J* = 273.9 Hz), 123.16, 117.53 (q, *J* = 6.5 Hz), 116.40, 113.57, 57.71, 52.59 (2C), 52.43 (2C), 52.20, 17.41, 11.49. MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* : 421.2 ([M+H<sup>+</sup>]) (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O :

420.2).

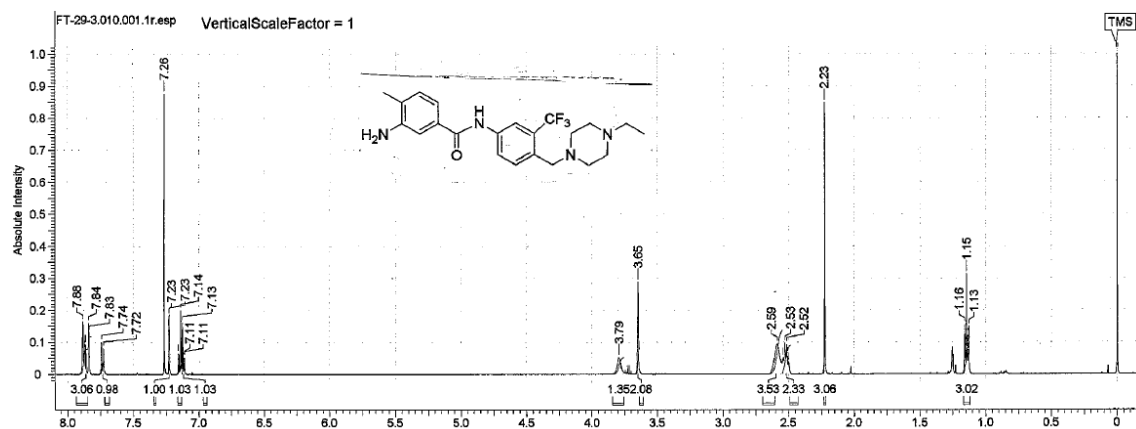


Figure S7.  $^1\text{H-NMR}$  spectra (500 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of 3-amino-*N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamide

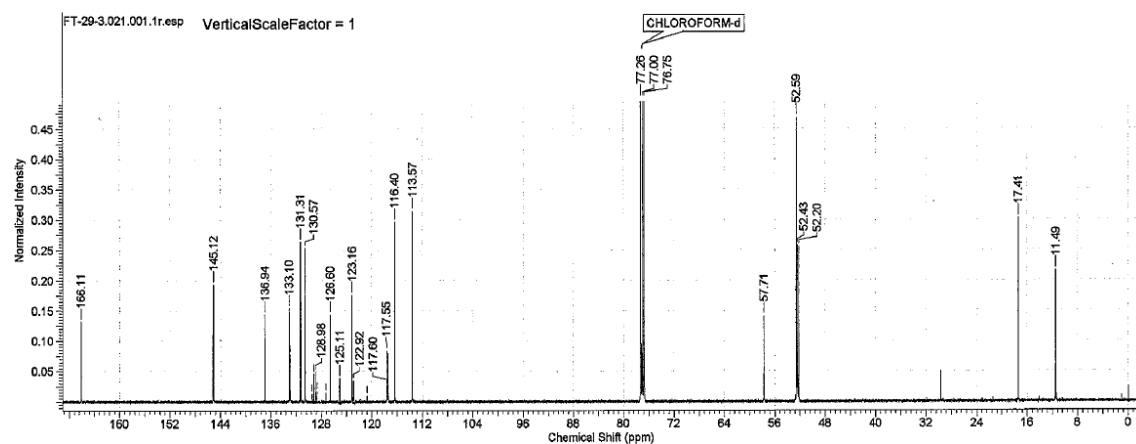


Figure S8.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra (126 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of 3-amino-*N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamide

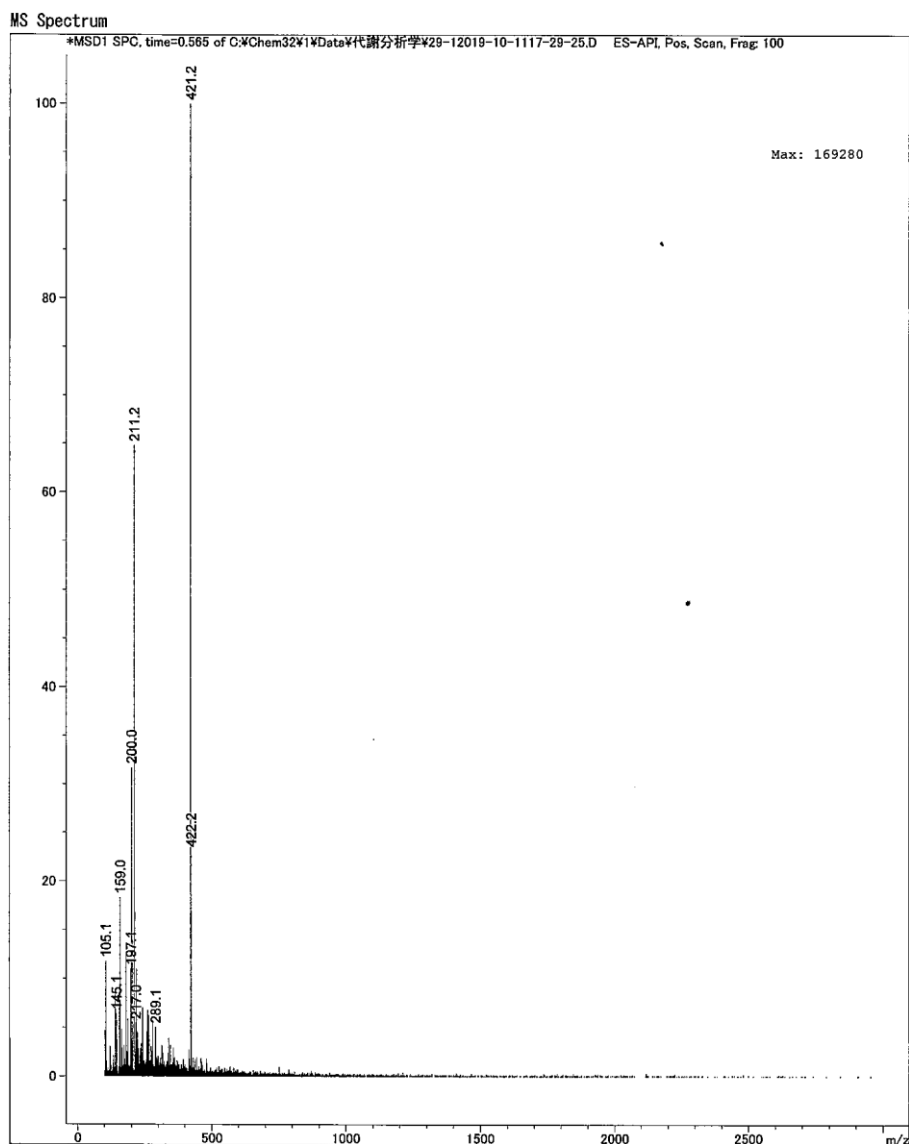


Figure S9. Mass spectra of 3-amino-*N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamide

*N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methyl-3-(3-(thiophen-2-yl)benzamido)benzamide: ALW-II-41-27 (5)

Compound **4** (60.8 mg, 0.144 mmol) was dissolved dichloromethane (0.86 mL), and to the solution was added 5-thiophen-2-yl nicotinic acid (35.5 mg, 0.173 mmol), HATU (65.8 mg, 0.173 mmol), DMAP (2.1 mg, 0.017 mmol) and DIPEA (56.1 mg, 0.434 mmol). The mixture underwent three cycles of vacuum/filling with N<sub>2</sub> gas and stirred at 20-25 °C for 24 h. The resultant reaction mixture was extracted with chloroform, and organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (inject: Silica gel L, column: Silica gel L premium, YAMAZEN) using methanol in chloroform to give **5** as a white solid (26 mg, 26.5% yield). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.27 (br, 1H), 9.08 (br, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.86-7.83 (m, 3H), 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H),

7.34 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 7.06-7.04 (m, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.50 (br, 8H), 2.45 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.08 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.36, 164.57, 149.19, 146.53, 138.71, 136.91, 136.59, 134.98, 133.19, 133.08, 132.08, 131.05, 130.94, 130.45, 129.61, 128.86 (q,  $J = 30.3$  Hz), 128.46, 126.85, 125.57, 125.13, 124.01, 124.01 (q,  $J = 274.8$  Hz), 123.41, 117.74 (q,  $J = 5.5$  Hz), 57.68, 52.65 (2C), 52.59 (2C), 52.12, 17.90, 11.62. MS (ESI $^+$ )  $m/z$  : 608.3 ([ $\text{M}+\text{H}^+$ ]). (calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ : 607.2).

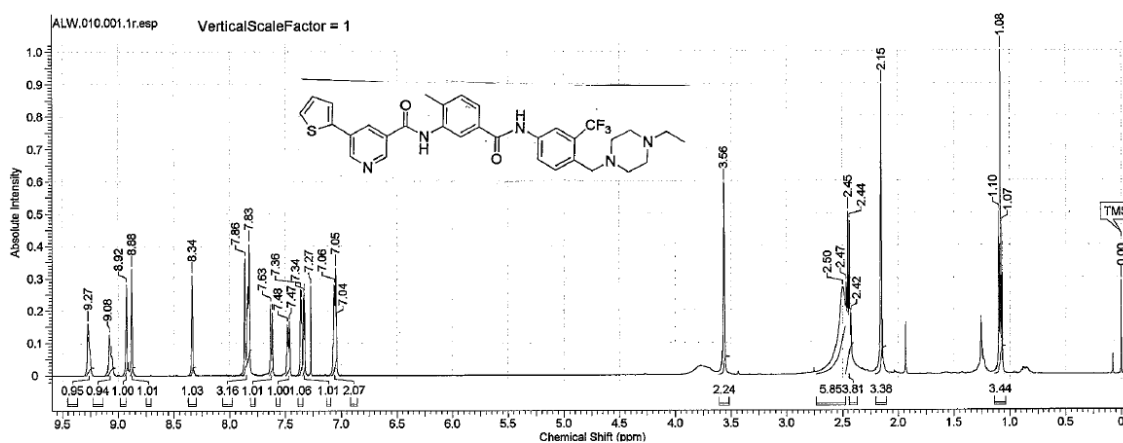


Figure S10.  $^1\text{H}$ -NMR spectra (500 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of *N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methyl-3-(3-(thiophen-2-yl)benzamido)benzamide

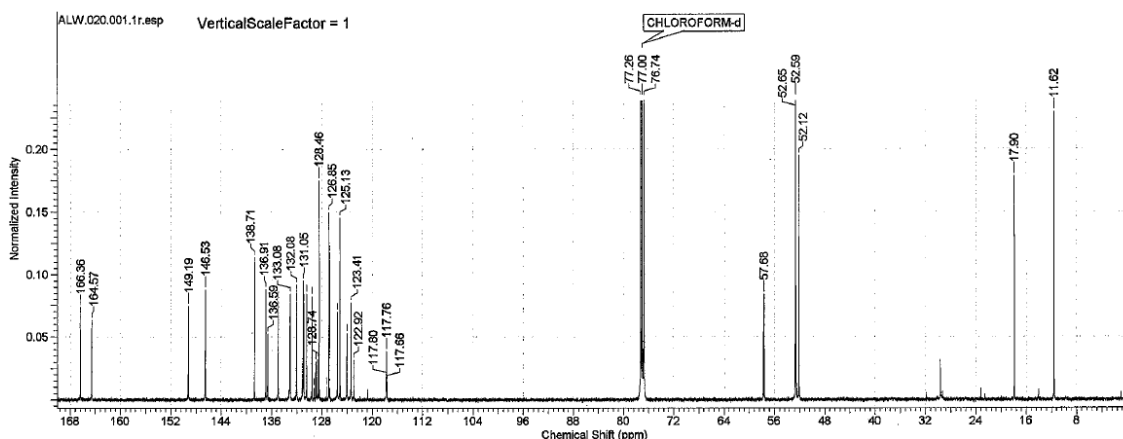


Figure S11.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (126 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of *N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methyl-3-(3-(thiophen-2-yl)benzamido)benzamide

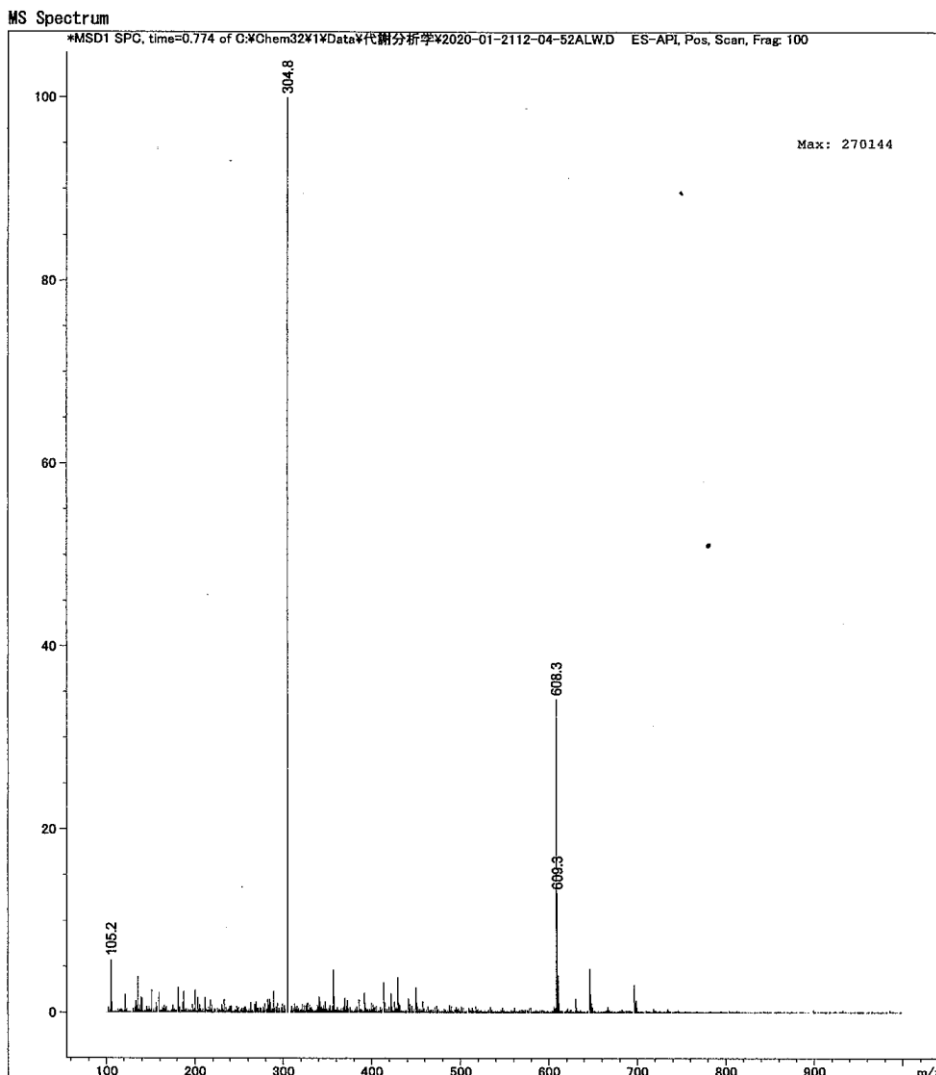


Figure S12. Mass spectra of *N*-(4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methyl-3-(3-(thiophen-2-yl)benzamido)benzamide

*N*-(5-((4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-iodonicotinamide: ETB (**6**)

Compound **4** (142 mg, 0.337 mmol) was dissolved dichloromethane (2 mL), and to the solution was added 5-iodo nicotinic acid (101 mg, 0.406 mmol), HATU (154 mg, 0.406 mmol), DMAP (5.0 mg, 0.04 mmol) and DIPEA (175  $\mu$ L, 1.01 mmol). The mixture underwent three cycles of vacuum/filling with  $N_2$  gas and stirred at 20-25  $^\circ$ C for 24 h. The resultant reaction mixture was extracted with chloroform, and organic layer was over  $MgSO_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (inject: Silica gel L, column: Silica gel L premium, YAMAZEN) using methanol in chloroform to give **6** as a white solid (132 mg, 60.1% yield).  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 9.06-9.04 (m, 2H), 8.59-8.57 (m, 2H), 8.21 (s, 1H), 7.97-7.90 (m, 3H), 7.77 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H), 7.71 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.37 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 2.54 (br, 8H), 2.44 (q,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.10 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H).  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  165.02, 162.80, 157.73,

147.39, 143.16, 138.22 (2C), 135.95, 132.38, 132.02, 131.49, 131.18, 130.54, 127.36 (q,  $J = 29.4$  Hz), 125.99, 125.56, 124.34 (q,  $J = 273.9$  Hz), 123.52, 117.25 (q,  $J = 6.5$  Hz), 94.12, 57.47, 52.81 (2C), 52.37 (2C), 51.58, 18.03, 11.98. MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  : 652.2 ([M+H<sup>+</sup>]), HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  : 652.1398 ([M+H<sup>+</sup>]) (calcd for C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>2</sub> : 652.1391)

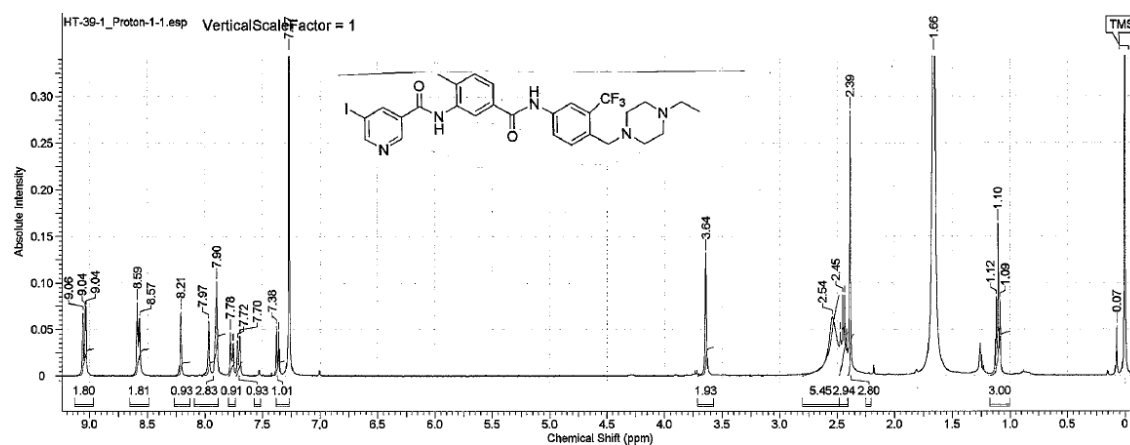


Figure S13. <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz) in CDCl<sub>3</sub> of *N*-(5-(((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-iodonicotinamide

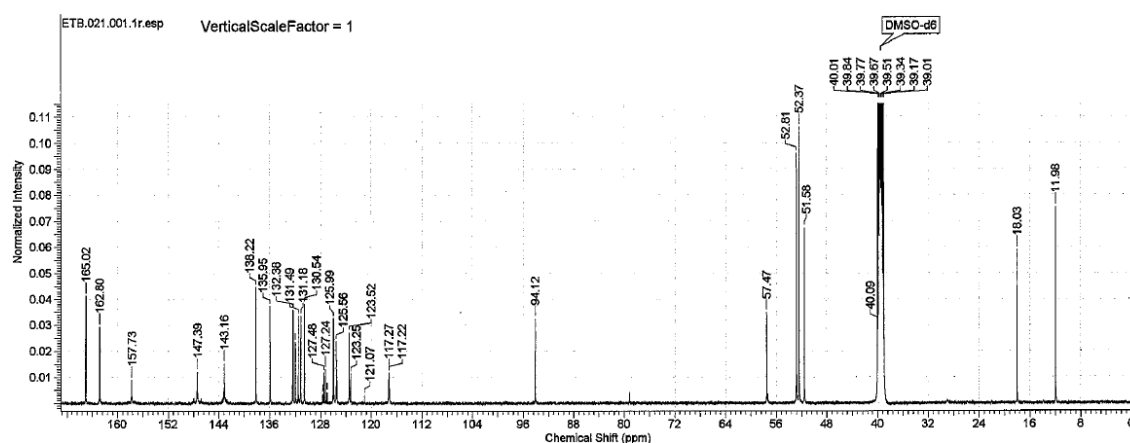


Figure S14. <sup>13</sup>C-NMR spectra (126 MHz) in DMSO of *N*-(5-(((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-iodonicotinamide



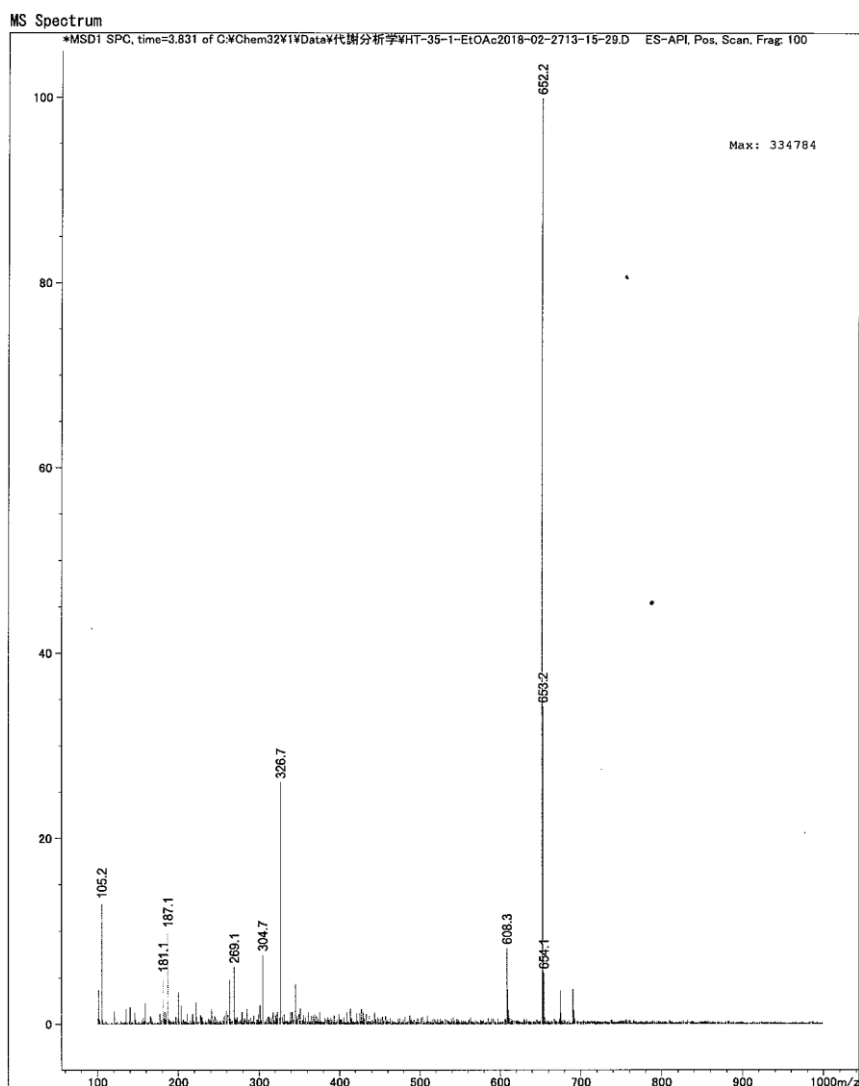


Figure S15. Mass spectra of *N*-(5-((4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-iodonicotinamide

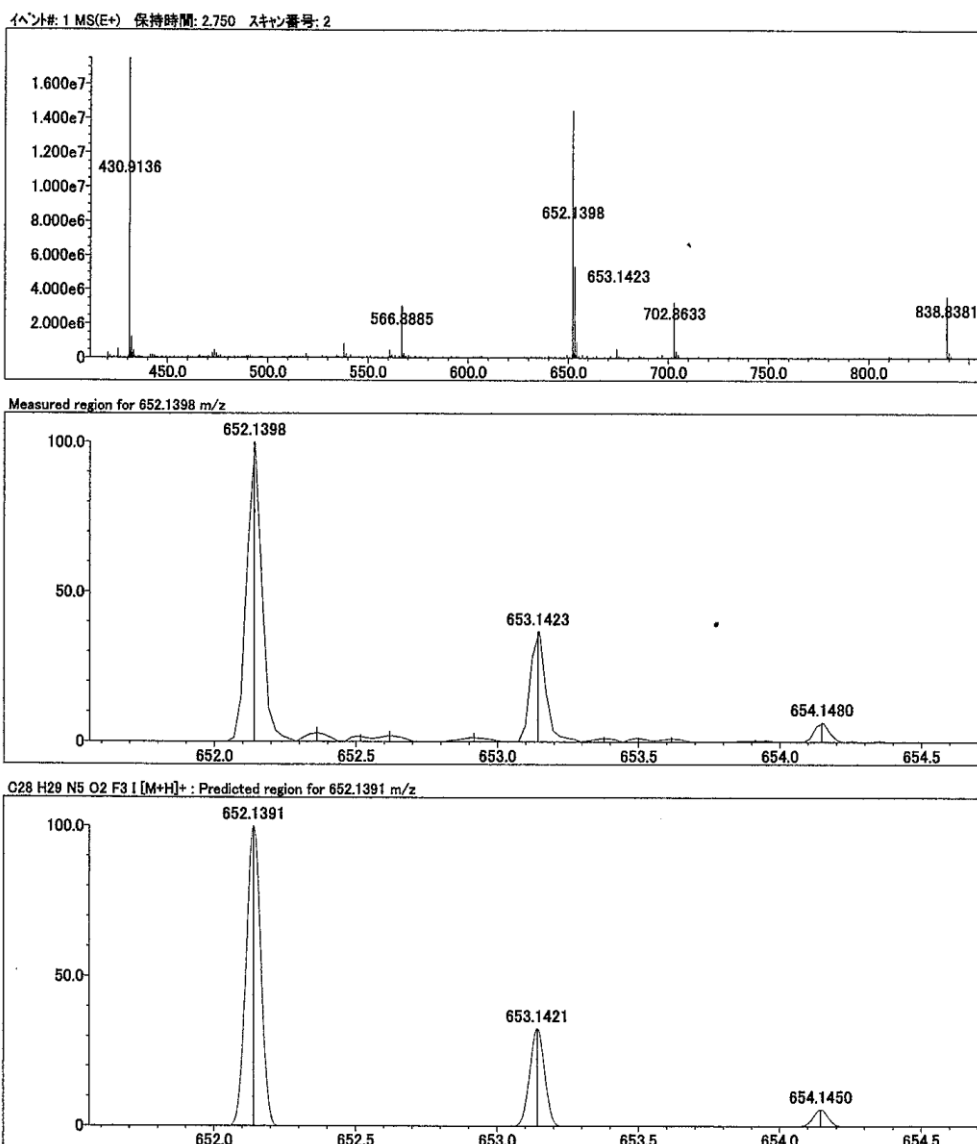


Figure S16. HRMS of *N*-(5-((4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-iodonicotinamide

*N*-(5-((4-((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-(tributylstannyl)nicotinamide (7)

ETB (34.4 mg, 52  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in dioxane (1.5 mL), and hexabutyltin (60  $\mu\text{L}$ , 114  $\mu\text{mol}$ ) and bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride (3.6 mg, 5.2  $\mu\text{mol}$ ) were added to the solution. The mixture underwent three cycles of vacuum/filling with Ar gas and stirred at 105  $^{\circ}\text{C}$  for 7 h. The reaction mixture was filtered using Hyflo Super-Cel<sup>®</sup>, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative thin-layer chromatography using hexane in ethyl acetate to give **7** as a clear oil (43.1 mg, 79.1% yield). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.03 (m, 1H), 8.90 (br, 1H), 8.77 (m, 1H), 8.34 (dd,  $J = 1.4$  Hz, 2.3 Hz, 1H), 8.26 (br, 1H), 8.14 (br, 1H), 7.93-7.90 (m, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J = 1.9$  Hz, 8.0 Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 3.62 (s, 2H), 2.52 (br, 8H), 2.43 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.59-1.51 (m, 6H), 1.38-1.29 (m, 6H), 1.16 (m, 6H), 1.09 (t,  $J =$

7.3 Hz, 3H), 0.89 (t,  $J = 7.4$  Hz, 9H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.95, 165.06, 158.89, 147.24, 143.26, 137.98, 136.91, 135.31, 134.69, 133.44, 133.39, 131.21, 131.19, 129.58, 129.06 (q,  $J = 30.3$  Hz), 125.34, 124.06 (q,  $J = 273.9$  Hz), 123.30, 122.29, 117.66 (q,  $J = 6.4$  Hz), 57.79, 52.95 (2C), 52.80 (2C), 52.25, 28.94 (3C), 27.25 (3C), 17.90, 13.61 (3C), 11.84, 9.76 (3C). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  : 816.3 ([M+H<sup>+</sup>]), HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  : 816.3508 ([M+H<sup>+</sup>]) (calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_2\text{Sn}$  : 816.3489)

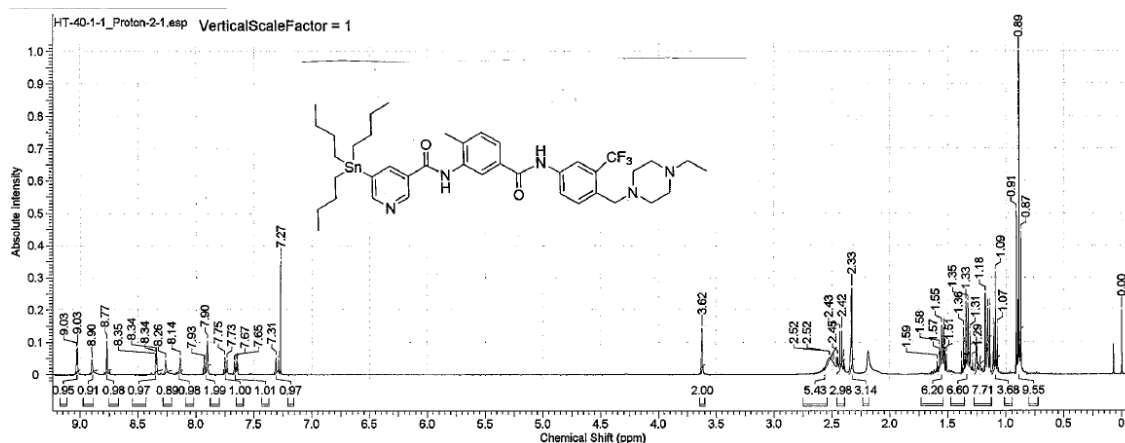


Figure S17.  $^1\text{H-NMR}$  spectra (400 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of *N*-(5-(((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-(tributylstannyl)nicotinamide

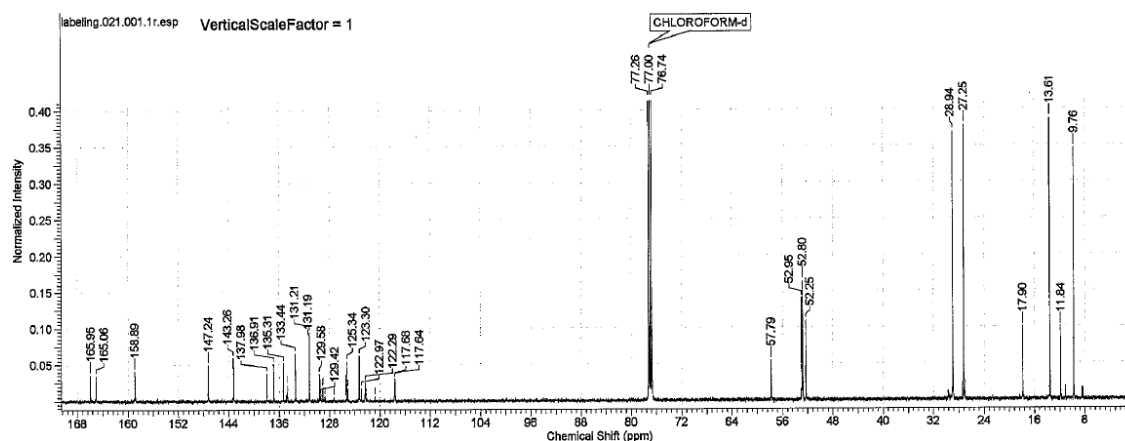


Figure S18.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra (126 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  of *N*-(5-(((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-(tributylstannyl)nicotinamide



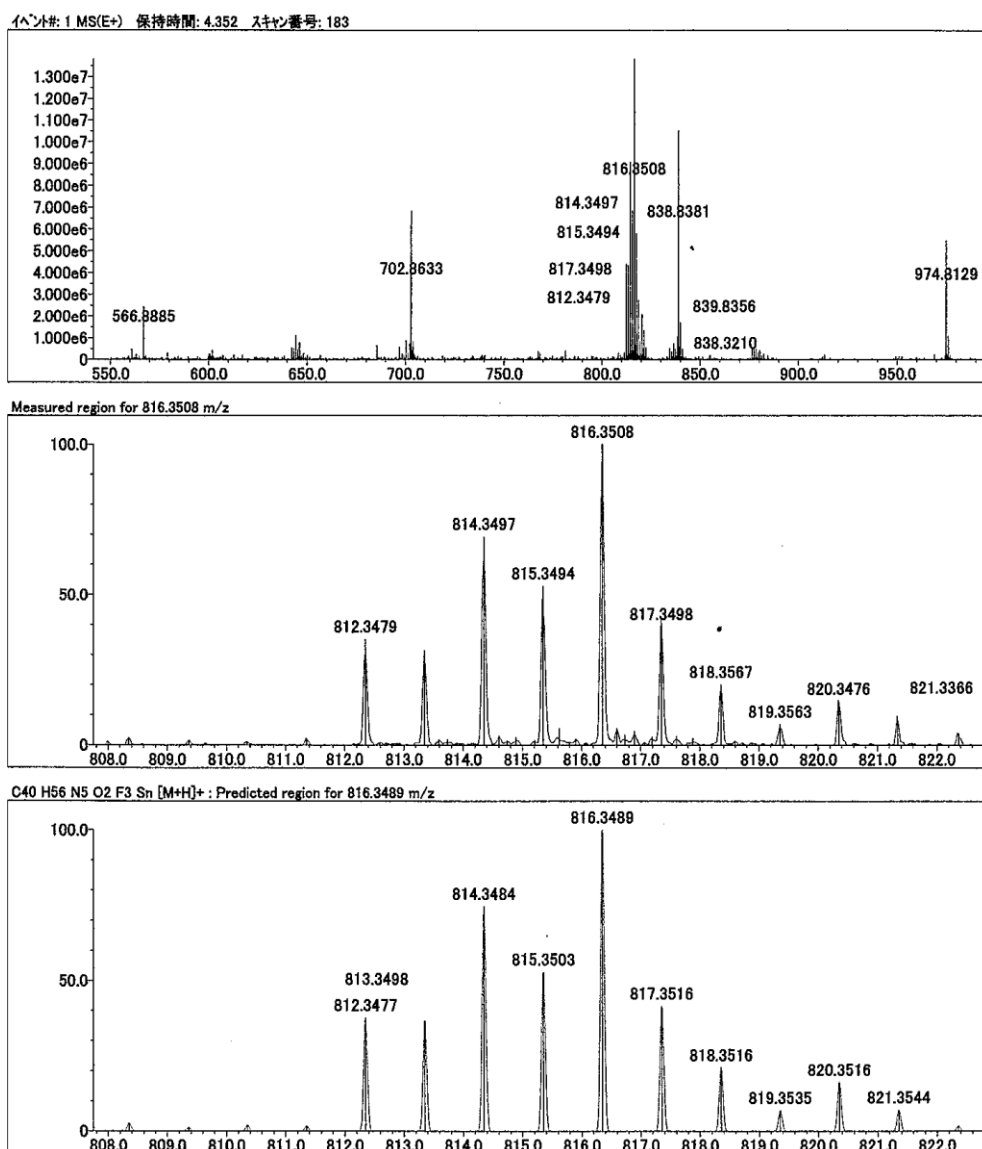


Figure S20. HRMS of *N*-(5-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-(tributylstannyl)nicotinamide

### EphA2 receptor kinase inhibition assay

The inhibition of EphA2 receptor was examined by using an EphA2 receptor Kinase Enzyme System (Catalog #:VA7441, Promega, Wisconsin, USA) and ADP-Glo<sup>TM</sup> Kinase Assay Kit (Catalog #: V9101, Promega), which quantify the amount of ADP produced from the kinase reaction by depleting the remaining ATP, followed by regeneration of the consumed ADP to ATP. The amount of regenerated ATP is measured based on the luminescence signal from luciferin. The experiment was done according to the Kinase Enzyme System protocol. In brief, inhibitor compounds in various concentrations were combined with recombinant EphA2 receptor kinase (25.6 ng) diluted in a reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH = 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, and 0.1 mg/mL BSA). After incubation for 10 min at 22-25 °C, ATP (10 μM) was added to start the kinase reaction. The reaction was done at 22-25 °C for 120 min in a total volume of 10 μL (2 μL of inhibitors, 4 μL of EphA2 receptor kinase solution, and 4

$\mu\text{L}$  of ATP). To stop the reaction, 10  $\mu\text{L}$  of ADP-Glo Reagent was added and incubated at 22-25 °C for 40 min, following which 20  $\mu\text{L}$  of Kinase Detection Reagent was added for a further 60 min of incubation. Luminescence was measured by using a plate reader (infinite F200Pro, TECAN, Männedorf, Switzerland), and  $\text{IC}_{50}$  values were calculated from the inhibition curve by using the GraphPad Prism software (version 5.03 for Windows; GraphPad, Inc., California, USA).

### **Radiosynthesis of [ $^{125}\text{I}$ ]ETB and [ $^{123}\text{I}$ ]ETB**

Radioactive [ $^{125}\text{I}$ ]ETB and [ $^{123}\text{I}$ ]ETB were prepared from the corresponding tributyltin derivatives by iododestannylation. After tributyltin derivatives (100  $\mu\text{g}$ ) was dissolved methanol (100  $\mu\text{L}$ ), solvent (methanol/acetic acid = 80:20, 50  $\mu\text{L}$ ) and *N*-chlorosuccinimide (1 mg) was added to the precursor solution. Sodium [ $^{125}\text{I}$ ]iodide (4.3 MBq) or sodium [ $^{123}\text{I}$ ]iodide (155.9 MBq) was added and the mixture was shaken at 20-25 °C for 30 min. After adding water (100  $\mu\text{L}$ ) for stopping the reaction, the mixture was purified by preparative-HPLC (water with 0.1% trifluoroacetic acid: methanol with 0.1% trifluoroacetic acid = 50:50, gradually adjusted to 10:90 over 20 min) to give [ $^{125}\text{I}$ ]ETB (2.9–3.1 MBq) and [ $^{123}\text{I}$ ]ETB (25.6–59.1 MBq). After incubation at 20-25 °C for 1 min, sterile water was added to a final volume of 100 mL, and the product was subsequently purified using a Sep-Pak Light C18 Cartridge (Waters, Massachusetts, USA). Diluted solution (100 mL) was applied to a Sep-Pak Light C18 Cartridge activated with EtOH (10 mL) and water (10 mL). After washing with water (10 mL), [ $^{125}\text{I}$ ]ETB or [ $^{123}\text{I}$ ]ETB were eluted from the Sep-Pak Light C18 Cartridge with EtOH (400  $\mu\text{L}$ ). The solvent was concentrated under  $\text{N}_2$  gas, and the [ $^{125}\text{I}$ ]ETB and [ $^{123}\text{I}$ ]ETB solution were diluted with saline. The isolated radiochemical yield was measured using a curiemeter. Radiochemical purity was determined by analytical radio-HPLC using the same condition described above.

### ***In vitro* stability of [ $^{123}\text{I}$ ]ETB in mouse plasma**

Plasma was collected from 6-week-old male BALB/c *Slc-nu/nu* mice. [ $^{123}\text{I}$ ]ETB (1.2 MBq/3  $\mu\text{L}$ ) was mixed plasma (25  $\mu\text{L}$ ) and incubated in 37 °C. The mixtures were incubated at 37 °C for 0, 120 and 240 min, and mixed acetonitrile and centrifuged at 2,300 $\times g$  for 10 min at 4 °C. The supernatants were analyzed by radio-TLC (25 Aluminium TLC silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, German) with condition of chloroform: methanol = 5:1. ARG was carried out Typhoon FLA 9500 BGR (GE health care, Little chalfont, U.K.).

### **Cell culture**

The glioma cell line U87MG were obtained from European Collection of Authenticated Cell Cultures (London, UK). Cells were grown in Eagle's minimal essential medium (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) supplemented with 10% FBS (Biowest, Nuaillé, France), 2 mM L-glutamine (Nacalai Tesque Inc), 1 mM pyruvic acid (Nacalai Tesque Inc), non-essential amino acid (Nacalai Tesque Inc) and penicillin- Streptomycin (Nacalai Tesque Inc) were cultured under 5%  $\text{CO}_2$  and 95% ambient air at 37 °C.

### **Cell-binding assay (Uptake study, Blocking study)**

U87MG cells (approximately  $5 \times 10^5$ /well) were seeded in 24-well plates containing growth medium and were incubated at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>, until 60% confluent. Uptake study: The medium was aspirated and replaced with 1.5 mL of FBS-free medium. Cells were then treated with [<sup>125</sup>I]ETB (3.7 kBq) 10 min later. Blocking study: The medium was aspirated and replaced with 1.0 mL of FBS-free medium containing ALW-II-41-27 at a final concentration of 0.1 μM in DMSO (0.5 μL/well). Cells were then cotreated with [<sup>125</sup>I]ETB (3.7 kBq) and ALW-II-41-27 (0.1 μM) 60 min later. After 60 min or 120 min of additional incubation, the radioactive medium was aspirated and the plate was washed twice with 0.5 mL of cold PBS. Counts containing radioactive medium and PBS were designated as C<sub>out</sub>. The cellular fraction was lysed with 0.1 M NaOH, and the protein concentration was calculated by BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Radioactivity counts of the lysis solution and PBS were defined as C<sub>in</sub>. Radioactivity of each fraction was measured using a γ-counter. CUR was calculated using the formula  $C_{in}/(C_{in} + C_{out})$ .

### **Animal model**

The animal studies were approved by the Bioscience Research Center at the Kyoto Pharmaceutical University and performed according to the Guidelines for Animal Experimentation at the Kyoto Pharmaceutical University. Five-week-old male BALB/c Slc-*nu/nu* mice were obtained from Japan SLC (Shizuoka, Japan). For each BALB/c Slc-*nu/nu* mouse,  $2 \times 10^6$  U87MG glioblastoma cells in 100 μL consist of Matrigel Matrix (Corning Incorporated, Arizona, USA):PBS=1:1 were inoculated subcutaneously into the right thigh. The tumor reached an approximate volume of 300 mm<sup>3</sup> after 28-35 days. The mice were used for *ex vivo* biodistribution study and SPECT/CT imaging experiments.

### **Biodistribution study in U87MG tumor-bearing mice**

Biodistribution study using [<sup>125</sup>I]ETB was conducted in U87MG tumor-bearing mice. 37 kBq [<sup>125</sup>I]ETB in 100 μL saline with 0.1% Tween80 was administered to the mice intravenously through the tail vein without anesthesia using a mouse holder. At 30, 60, 120, and 240 min after administration, the mice were euthanized by exsanguination. The following organs were removed for analysis: blood, brain, thyroid, heart, lung, liver, pancreas, spleen, kidneys, stomach, intestines (small and large), skeletal muscles and tumor. Tissue samples were weighed, and radioactivity was determined using an auto-well γ-counter. Tissue radioactivity levels were expressed as % ID/g or % ID of thyroid.

### **SPECT/CT Study**

For SPECT/CT study, tumor-bearing mice were intravenously injected with 33.62 MBq [<sup>123</sup>I]ETB in 140 μL saline with 0.1% Tween80. [<sup>123</sup>I]ETB (33.62 MBq/140 μL) was administered intravenously to non-anesthetized U87MG tumor-bearing mice, and the mice were maintained in a non-anesthetized

condition for 205 minutes after administration. SPECT/CT images were obtained using X-CUBE and  $\gamma$ -CUBE scanners (MOLECUBES, Ghent, Belgium). Mice were anesthetized using isoflurane/O<sub>2</sub> (5% for induction, 1.5%-2% for maintenance), and their body temperature was kept constant with an integrated heating circuit. At 205 min after administration, CT imaging was performed for 5min and SPECT imaging was performed for 60 min after CT imaging. The SPECT images were acquired using helical-orbit scan with linear-stage motion and step-and-shoot camera motion. A multi-lofthole collimator (GPmouse, 48 loftholes) was mounted in a heptagonal SPECT system, and the following parameters were used for SPECT scan: an <sup>123</sup>I energy window (27 keV +/- 20 % and 159 keV +/- 10 %), 237 projections, an 18° angle increment with a 1 mm bed step, and a 60 min acquisition time. SPECT projection data were reconstructed using 3D maximum likelihood- expectation maximization (ML-EM) algorithm (15 iterations) at an isotropic voxel size of 250  $\mu$ m. CT images were subsequently acquired using helical scan with the following acquisition parameters: an X-ray source setting of 50 kVp/100  $\mu$ A, 480 projections, a 1.4 spiral pitch, resulting in a 1 min acquisition time. CT projections were reconstructed using an ISRA algorithm that yielded a 0.1 mm  $\times$  0.1 mm  $\times$  0.1 mm voxel size and 400  $\times$  400  $\times$  975 image volume. Image analysis was performed using the VivoQuant software (version 4.0 patch1, inviCRO, LLC, Boston, MA, USA).

### **Statistics**

Student's t-test was performed for blocking distribution using XLSTAT (Addinsoft, New York, NY, USA). The data points represent the mean of at least triplicate measurements with error bars corresponding to the SD.



## 引用文献

- 1) 厚生労働省 令和 2 年度 (2020) 人口動態統計 (確定数) の概況  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei20/index.html> 2023 年 1 月 26 日
- 2) がん細胞の特性 | 国際遺伝子免疫薬学会 (igi.or.jp) 2023 年 1 月 26 日
- 3) FDG スキャン注 (pmda.go.jp) 2023 年 1 月 26 日
- 4) <https://www.jsrt-tohoku.jp/cms/wp-content/uploads/2017/04/74fe286a0514b597b1e0026f2c2c3bbb>
- 5) 日本で承認・発売中の分子標的薬一覧【2022/1 更新】 - GOROKICHI Co. ゴロ吉商事  
2023 年 1 月 26 日
- 6) Hirai, H.; Maru, Y.; Hagiwara, K.; Nishida, J.; Takaku, F. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science*. **1987**, 238, 1717–1720.
- 7) Nicholas, W. G.; George, D. Y. Ephrins and their receptors: a repulsive topic? *Cell Tissue Res*. **1997**, 290, 227–241.
- 8) Miao, H.; Wang, B. Eph/ephrin signaling in epithelial development and homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, 41, 762–770.
- 9) Zhou, Y.; Sakurai, H. Emerging and diverse functions of the ephA2 noncanonical pathway in cancer progression. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 1616–1624.
- 10) Wilkinson, D. G. Interplay of Eph-Ephrin signalling and cadherin function in cell segregation and boundary formation. *Front. Cell. Dev. Biol.* **2021**, 5, 784039.
- 11) Pasquale, E. B. eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*. **2008**, 133, 38–52.
- 12) Sahoo, A. R.; Buck, M. Structural and functional insights into the transmembrane domain association of eph receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 8593.
- 13) Yamaguchi, Y.; Pasquale, E.B. Eph receptors in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, 14, 288–296.
- 14) Kaushansky, A.; Douglass, A. N.; Arang, N.; Vigdorovich, V.; Dambrauskas, N.; Kain, H. S.; Austin, L. S.; Sather, D. N.; Kappe, S. H. I. Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. *Science*. **2015**, 350, 1089–1092.
- 15) Konstantinova, I.; Nikolova, G.; Ohara-Imaizumi, M.; Meda, P.; Kucera, T.; Zarbalis, K.; Wurst, W.; Nagamatsu, S.; Lammert, E. EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell*. **2007**, 129, 359–370.
- 16) Pasquale, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. *Nat. Rev. Cancer*. **2010**, 10, 165–180.
- 17) Miao, H.; Li, D. Q.; Mukherjee, A.; Guo, H.; Petty, A.; Cutter, J.; Basilion, J. P.; Sedor, J.; Wu, J.; Danielpour, D.; Sloan, A. E.; Co-hen, M. L.; Wang, B. EphA2 Mediates Ligand-Dependent Inhibition and Ligand-Independent Promotion of Cell Migration and Invasion via a Reciprocal Regulatory Loop With Akt. *Cancer Cell*. **2009**, 16, 9–20.
- 18) Zeng, G.; Hu, Z.; Kinch, M. S.; Pan, C. X.; Flockhart, D. A.; Kao, C.; Gardner, T. A.; Zhang,

- S.; Li, L.; Baldrige, L. A.; Koch, M. O.; Ulbright, T. M.; Eble, J. N.; Cheng, L. High-level expression of EphA2 receptor tyrosine kinase in prostatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* **2003**, 163, 2271–2276.
- 19) Nasreen, N.; Mohammed K. A.; Antony V. B. Silencing the receptor EphA2 suppresses the growth and haptotaxis of malignant mesothelioma cells. *Cancer.* **2006**, 107, 2425–2435.
  - 20) Miyazaki, T.; Kato, H.; Fukuchi, M.; Nakajima, M.; Kuwano, H. EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* **2003**, 103, 657–663.
  - 21) Wykosky, J.; Gibo, D. M.; Stanton, C.; Debinski, W. EphA2 as a novel molecular marker and target in glioblastoma multiforme. *Mol. Cancer Res.* **2005**, 3, 541–551.
  - 22) Merritt, W. M.; Thaker, P. H.; Landen, C. N. Jr; Deavers, M. T.; Fletcher, M. S.; Lin, Y. G.; Han, L. Y.; Kamat, A. A.; Schmandt, R.; Gershenson, D. M.; Kinch, M. S.; Sood, A. K. Analysis of EphA2 expression and mutant p53 in ovarian carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **2006**, 5, 1357–1360.
  - 23) Duxbury, M. S.; Ito, H.; Zinner, M. J.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene.* **2004**, 23, 1448–1456.
  - 24) Noblitt, L. W.; Bangari, D. S.; Shukla, S.; Mohammed, S.; Mittal, S. K. Immunocompetent mouse model of breast cancer for preclinical testing of EphA2-targeted therapy. *Cancer Gene Ther.* **2005**, 12, 46–53.
  - 25) Kou, C. T. J.; Kandpal, R. P. Differential expression patterns of Eph receptors and ephrin ligands in human cancers. *Biomed. Res. Int.* **2018**, 2018, 7390104.
  - 26) Huang, F.; Reeves, K.; Han, X.; Fairchild, C.; Platero, S.; Wong, T. W.; Lee, F.; Shaw, P.; Clark, E. Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer Res.* **2007**, 67, 2226–2238.
  - 27) Wang, X. D.; Reeves, K.; Luo, F. R.; Xu, L. A.; Lee, F.; Clark, E.; Huang, F. Identification of candidate predictive and surrogate molecular markers for dasatinib in prostate cancer: rationale for patient selection and efficacy monitoring. *Genome Biol.* **2007**, 8, R255.
  - 28) Tandon, M.; Vemula, S. V.; Mittal, S. K. Emerging strategies for ephA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets.* **2011**, 15, 31–51.
  - 29) Macrae, M.; Neve, R. M.; Viciano, P. R.; Haqq, C.; Yeh, J.; Chen, C.; Gray, J. W.; McCormick, F. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. *Cancer Cell.* **2005**, 8, 111–118.
  - 30) Zelinski, D. P.; Zantek, N. D.; Stewart, J. C.; Irizarry, A. R.; Kinch, M. S. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **2001**, 61, 2301–2306.
  - 31) Nikas, I.; Giaginis, C.; Petrouska, K.; Alexandrou, P.; Michail, A.; Sarantis, P.; Tsourouflis, G.; Danas, E.; Pergaris, A.; Politis, P. K.; Nakopoulou, L.; Theocharis, S. EPHA2, EPHA4, and

- EPhA7 expression in triple-negative breast cancer. *Diagnostics*. **2022**, 12, 366.
- 32) Faoro, L.; Singleton, P. A.; Cervantes, G. M.; Lennon, F. E.; Choong, N. W.; Kanteti, R.; Ferguson, B. D.; Husain, A. N.; Tretiakova, M. S.; Ramnath, N.; Vokes, E. E.; Salgia, R. EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 18575-18585.
- 33) Xiao, T.; Xiao, Y.; Wang, W.; Tang, Y. Y.; Xiao, Z.; Su, M. Targeting EphA2 in cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, 13, 113
- 34) Mudd, G. E.; Brown, A.; Chen, L.; van Rietschoten, K.; Watcham, S.; Teufel, D. P.; Pavan, S.; Lani, R.; Huxley, P.; Bennett, G. S. Identification and optimization of EphA2-selective bicycles for the delivery of cytotoxic payloads. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 4107–4116.
- 35) Cai, W.; Ebrahimnejad, A.; Chen, K.; Cao, Q.; Li, Z. B.; Tice, D. A.; Chen, X. Quantitative radioimmunoPET imaging of EphA2 in tumor-bearing mice. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2007**, 34, 2024–2036.
- 36) Burvenich, I. J. G.; Parakh, S.; Gan, H. K.; Lee, F. T.; Guo, N.; Rigopoulos, A.; Lee, S. T.; Gong, S.; O’Keefe, G. J.; Tochon-Danguy, H.; Kotsuma, M.; Hasegawa, J.; Senaldi, G.; Scott, A. M. Molecular imaging and quantitation of EphA2 expression in xenograft models with <sup>89</sup>Zr-DS-8895a. *J. Nucl. Med.* **2016**, 57, 974–980.
- 37) Gravina, G. L.; Mancini, A.; Colapietro, A.; Monache, S. D.; Sferra, R.; Vitale, F.; Cristiano, L.; Martellucci, S.; Marampon, F.; Mattei, V.; Beirinckx, F.; Pujuguet, P.; Saniere, L.; Lorenzon, G.; van der Aar, E.; Festuccia, C. The small molecule ephrin receptor inhibitor, GLPG1790, reduces renewal capabilities of cancer stem cells, showing anti-tumour efficacy on preclinical glioblastoma models. *Cancers*. **2019**, 11, 359.
- 38) Festuccia, C.; Gravina, G. L.; Giorgio, C.; Mancini, A.; Pellegrini, C.; Colapietro, A.; Monache, S. D.; Maturo, M. G.; Sferra, R.; Chiodelli, P.; Rusnati, M.; Cantoni, A.; Castelli, R.; Vacondio, F.; Lodola, A.; Tognolini, M. UniPR1331, a small molecule targeting Eph/ephrin interaction, prolongs survival in glioblastoma and potentiates the effect of antiangiogenic therapy in mice. *Oncotarget*. **2018**, 11, 24347–24363.
- 39) Murakoshi, M.; Iwasawa, T.; Koshida, T.; Suzuki, Y.; Gohda, T.; Kato, K. Development of an in-house EphA2 ELISA for human serum and measurement of circulating levels of EphA2 in hyper-tensive patients with renal dysfunction. *Diagnostics*. **2022**, 12, 3023.
- 40) ルタテラ静注<sup>®</sup> (pmda.go.jp) 2023年2月22日
- 41) Miao, B.; Ji, Z.; Tan, L.; Taylor, M.; Zhang, J.; Choi, H. G.; Frederick, D. T.; Kumar, R.; Wargo, J. A.; Flaherty, K. T.; Gray, N. S.; Tsao, H. EphA2 is a mediator of Vemurafenib resistance and a novel therapeutic target in melanoma. *Cancer Discov.* **2015**, 5, 274–287.
- 42) Ishigaki, H.; Minami, T.; Morimura, O.; Kitai, H.; Horio, D.; Koda, Y.; Fujimoto, E.; Negi, Y.; Nakajima, Y.; Niki, M.; Kanemura, S.; Shibata, E.; Mikami, K.; Takahashi, R.; Yokoi, T.; Kuribayashi, K.; Kijima, T. EphA2 inhibition suppresses proliferation of small-cell lung cancer

- cells through inducing cell cycle arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 519, 846–853.
- 43) Baron, M. G.; Holzer, P.; Billy, E.; Schnell, C.; Brueggen, J.; Ferretti, M.; Schmiedeberg, N.; Wood, J. M.; Furet, P.; Imbach, P. The small molecule specific EphB4 kinase inhibitor NVP-BHG712 inhibits VEGF driven angiogenesis. *Angiogenesis.* **2010**, 13, 259–267.
- 44) Martini, G. et al, EphA2 is a predictive biomarker of resistance and a potential therapeutic target for improving antiepidermal growth factor receptor therapy in colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, 18, 845–855.
- 45) Amato, K. R. et al, Genetic and pharmacologic inhibition of EphA2 promotes apoptosis in NSCLC. *J. Clin. Invest.* **2014**, 14, 2037–2049.
- 46) Molecular Operating Environment, 2022.01; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2022.
- 47) Heinzlmeir, S.; Lohse, J.; Treiber, T.; Kudlinzki, D.; Linhard, V.; Gande, S. L.; Sreeramulu, S.; Saxena, K.; Liu, X.; Wilhelm, M.; Schwalbe, H.; Kuster, B.; Medard, G. Chemoproteomics-aided medicinal chemistry for the discovery of EPHA2 inhibitors. *ChemMedChem.* **2017**, 12, 999-1011.
- 48) Zhang, C. H.; Zheng, M. W.; Li, Y. P.; Lin, X. D.; Huang, M.; Zhong, L.; Li, G. B.; Zhang, R. J.; Lin, W. T.; Jiao, Y.; Wu, X. A.; Yang, J.; Xiang, R.; Chen, L. J.; Zhao, Y. L.; Cheng, W.; Wei, Y. Q.; Yang, S. Y. Design, synthesis, and structure–activity relationship studies of 3-(phenylethynyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-amine derivatives as a new class of Src inhibitors with potent activities in models of triple negative breast cancer. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 3957–3974.
- 49) Terai, H.; Tan, L.; Beauchamp, E. M.; Hatcher, J. M.; Liu, Q.; Meyerson, M.; Gray, N. S.; Hammerman, P. S. Characterization of DDR2 inhibitors for the treatment of DDR2 mutated non-small cell lung cancer. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 2687–2696.
- 50) Choi, Y.; Syeda, F.; Walker, J. R.; Finerty, P. J. Jr.; Cuerrier, D.; Wojciechowski, A.; Liu, Q.; Paganon, D. S.; Gray, N. S. Discovery and structural analysis of Eph receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4467–4470.
- 51) Saji, H.; Kimura, H.; Matsumoto, H. Preparation of 2-(3-pyridinyl)-1*H*-benzimidazole derivatives as radiodiagnostic agents. Patent No. JP 2015193545.

## 謝辞

本研究の終わりに臨み、本研究を行うに際し終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学大学院薬学研究科代謝分析学分野 安井 裕之 教授に衷心より感謝の意を表します。

本研究の遂行及び本論文の作成において終始懇切なる御指導と御教示を賜りました京都薬科大学大学院薬学研究科代謝分析学分野 木村 寛之 准教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言とご協力、懇切なる御指導を戴きました、京都薬科大学大学院薬学研究科放射性同位元素研究センター 河嶋 秀和 准教授、同代謝分析学分野 屋木 祐亮 研究員（現、京都医療科学大学 医療科学部 助教）及び有光 健治 助教（現、大阪大谷大学薬学部薬学科 助教）に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、抗体の作成、評価を行って戴き、また、有益な御助言とご協力を戴きました、東洋大学理工学部生体医工学科 加藤 和則 教授、岩澤 卓弥 博士研究員、山田 拓武 修士に厚く御礼申し上げます。

また、副査として本論文の審査を引き受けて頂きました京都薬科大学大学院薬学研究科薬剤学分野 山本 昌 教授、同薬品分析学分野 武上 茂彦 教授に深く感謝致します。

本研究において質量分析を行っていただきました京都薬科大学共同利用機器センター 服部 恭尚 講師に深く感謝致します。

本研究の遂行にご協力戴きました、京都薬科大学大学院薬学研究科代謝分析学分野 内藤 行喜 助教に深く感謝申し上げます。

最後に、研究に励めるように支え、応援して戴いた代謝分析学分野の大学院生、学部生諸氏、家族、友人に感謝申し上げます。