

がん治療を指向した

2-fluorinated 2-deoxyglucoside 連結白金(II)錯体の創製ならびに抗腫瘍効果

および体内分布特性に関する研究

2023 年度

京都薬科大学大学院 博士課程学位論文

【薬学】代謝分析学分野

面川真里奈

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。また本論文は、一部、未発表データを含んでいる。

1. Marina Omokawa, Hiroyuki Kimura, Kenji Arimitsu, Yusuke Yagi, Yasunao Hattori, Hidekazu Kawashima, Yuki Naito, Hiroyuki Yasui. Synthesis and biological evaluation of a novel sugar-conjugated platinum(II) complex having a tumor-targeting effect. *ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. doi :10.1021/acsomega.3c06922 [第 1 章]
2. Marina Omokawa, Hiroyuki Kimura, Yuichi Hatsukawa, Hidekazu Kawashima, Kazuaki Tsukada, Yusuke Yagi, Yuki Naito, Hiroyuki Yasui. Production and synthesis of a novel <sup>191</sup>Pt-labeled platinum complex and evaluation of its biodistribution in healthy mice. *Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 97, 117557. doi :10.1016/j.bmc.2023.117557 [第 2 章]

## 目次

### 略語一覧表

序論	1
第1章 新規糖連結白金(II)錯体 (FGC-Pt) の開発	5
第1節 緒言	5
第2節 結果と考察	6
1. FGC-Pt の合成	6
2. HeLa 細胞および A549 細胞における FGC-Pt の細胞毒性評価	10
3. HeLa 細胞における Pt の細胞内取り込み評価	13
4. FGC-Pt のマウス血漿中での化学構造の安定性評価	15
5. 健常マウスおよび A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した FGC-Pt の体内分布の 評価	16
6. A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した FGC-Pt の抗腫瘍効果の評価	19
第3節 小括	23
第2章 $^{191}\text{Pt}$ 標識新規糖連結白金(II)錯体 ( $^{191}\text{Pt}$ FGC-Pt) の開発	24
第1節 緒言	24
第2節 結果と考察	25
1. $^{191}\text{Pt}$ FGC-Pt (method A) の精製と分析	25
2. $^{191}\text{Pt}$ FGC-Pt (method B) の合成と分析	29
3. 健常マウスにおける FGC-Pt と $^{191}\text{Pt}$ FGC-Pt の体内分布の比較	31
第3節 小括	34
総括	35
実験項	37
第1章の実験方法・材料	37
1. General information	37
2. 化合物の合成	38
3. 細胞培養	40
4. 細胞毒性評価	40
5. ウェスタンブロット法による GLUT1 の発現量の評価	40
6. 細胞内 Pt 取り込み評価	41
7. マウス血漿中における FGC-Pt の化学構造の安定性評価	41
8. 健常マウスおよび A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した FGC-Pt の体内分布の 評価	41

9. A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した FGC-Pt の抗腫瘍効果の評価.....	42
10. 統計解析.....	42
第 2 章の実験方法・材料.....	43
1. General information.....	43
2. $^{191}\text{Pt}$ の製造.....	43
3. $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ (method A) の精製と分析.....	43
4. $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ (method B) の合成と分析.....	44
5. 健常マウスにおける FGC-Pt と $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ の体内分布の比較.....	44
6. 統計解析.....	44
化合物の NMR スペクトルと HR-MS スペクトル.....	45
引用文献.....	57
謝辞.....	61

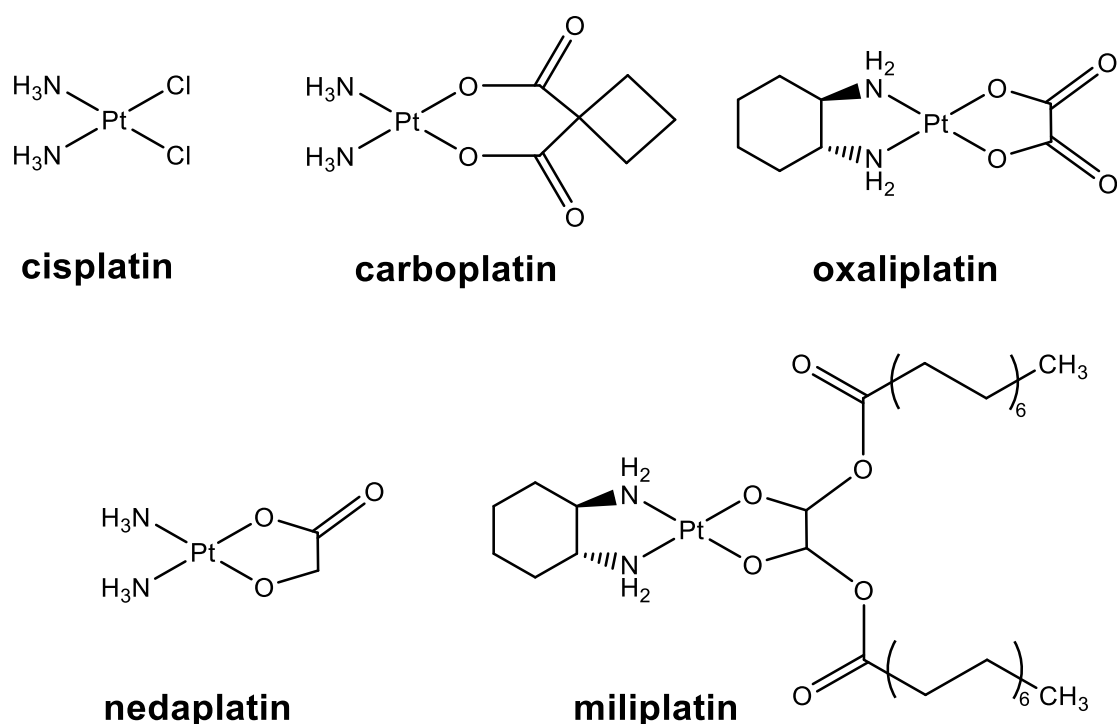
## 略語一覧表

ATP	: adenosine triphosphate
CCl <sub>3</sub> CN	: trichloroacetonitrile
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: dichloromethane
COSY	: correlation spectroscopy
DAST	: <i>N,N</i> -diethylaminosulfur trifluoride
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undecene
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DNA	: deoxyribonucleic acid
D <sub>2</sub> O	: deuterium oxide
EDG	: 6- <i>O</i> -ethylidene- $\alpha$ -D-glucopyranose
EDS	: electrostatic-discharge material
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
E-MEM	: eagle's minimal essential medium
ESI-MS	: electrospray ionization mass spectrometry
FDA	: food and drug administration
[ <sup>18</sup> F]FDG	: [ <sup>18</sup> F]2-deoxy-2-fluoro-D-glucose
GLUT	: glucose transporter
HMQC	: heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	: high performance liquid chromatography
HR-MS	: high resolution mass spectrometry
HSQC	: heteronuclear single quantum correlation
ICP-MS	: inductively coupled plasma mass spectrometry
IC <sub>50</sub>	: half-maximal inhibitory concentration
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	: potassium tetrachloroplatinate(II)
LR-MS	: low resolution mass spectrometry
MATE	: multidrug and toxin extrusion
MeOH	: methanol
MTS	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
NaN <sub>3</sub>	: sodium azide
NaOMe	: sodium methoxide
NMR	: nuclear magnetic resonance
OCT	: organic cation transporter
PBS	: phosphate-buffered saline
Pd/c	: palladium on carbon
PET	: positron emission tomography
q-NMR	: quantitative nuclear magnetic resonance

Radio-TLC	: TLC autoradiography
RT	: retention time
TFNA	: 4-(trifluoromethyl)nicotinic acid
THF	: tetrahydrofuran
TLC	: thin-layer chromatography
TMSOTf	: trimethylsilyltrifluoromethanesulfonate
UV	: ultra violet

## 序論

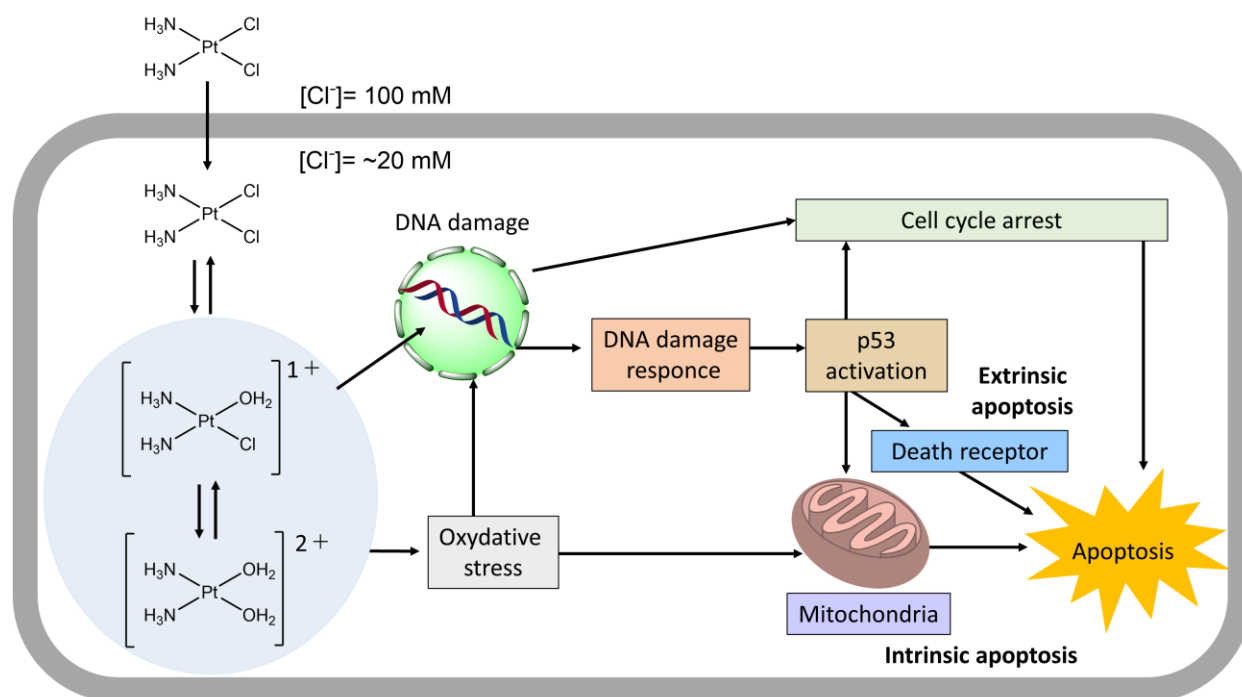
食品医薬品局 (FDA) により承認された白金系薬剤は、さまざまな固形がんの治療薬として世界中で広く使用されている。本邦では、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、ミリプラチンの5つの薬剤ががん治療薬として承認されている (Figure 1)。海外でのみ使用が認められているのは、ロバプラチン、ヘプタプラチンの2種類である<sup>1,2</sup>。中でもシスプラチンは、膀胱がん、卵巣がん、頭頸部がん、肺がん、精巣がん、子宮頸がん、食道がん、乳がん、脳腫瘍などの患者の治療に使用され、癌腫、胚細胞腫瘍、リンパ腫、肉腫など多くの種類のがんに有効である。そのため、シスプラチンは臨床で最もよく使用される薬剤の一つであり、がん化学療法には不可欠である<sup>2-5</sup>。



**Figure 1.** The structure of platinum-based drugs which were approved in Japan.

シスプラチンの化学名は *cis*-diamminedichloridoplatinum(II)であり、正方形の平面構造を有する白金(II)錯体として知られている。シス配置配向に塩化物イオンとアンモニア分子の配位子を2つずつ有し、正味の電荷を持たない中性金属錯体であるため、受動輸送により細胞膜を容易に通過する<sup>4,6</sup>。さらに、有機カチオントランスポーター (OCT) もシスプラチンの細胞内への輸送に関与することが報告されている<sup>7</sup>。細胞質中の塩化物イオン濃度 (~20 mM) は血液中の塩化物イオン濃度 (100 mM) よりも低いため、白金 (Pt) に配位していた塩化物イオンは、細胞内で水分子に置換され、活性化体が生じる。この加水分解された生成物は、核内のプリン残基、特にグアニン塩基の N7 位に優先的に結合する。そして、デオキシリボ核酸 (DNA) との共有結合性付加

体の形成が、がん細胞内の DNA を損傷し、細胞周期を停止させることで、細胞分裂を阻害し、アポトーシス細胞死を引き起こす<sup>3-6,8-12</sup>。さらに、シスプラチンのよく知られている作用機序には、死受容体に関与する外因性アポトーシスと、ミトコンドリアが関与する内因性アポトーシスの誘導が含まれる<sup>4,8,9</sup>。したがって、シスプラチンは複数のメカニズムを通じて抗がん作用を示す (Figure 2)<sup>3-6,8-12</sup>。



**Figure 2.** Mechanisms by which cisplatin causes cell death.

シスプラチンと DNA との相互作用は、プリン塩基との共有結合性付加体の形成につながり、がん治療においてシスプラチンが有効性を発揮する要因となっている。一方で、共有結合性付加体の形成は、シスプラチンの細胞毒性の根本的な原因でもあり、吐き気、腎毒性、心毒性、肝毒性、神経毒性など様々な副作用を引き起こす<sup>5</sup>。そのため、既存の白金系薬剤はがん治療に有効ではあるが、腫瘍特異性に乏しく、重篤な副作用を引き起こすことが臨床上大きな問題になっている。また、他の白金系薬剤についても、シスプラチンが有する上記の欠点を改善するには至っていない<sup>1</sup>。したがって、白金系薬剤の非特異的な体内分布をより制御するため、腫瘍特異的な集積を達成できる白金錯体の開発が課題である<sup>1,13</sup>。

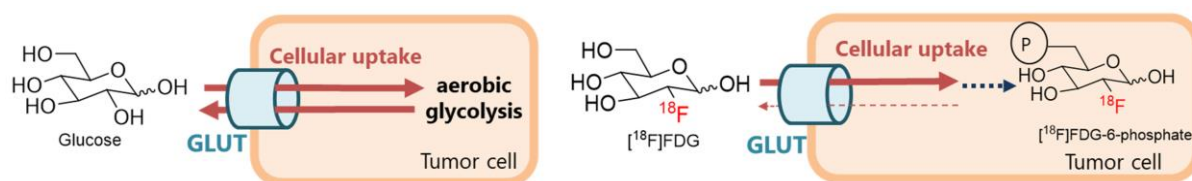
がん細胞は一般的に、悪性病変が有する低酸素環境下で生き残るために、正常細胞とは異なる糖代謝を示し、酸素の有無にかかわらず、ほとんどのグルコースを乳酸に変換し、エネルギー産生を解糖系に依存する傾向がある。この過程は、正常細胞とは異なり、好氣的解糖として知られている。また、好気性条件下で正常細胞が適応する酸化的リン酸化によるアデノシン三リン酸 (ATP) の生成量と比べ、がん細胞における好氣的解糖はグルコースから ATP を生成する量がはるかに少なく、ATP の生成効率が低い。その結果、増殖力の高いがん細胞では、エネルギー源と



なるグルコースの要求量が著しく増加するため、細胞膜上のグルコーストランスポーター (GLUT) の発現が亢進し、グルコースの取り込みが促進される<sup>1,14-18</sup>。この現象は、後にワールブルグ効果 (Warburg effect) と名付けられ、がんの特徴として知られている<sup>1,14-18</sup>。

ヒトにおいて14種類存在する GLUT は、配列の類似性によって3つのクラスに分類され、それぞれ、クラス1 (GLUT1-4, 14)、クラス2 (GLUT5, 7, 9)、クラス3 (GLUT6, 8, 10, 12, 13/HMIT) である。アミノ酸配列は、ヒトの GLUT1-5 の間で39-65%の同一性を示し、GLUT1 と他の全ての GLUT との間には少なくとも28%の同一性がある<sup>15</sup>。中でも GLUT1 は様々ながんで過剰発現している。患者由来の腫瘍サンプルにおける GLUT1 の高発現は、腫瘍の増殖活性や患者の生存率低下などの予後不良とよく相関している<sup>15-21</sup>。さらに、GLUT3 発現の増加は悪性度の高いがんを示すことが示唆されている<sup>18</sup>。したがって、がん細胞におけるグルコース摂取量の変化と GLUT の過剰発現は、がんによくみられることから、GLUT はがん治療において有効な標的分子となり得る<sup>19,21</sup>。また、診断と治療の両方における糖連結体の薬剤としての可能性は、がんの陽電子放出断層撮影 (PET) 診断で広く利用されている [<sup>18</sup>F]FDG の GLUT を介したがん組織への選択的な取り込みと蓄積によって裏付けられている<sup>21</sup>。それゆえ、がん細胞膜上に過剰発現した GLUT に注目し、白金錯体の担体として単糖を利用する薬剤開発の戦略は、白金錯体の腫瘍への選択性を高めるために有望であると考えられている。そこで、新規の糖連結白金(II)錯体誘導体の創製が近年活発に行われており、これまでに、白金錯体に単糖を導入することで、毒性が大幅に減少し、抗腫瘍効果が向上した報告もなされている<sup>21-28</sup>。

さらに、[<sup>18</sup>F]FDG は様々な種類のがんの診断、病期分類、モニタリングのために臨床で頻繁に使用される診断薬である<sup>29,30</sup>。静脈内注射後、[<sup>18</sup>F]FDG は GLUT を介して細胞内に入り、ヘキソキナーゼによってリン酸化され、[<sup>18</sup>F]FDG-6-リン酸を形成する。通常、リン酸化されたグルコースは、細胞内で解糖やグリコーゲン形成などの代謝過程を経て、グルコース-6-リン酸からフルクトース-6-リン酸へと異性化する。一方で、[<sup>18</sup>F]FDG-6-リン酸は、C-2 位に酸素原子を欠くため、それ以上の異性化が阻害される。さらに、ヘキソキナーゼ酵素活性の増加、および脱リン酸化に関与するグルコース-6-ホスファターゼ活性の相対的な低下などの要因も重なり、結果として、[<sup>18</sup>F]FDG-6-リン酸は細胞外に拡散することができず、ゆっくりと脱リン酸化を受ける。したがって、[<sup>18</sup>F]FDG は細胞内に捕捉され、蓄積する (Figure 3)<sup>16,31</sup>。この現象は、メタボリックトラッピングとして知られている。



**Figure 3.** The difference of metabolism between glucose and [<sup>18</sup>F]FDG in tumor cell.

よって、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  の特性に基づき、白金錯体の担体として、グルコースの 2 位にフッ素原子を有する 2-fluorinated 2-deoxyglucoside を利用することで、腫瘍へ Pt を特異的に集積させるだけでなく、Pt のがん細胞での滞留性を高め、治療効果の向上を目指すことが可能であると考えた。しかしながら、これまでの白金錯体の研究において、この概念を反映させた薬剤開発の戦略は行われていない。

そこで本研究では、前述の白金系薬剤の問題を解決するため、腫瘍特異的な集積による副作用の軽減を目指した新規白金錯体の開発に取り組むこととした。がん細胞がグルコースの取り込み量が高いことおよび  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  の特性を利用するために、白金錯体と 2-fluorinated 2-deoxyglucoside を結合させた新規糖連結白金(II)錯体 (cis-dichloro [(2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranosidyl) propane-1,3-diamino-2-propyl] platinum : FGC-Pt) の開発を計画した。

第 1 章では、FGC-Pt の設計と合成を行い、in vitro と in vivo において FGC-Pt の細胞毒性や体内分布特性、抗腫瘍効果の評価を実施することで FGC-Pt はがん治療薬としての可能性を有するか検討した。

一方で、同じ組織型や病期のがんであっても、白金系薬剤の治療効果には個人差が生じることが知られている。ゆえに、治療の最適化が必要であり、白金系薬剤の体内での薬物動態を把握するために、腫瘍組織やその他の臓器における Pt 濃度を非侵襲的、定量的に測定する方法の開発が求められている<sup>32,33</sup>。これまでに、放射性白金錯体や生体内蛍光 X 線 (XRF) 法を用いて、シスプラチンを含む既知の白金錯体のマウスやヒトにおける組織への取り込み、分布や動態について数多くの研究が行われてきた<sup>32-40</sup>。しかしながら、現在までのところ、抗腫瘍薬として開発段階にある新規の白金錯体について、全身の臓器における体内分布を評価する唯一の方法は、生検を用いて組織中の Pt 濃度を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 法や原子吸光度法などにより測定する侵襲的な方法であり、経時的かつ非侵襲的な解析法は存在しない。

そこで本研究では、ガンマ線イメージング技術を利用して、全身の臓器や組織への Pt の集積を経時的、定量的かつ非侵襲的に追跡することを目指して、第 1 章で開発した FGC-Pt の構造中に、半減期が短くトレーサー研究に有効なガンマ線放出核種である放射性白金を導入した放射性  $^{191}\text{Pt}$  標識 FGC-Pt ( $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ ) の開発を計画した。この技術と  $^{191}\text{Pt}$  標識体を利用して得られた画像データから、FGC-Pt の開発段階のみならず、FGC-Pt を用いてヒトのがん治療を行うことを想定した場合において、白金錯体により副作用が生じる可能性のある臓器の特定、薬剤が適応する患者の選定、最適な投与量の推定が可能になると考えられる。これらを達成できれば、患者の体質に合わせた治療計画の立案へと繋げることができ、将来的には個別化医療に役立てる可能性がある。

そのため、第 2 章では、 $^{191}\text{Pt}$  の製造法、放射性  $^{191}\text{Pt}$  標識 FGC-Pt ( $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ ) の合成法を先ず検討した。続いて、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  および FGC-Pt の体内分布データを定量的に比較することで、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  が FGC-Pt の薬物動態特性を追跡できるガンマ線イメージングプローブとして利用可能かを検証した。

## 第1章 新規糖連結白金(II)錯体 (FGC-Pt) の開発

### 第1節 緒言

シスプラチンを代表とする既存の白金系薬剤はがん化学療法に有効である一方、腫瘍特異性に乏しく、重篤な副作用が臨床上の問題であり、これらの問題を解決する新規白金系薬剤の開発が求められている。また、増殖力の高いがん細胞の細胞膜上では、GLUT の発現が亢進し、グルコースの取り込みが促進される。さらに 14 種類ある GLUT アイソフォームの中でも、GLUT1 は様々ながんで広く過剰発現しており、予後不良とよく相関する。ゆえに、GLUT はがん治療において有効な標的分子となり得る。上記のがん細胞の特徴を利用したがんの PET 用診断薬である [ $^{18}\text{F}$ ]FDG は、GLUT を介してがん細胞内に入り、リン酸化を受ける。しかし、グルコースとは異なりその後の糖代謝を受けず、がん細胞内で蓄積される。この [ $^{18}\text{F}$ ]FDG の特徴はメタボリックトラッピングといわれている。

そこで、著者は、白金系薬剤の非特異的な体内分布をより制御するため、がん細胞膜上に過剰発現した GLUT に注目し、白金錯体の担体として単糖を利用する薬剤開発の戦略を考えた。さらに、上述の [ $^{18}\text{F}$ ]FDG の有する糖代謝のメカニズムに基づき、白金錯体とグルコースの 2 位にフッ素原子を導入した 2-fluorinated 2-deoxyglucoside を結合させることで、Pt の腫瘍への滞留性を高め、治療効果が向上する可能性を考えた。

よって、第1章では、がん細胞がグルコースを多く取り込むこと、および [ $^{18}\text{F}$ ]FDG の特性を利用するために、白金錯体と 2-fluorinated 2-deoxyglucoside が結合した糖新規糖連結白金(II)錯体 (FGC-Pt) を設計・合成した。そして、FGC-Pt はこれらの薬剤開発の戦略が反映されたがん治療薬としての可能性を有するか検討するため、*in vitro* および *in vivo* において、がん細胞や担がんモデルマウスを使って細胞毒性、体内分布特性、および抗腫瘍効果の評価を実施した。

## 第2節 結果と考察

### 1. FGC-Pt の合成

白金錯体と 2-fluorinated 2-deoxyglucoside を結合させた新規化合物を設計する際、ワールブルグ効果を利用してがん細胞内への Pt の取り込みを促進し、さらに、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -6-リン酸のような代謝産物を細胞内で滞留させることにより細胞内での DNA への反応性を高め、治療効果を向上させることを目指した薬剤設計を試みた。これらを達成するために、シスプラチンのアンモニア分子のように、白金系薬剤の非脱離型の配位子側に糖を導入することを考えた。これまでに、2-glucopyranosidyl-1,3- propanediamine と 2 個の塩化物イオンを配位子とする糖連結白金錯体が報告されている<sup>28</sup>。また、Mikata らも、1,3-propanediamine と様々な糖が結合した同様の配位子を報告している<sup>41</sup>。そこで本研究では、1,3-propanediamine と 2-fluoro-2-deoxyglucose が結合した糖誘導体および 2 つの塩化物イオンからなる FGC-Pt の合成を計画した (Scheme 1)。

まず、市販の 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranose (**1**) を出発物質として DAST を使って求核的フッ素化を行い、化合物 **1** の 2 位のエクアトリアル位にフッ素原子が導入された化合物 **S1** を得た。続いて、1 位の脱アセチル化とクロロイミド化を行い、1,3-dibromo-2-propanol によるグリコシル化のためのグリコシルドナーとしてイミデート **2** を合成した。化合物 **S1** から直接グリコシル化せずにこのステップが必要であった理由は、Mikata らによる以前の研究のように、アセチル基を脱離基とするグリコシル化が、2-フッ素化の後では進行しなかったからである。

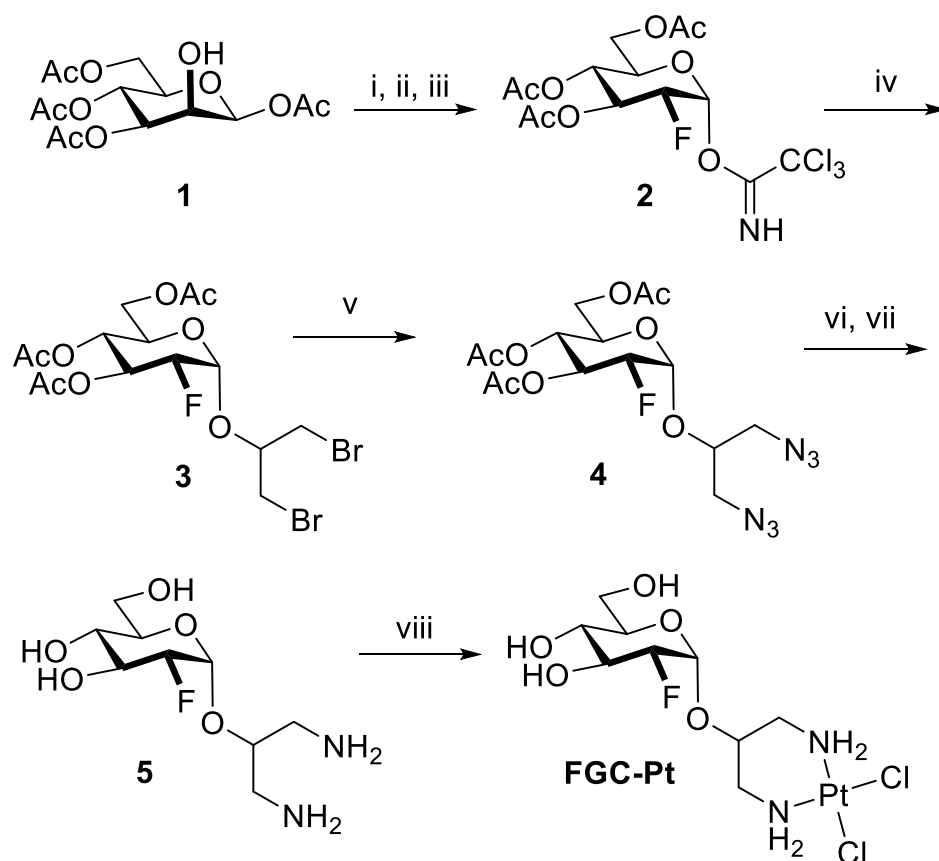
その後、酸触媒に TMSOTf を使い、イミデート **2** と 1,3-dibromo-2-propanol を用いた Schmidt のグリコシル化を 24°C で行い、化合物 **3** を合成した。Bucher らも 2-フッ素化 2-デオキシ糖を用いた Schmidt のグリコシル化を報告しているが、彼らは -30°C で 2-fluorinated 2-deoxyglucose を用いると  $\alpha$ -異性体と  $\beta$ -異性体の混合物が得られると報告している ( $\alpha/\beta = 1:1.9$ )<sup>42</sup>。一方で、本研究の 24°C の条件下では  $\alpha$ -異性体しか得られなかった。この結果から、このグリコシル化反応においては反応温度が異性体の生じる割合に影響すると考えられ、 $\alpha$ -異性体のみ得られた理由は、反応温度の上昇に伴った熱力学的な立体選択性制御による結果と考えている。

続いて、化合物 **3** をアジド化すると、ジアジド誘導体 **4** が生成した。次いで、化合物 **4** を脱アセチル化し、アジド基をアミノ基に還元すると、白金錯体のジアミン配位子として化合物 **5** が得られた。次に、化合物 **5** と  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  を錯体形成反応させると、37%の収率で FGC-Pt を得た。FGC-Pt は全 8 工程、総収率 11%で得られた。

FGC-Pt は、超純水を使ったゲルろ過による精製や、 $\text{D}_2\text{O}$  中での  $^1\text{H}$  NMR 測定の結果から分解している様子は確認されなかったため、この錯体は水中では比較的安定であると考えられる。一方で、HPLC 分析の際、移動相にアセトニトリルを使用すると、分析中に FGC-Pt の塩化物イオンが容易にアセトニトリルへと置換されることが ESI-MS 測定により判明した。移動相にメタノールを使用した HPLC 分析により分取された FGC-Pt は、LR-MS 測定では FGC-Pt の Na 付加体を確認されたが、アセトニトリル配位体のピークは検出されない (Figure 4A)。一方で、 $\text{H}_2\text{O}$ /アセトニトリル=1:1 に溶解した TFNA を標準物質として使用した HR-MS 測定では、アセトニトリル配位体が検出された (HR-MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 525.0893 ([M]<sup>+</sup>, calcd. 525.0875), formula:  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5\text{FCIPt}$ ) (Figure 4B)。これらの結果から、FGC-Pt はアセトニトリルが少しでも存在すると瞬時にアセトニトリルと反応し、アセトニトリル中では非常に不安定だと判明した<sup>43</sup>。

NMR および ESI-MS 測定により、目的の構造を同定した。FGC-Pt の純度については、q-NMR

により 96%であった。一方で、NMR 測定の結果、 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz)と  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz)の錯体形成による化学シフト変化について興味深い結果が得られた。具体的には、白金と配位した 1,3-propanediamine 部分に隣接するメチレン水素とメチレン炭素の化学シフトは低磁場にシフトした (Figure 5 and 6)。しかし、窒素原子から  $\gamma$  位にあるメチレン炭素の化学シフトは、錯体形成により高磁場へシフトした (Figure 6)。このメチレン炭素の高磁場シフトは、配位により遮蔽された  $\gamma$  位の炭素と白金との間のゴースト関係に基づく立体圧縮効果に起因すると考えられる。

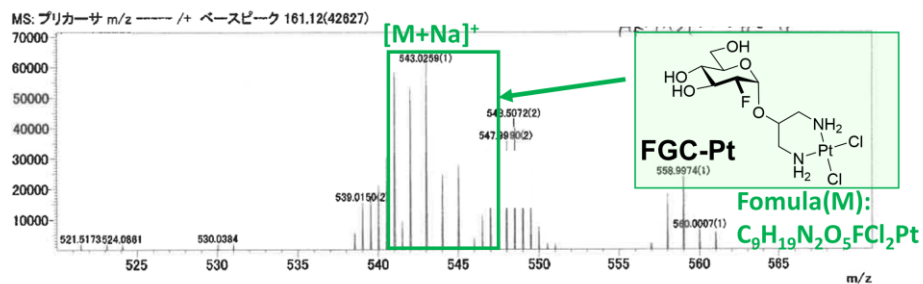


**Scheme 1.** Synthesis of FGC-Pt

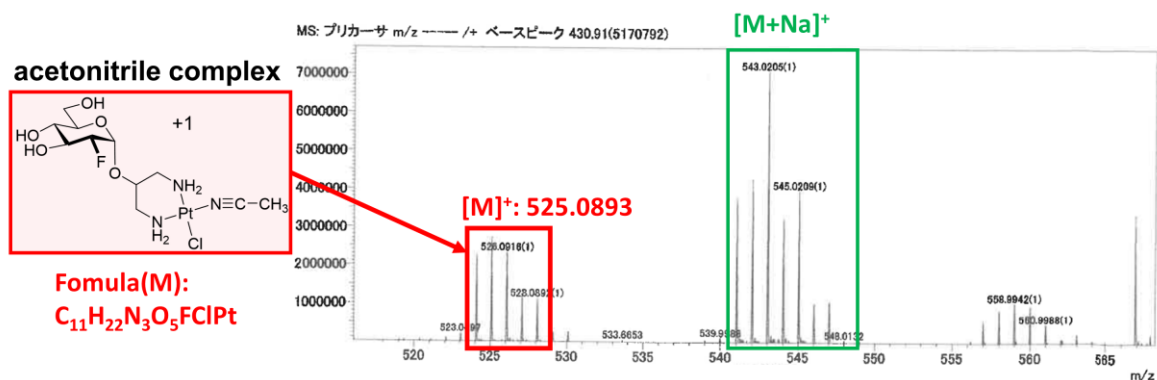
Reagents and conditions: (i) DAST, 1,4-dioxane, 100°C, 7 min, 78%; (ii) piperidine, THF, 24°C, 4 h, 83%; (iii)  $\text{CCl}_3\text{CN}$ , DBU,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 24°C, 3 h, 76%; (iv) 1,3-dibromo-2-propanol,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TMSOTf, 0°C to 24°C, 22 h, 89%; (v)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 30°C to 70°C, 6 h, 92%; (vi) NaOMe, MeOH, 24°C, 2 h; (vii) Pd/C, MeOH, 24°C, 2 h, 86%, 2 steps; (viii)  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 24°C, 24 h, 37%.

Omokawa M, *et al.* *ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. Scheme 1

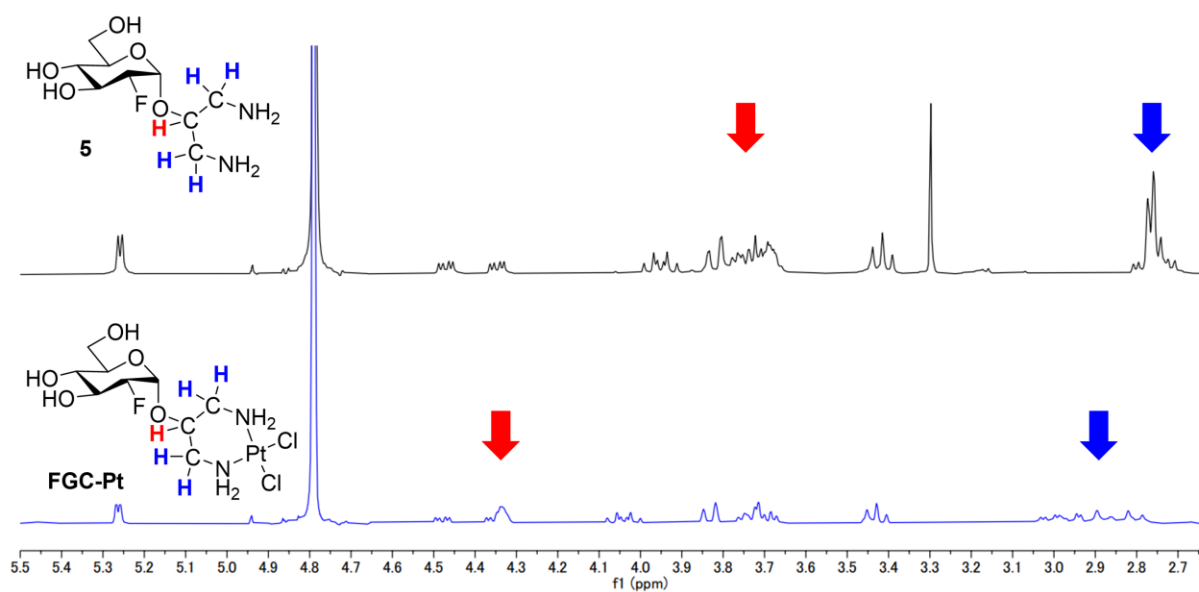
## A: LR-MS



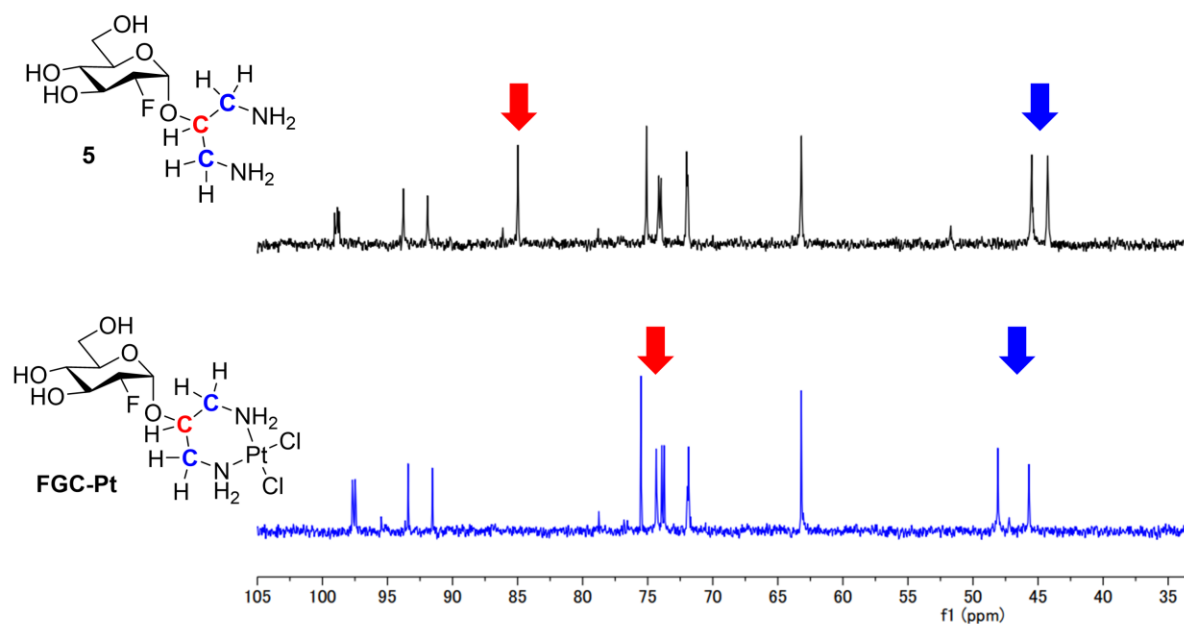
## B: HR-MS



**Figure 4.** ESI-MS spectrum showing reactivity of FGC-Pt with acetonitrile. (A) LR-MS spectra of FGC-Pt collected by HPLC analysis using methanol as mobile phase. (B) HR-MS spectra of FGC-Pt collected by HPLC analysis using methanol as mobile phase. TFNA dissolved in H<sub>2</sub>O: acetonitrile = 1:1 was used as a standard in HR-MS.



**Figure 5.** Comparison of  $^1\text{H}$ -NMR spectra of compound **5** and FGC-Pt  
 Omokawa M, *et al. ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. Figure S18 を改変



**Figure 6.** Comparison of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of compound **5** and FGC-Pt  
 Omokawa M, *et al. ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. Figure S19 を改変

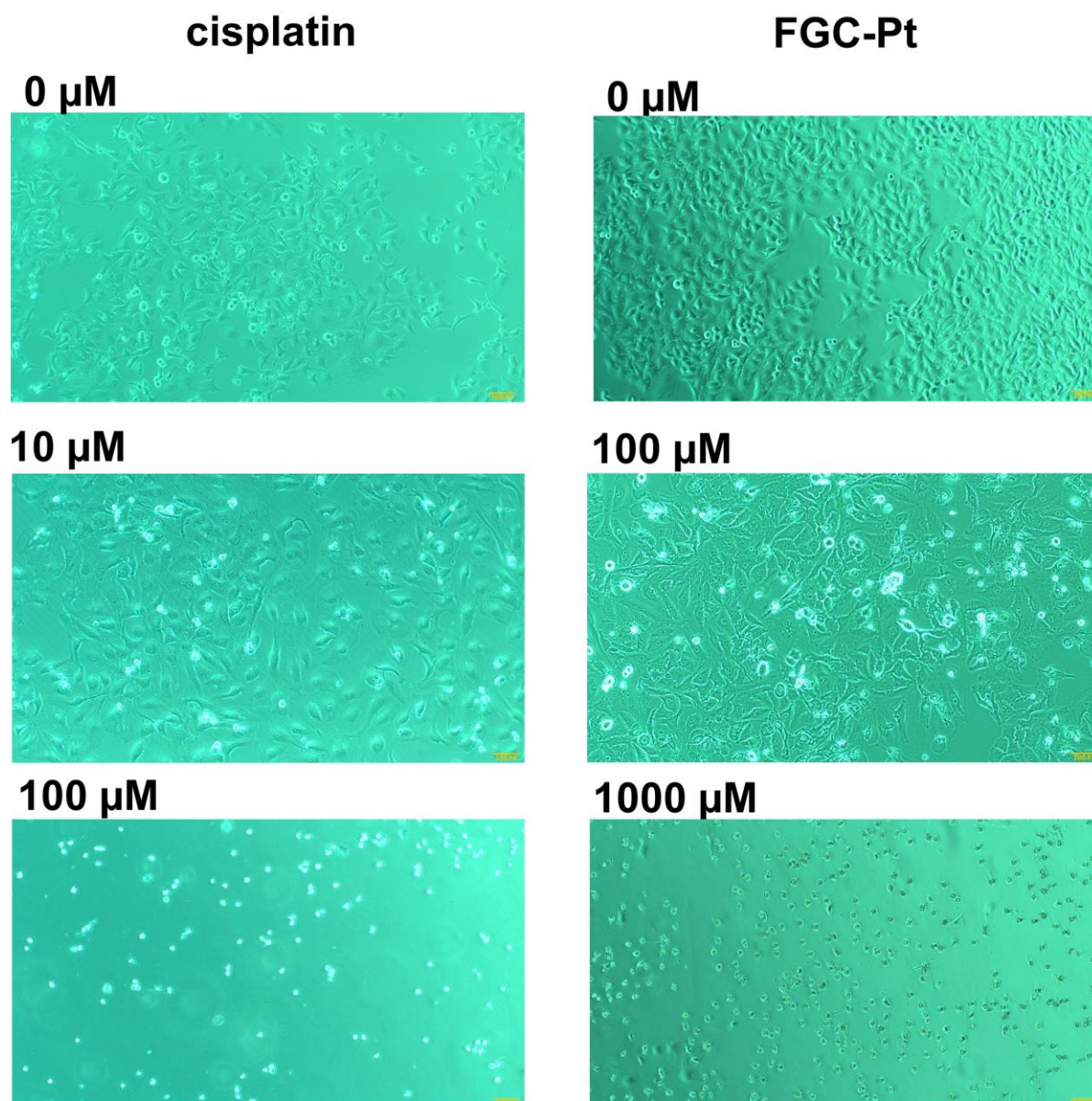
## 2. HeLa 細胞および A549 細胞における FGC-Pt の細胞毒性評価

FGC-Pt が殺細胞能を有するか明らかにするため、ヒト子宮頸がん由来細胞である HeLa 細胞やヒト非小細胞肺癌由来細胞である A549 細胞を使用して、細胞毒性の評価を MTS アッセイ法により行った。

まずは、HeLa 細胞における FGC-Pt の細胞毒性について、シスプラチンと比較したところ、シスプラチンの  $IC_{50}$  値は  $15.5 \pm 2.3 \mu M$  であった。また、光学顕微鏡による細胞の観察では、シスプラチンで処理した細胞は濃度依存的な形態変化を示し、 $100 \mu M$  のシスプラチンで処理した細胞において死細胞が目立った (Figure 7)。このように、シスプラチンは強い細胞毒性を有し、濃度依存的に殺細胞活性を示す。一方、FGC-Pt の  $IC_{50}$  値は  $447 \pm 99 \mu M$  であり、細胞毒性がシスプラチンよりも弱く、FGC-Pt の活性はシスプラチンの 1/30 であった (Table 1)。しかし、光学顕微鏡による細胞の形態変化と吸光度測定に基づき算出した細胞生存率の結果から、高濃度の FGC-Pt が細胞死を効果的に誘導できることが明らかになった。FGC-Pt がシスプラチンと同様に DNA へ結合することで効果を発揮するのか、またその場合の FGC-Pt の結合状態など細胞死が生じる詳細な機序については解明できておらず今後の検討課題であるが、得られた結果は、FGC-Pt が濃度依存的な殺細胞活性を有することを示した。

続いて、がん細胞膜に過剰発現した GLUT の中でも、様々ながんにおいて過剰発現が報告される  $^{15-21}$ GLUT1 の発現量と FGC-Pt の細胞毒性の関連性について調べるために、GLUT1 の発現量が異なる 2 つの細胞 (GLUT1/ $\beta$  アクチン比 ; HeLa 細胞 : 2.60、A549 細胞 : 0.94, Figure 8) を使って、FGC-Pt の  $IC_{50}$  値を算出し比較した。その結果、GLUT1 の発現量が高い HeLa 細胞の FGC-Pt の  $IC_{50}$  値の方が、その約 1/3 倍の GLUT1 の発現量である A549 細胞の FGC-Pt の  $IC_{50}$  ( $705 \pm 141 \mu M$ ) よりも低く、細胞毒性が強いことが明らかとなった。この結果から、FGC-Pt の GLUT1 を介した細胞内への取り込みが、殺細胞効果に影響を与えることが示唆された。一方で、今回、GLUT3 など他の GLUT アイソフォームの発現量と細胞毒性との関連性については検討できておらず今後の課題である。したがって、GLUT1 以外の GLUT アイソフォームの発現量の違いが殺細胞効果への程度影響を与えるのかについては現在のところ解明できていない。





**Figure 7.** The observation of HeLa cells treated with cisplatin (0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , and 100  $\mu\text{M}$ ) and FGC-Pt (0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , and 1000  $\mu\text{M}$ ) by optical microscopy. ( $\times 100$ )

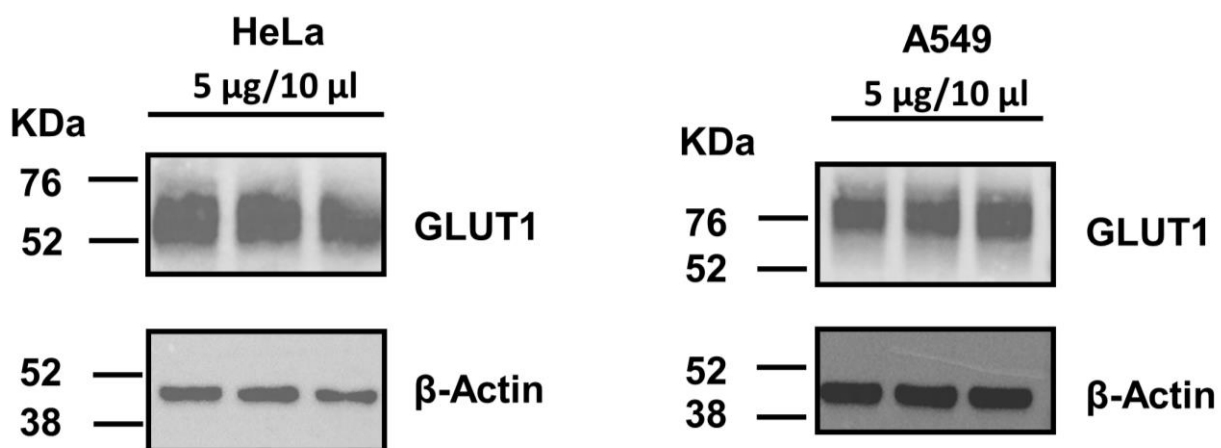
Omokawa M, *et al. ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. Figure 1

**Table 1.** Half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values ( $\mu\text{M}$ ) of cisplatin and FGC-Pt in HeLa cell line.

Compounds	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
cisplatin	$15.5 \pm 2.3$
FGC-Pt	$447 \pm 99$

Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Omokawa M, *et al. ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. Table 1



The ratio of GLUT1/ $\beta$ -Actin = 2.60

The ratio of GLUT1/ $\beta$ -Actin = 0.94

**Figure 8.** Expression of GLUT1 and calculation of GLUT1/ $\beta$ -actin in HeLa cells and A549 cells were confirmed by western blotting analysis.

Omokawa M, *et al. ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. Figure S20 を改変

### 3. HeLa 細胞における Pt の細胞内取り込み評価

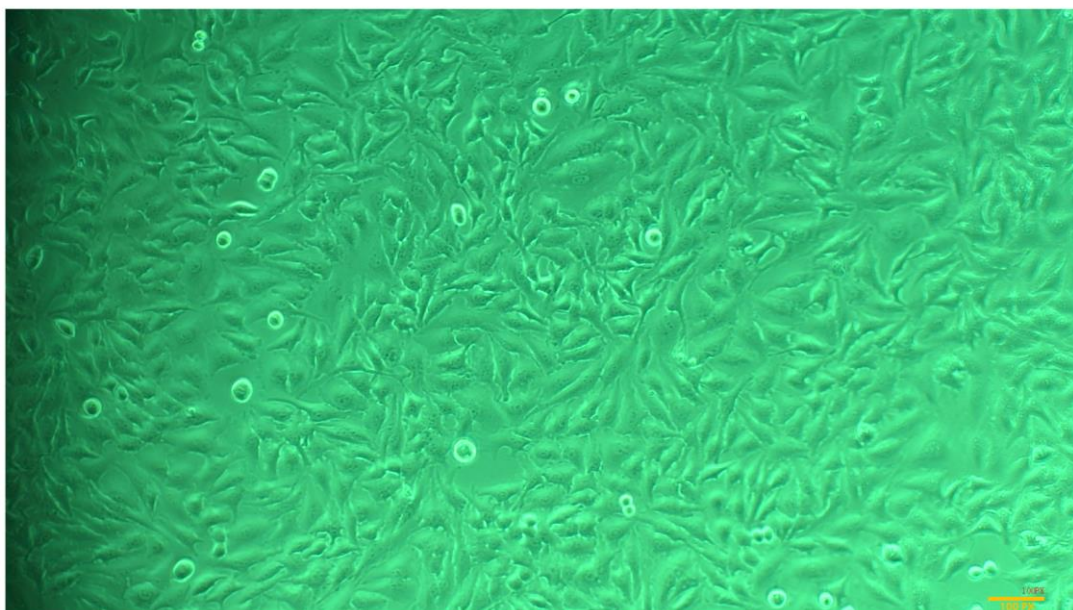
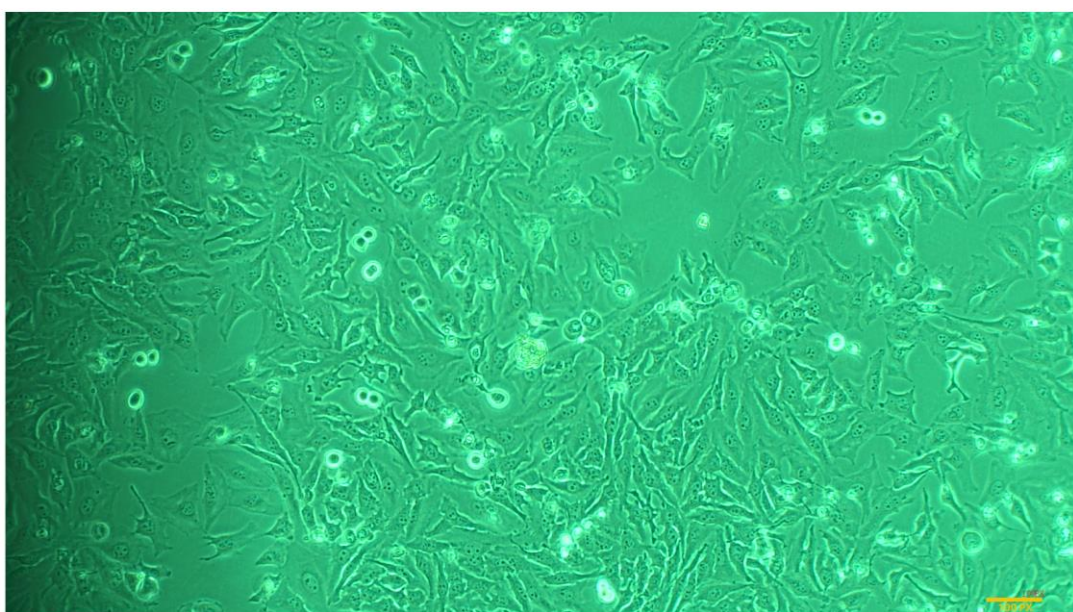
第1章第2節-2により、GLUT1 以外のアイソフォームについては検討できていないが、FGC-Pt の GLUT1 を介した細胞内への取り込みが、細胞毒性に影響を与えていることが示唆された。そこで、次に FGC-Pt が細胞内へ取り込まれているのか、またその取り込みに GLUT1 が関与しているかを明らかにするために、HeLa 細胞を使った Pt の細胞内取り込み実験を行ったが、現在のところ明確な手掛かりは得られていない。

E-MEM 培地中で HeLa 細胞を、FGC-Pt (30  $\mu$ M)、FGC-Pt+GLUT1 阻害剤 (EDG) (30  $\mu$ M+30  $\mu$ M)、シスプラチン(30  $\mu$ M)と 10 時間インキュベートした。その後、細胞内への Pt の取り込み量を ICP-MS によって分析した。結果は、FGC-Pt ( $1.2 \pm 0.1$  Pt ng/ $5 \times 10^5$  cells)、FGC-Pt+EDG ( $1.3 \pm 0.2$  Pt ng/ $5 \times 10^5$  cells)、シスプラチン ( $15.5 \pm 2.1$  Pt ng/ $5 \times 10^5$  cells) であり、FGC-Pt 処理細胞はシスプラチン処理細胞よりも Pt の細胞内取り込み量が 1/13 倍と少ないことが明らかとなった。一方で、FGC-Pt 処理した細胞は、Pt が細胞内に取り込まれていることが確認できたため、この結果は、第1章第2節-2において FGC-Pt が細胞内へ取り込まれて毒性を示した結果を支持すると考えられる。FGC-Pt 処理群と FGC-Pt+EDG 処理群では、Pt の細胞内への取り込み量に差はなかった。この原因について、下記の考察を行った。

実験に用いた E-MEM 培地中のグルコース濃度 (5.5 mM) は、FGC-Pt の濃度 (30  $\mu$ M) よりもはるかに高かったため、FGC-Pt は、細胞内へ取り込まれる際に、グルコースと競合すると推測できる。よって、今回行った実験条件では、GLUT1 阻害剤を添加していなかったが、GLUT1 阻害剤存在下で評価しているような条件であったと考えられる。その結果、シスプラチンと比較して FGC-Pt 処理した細胞への Pt の取り込み量は低くなり、Pt の細胞内取り込み評価と MTS アッセイの結果に影響を与えた可能性があると考えた。

そこで、グルコース非含有の培地や異なるグルコース濃度の培地で細胞を培養し条件の検討を試みたが、一部の細胞は、グルコース非含有では生存率が低下し、死細胞が浮遊した (Figure 9)。そのため、グルコース濃度を変化させる実験は E-MEM 培地中で行う必要があるが、グルコース非含有もしくは低グルコース濃度での細胞培養では根本的に実験条件として成立しなかった。したがって、実験条件の最適化が今後の課題と考える。



**A****B**

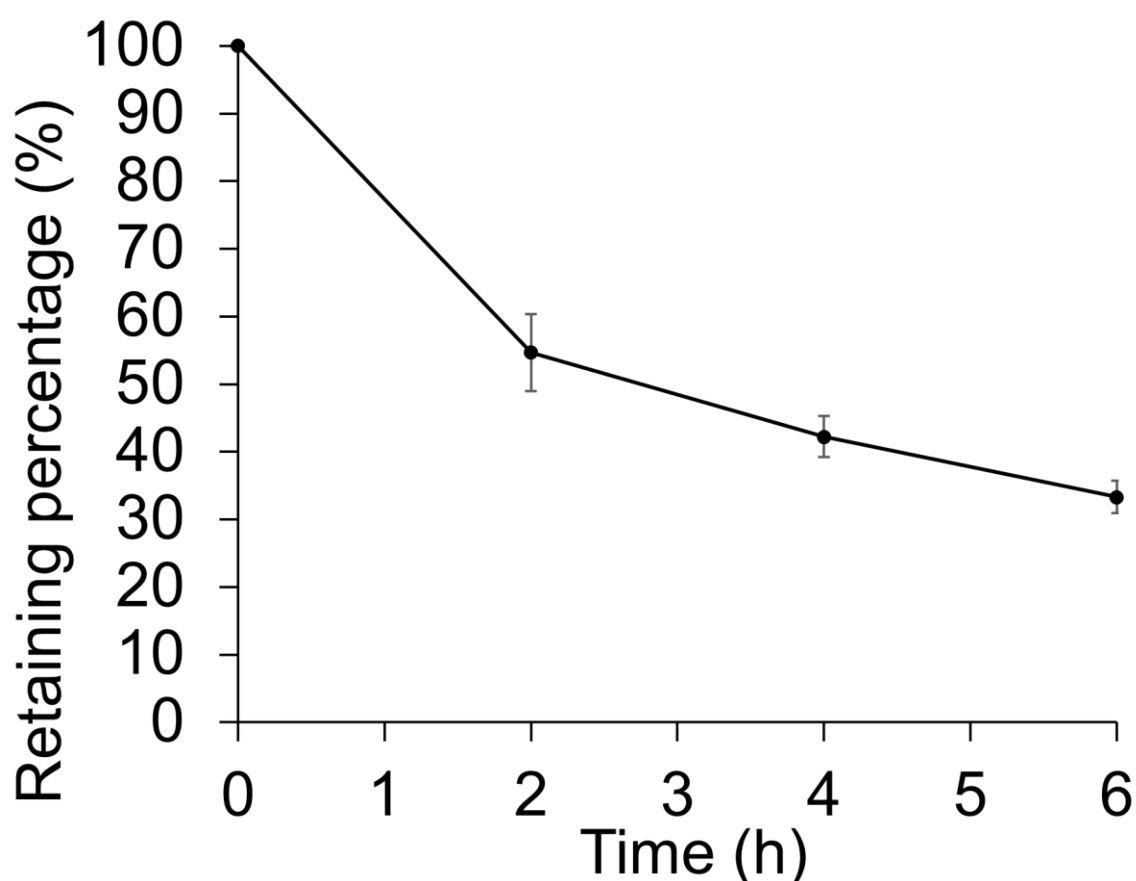
**Figure 9.** Influence of glucose-free medium on suspended cell.

(A) HeLa cells incubated in glucose-containing medium for 10 h. (B) HeLa cells incubated in glucose-free medium for 10 h. ( $\times 100$ )

#### 4. FGC-Pt のマウス血漿中での化学構造の安定性評価

FGC-Pt のマウス血漿中での安定性を調べるため、FGC-Pt をマウス血漿と混合し、37°C でインキュベート後、HPLC-UV 法により定量し評価した。その結果、インキュベート 2 時間後にマウス血漿中に  $54.7 \pm 5.7\%$  の FGC-Pt が存在しており、FGC-Pt の半減期は約 2 時間であることが判明した (Figure 10)。この FGC-Pt の半減期は、既に報告にある血漿中におけるシスプラチンの半減期 0.9 時間<sup>44</sup> の約 2 倍であることから、血漿中では FGC-Pt はシスプラチンよりも化学構造を維持したまま安定であることが明らかとなった。よって、FGC-Pt は、静脈内投与後の血中から組織への移行過程ではシスプラチンよりも有用であることが示唆された。

シスプラチンは血漿タンパク質と非可逆的に結合し、タンパク結合していない Pt の減少率は速い<sup>45</sup>ことが知られている。この知見を基に、FGC-Pt はシスプラチンよりもタンパク結合率が低く、血中において未変化体の FGC-Pt がシスプラチンよりも多く滞留していた可能性を考えている。よって、FGC-Pt の血中でのタンパク結合率についても今後の調査が必要である。



**Figure 10.** Stability of FGC-Pt in mouse plasma. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Omokawa M, *et al. ACS Omega*. 2024, 9, 879–886. Figure 2

## 5. 健常マウスおよび A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した FGC-Pt の体内分布の評価

FGC-Pt を健常マウスへ尾静脈内投与し、24 時間後の臓器 (脾臓、心臓、肺、脾臓、脳、筋肉、骨、血液、胆嚢、胃、小腸、大腸、肝臓、腎臓、甲状腺) における組織重量当たりの Pt 量 (以下、Pt 量とする) (Pt ng/g tissue として表記する) を ICP-MS で分析した (Figure 11A)。同様に、FGC-Pt を A549 細胞皮下移植モデルマウスへ尾静脈内投与し、24 時間および 48 時間後の主要臓器 (筋肉、骨、血液、肝臓、腎臓) および腫瘍の Pt 量を分析し比較した (Figure 11B)。シスプラチンについても、投与 24 時間後の主要臓器および腫瘍中の Pt 量を分析し、A549 細胞皮下移植モデルマウスにおける FGC-Pt とシスプラチンの投与 24 時間後の体内分布を比較した (Figure 11C)。さらに、FGC-Pt 投与 24 時間後と 48 時間後、およびシスプラチン投与 24 時間後の[腫瘍における組織重量当たりの Pt 量]/[主要臓器における組織重量当たりの Pt 量] ((腫瘍/主要臓器) 比) を算出し比較した (Table 2)。

健常マウスにおける FGC-Pt の投与 24 時間後の体内分布の特徴として、肝臓、腎臓で高い Pt 量の集積 (肝臓:  $2526 \pm 453$  Pt ng/g tissue、腎臓:  $3464 \pm 590$  Pt ng/g tissue) が確認された (Figure 11A)。一方で、GLUT1 が高発現していることが知られる脳<sup>30</sup>では、Pt 集積量が高いことが予想されたが、結果は低く (脳:  $77.9 \pm 4.4$  Pt ng/g tissue)、脳において Pt 蓄積による副作用が生じるリスクは低いことが示唆された (Figure 11A)。

A549 細胞皮下移植モデルマウスにおいて、FGC-Pt 投与 24 時間および 48 時間後の腫瘍では、同等の Pt の集積量 (24 時間:  $1058 \pm 220$  Pt ng/g tissue、48 時間:  $1055 \pm 278$  Pt ng/g tissue) を確認でき、さらに投与 24 時間から 48 時間にかけて Pt 量の減少率はわずか 0.3%である一方で、主要臓器では 3-32%であり (Figure 11B)、腫瘍において Pt 量が保持されていることが示された。また、FGC-Pt 投与 24 時間および 48 時間後における (腫瘍/主要臓器) 比は、時間経過とともに増大した (Table 2)。これらの結果から、FGC-Pt を投与した A549 細胞皮下移植モデルマウスでは、腫瘍からの Pt の排出が他の臓器と比較して遅いことが明らかとなり、FGC-Pt は腫瘍で滞留していることが示された。この結果は、腫瘍におけるメタボリックトラッピングが関与していると考えられている。

次に、FGC-Pt とシスプラチンの投与 24 時間後の臓器中の Pt 量を比較したところ、腫瘍における Pt 量は、FGC-Pt とシスプラチンの間に有意な差は無かった (Figure 11C)。一方で、FGC-Pt 投与 24 時間後における腫瘍以外の臓器における Pt 量は、シスプラチンの 0.3-0.7 倍であり、低いことが明らかとなった ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; Figure 11C)。さらに、(腫瘍/主要臓器) 比は、(腫瘍/腎臓) 比を除く全ての結果において、FGC-Pt の方が高かった (Table 2)。これらの結果から、FGC-Pt がシスプラチンよりも相対的に腫瘍へ集積しやすいことが示唆された。

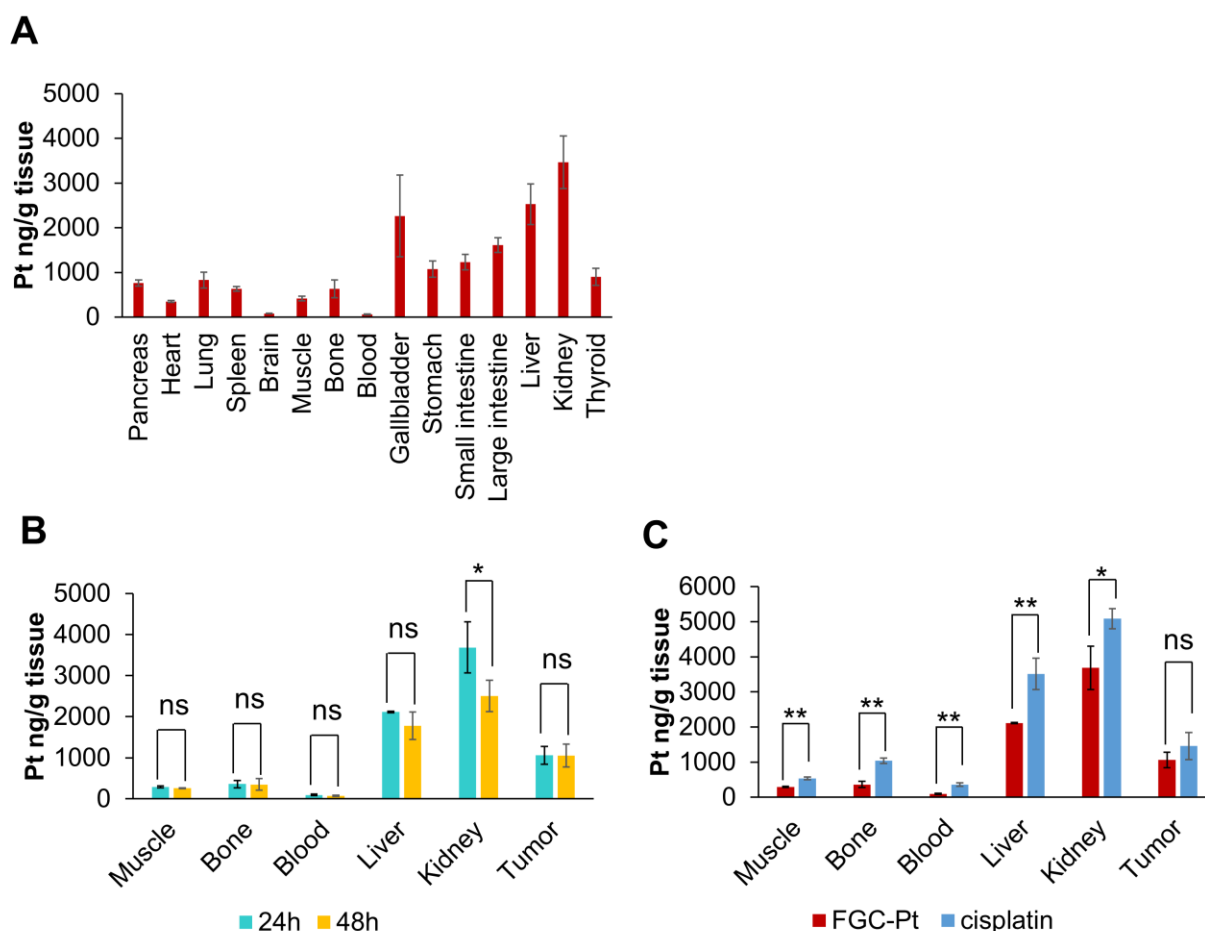
白金系薬剤の腎毒性は、腎臓への Pt の蓄積量に依存することが知られている<sup>46</sup>。さらに、ジャコウネズミにシスプラチンを腹腔内投与して体内分布を評価した研究では、投与後 24-72 時間の間、腎臓において他の臓器よりも高い Pt 濃度が保持された結果が示されている<sup>47</sup>。そこで、FGC-Pt 投与 24 時間および 48 時間後の腎臓における Pt 量を比較すると、投与 24 時間から 48 時間にかけて 32%の Pt 量が有意に減少していた ( $*p < 0.05$ ; Figure 11B)。さらに、FGC-Pt は、シスプラチンよりも投与 24 時間後の腎臓への Pt 集積量が低い ( $*p < 0.05$ ; Figure 11C)。これらの結果から、FGC-Pt が腎臓に保持されず、腎臓から排泄されることが示され、FGC-Pt はシスプラチンでよく知られる腎臓への Pt 蓄積による腎毒性を回避できる可能性が示唆された。

FGC-Pt が投与後 24 時間経過した時点で脳内への Pt 集積性が低い結果から、脳において FGC-Pt は早期に取り込まれるがその後に何らかの排出トランスポーターによって排出され、24 時間時点で Pt 集積量が低い結果であった可能性、または脳において GLUT1 を介す細胞内への取り込み以外の機構を主とする可能性が考えられる。ここで、後者の可能性であった場合、どのような機構や生体分子が FGC-Pt の取り込みに関与しているのかを考察した。

FGC-Pt と同様に、シスプラチンやオキサリプラチンは投与後に脳への Pt 集積量が低く、肝臓や腎臓への Pt 集積量が高いことが知られている<sup>47-50</sup>。さらに、それら 2 つの白金系薬剤は、有機カチオントランスポーターの 1 つである OCT2 を介して腎臓の近位尿細管内皮細胞内へ輸送されるが、尿細管管腔膜に存在する H<sup>+</sup>/有機カチオントランスポーター (MATE)2-K により、オキサリプラチンは効率良く細胞から排出される一方で、シスプラチンは MATE2-K を介して輸送されない。これにより、シスプラチンはオキサリプラチンと比べて腎臓への Pt の蓄積が生じやすく、腎毒性が出現しやすいと考えられている<sup>7,51,52</sup>。さらに、ヒト OCT1、OCT2 および OCT3 をそれぞれ発現させた細胞を使った研究において、コントロールの細胞と比べて、腎臓に発現する OCT2 によってシスプラチンとオキサリプラチンは輸送されることが示され、肝臓に多く発現する OCT1 によりシスプラチンが、胎盤や多くの臓器に発現する OCT3 によりオキサリプラチンが、OCT2 よりもそれぞれ程度としては低い輸送されることも報告されている<sup>52,53</sup>。また、マウスの系統に関係なく血液脳関門には *Oct1* の mRNA はほとんど発現せず、*Oct2* と *Oct3* の mRNA レベルは極めて低いことが明らかにされている<sup>54</sup>。したがって、これらの知見から、OCT2 を介して輸送される白金系薬剤の脳内への移行量が少ないことに説明がつくと考えた。

そこで、FGC-Pt が有する脳内への Pt 集積量の低さ、肝臓や腎臓への Pt 集積量の高さ、シスプラチンとは異なり腎臓から Pt が排出される特徴から、FGC-Pt は GLUT だけでなく、オキサリプラチンに類似した細胞内への取り込みと細胞外への排出の機構が関与している可能性も考えた。すなわち、OCT を介した細胞内への取り込みと MATE2-K による腎臓からの排出機構の関与を考えている。これまでに、GLUT および OCT の 2 種類のトランスポーターの基質として報告された糖連結白金錯体の例がある<sup>55</sup>。よって、FGC-Pt も GLUT に注目して薬剤設計した化合物ではあるが、GLUT だけでなく OCT の基質にもなり得ると考えた。その場合、今回得られた FGC-Pt の体内分布のデータは、FGC-Pt への 2 種類のトランスポーターの寄与の度合いと、臓器毎に異なるトランスポーターの発現量の違いが掛け合わされた結果である可能性が考えられる。

一方で、これらの考えはあくまでも、得られた結果と既知の報告から考察した著者の推測であり、GLUT や OCT を介した細胞内への取り込み機構の直接的な検証やアイソフォームの特定にも至っておらず、それらについて解明することは今後の課題である。



**Figure 11.** In vivo biodistribution of FGC-Pt and cisplatin. (A) Biodistribution of FGC-Pt in healthy mice at 24 h after administration. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). (B) Biodistribution in A549 cell-bearing mice at 24 and 48 h post-injection of FGC-Pt. (C) Comparison of biodistribution in A549 cell-bearing mice 24 h post-injection of FGC-Pt and cisplatin. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). The statistical significance of the difference among groups was determined by Student's t-test. (Significance: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: not significant)

Omokawa M, *et al. ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. Figure 3

**Table 2.** The ratio of platinum concentration in tumors to other major organs (muscle, bone, blood, liver, and kidney) at 24 and 48 h post-injection of FGC-Pt and 24 h post-injection of cisplatin in A549 cell-bearing mice.

	Value of the ratio				
	Tumor/Muscle	Tumor/Bone	Tumor/Blood	Tumor/Liver	Tumor/Kidney
FGC-Pt (24 h)	3.64	2.93	11.07	0.50	0.29
FGC-Pt (48 h)	4.09	3.03	14.37	0.59	0.42
cisplatin (24 h)	2.72	1.41	4.10	0.42	0.29

Omokawa M, *et al. ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886. Table 2



## 6. A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した FGC-Pt の抗腫瘍効果の評価

FGC-Pt の抗腫瘍効果を調べるため、A549 細胞皮下移植モデルマウスに 1、8、15、22 日目に生理食塩水(対照群) (80  $\mu$ L/kg)、FGC-Pt (2.7 mg of Pt/kg)、シスプラチン (2.7 mg of Pt/kg) を尾静脈内投与し、30 日間の腫瘍体積を測定することで抗腫瘍効果について評価した。さらに、体重、摂餌量について計測、および注射部位の皮膚状態を観察してスコア化 (0; 正常、1; 赤み、2; 赤みと腫れ)することにより、FGC-Pt およびシスプラチンの個体への毒性について評価した。シスプラチンは、ヒトの治療では腎毒性軽減のために大量の輸液とともに投与されるが、マウスの実験ではその方法は適用できない。したがって、本研究では、できるだけ臨床で使用されている条件に近づけるために、毒性を引き起こす可能性が高い条件ではあるが、尾静脈内投与を投与方法として選択した。

治療 30 日目の腫瘍サイズを比較したところ、FGC-Pt 投与群とシスプラチン投与群の間には腫瘍サイズに有意差は無く (FGC-Pt;  $451 \pm 97 \text{ mm}^3$ , シスプラチン;  $403 \pm 179 \text{ mm}^3$ )、同様の腫瘍増殖抑制効果を示した (Figure 12A)。さらに、Tukey の全対比較検定により、帰無仮説が維持されたが、これら 2 つの群の腫瘍サイズは対照群に対して FGC-Pt 投与群では 0.7 倍、シスプラチン投与群では 0.6 倍の大きさであり、対照群と比較して腫瘍増殖抑制傾向を示した (Figure 12A)。また、シスプラチン投与群は FGC-Pt 投与群よりも 4 回目 (治療実験 22 日目) の投与後に顕著な体重減少を示した。これは、治療実験初日の体重を基に算出した体重変化率から明らかであり、それぞれ FGC-Pt 投与群では +4.5%、シスプラチン投与群では -8.7% の変化が確認され、シスプラチン投与群では大幅に体重減少したのに対し、FGC-Pt 投与群ではむしろ体重が増加していた (Figure 12B)。さらに、摂餌量の変化を確認すると、シスプラチン投与群では FGC-Pt 投与群に比べ、摂餌量の減少傾向が確認され、より多くのマウスで食欲不振を示した (Figure 12C)。シスプラチン投与群では、FGC-Pt 投与群よりも注射部位が赤く腫れているマウスが多く見られ (Figure 12D and 12E)、注射部位の観察結果をスコア化した結果では、スコア値の 2 を示すマウスが多かった (Figure 13)。さらに、肝臓と腎臓において、実験終了時における体重当たりの臓器重量 (g/g) を算出し比較したところ、肝臓には有意差は無いが、腎臓には有意差が確認された ( $*p < 0.05$ ; Figure 12G and 12H)。FGC-Pt 投与群と比べてシスプラチン投与群では、腎臓へ悪影響が生じ、臓器重量の低下を導いたことが示唆された。これは、体内分布の結果でも述べたシスプラチンと FGC-Pt の腎臓からの Pt の排出速度の違いを反映した結果ではないかと考えられる。

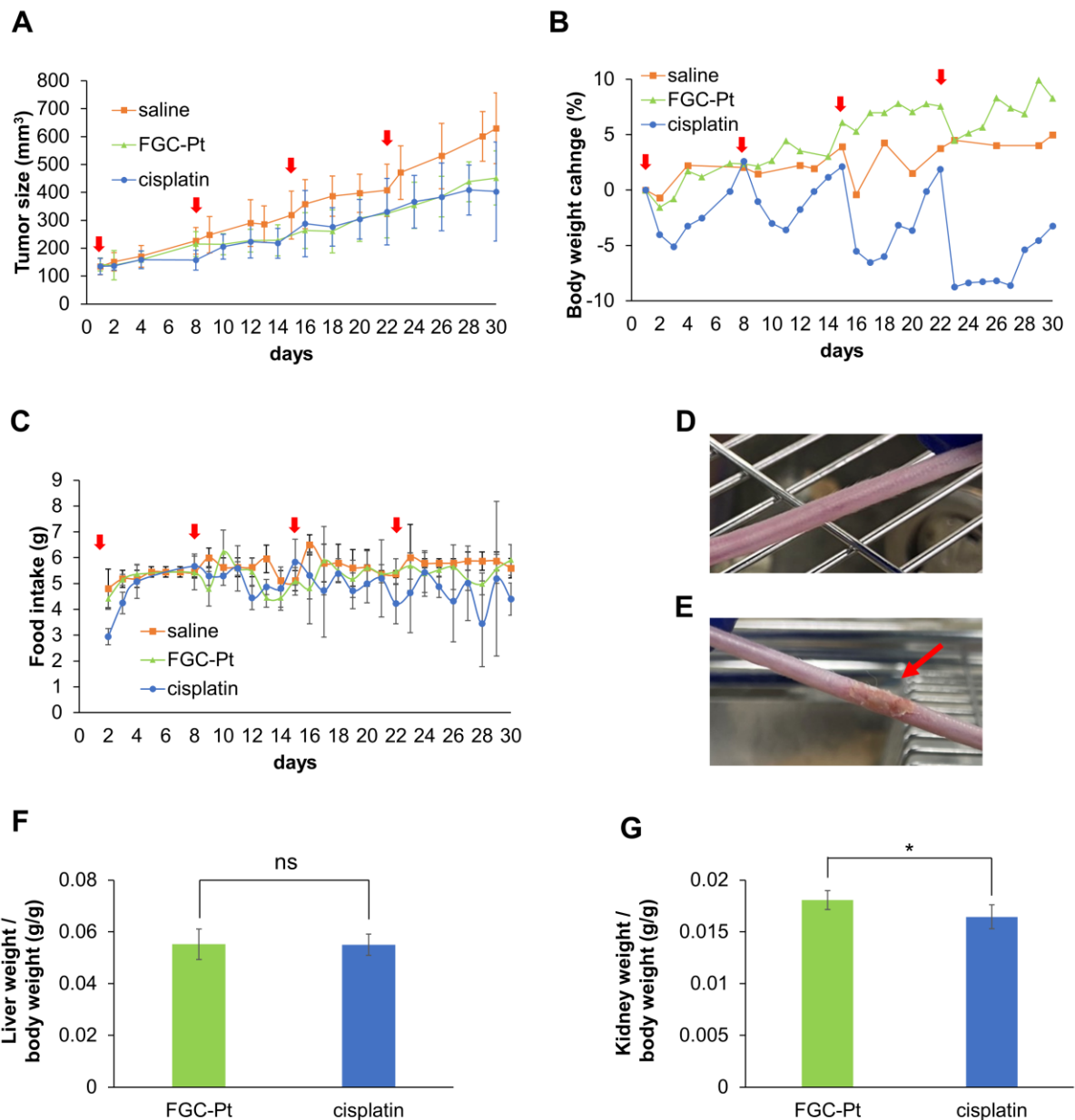
以上の結果から、FGC-Pt はシスプラチンに比べ個体への毒性を軽減するが、同等の腫瘍増殖抑制効果を示す新規化合物であることが示された。

ここで、第 1 章第 2 節-2 において FGC-Pt はシスプラチンよりも低い細胞毒性を示したのに対し、シスプラチンと同等の抗腫瘍効果を示したのか、理由を考察した。

まず、FGC-Pt を使った細胞毒性の評価や細胞内への Pt 取り込み実験に関しては、第 1 章第 2 節-2,3 で、使用した E-MEM 培地中に含まれるグルコース濃度が結果に影響を与えたと考えた。しかし、この E-MEM 培地中のグルコース濃度 (5.5 mM) は、ヒトの血中グルコース濃度 100 mg/dL に相当し、正常範囲内の数値である。ゆえに、E-MEM 培地中のグルコース濃度 (5.5 mM) はヒトの血中を想定した評価系として妥当な数値であるが、用いた薬剤濃度よりはるかに高い濃度であったため、細胞毒性評価において FGC-Pt はシスプラチンよりも毒性が低い結果になっ

たと考えた。また、第1章第2節-4において、FGC-Ptの血漿中での化学構造の安定性はシスプラチンよりも高いことが示された。これら2つの結果と、シスプラチンと比較したFGC-Ptの腫瘍への相対的な集積性の向上といった複数の要因が重なり、偶発的であったかもしれないが、FGC-Ptとシスプラチンの投与後に腫瘍へのPtの取り込み量が同程度になり、FGC-Ptとシスプラチンは同等の抗腫瘍効果を発揮したと考えた。

一方で、第1章第2節-5において、FGC-Ptは、腫瘍以外の臓器からのPt排出はより速い。さらに、FGC-Ptを静脈内投与し、24時間および48時間後の腎臓において、Pt量に有意な差が見られ、時間経過とともにPt量が減少した。FGC-Ptとシスプラチンを静脈内投与し24時間経過した時点で、腫瘍以外の臓器におけるPt量は、FGC-Ptの方が低い。これら3つの結果から、シスプラチンとFGC-Ptは投与したPt量が同じ場合、前述した通り腫瘍へのPt集積量には有意な差が無く同等の抗腫瘍効果を発揮したが、他の臓器ではPt集積量に差が生じたため、抗腫瘍効果の評価時にシスプラチン投与群でFGC-Pt投与群よりも個体への毒性が生じたと考えた。よって、FGC-Ptの最大耐容量を決定する必要があるが、FGC-Pt投与の際、抗腫瘍効果実験で投与した2.7 mg of Pt/kg以上へと投与量を増量することは可能であると考えられ、その場合は、さらなる治療効果の向上が期待できる。

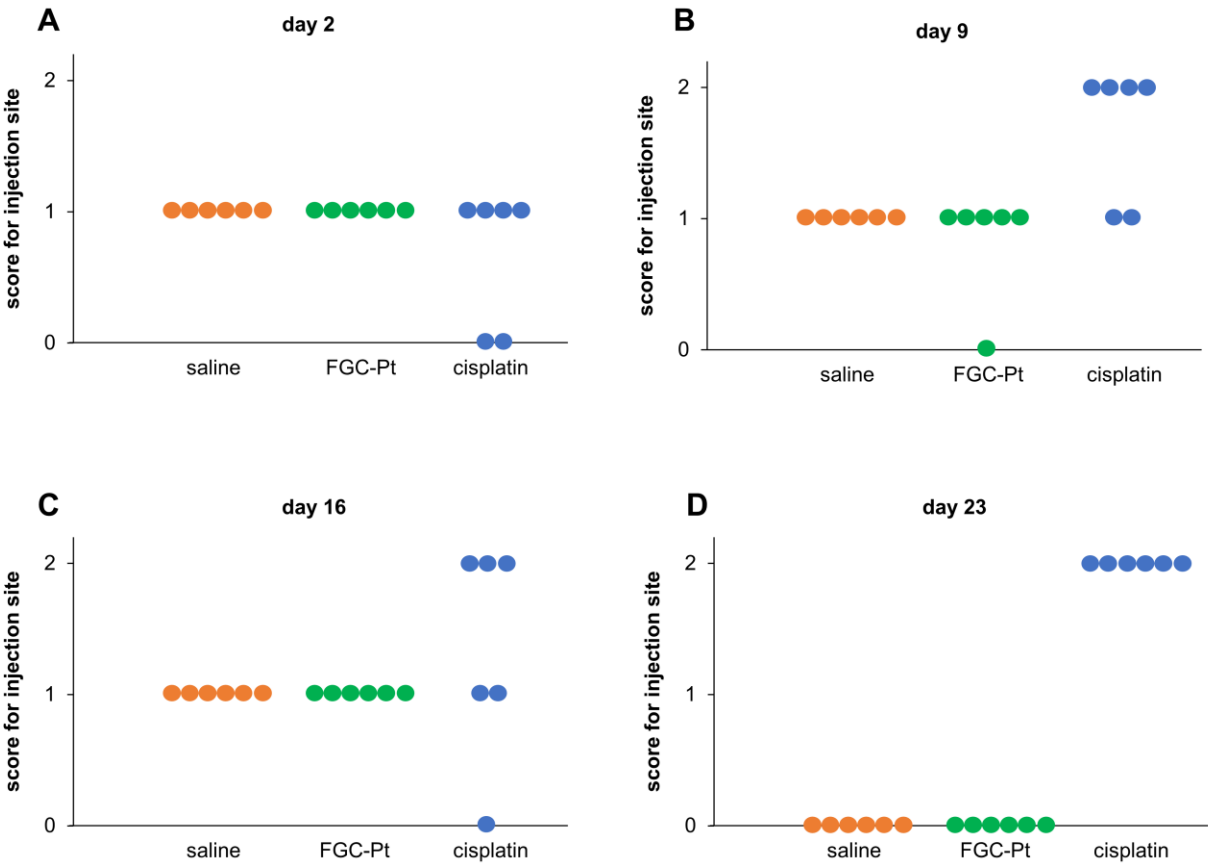


**Figure 12.** In vivo antitumor effect of FGC-Pt in A549 cell-bearing mice.

Mice were randomly divided into three groups: saline group (n = 6), FGC-Pt group (n = 6), and cisplatin group (n = 6). They were treated on days 1, 8, 15, and 22 with saline, FGC-Pt (2.7 mg of Pt/kg), or cisplatin (2.7 mg of Pt/kg) via intravenous injection. (A) Tumor growth over time in A549 cell-bearing mice treated with saline, FGC-Pt, or cisplatin. (B) Toxicity assessment of saline, FGC-Pt, and cisplatin by monitoring body weight and calculation of body weight change (%) in A549 cell-bearing mice. (C) Toxicity assessment of saline, FGC-Pt, and cisplatin by monitoring food intake (g) in A549 cell-bearing mice. (D)(E) Comparison of FGC-Pt and cisplatin injection site photos of day 23. D; FGC-Pt, E; cisplatin. (F)(G) Comparison of liver weight and kidney weight per body weight at the end of the experiment in the cisplatin and FGC-Pt groups. F; liver weight per body weight. G; kidney weight per body.

Data are expressed as mean or mean  $\pm$  SD (n = 6). The statistical significance of differences among groups was determined by Tukey's test. The statistical significance of the difference among groups was determined

by Student's t-test. (Significance: \* $p < 0.05$ , ns: not significant)  
Omokawa M, *et al. ACS Omega*. 2024, 9, 879–886. Figure 4 を改変



**Figure 13.** Clinical severity score of injection site on the day after administration (days 2, 9, 16, and 23).  
Score 0; normal, 1; some redness at margins, 2; redness and swelling

### 第3節 小括

本章では、がん細胞がグルコースを多く取り込むこと、および [ $^{18}\text{F}$ ]FDG の特性を利用した薬剤開発の戦略を考え、白金錯体と 2-fluorinated 2-deoxyglucoside を結合させた FGC-Pt を設計し合成した。次に、FGC-Pt はこれらの薬剤開発の戦略が反映されたがん治療薬としての可能性を有するか検討するため、*in vitro* および *in vivo* において、がん細胞や担がんモデルマウスを使って細胞毒性、体内分布特性、および抗腫瘍効果の評価を実施し、以下の結果を得た。

1. HeLa 細胞および A549 細胞を使用した細胞毒性の評価から、FGC-Pt はシスプラチンよりも細胞毒性は低い、FGC-Pt が濃度依存的な殺細胞活性を示すことが明らかとなった。さらに、GLUT1 を介した細胞内への取り込みが殺細胞効果に影響を与えることが示唆された。
2. FGC-Pt 処理した HeLa 細胞は Pt が細胞内に取り込まれていることが確認できた。
3. マウス血漿中における化学構造の安定性の評価から、FGC-Pt はシスプラチンよりも半減期が長く安定であり、静脈内投与後の血中から組織への移行過程ではシスプラチンよりも有用だと示された。
4. 健常マウスを使った FGC-Pt の体内分布の評価では、肝臓、腎臓で高い Pt 量の集積が確認されたが、脳では低く、脳へ副作用が生じるリスクは低いことが示唆された。
5. A549 細胞皮下移植モデルマウスを使った体内分布の評価では、FGC-Pt は腫瘍において滞留することが示された。FGC-Pt とシスプラチンの尾静脈内投与 24 時間後の体内分布の比較から、FGC-Pt はシスプラチンよりも相対的に腫瘍に集積しやすいことが示された。さらに、FGC-Pt はシスプラチンでよく知られる Pt 蓄積による腎毒性を回避できる可能性が示唆された。
6. A549 細胞皮下移植モデルマウス用いた抗腫瘍効果試験の結果から、FGC-Pt はシスプラチンよりも個体への毒性が低い、対照群と比較するとシスプラチンと同等の腫瘍増殖抑制傾向を示した。

本章では、FGC-Pt の細胞内への取り込み機構の直接的な検証やトランスポーターの特定には至っておらず、それらについて解明することが今後の課題ではあるが、以上の結果から、FGC-Pt はメタボリックトラッピングを利用した腫瘍内での滞留性や、腎臓からの Pt の排出による腎毒性を回避できることが示唆される抗腫瘍薬として利用できる可能性が見出された。

## 第2章 $^{191}\text{Pt}$ 標識新規糖連結白金(II)錯体 ( $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ ) の開発

### 第1節 緒言

同じ組織型や病期のがんであっても、白金系薬剤の治療効果には個人差が生じるため、治療の最適化を目指すために、白金系薬剤の薬物動態を把握する必要がある。そのため、腫瘍組織やその他の臓器における Pt 濃度を非侵襲的、定量的に測定する方法の開発が求められている。これまでに、放射性白金錯体や生体内蛍光 X 線 (XRF) 法を用いて、シスプラチンを含む既知の白金錯体のマウスやヒトにおける組織への取り込み、分布や動態について数多くの研究が行われてきた<sup>32-40</sup>。しかしながら、現在までのところ、抗腫瘍薬として開発段階にある新規の白金錯体について、全身の臓器における Pt の体内分布を評価する唯一の方法は、生検を用いた方法であり、経時的かつ非侵襲的な解析は存在しない。

そこで、ガンマ線イメージング技術を利用して、全身の臓器や組織への Pt の集積を経時的・定量的かつ非侵襲的に追跡することを目指して、第1章で開発した FGC-Pt の構造中にガンマ線放出核種である放射性白金を導入した放射性  $^{191}\text{Pt}$  標識 FGC-Pt ( $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ ) の開発を計画した。

よって、第2章では、まずは放射性  $^{191}\text{Pt}$  の製造法、放射性 FGC-Pt ( $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ ) の合成法を検討した。続いて、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  および FGC-Pt の健常マウスにおける体内分布データを定量的に比較することで、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  が FGC-Pt の薬物動態特性を追跡できるガンマ線イメージングプローブとして利用可能かを検証した。

## 第2節 結果と考察

### 1. $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ (method A) の精製と分析

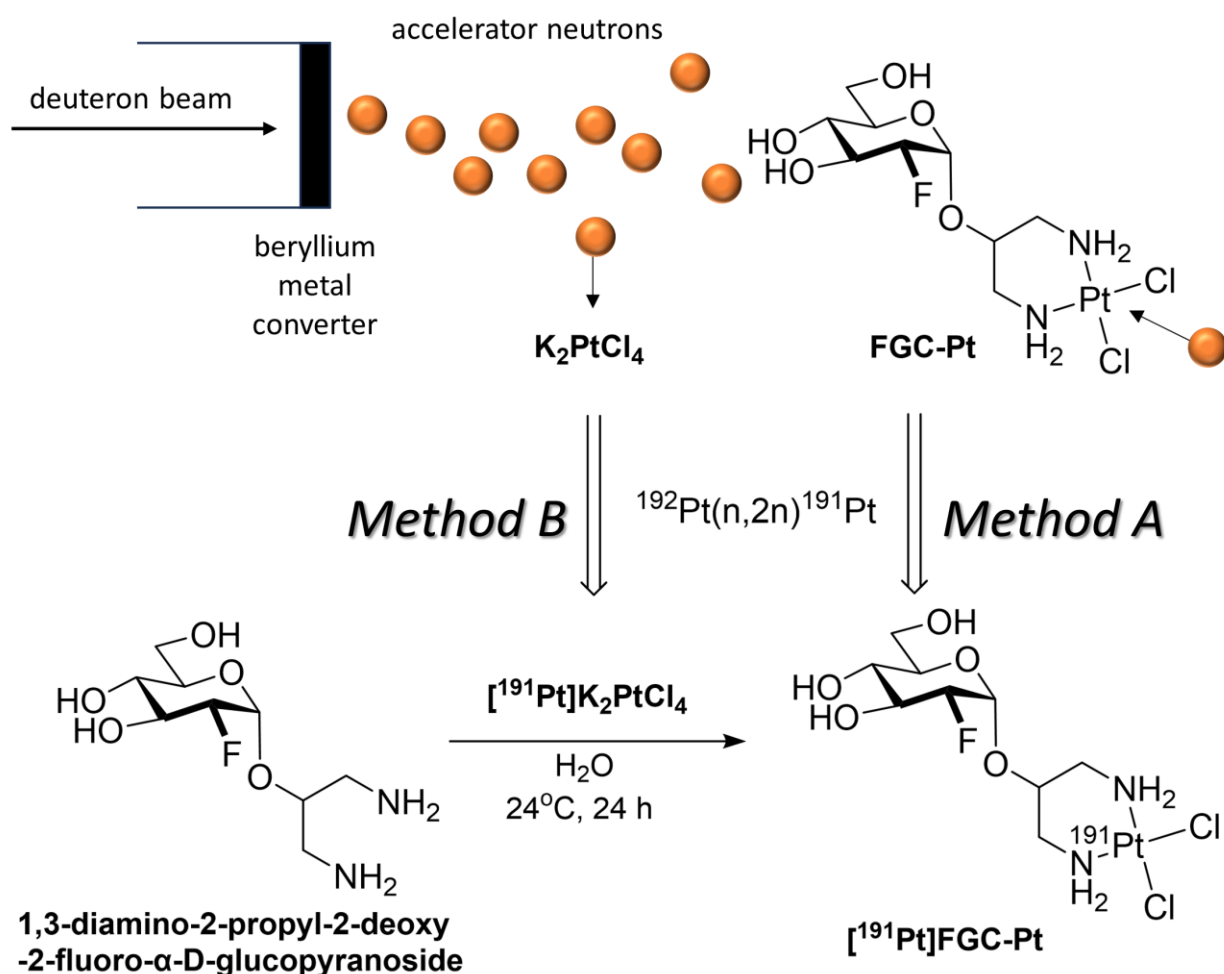
本研究で製造した  $^{191}\text{Pt}$  は比放射能が低く、得られた  $^{191}\text{Pt}$  標識体は Radio-HPLC によって検出できないため、UV 分光法 (220 nm) を用いて HPLC 分析を行った。

$[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  は異なる2つの方法 (A法 (以下、Method A と表記する)、B法 (以下、Method B と表記する)) で得られた。Method A は、FGC-Pt に加速器により得られた中性子を照射し、 $^{192}\text{Pt}(n,2n)^{191}\text{Pt}$  核反応により  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  を生成する方法である (Figure 14)<sup>56</sup>。Method A によって得られた  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  は  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method A) と定義した。また、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method A) のモル活性は 115 MBq/mol であった。

精製後の試料を Radio-TLC で分析したところ、FGC-Pt ( $R_f=0.75$ ) と同一のスポット ( $R_f=0.73$ ) が観察された (Figure 15)。一方で、確立した分析条件に基づいて、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method A) は HPLC による精製を行ったにもかかわらず、いくつかのスポットが Radio-TLC 分析で確認された (Figure 15)。また、同様の条件で HPLC 分析した結果、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  の保持時間 (RT) (6.6 分) は FGC-Pt の RT (6.5 分) と一致した (Figure 16)。したがって、2つの分析結果から、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  が得られたことが証明された。

しかし、Radio-TLC 分析の結果から、method A では精製後におけるサンプルにも不純物が残ってしまうことが問題であり、得られた  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  の純度は低い結果であった (放射化学的純度 : 61.7%)。不純物が生じた原因として、FGC-Pt は高いエネルギー (10 MeV) を持つ中性子で直接照射されたため、FGC-Pt が中性子のエネルギーに耐えられず、分解してしまった可能性を考えた。そして、HPLC 分析の結果、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  は単一のピークを示したが、分解物の構造が  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  と類似しており、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  と分解物のピークが重なっていたと考察した。したがって、今回実施した HPLC 分析の条件では分離が不十分であり、分解生成物が精製後の試料に混入し、不純物として他のスポットに現れたと考えられる (Figure 15)。

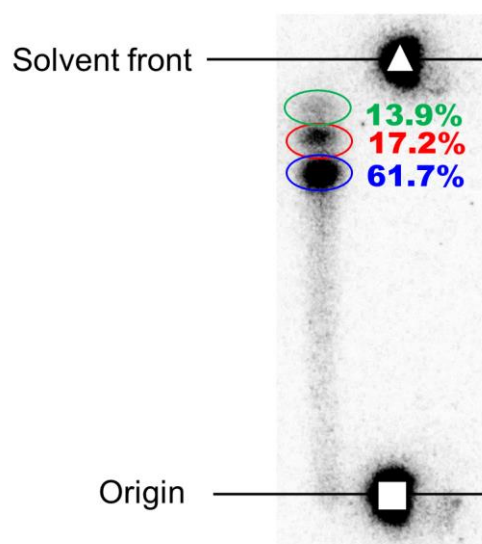
よって、method A を用いた  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  の製造は可能であり容易であるが、高純度の  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  を得ることは困難であることが明らかとなった。



**Figure 14.** Two different methods for obtaining  $[^{191}Pt]FGC-Pt$ .  $[^{191}Pt]FGC-Pt$  (method A) was obtained by irradiating FGC-Pt with accelerator neutrons.  $[^{191}Pt]FGC-Pt$  (method B) was synthesized using  $[^{191}Pt]K_2PtCl_4$ , which was obtained by irradiating  $K_2PtCl_4$  with accelerator neutrons.

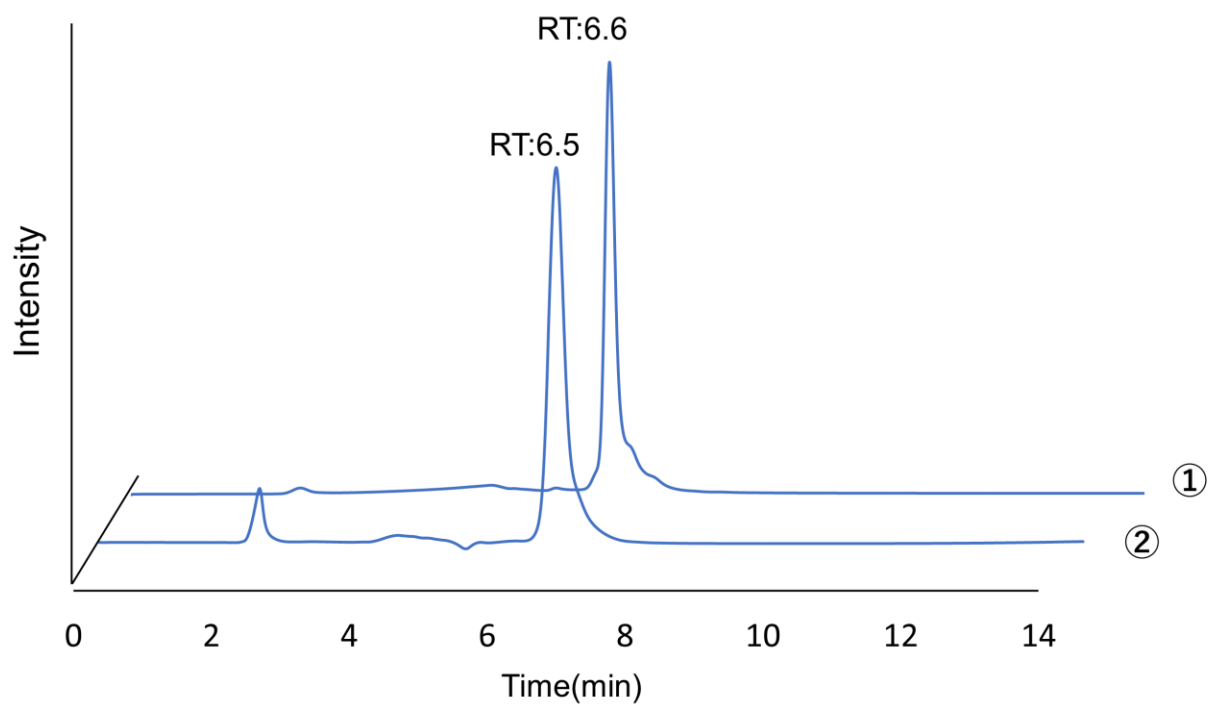
Omokawa M, *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 97, 117557. Figure 1 を改変





**Figure 15.** Radio- TLC analysis of [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt (method A). The corner spots (triangles) and origin spot (square) in the TLC image are markers. [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt (method A) after purification by HPLC:  $R_f = 0.73$ , radiochemical purity; 61.7%.

Omokawa M, *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 97, 117557. Figure 2 を改変



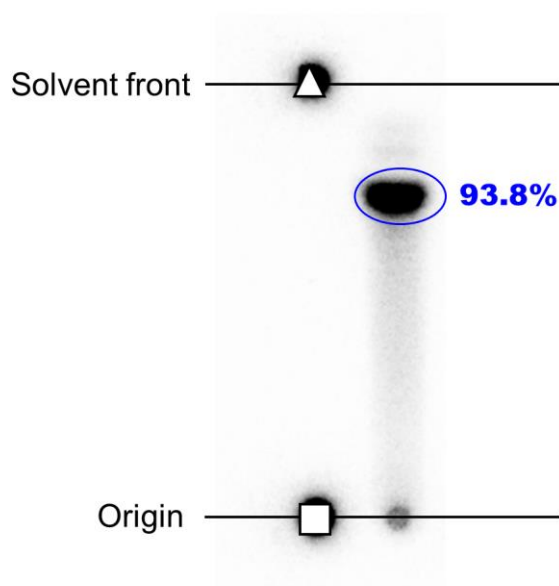
**Figure 16.** Comparison of HPLC analysis between [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt (method A) and FGC-Pt using Sugar-D column. ① [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt (method A); RT = 6.6 min. ② FGC-Pt; RT = 6.5 min. UV wavelength: 220 nm. Omokawa M, *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 97, 117557. Figure 3

## 2. $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ (method B) の合成と分析

Method B は、加速器により得られた中性子を利用した  $^{192}\text{Pt}(n,2n)^{191}\text{Pt}$  核反応により  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  から製造された  $[^{191}\text{Pt}]\text{K}_2\text{PtCl}_4$ <sup>56</sup> と、FGC-Pt の配位子である 1,3-diamino-2-propyl-2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside を反応させて、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  を合成する方法である (Figure 14)。Method B によって得られた  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  は  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method B) と定義した。 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method B) は放射化学収率  $14.5 \pm 7.3\%$  ( $n = 6$ ) で得られた。また、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method B) のモル活性は  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method A) と同程度であり、119 MBq/mol であった。

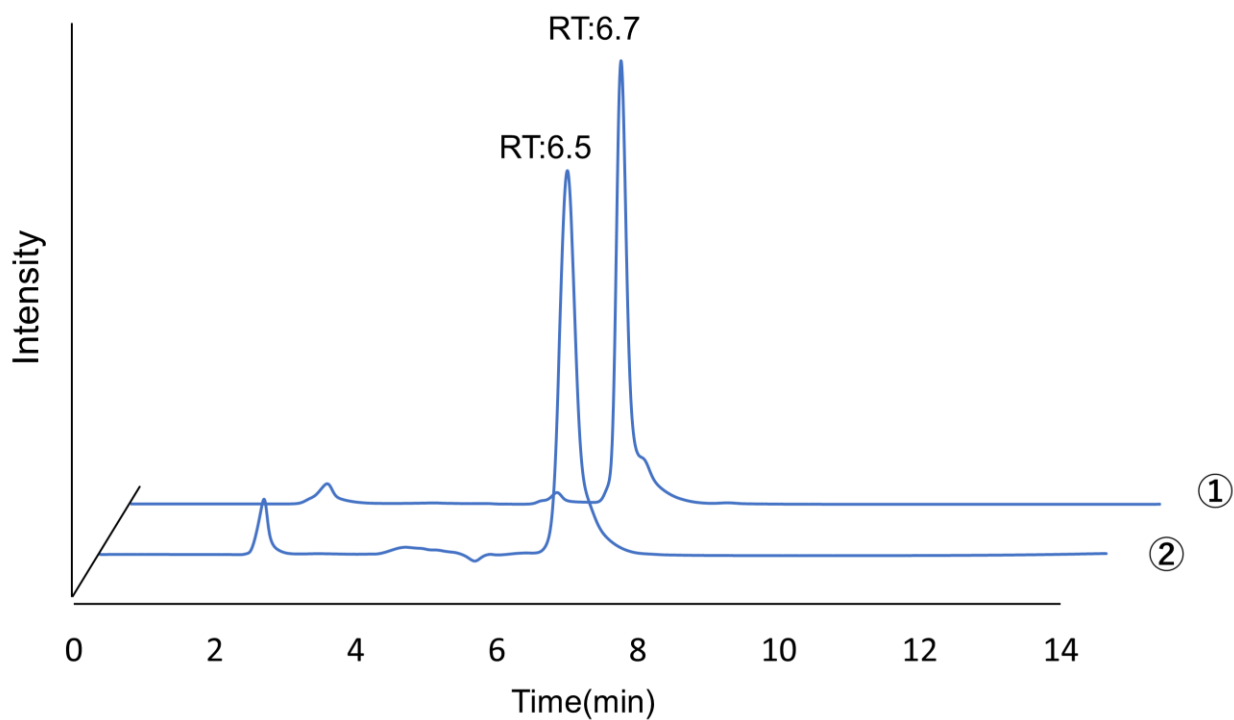
確立した分析条件に基づいて、反応混合物を HPLC で精製した後の試料について Radio-TLC 分析を行ったところ、FGC-Pt ( $R_f = 0.75$ ) と同一の明瞭なスポット ( $R_f = 0.73$ ) が得られた (Figure 17)。また、同様の条件で HPLC 分析した結果、RT (6.7 分) は FGC-Pt の RT (6.5 分) と一致した (Figure 18)。

以上 2 つの分析結果から、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method B) は  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method A) よりも高純度 (放射化学的純度: 93.8%) で得られることがわかり、method B は method A と比較して煩雑な方法ではあるが、 $^{191}\text{Pt}$  標識体を得るのに適していることが示された。



**Figure 17.** Radio-TLC analysis of  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method B). The corner spots (triangles) and origin spot (square) in the TLC image are markers.  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method B) after purification by HPLC:  $R_f = 0.73$ , radiochemical purity; 93.8%.

Omokawa M, *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 97, 117557. Figure 4 を改変



**Figure 18.** Comparison of HPLC analysis between [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt (method B) and FGC-Pt using Sugar-D column. ① [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt (method B); RT = 6.7 min ② FGC-Pt; RT = 6.5 min. UV wavelength: 220 nm. Omokawa M, *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 97, 117557. Figure 5

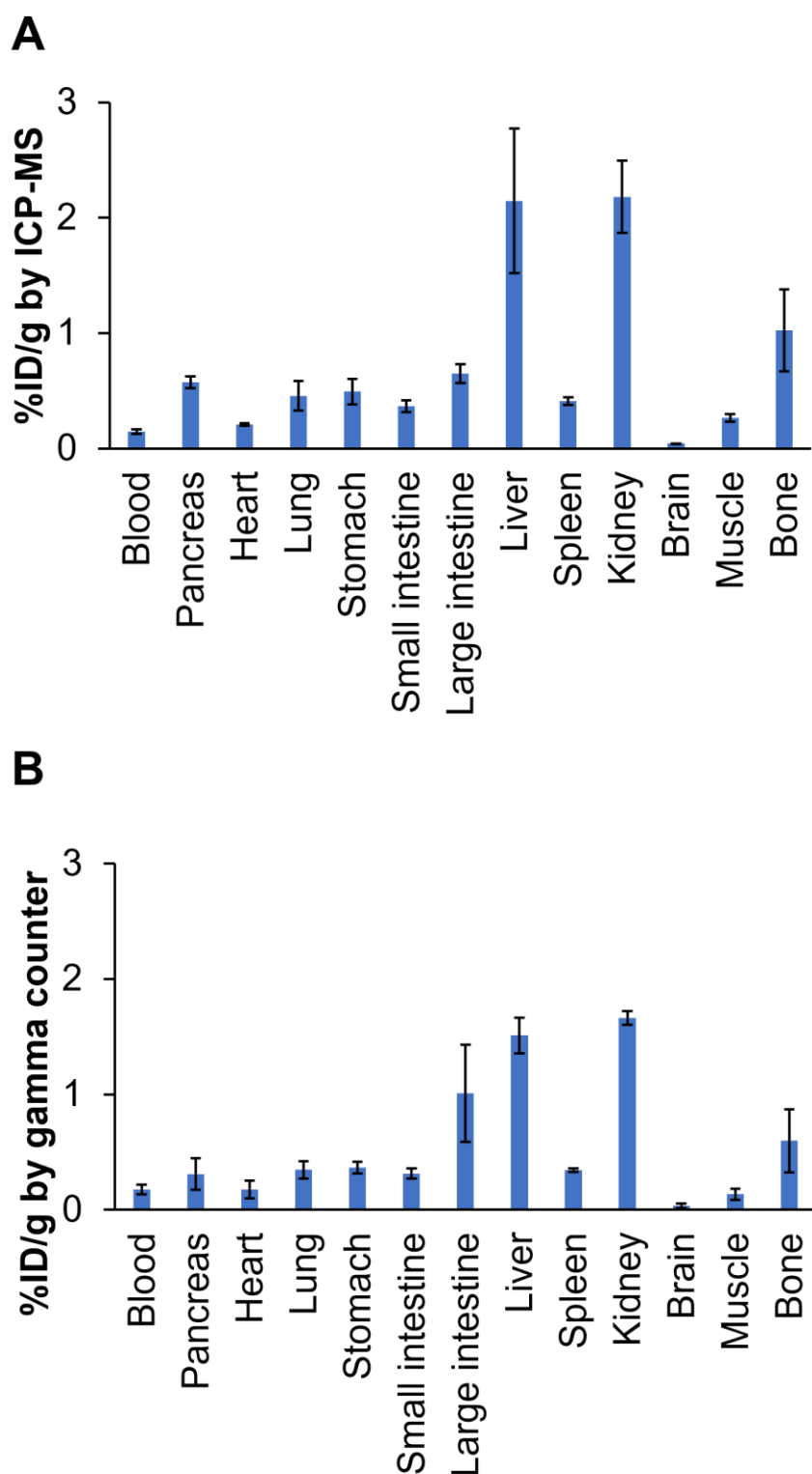
### 3. 健常マウスにおける FGC-Pt と [<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt の体内分布の比較

FGC-Pt と [<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt の体内分布の関連性について評価するため、FGC-Pt と [<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt (Method B)をそれぞれ尾静脈内投与し、24 時間後に摘出した健常マウスの 13 臓器 (脾臓、心臓、肺、脾臓、脳、筋肉、骨、血液、胃、小腸、大腸、肝臓、腎臓) における Pt 濃度 (%ID/g) を ICP-MS で、<sup>191</sup>Pt 放射能濃度をガンマカウンターにより定量して比較した。その結果、FGC-Pt と [<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt は投与 24 時間後において、肝臓 ([<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt :  $1.5 \pm 0.2\%$  ID/g、FGC-Pt :  $2.1 \pm 0.6\%$  ID/g) や腎臓 ([<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt :  $1.7 \pm 0.1\%$  ID/g、FGC-Pt :  $2.2 \pm 0.3\%$  ID/g) への高い集積が確認されたように、ほぼ同様の体内分布を示した (Figure 19A and 19B)。そして、スピアマンの相関分析により、全 13 臓器における Pt 濃度 (%ID/g by ICP-MS) と <sup>191</sup>Pt 放射能濃度 (%ID/g by gamma counter) との間に高い相関性 ( $r=0.92$ ,  $p<0.0001$ ; Figure 20) が認められた。よって、[<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt は FGC-Pt の動態を計測できるガンマ線イメージングプローブとしての可能性を有することが示唆された。

一方で、今回は <sup>191</sup>Pt の製造量に限界があり実現できなかったが、複数の細かいタイムポイントを設けて、経時的な体内分布データを得ることで、薬物動態解析を実施することが必要と考えられる。今後、<sup>191</sup>Pt の製造量が十分に確保できた場合は、検討していきたいと考えている。

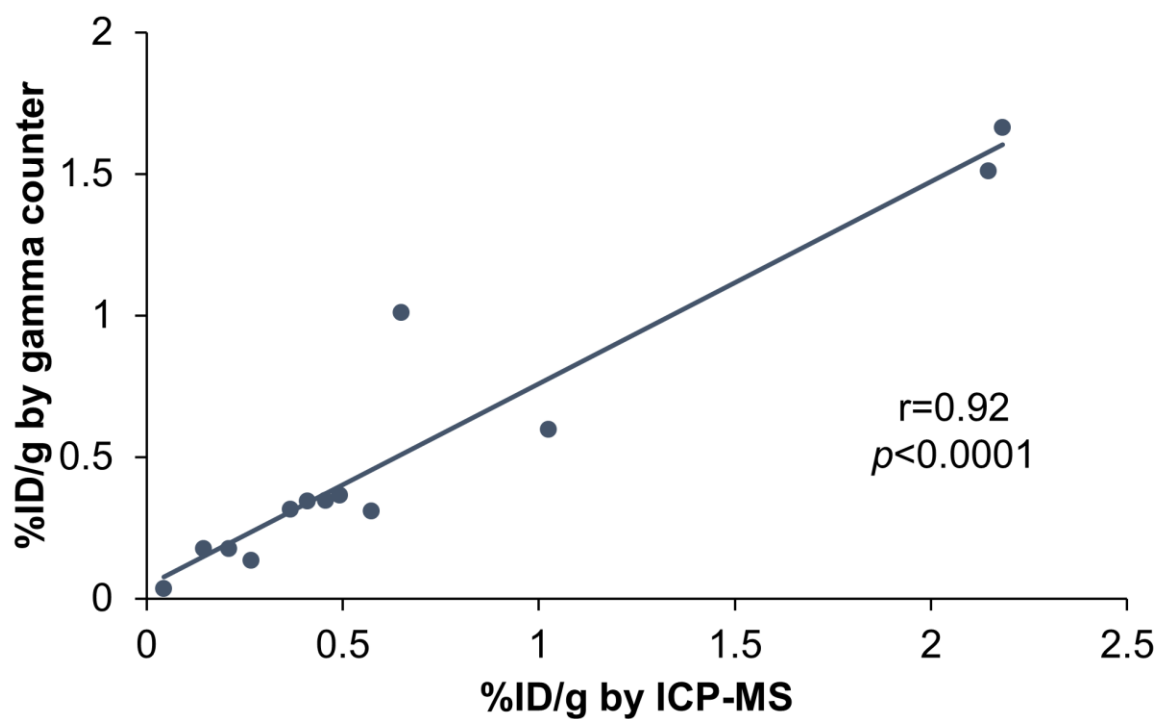
また、今回調製された [<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt はモル活性が低かったため、1 匹当たりに投与する放射能量を確保するために、投与するモル量を増やす必要があった。そのため、マウスに投与した [<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt の Pt モル量は FGC-Pt の Pt モル量の約 6.8 倍であったが、本研究で検討したモル量の差の範囲内では、体内分布に相関があった。今後、[<sup>191</sup>Pt]FGC-Pt のモル活性の向上を目指して、モル活性を高めるための <sup>191</sup>Pt の製造法や <sup>191</sup>Pt 標識体の合成条件の検討も必要である。

これまでに、ヒトにおいてガンマカメラと <sup>191</sup>Pt 標識されたシスプラチンを使ったガンマ線イメージングの例が報告されている<sup>33</sup>。したがって、<sup>191</sup>Pt から放出される高いエネルギーを検出できる専用装置を用いてガンマ線イメージングを達成することは実現可能だと考えられ、ガンマ線イメージング技術と <sup>191</sup>Pt 標識体を使って得られた画像データから、将来的には新規白金錯体の体内分布に関する情報を得られる可能性がある。この技術は、新規白金錯体の治療薬開発に活用できると考えられる。さらに、新しい白金錯体が患者に適用できるかどうかを判断し、それぞれの患者に適切な投与量を設定し、Pt が蓄積することで生じる毒性が生じる部位を予測することが可能になると期待できる。



**Figure 19.** Biodistribution of FGC-Pt and [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt in healthy mice at 24 h post-injection. (A) Platinum concentration (expressed as % injected dose/g tissue; %ID/g by ICP-MS) in organs at 24 h post-injection of FGC-Pt. (B)  $^{191}\text{Pt}$  radioactivity concentration (expressed as % injected dose/g tissue; %ID/g by gamma counter) in organs at 24 h post-injection of [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6).

Omokawa M, *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 97, 117557. Figure 6 を改変



**Figure 20.** Spearman's correlation analysis between platinum concentration (%ID/g by ICP-MS) and  $^{191}\text{Pt}$  radioactivity concentration (%ID/g by gamma counter) in 13 organs. The  $r$  value represents Spearman's rank correlation coefficients.

Omokawa M, *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 97, 117557. Figure 7 を改変

### 第3節 小括

本章では、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ を得るための2つの新しい手法を提示した。そして、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ がガンマ線イメージングプローブとして利用可能かを検証するため、得られた $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ とFGC-Ptの体内分布の関連性について評価を行い、以下の結果を得た。

1. Method A は、FGC-Pt に加速器によって得られた中性子を直接照射し、 $^{192}\text{Pt}(n,2n)^{191}\text{Pt}$  核反応により $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ を製造する方法である。Method B は、上記の方法で $[^{191}\text{Pt}]\text{K}_2\text{PtCl}_4$ を製造し、その後 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ を合成する方法である。結果として、method A と比べて method B により高純度の $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ が得られ、モル活性はそれぞれ115 MBq/mol、119 MBq/mol であった。
2. 健常マウスにおける体内分布を評価したところ、FGC-Pt および $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ をそれぞれ尾静脈内投与し、24 時間後に摘出した13臓器のPt濃度 (%ID/g by ICP-MS) と $^{191}\text{Pt}$ 放射能濃度 (%ID/g by gamma counter) の間に、高い相関性が観察された。

以上の結果から、モル活性の向上など $^{191}\text{Pt}$ の製造法や $^{191}\text{Pt}$ 標識体の合成法に改善の余地は残るが、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ はFGC-Ptの薬物動態特性を追跡できるガンマ線イメージングプローブとして利用できる可能性が見出された。



## 総括

本研究では、腫瘍特異性に欠け、しばしば副作用をもたらす白金系薬剤の問題を解決するため、腫瘍特異的な集積による副作用軽減を目指した新規白金錯体の開発に取り組むこととした。

第 1 章では、薬剤開発の戦略として、がん細胞におけるワールブルグ効果を利用し、さらに [ $^{18}\text{F}$ ]FDG の特性であるメタボリックトラッピングを利用するために、白金錯体と 2-fluorinated 2-deoxyglucoside を結合させた新規糖連結白金(II)錯体 (FGC-Pt) を設計した。

はじめに、1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranose を出発原料として、全 8 工程で FGC-Pt を合成した (FGC-Pt の総収率 : 11%、FGC-Pt の純度 : 96%)。細胞毒性の評価では、HeLa 細胞において、FGC-Pt はシスプラチンと同様に濃度依存的な殺細胞活性を示したが、シスプラチンよりも弱い細胞毒性であった。一方で、GLUT1 の発現量が異なる HeLa 細胞および A549 細胞における細胞毒性は GLUT1 の発現量を反映した結果となり、FGC-Pt の GLUT1 を介した細胞内への取り込みが、殺細胞効果に影響を与えることが示唆された。また、FGC-Pt 処理細胞における細胞内 Pt 取り込み量がシスプラチン処理細胞よりも少ない結果が得られたが、FGC-Pt 処理した細胞は Pt が細胞内に取り込まれていることが確認できた。この結果は、第 1 章第 2 節-2 において FGC-Pt が細胞内へ取り込まれて毒性を示した結果を支持するものと考えられる。マウス血漿中における FGC-Pt の安定性を評価したところ、FGC-Pt の半減期は約 2 時間であることが判明し、血漿中におけるシスプラチンの半減期 0.9 時間<sup>44</sup>の約 2 倍であることから、血漿中では FGC-Pt はシスプラチンよりも安定に化学構造を維持しており、静脈内投与後の血中から組織への移行過程ではシスプラチンよりも有用であることが示唆された。健常マウスにおける FGC-Pt の投与 24 時間後の体内分布評価では、肝臓、腎臓で高い Pt 集積量が確認された一方で、GLUT1 が高発現していることが知られる脳<sup>30</sup>では低く、脳へ副作用が生じるリスクは低いことが示唆された。A549 細胞皮下移植モデルマウスを使った体内分布の評価では、FGC-Pt の尾静脈内投与後において、腫瘍からの Pt の排出が他の臓器と比較して遅く、Pt が腫瘍で滞留していることが示され、腫瘍におけるメタボリックトラッピングが関与していることが考えられた。FGC-Pt とシスプラチンの尾静脈内投与 24 時間後における体内分布の比較から、FGC-Pt はシスプラチンよりも相対的に腫瘍に集積しやすいことが示された。また、FGC-Pt を投与した後、24 時間から 48 時間にかけて腎臓において Pt 量の有意な減少があることや、FGC-Pt はシスプラチンと比較して投与 24 時間後の腎臓への Pt 集積量が低いことから、シスプラチンでよく知られる腎臓への Pt 蓄積による腎毒性を回避できる可能性が示唆された。FGC-Pt が投与後 24 時間経過した時点で脳内への Pt 集積は低い結果から、脳において FGC-Pt は早期に取り込まれるが、その後、排出トランスポーターにより排出され、24 時間時点で Pt 集積量が低い結果であった可能性、または GLUT1 を介す細胞内への取り込み以外の機構を主とする可能性を考え、FGC-Pt は GLUT に注目して薬剤設計した化合物ではあるが、GLUT だけでなく OCT の基質になっている可能性があるかと推察した。一方で、FGC-Pt の細胞内取り込みの詳細なメカニズムについては、第 1 章第 2 節-3,5 で概説した通り、ワールブルグ効果を利用した薬剤開発の戦略や OCT を介した細胞内への取り込み機構を有するかについての直接的な検証には未だ至っておらず、これらは今後の検討課題である。A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した抗腫瘍効果の評価では、腫瘍サイズ、体重変化率、摂餌量、注射部位の皮膚状態、体重当たりの臓器重量の比較から、FGC-Pt はシスプラチンより

も個体への毒性は低いが、対照群と比較するとシスプラチンと同等の腫瘍増殖抑制傾向を示す新規化合物であることが明らかとなった。

第2章では、ガンマ線イメージング技術を利用して、全身の臓器や組織への Pt の集積を経時的、定量的かつ非侵襲的に追跡することを目指して、放射性  $^{191}\text{Pt}$  標識 FGC-Pt ( $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ ) の開発を計画し、放射性  $^{191}\text{Pt}$  の製造法および  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  の合成法の検討を行った。さらに、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  および FGC-Pt の体内分布データを定量的に比較することで、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  がガンマ線イメージングプローブとして利用可能かを検証した。

$[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  は2つの異なる方法で得た。Method A は、FGC-Pt に加速器によって得られた中性子を直接照射し、 $^{192}\text{Pt}(n,2n)^{191}\text{Pt}$  核反応により  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  を製造する方法である。Method B は、上記の方法で  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  から  $[^{191}\text{Pt}]\text{K}_2\text{PtCl}_4$  を製造し、続いて FGC-Pt の配位子と反応させて、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  を合成する方法である。Method A および method B によって得られた  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  のモル活性は、それぞれ 115 MBq/mol、119 MBq/mol であった。Radio TLC 分析や HPLC 分析の結果から、method A は  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  を製造するには容易な方法ではあるが、精製後のサンプルにおいても不純物が残ってしまうため、 $^{191}\text{Pt}$  標識法としては不向きであることが示された。一方で、method B により高純度の  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  が得られることが明らかとなり、method B は method A よりも煩雑な方法ではあるが、 $^{191}\text{Pt}$  標識体を得るのに適していることが示された。したがって、method B は他の新規  $^{191}\text{Pt}$  標識白金錯体の合成にも応用できると考えられる。さらに、健常マウスにおける体内分布の評価から、13 臓器の Pt 濃度 (%ID/g by ICP-MS) と  $^{191}\text{Pt}$  放射能濃度 (%ID/g by gamma counter) の間に、高い相関性が観察され、同様の体内分布を示したことが明らかとなった。

以上の結果から、FGC-Pt は、メタボリックトラッピングを利用した腫瘍内での滞留性や、腎臓からの Pt の排出による腎毒性を回避できることが示唆される抗腫瘍薬としての可能性が示された。さらに、 $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  は FGC-Pt の薬物動態特性を追跡することができるガンマ線イメージングプローブとしての可能性を有することが示唆された。よって、本研究で示した薬剤開発戦略や  $^{191}\text{Pt}$  標識体を利用したガンマ線イメージングの手法は、がん治療を指向した新規白金錯体の創薬研究に有益な知見を与えるものと考えられる。

## 実験項

### 第 1 章の実験方法・材料

#### 1. General information

All reagents, solvents, and starting materials were purchased from commercial sources: 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. NMR spectra were obtained using a Bruker Ascend 500 NMR spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) and a JEOL JNM ECS-400 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan).  $^1\text{H}$  NMR spectra were collected at 400 or 500 MHz, and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were collected at 125 or 100 MHz.  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts ( $\delta$ ) are shown in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (0 ppm), which was used as the internal standard.  $^1\text{H}$  NMR showed chemical shifts based on the solvent peak (4.75 ppm) when  $\text{D}_2\text{O}$  was used. The  $^{13}\text{C}$  NMR values were reported relative to tetramethylsilane (0 ppm) or 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- $\text{d}_4$ -acid sodium salt (0 ppm), which was used as an internal standard. Assignments were based on the analysis of coupling constants, as well as COSY, HSQC, and HMBC spectra. LR-MS and HR-MS were obtained using an LC-MS-IT-TOF instrument (Shimadzu, Kyoto, Japan). Chromatographic purification was performed using the EPCLC W-Prep 2XY automated flash chromatography system (Yamazen Corp., Osaka, Japan). TLC was performed on silica gel 60  $\text{F}_{254}$  plates (Merck, Darmstadt, Germany) and  $\text{NH}_2$  silica gel 60  $\text{F}_{254}$  plates (Wako Pure Chemical Industries). Platinum concentration was determined using ICP-MS (Agilent 7700X ICP-MS, Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Analytical HPLC was performed using a Shimadzu LD-20AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) fitted with a Sugar-D column (4.6 ID  $\times$  150 mm) (Nacalai Tesque Inc.) and SPD-20A (Shimadzu Corporation) UV detector. The flow rate was 0.5 ml/min, and UV absorption was measured at 220nm. The runs were performed with liner gradients of Millipore water (A) and methanol (B; Fujifilm Wako HPLC-grade):  $t = 0\text{-}7\text{min}$ , 85% B;  $t = 7\text{-}10\text{ min}$ , 85-50%,  $t = 10\text{-}30\text{min}$ , 50-10% B. All animal care and experimental studies were performed in accordance with the guidelines and with the approval of the Animal Investigation Committee of Kyoto Pharmaceutical University.

## 2. 化合物の合成

### 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-fluoro- $\beta$ -D-glucopyranose (**S1**).

1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranose (**1**) (2.00 g, 5.74 mmol) was reacted with DAST (2.30 mL, 17.2 mmol) in 1,4-dioxane (40.0 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere. After being stirred at 100°C for 7 min, the reaction mixture was cooled to 0°C, and methanol (6.60 mL) was added. The reaction mixture was diluted with chloroform and washed thrice with saturated aqueous sodium bicarbonate and brine. The organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated in vacuo. The residue was purified by silica gel chromatography (hexane:ethyl acetate = 1:1) to obtain **S1** (1.57 g, 78%). The following data are consistent with reference<sup>57</sup>: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.79 (dd,  $J$  = 3.2, 8.2 Hz, 1H, H-1), 5.38 (dt,  $J$  = 9.1, 14.2 Hz, 1H, H-3), 5.08 (t,  $J$  = 10.0 Hz, 1H, H-4), 4.46 (dt,  $J$  = 8.2, 50.8 Hz, 1H, H-2), 4.31 (dd,  $J$  = 4.6, 12.8 Hz, 1H, H-6), 4.10 (dd,  $J$  = 1.8, 12.8 Hz, 1H, H-6), 3.87 (ddd,  $J$  = 1.8, 4.6, 10.0 Hz, 1H, H-5), 2.19 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H). HR-MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 373.0900 ([M+Na]<sup>+</sup>, calcd. 373.0905). Formula: C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>FO<sub>9</sub>Na.

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate (**2**).

Compound **S1** (2.77 g, 7.91 mmol) was reacted with piperidine (4.55 mL, 45.9 mmol) in THF (55.4 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere. The solution was stirred at 24°C for 4 h. After completing the reaction, the mixture was poured into 1% hydrochloric acid and extracted using ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and evaporated in vacuo. The crude product was purified by silica gel chromatography (hexane: ethyl acetate = 1:1) yielding 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-fluoro-D-glucopyranose (compound **S2**) (2.02 g, 83%) as a mixture of  $\alpha$  and  $\beta$  anomers ( $\alpha$ : $\beta$  anomer ratio = 71:29). CCl<sub>3</sub>CN (3.60 mL, 35.5 mmol) and DBU (3.60 mL, 35.5 mmol) were added to a solution of compound **S2** (1.99 g, 6.45 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40.0 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere. The resulting solution was stirred at 24°C for 1.5 h. The reaction was quenched with water, and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, and evaporated in vacuo. The crude product was purified using silica gel chromatography (hexane:ethyl acetate = 2:1) to yield **2** (2.23 g, 76%). The following data is consistent with the reference<sup>42</sup>: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.81 (s, 1H), 6.63 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, H-1), 5.63 (dt,  $J$  = 9.6, 12.4 Hz, 1H, H-3), 5.15 (t,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, H-4), 4.75 (ddd,  $J$  = 4.1, 9.6, 48.1 Hz, 1H, H-2), 4.10–4.30 (m, 3H, H-6 and H-5), 2.10 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H). HR-MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ : 473.9895 ([M+Na]<sup>+</sup>, calcd. 473.9896). Formula: C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>3</sub>FNO<sub>8</sub>Na.

### 1,3-Dibromo-2-propyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside (**3**)

1,3-dibromo-2-propanol (55.6  $\mu$ L, 0.54 mmol) and TMSOTf (19.5  $\mu$ L, 0.108 mmol) were added to a solution of compound **2** (98.5 mg, 0.217 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.00 mL) under Ar atmosphere. The solution was stirred for 22 h, gradually returning to 24°C from 0°C. After completion of the reaction, the reaction was quenched with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate, and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and evaporated in vacuo. The crude product was purified using amino silica gel chromatography (hexane:ethyl acetate = 2:1) to yield compound **3** (97.1 mg, 88%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.53 (dt,  $J$  = 9.7, 11.4

Hz, 1H, H-3), 5.22 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H, H-1), 5.02 (t,  $J = 10.1$  Hz, 1H, H-4), 4.50 (ddd,  $J = 4.1, 9.7, 49.0$  Hz, 1H, H-2), 4.38 (ddd,  $J = 2.3, 5.1, 10.1$  Hz, 1H, H-5), 4.26 (dd,  $J = 5.1, 12.4$  Hz, 1H, H-6), 4.13 (dd,  $J = 2.3, 12.4$  Hz, 1H, H-6), 4.04–4.07 (m, 1H,  $-\underline{\text{CH}}(\text{CH}_2\text{Br})_2$ ), 4.13 (dd,  $J = 4.5, 11.0$  Hz, 1H,  $-\text{CHCH}_2\text{Br}$ ), 3.72 (dd,  $J = 5.1, 11.0$  Hz, 1H,  $-\text{CHCH}_2\text{Br}$ ), 3.51–3.60 (m, 2H,  $-\text{CHCH}_2\text{Br}$ ), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.5 ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ), 170.0 ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ), 169.7 ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ), 96.6 (d,  $J = 20.2$  Hz, C-1), 86.8 (d,  $J = 195.8$  Hz, C-2), 79.4 ( $-\underline{\text{CH}}(\text{CH}_2\text{CH}_2)$ ), 70.4 (d,  $J = 19.3$  Hz, C-3), 68.5 (C-5), 67.8 (d,  $J = 7.4$  Hz, C-4), 61.7 (C-6), 32.9 ( $-\text{CH}(\underline{\text{CH}_2\text{Br}}_2)$ ), 31.2 ( $-\text{CH}(\underline{\text{CH}_2\text{Br}}_2)$ ), 20.7 (2C,  $\underline{\text{CH}_3\text{COO}}-$ ), 20.6 ( $\underline{\text{CH}_3\text{COO}}-$ ). HR-MS ( $\text{ESI}^+$ )  $m/z$ : 528.9487 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , calcd. 528.9479). Formula:  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{FO}_8\text{Na}$ .

### 1,3-Diazido-2-propyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside (4)

A solution of compound **3** (1.71 g, 3.37 mmol) in DMF (34.0 mL) was reacted with  $\text{NaN}_3$  (2.65 g, 40.5 mmol) under  $\text{N}_2$  atmosphere. The resulting solution was stirred at  $70^\circ\text{C}$  for 6 h. The reaction was quenched with water, and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed five times with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, and evaporated in vacuo. The crude product was purified using silica gel chromatography (hexane:ethyl acetate = 2:1) to yield **4** (1.34 g, 92%).  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.55 (dt,  $J = 9.6, 11.9$  Hz, 1H, H-3), 5.25 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H, H-1), 5.03 (t,  $J = 10.1$  Hz, 1H, H-4), 4.53 (ddd,  $J = 4.1, 9.6, 49.0$  Hz, 1H, H-2), 4.20–4.30 (m, 2H, H-6, H-5), 4.09–4.15 (m, 1H, H-6), 3.88 (quintet,  $J = 6.0$  Hz, 1H,  $-\underline{\text{CH}}(\text{CH}_2\text{N}_3)_2$ ), 3.60 (dd,  $J = 4.6, 12.8$  Hz, 1H,  $-\underline{\text{CH}_2\text{N}_3}$ ), 3.54 (dd,  $J = 6.4, 12.8$  Hz, 1H,  $-\underline{\text{CH}_2\text{N}_3}$ ), 3.42–3.49 (m, 2H,  $-\underline{\text{CH}_2\text{N}_3}$ ), 2.10 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.6 ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ), 170.0 ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ), 169.7 ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ), 96.4 (d,  $J = 21.2$  Hz, C-1), 86.8 (d,  $J = 195.7$  Hz, C-2), 77.4 ( $-\underline{\text{CH}}(\text{CH}_2\text{N}_3)_2$ ), 70.4 (d,  $J = 19.3$  Hz, C-3), 68.2 (C-5), 67.9 (d,  $J = 7.40$  Hz, C-4), 61.8 (C-6), 52.4 ( $-\underline{\text{CH}_2\text{N}_3}$ ), 51.8 ( $-\underline{\text{CH}_2\text{N}_3}$ ), 20.72 ( $\underline{\text{CH}_3\text{COO}}-$ ), 20.71 ( $\underline{\text{CH}_3\text{COO}}-$ ), 20.6 ( $\underline{\text{CH}_3\text{COO}}-$ ). HR-MS ( $\text{ESI}^+$ )  $m/z$ : 455.1301 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , calcd. 455.1297). Formula:  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}_8\text{Na}$ .

### 1,3-Diamino-2-propyl 2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside (5)

A solution of compound **4** (1.34 g, 3.45 mmol) in MeOH (27.0 mL) was added to NaOMe (28% in methanol, ca. 0.8 mL) under  $\text{N}_2$  atmosphere. The mixture was stirred at  $24^\circ\text{C}$  for 2 h. The resulting solution was neutralized using a Dowex 50 W-X4 200-400 MESH HFORM. After filtration to remove the resin (washing with MeOH), the filtrate was evaporated in vacuo to give 1,3-diazido-2-propyl 2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside (compound **S3**) (987 mg, 93%). Compound **S3** was used in the subsequent reactions without purification. Palladium-activated carbon (10% Pd, 98.2 mg) was added to a solution of compound **S3** (935 mg, 3.05 mmol) in methanol (20.0 mL), and the mixture was stirred under  $\text{H}_2$  atmosphere at  $24^\circ\text{C}$  for 2 h. The resulting solution was filtered through a Hyflo Super-Cel layer, and the filtrate was evaporated in vacuo to obtain **5** (703 mg, 91%).  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.23 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H, H-1), 4.38 (ddd,  $J = 3.7, 9.6, 49.9$  Hz, 1H, H-2), 3.92 (dt,  $J = 9.6, 12.8$  Hz, 1H, H-3), 3.62–3.80 (m, 4H, H-5, H-6, and  $-\underline{\text{CH}}(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$ ), 3.39 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H-4), 2.67–2.77 (m, 4H,  $-\underline{\text{CH}_2\text{NH}_2}$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  98.9 (d,  $J = 34.6$  Hz, C-1), 92.8 (d,  $J = 186.9$  Hz, C-2), 85.0 ( $-\underline{\text{CH}}(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$ ), 75.1 (C-5), 74.1 (d,  $J = 17.2$  Hz, C-3), 72.0 (d,  $J = 7.6$  Hz, C-4), 63.2 (C-6), 45.5 ( $-\underline{\text{CH}_2\text{NH}_2}$ ), 44.3 ( $-\underline{\text{CH}_2\text{NH}_2}$ ). HR-MS ( $\text{ESI}^+$ )  $m/z$ : 255.1352 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calcd. 255.1351). Formula:  $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{FNa}$ .

### ***cis*-Dichloro [(2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranosidyl)propane-1,3-diamine] platinum (6) : FGC-Pt**

K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (257 mg, 0.620 mmol) was added to a solution of **5** (155 mg, 0.610 mmol) in water (3.10 mL). The mixture was stirred in the dark under a N<sub>2</sub> atmosphere at 24°C for 24 h. The resulting solution was purified using a Bio-gel P2 resin column. Based on SiO<sub>2</sub>-TLC monitoring (isopropanol:water:aqueous ammonium solution = 6:5:2, R<sub>f</sub> = 0.77), the fractions were combined and evaporated in vacuo to yield **6** (116 mg, 37%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.23 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H, H-1), 4.30–4.46 (m, 2H, H-2 and -CH(CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 4.01 (dt,  $J$  = 9.6 Hz, 13.3 Hz, 1H, H-3), 3.80 (br d,  $J$  = 11.9 Hz, 1H, H-6), 3.63–3.71 (m, 2H, H-5 and H-6), 3.39 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, H-4), 2.76–3.00 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  97.6 (d,  $J$  = 21.0 Hz, C-1), 92.5 (d,  $J$  = 186.9 Hz, C-2), 75.5 (C-5), 74.3 (-CH(CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 73.8 (d,  $J$  = 17.3 Hz, C-3), 71.9 (d,  $J$  = 8.6 Hz, C-4), 63.2 (C-6), 48.1 (-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 45.7 (-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). HR-MS (ESI+)  $m/z$ : 542.0191 ([M+Na]<sup>+</sup>, calcd. 542.0196). Formula: C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>NaPt.

### **3. 細胞培養**

HeLa (human cervical cancer) and A549 (human lung cancer) cell lines were purchased from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, London, UK). HeLa cells were cultured in E-MEM (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) containing 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque Inc.), non-essential amino acids solution 1 mM (Nacalai Tesque Inc.), and 1% sodium pyruvate solution (Nacalai Tesque Inc.) in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. A549 cells were cultured in Ham's F-12K medium (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) containing 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque Inc.) in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The cells were passaged twice a week until reaching 70-90% confluence.

### **4. 細胞毒性評価**

HeLa cells and A549 cells were seeded in 24-well plates (Corning, New York, USA) at 40000 cells/well and incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in 1 mL of complete medium at 37°C for 24 h. Subsequently, 500  $\mu$ L of freshly prepared culture medium containing drugs at concentrations (cisplatin:0-100  $\mu$ M, FGC-Pt:0-1000  $\mu$ M) for HeLa cells and (FGC-Pt:0-1500  $\mu$ M) for A549 cells were added and incubated for another 48 h. MTS reagent (Promega Corporation, Madison, WI, USA) was added, and the cells were incubated for 3 h. Finally, 100  $\mu$ L of medium containing MTS was transferred to 96-well plates (AGC TECHNO GLASS Co., Ltd., Shizuoka, Japan). The absorbance was measured at 490 nm. IC<sub>50</sub> values were calculated using GraphPad Prism software (version 6.00 for Windows; GraphPad, Inc., California, USA). All experiments were performed in triplicate.

### **5. ウェスタンブロット法による GLUT1 の発現量の評価**

Cells were washed three times with PBS (Nacalai Tesque Inc.). Then, cells were added M-PER reagent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) with phosphatase inhibitor ((Nacalai Tesque Inc.) and protease inhibitor (Thermo Fisher Scientific), and shaken gently for 5 min. The supernatant collected by

centrifuging at 14,000×g at 4°C for 5 min. Samples were diluted and mixed with NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific) and NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fisher Scientific), heated at 95°C for 5 min. Samples were separated electrophoretically with 4-20% Mini-PROTEAN® TGXTM precast gel at 100 V and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) 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). Membranes were scanned using the ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). GLUT1 mouse mAb (1:500) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Texas, USA). Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (1:5000) 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).

## 6. 細胞内 Pt 取り込み評価

The cellular uptake of platinum was measured in HeLa cells. HeLa cells were seeded in 6-well plates (AS ONE Corporation., Osaka, Japan) at 300000 cells/well and incubated in 3 mL complete medium at 37°C for 24 h in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After incubation, cells were incubated with FGC-Pt (30 µM), FGC-Pt + EDG (30 µM + 30 µM), and cisplatin (30 µM) in standard culture conditions for 10 h. The cells were washed three times with PBS (Nacalai Tesque Inc.) containing 1 mM EDTA and harvested by trypsinization. The harvested cells were concentrated and digested with nitric acid, perchloric acid, and hydrogen peroxide for ICP-MS analysis. Cells were counted before digestion.

## 7. マウス血漿中における FGC-Pt の化学構造の安定性評価

Plasma was purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). FGC-Pt (2.4 mg) was mixed with plasma (160 µL) and incubated at 37°C. The mixtures were incubated at 37°C for 0, 2, 4, and 6 h, mixed with saline, and filtrated using a syringe filter (Nacalai Tesque Inc.). The filtrate was analyzed by HPLC. HPLC analysis was carried out under the aforementioned measurement conditions.

## 8. 健常マウスおよび A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した FGC-Pt の体内分布の評価

The in vivo biodistribution of FGC-Pt was evaluated in healthy and A549 cell-bearing mice. Five-week-old male BALB/c nu/nu mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan) and quarantined for one week prior to tumor inoculation. A549 cells were injected subcutaneously into the right shoulder at a concentration of  $1 \times 10^7$  cells/site. Tumor volume was calculated using the following formula:  $V = (4/3) \times \pi \times (\text{tumor length}/2) \times (\text{tumor width}/2) \times (\text{tumor height}/2)$ . Five-week-old male Slc/ddy mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan) and quarantined for one week prior to drug injection. The experiment began when the tumor size reached 50 mm<sup>3</sup>. Freshly prepared saline solutions of 4 mg of Pt/kg FGC-Pt and cisplatin were administered by tail vein injections to healthy mice (n = 6/group) and A549 cell-bearing mice (n = 4/group). Biodistribution was assessed by ICP-MS at 24 and 48 h post-injection of the tested drugs. Quantification of the platinum concentration was performed by ICP-MS after nitric acid, perchloric acid,

and hydrogen acid digestion.

#### 9. A549 細胞皮下移植モデルマウスを使用した FGC-Pt の抗腫瘍効果の評価

Five-week-old male BALB/c nu/nu mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan) and quarantined for one week prior to tumor inoculation. A549 cells were subcutaneously injected at a concentration of  $1 \times 10^7$  cells/site into the right shoulder. The experiment began when the tumors reached 100-200 mm<sup>3</sup> in size. The mice were randomly divided into three groups: control (saline, 4.0 mL/kg, n = 6), FGC-Pt (2.7 mg of Pt/kg, n = 6), and cisplatin (2.7 mg of Pt/kg, n = 6). FGC-Pt and cisplatin were freshly prepared by dissolution in saline before injection and administered via tail vein injection on days 1, 8, 15, and 22. The mice were weighed, and their weight was recorded until day 30 and then observed for 20 days.

#### 10. 統計解析

Data are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD), and BellCurve for Excell (version 3.21) (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used for all statistical analyses. Student's t-test was used for two-group comparisons. Multiple comparisons among groups were performed using Tukey's test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .



## 第2章の実験方法・材料

### 1. General information

All reagents, solvents, and starting materials, except the radioactive platinum complexes, were purchased from Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) and Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan), and used without further purification. Thin-layer chromatography (TLC) autoradiographical analysis of [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt and TLC analysis of FGC-Pt were performed using TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> 25 aluminum sheets (EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Germany). TLC autoradiography (radio-TLC) was performed using an Amersham Typhoon scanner (GE Healthcare Life Sciences). Analytical and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) was performed using Shimadzu LD-20AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) fitted with a Sugar-D column (10 ID ×150 mm) (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) and an SPD-20A (Shimadzu Corporation) UV detector. The flow rate was 1.8 ml/min and UV absorption was measured at 220 nm. The runs were performed with a linear gradient of Millipore water (A) and methanol (B; Fujifilm Wako HPLC-grade):  $t = 0\text{--}7$  min, 85% B;  $t = 7\text{--}10$  min, 85–50% B;  $t = 10\text{--}30$  min, 50–10% B.  $^{191}\text{Pt}$  radioactivity was determined using a 1480 Automatic Gamma Counter (PerkinElmer, Massachusetts, USA). All animal care and experimental studies were performed in accordance with the guidelines and approval of the Animal Investigation Committee of Kyoto Pharmaceutical University.

### 2. $^{191}\text{Pt}$ の製造

The Pt-191 isotope was produced using the (n,2n) reaction, which is induced by accelerator neutrons ( $E_n > 10$  MeV). The irradiation experiment was performed with accelerator neutrons provided by the Be (d,n) reaction using 40 MeV deuterons in the AVF cyclotron at the Cyclotron and Radioisotope Center (CYRIC), Tohoku University.

FGC-Pt (3.70 mg) and  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  (29.0 mg) powders were used as irradiation targets (Figure 13). To prevent charging, the sample powder was sealed in an electrostatic-discharge material (EDS) plastic bag. The target bag was placed 15 mm from a 9 mm thick beryllium metal converter irradiated by a deuteron beam. The energy of the deuteron beam was 40 MeV, and the average beam current was 5.54  $\mu\text{A}$  for 12 h of irradiation. After irradiation,  $^{191}\text{Pt}$  activity was measured using a germanium detector. At the end of bombardment, 20 kBq of  $^{191}\text{Pt}$  was produced. The determination was quantified using gamma-ray energy spectra at both 409 keV and 538 keV.

### 3. [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt (method A)の精製と分析

[ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt, which was obtained by irradiating FGC-Pt with accelerator neutrons, was purified using a Sugar-D column. The peak at 6.6 min was collected by HPLC. The sample was then evaporated in vacuo to obtain [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt, which was analyzed using HPLC. HPLC analysis was performed under the aforementioned conditions. After purification, the samples were analyzed using radio-TLC (isopropyl alcohol:water:aqueous ammonia solution = 6:5:2,  $R_f = 0.73$ ). For comparison, FGC-Pt was also analyzed by TLC (isopropyl alcohol:water:aqueous ammonia solution = 6:5:2,  $R_f = 0.75$ ) and HPLC using a similar method. In this study, [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt obtained by irradiating FGC-Pt with accelerator neutrons is defined as [ $^{191}\text{Pt}$ ]FGC-Pt (method A).

#### 4. $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ (method B) の合成と分析

Of the aqueous solution of unpurified  $[^{191}\text{Pt}]\text{K}_2\text{PtCl}_4$  (29.0 mg) in water (340  $\mu\text{L}$ ), 320  $\mu\text{L}$  was transferred into a glass vial. Subsequently, 1,3-diamino-2-propyl-2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside (17.0 mg) was added to the glass vial. The mixture was stirred on a shaker and incubated at 24°C for 24 h. Progression of the  $^{191}\text{Pt}$  labelling reaction was monitored and analyzed using HPLC and radio-TLC.

At the end of the reaction, the resulting solution was purified using a Sugar-D column. The peak at 6.7 min collected by HPLC analysis was evaporated in vacuo to yield  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ , which was then analyzed by HPLC. HPLC analysis was performed under the measurement conditions described above. In addition, the purified samples were analyzed by radio-TLC (isopropyl alcohol:water:aqueous ammonia solution = 6:5:2,  $R_f$  = 0.73). FGC-Pt was analyzed by HPLC using a similar method. In this study,  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  synthesized using  $[^{191}\text{Pt}]\text{K}_2\text{PtCl}_4$ , which was obtained by irradiating  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  with accelerator neutrons, is defined as  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method B).

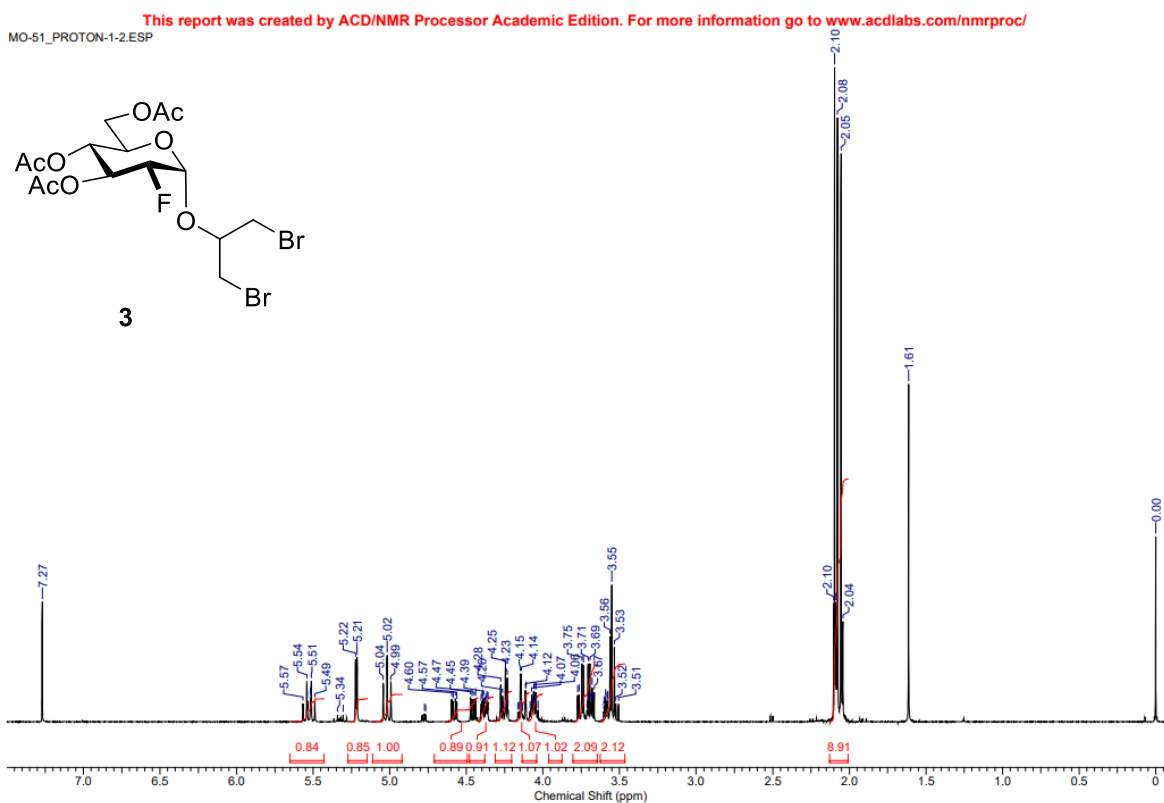
#### 5. 健常マウスにおける FGC-Pt と $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ の体内分布の比較

The in vivo biodistribution of  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  in healthy mice was evaluated. Five-week-old male slc ddY mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan) and quarantined for 1 week prior to drug injection. Freshly prepared saline solutions containing  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$  (method B) (163 Bq/60  $\mu\text{L}$  of saline) were administered to healthy mice via tail vein injections ( $n$  = 6/group). Approximately 24 h after the administration of  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ , the mice were euthanized by exsanguination. The following organs were removed for analysis: blood, pancreas, heart, lung, stomach, small intestine, large intestine, liver, spleen, kidney, brain, muscle, and bone. Tissue samples were weighed and the  $^{191}\text{Pt}$  radioactivity concentration (expressed as % injected dose/g tissue; %ID/g by gamma counter) in the organs at 24 h post-injection was assessed using a gamma counter. Using the data on the platinum concentration (expressed as Pt ng/g tissue) in organs at 24 h post-injection of FGC-Pt (4 mg of Pt/kg) in healthy mice analyzed on the chapter 1, we calculated the platinum concentration (expressed as % injected dose/g tissue; %ID/g by ICP-MS) in organs at 24 h post-injection of FGC-Pt to compare the accumulation rates of FGC-Pt and  $[^{191}\text{Pt}]\text{FGC-Pt}$ . Subsequently, the correlation between platinum concentration (%ID/g by ICP-MS) and  $^{191}\text{Pt}$  radioactivity concentration (%ID/g by gamma counter) was evaluated.

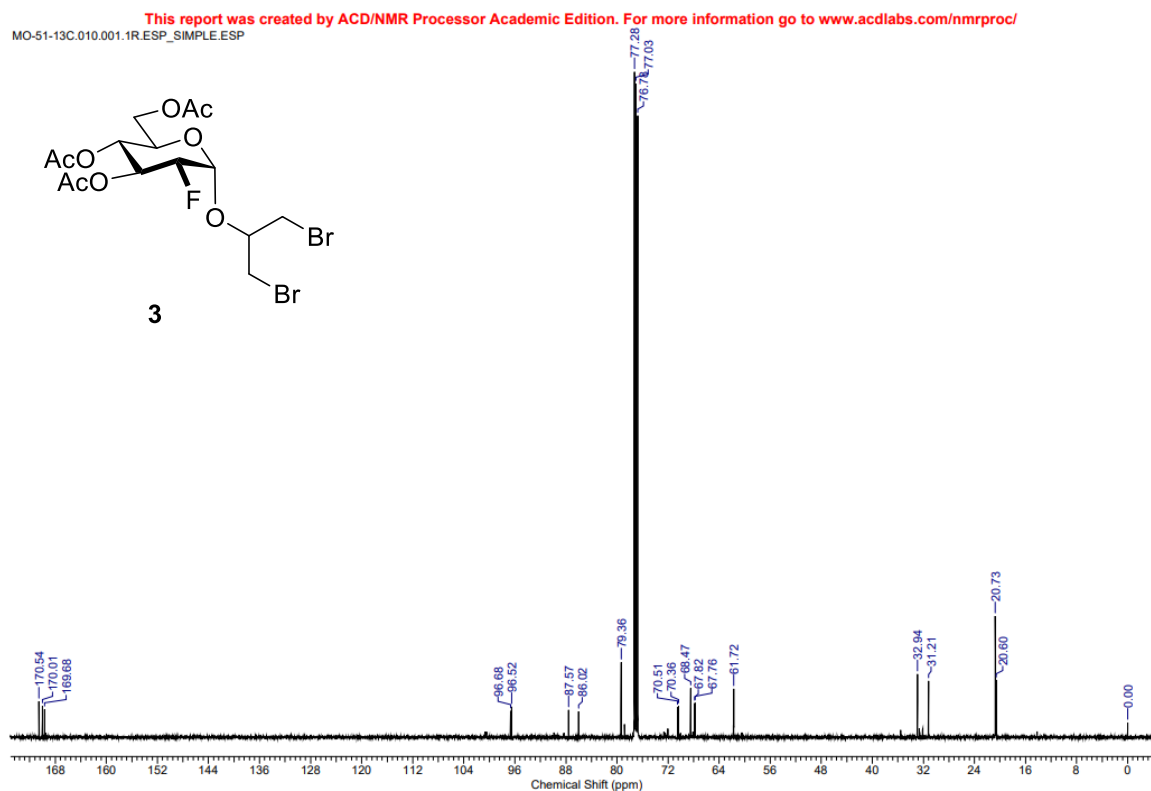
#### 6. 統計解析

Data are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) and GraphPad Prism Software (version 6.00 for Windows; GraphPad, Inc., California, USA) was used for statistical analysis. Spearman's correlation analysis was used to evaluate the relationship between platinum concentration (%ID/g by ICP-MS) and  $^{191}\text{Pt}$  radioactivity concentration (%ID/g by gamma counter).  $p$  < 0.05 was considered statistically significant.

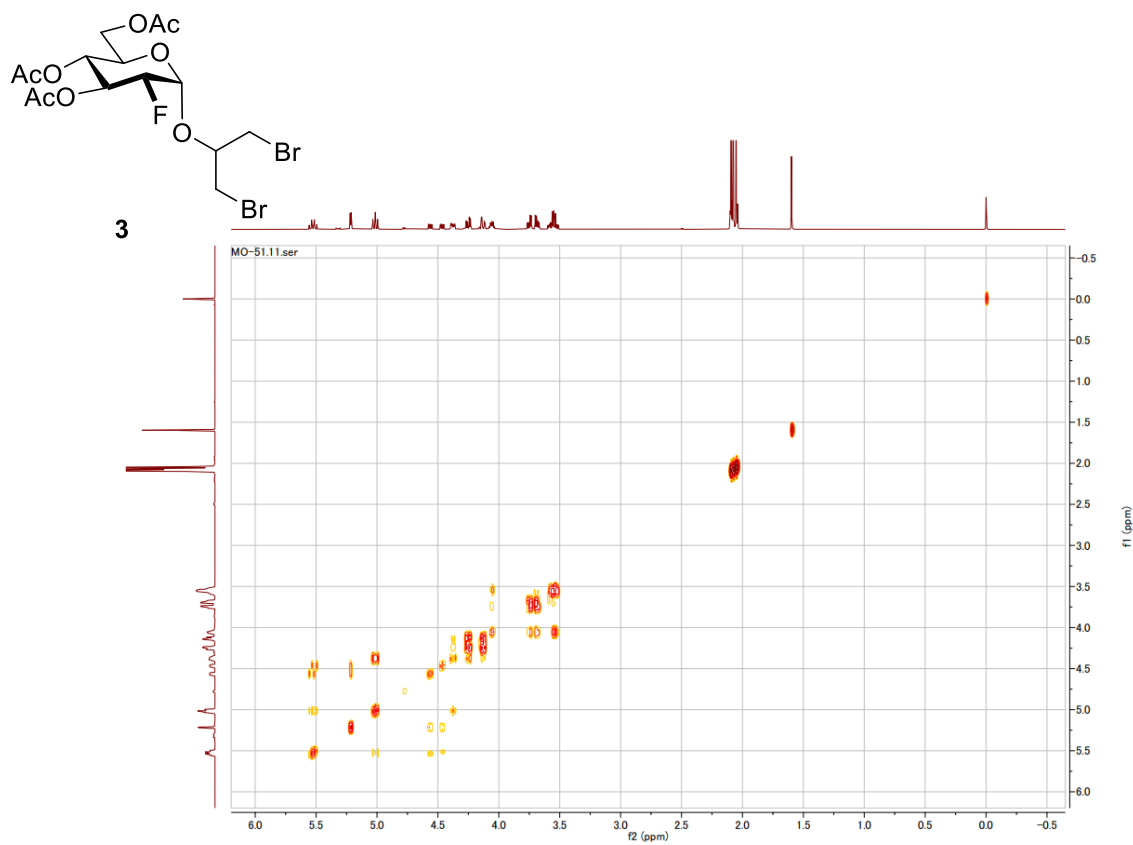
## 化合物の NMR スペクトルと HR-MS スペクトル



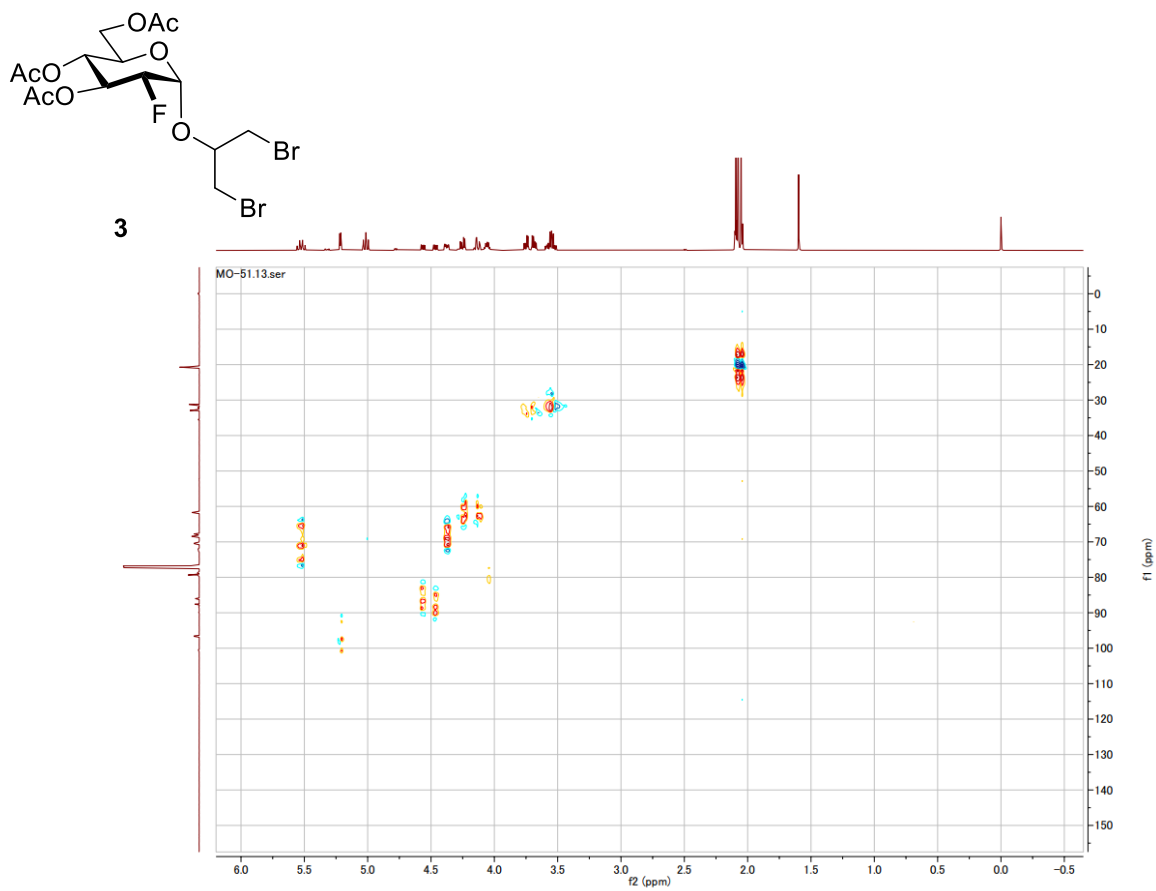
**Figure S1.**  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of compound **3**



**Figure S2.**  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of compound **3**



**Figure S3.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY of compound **3**



**Figure S4.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC of compound **3**

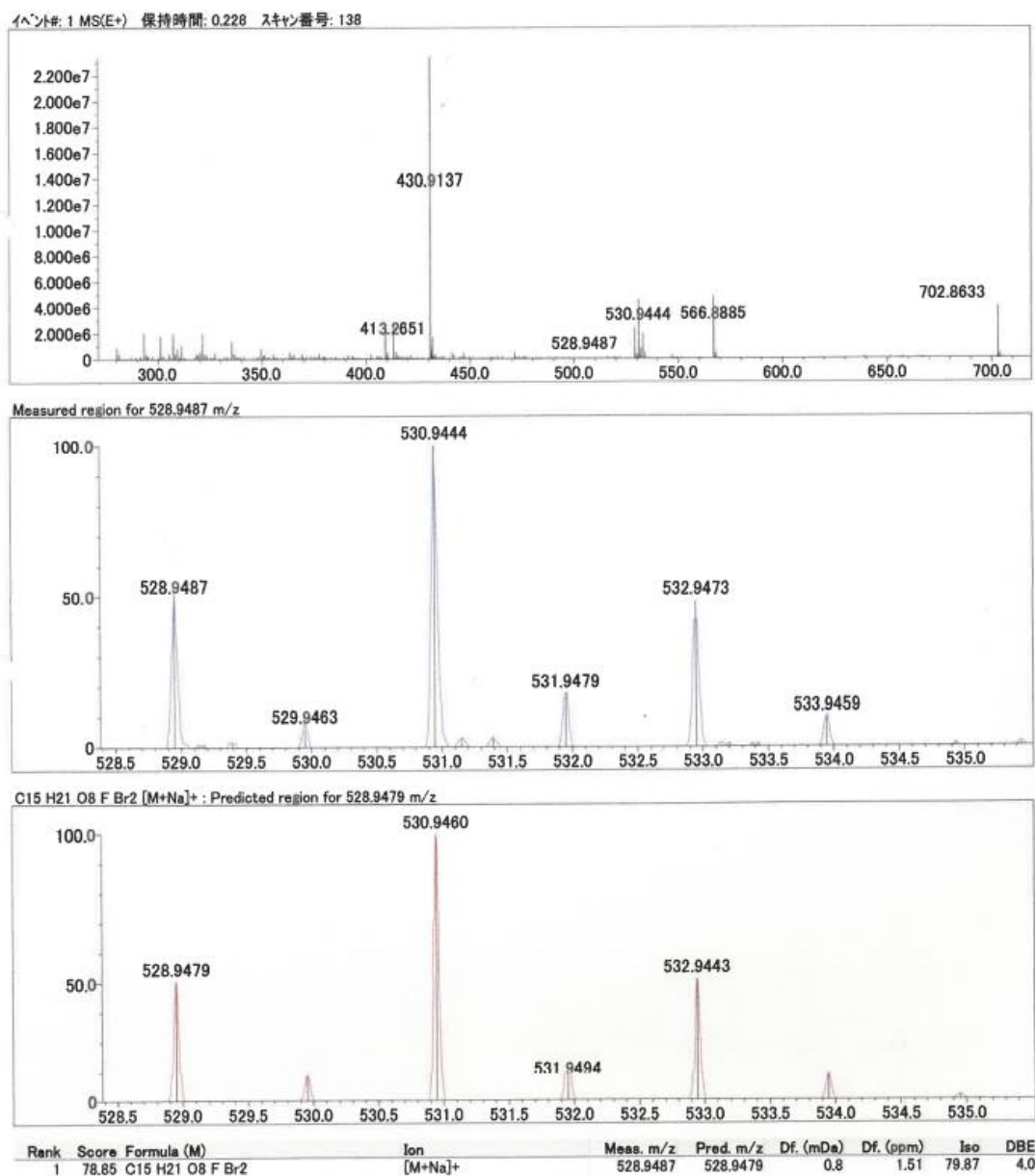
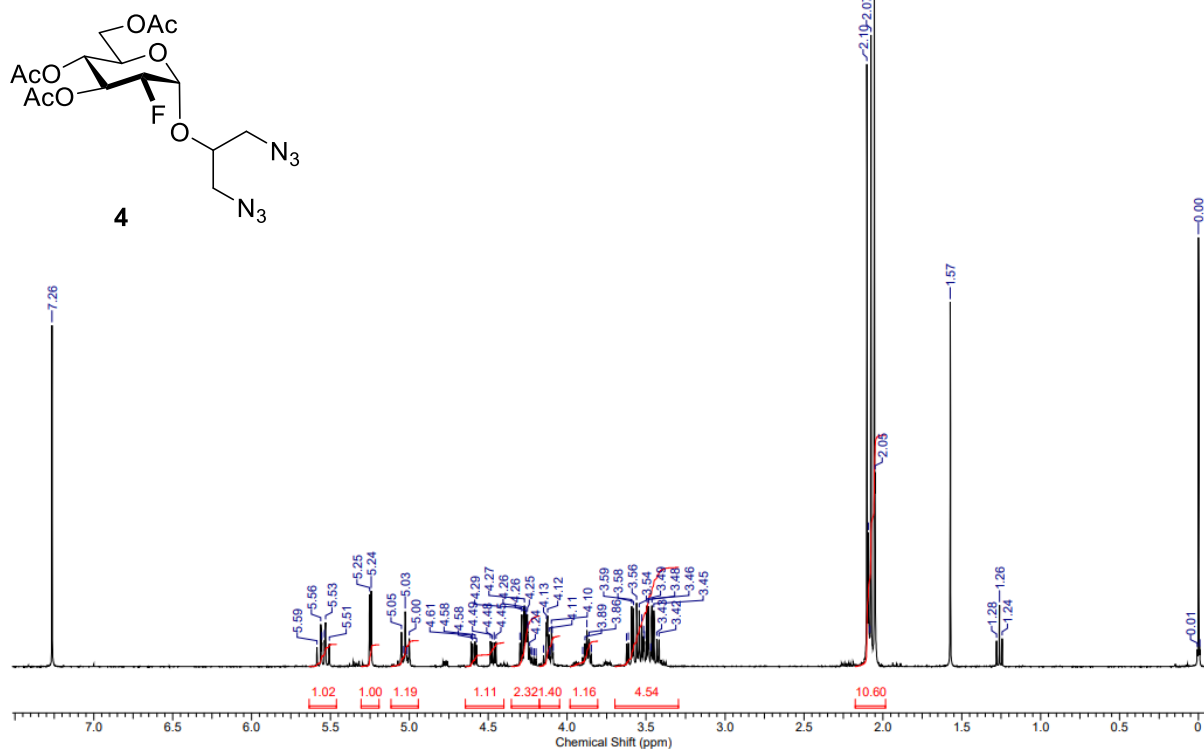
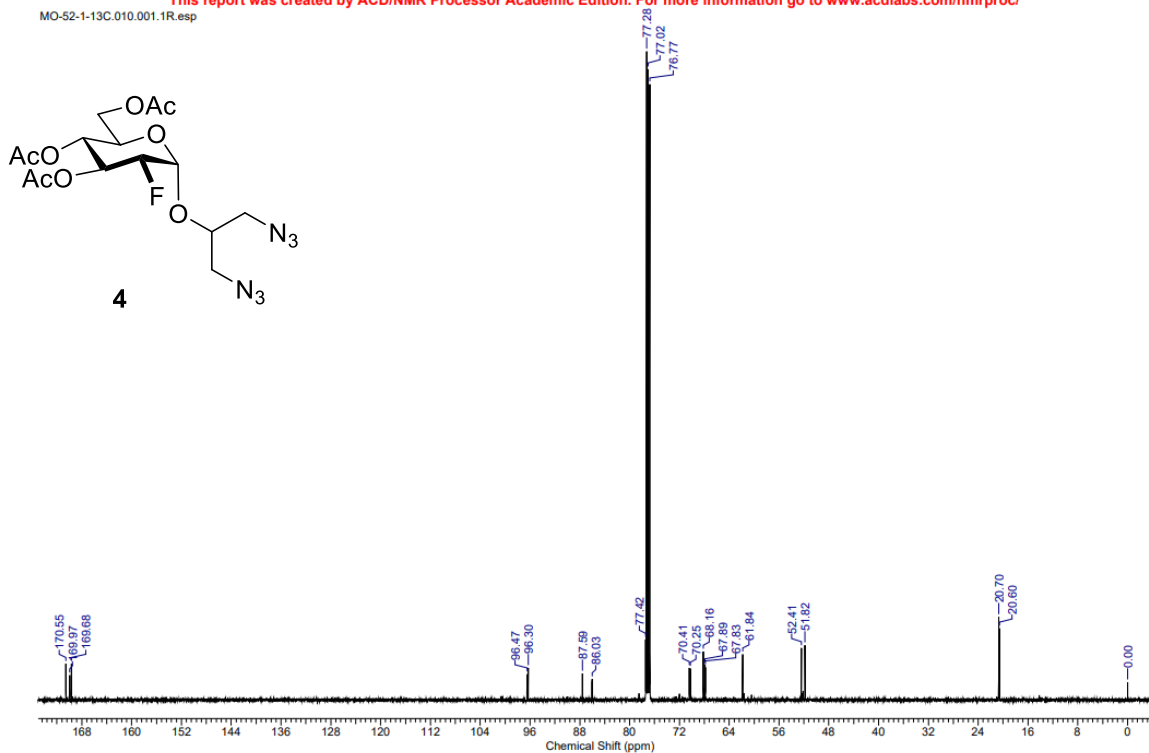


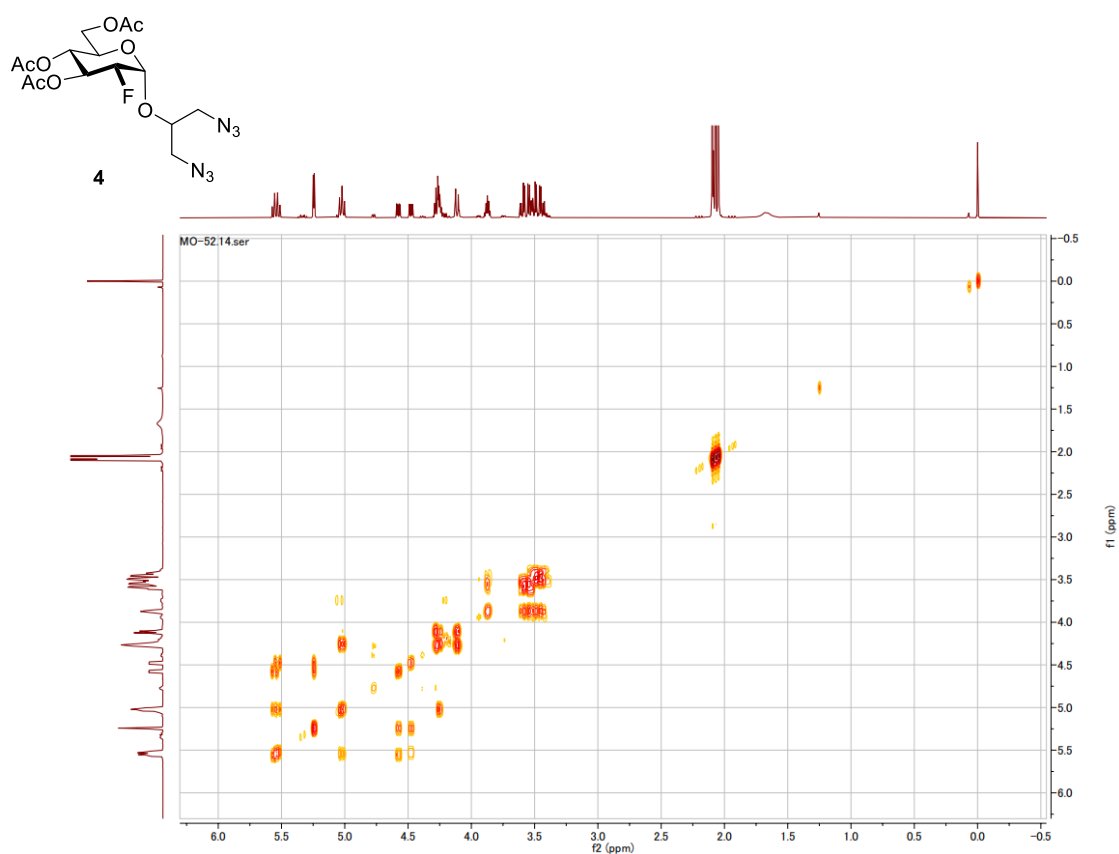
Figure S5. HR-MS spectra of compound 3



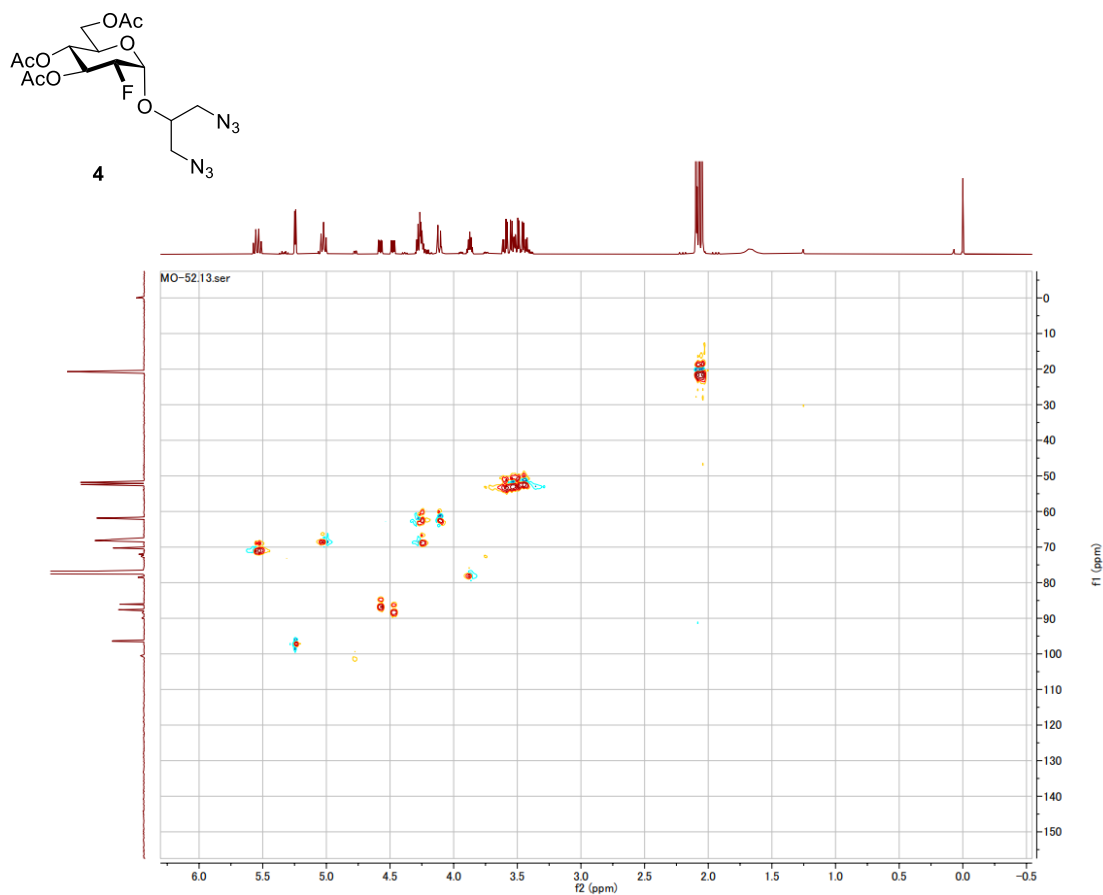
**Figure S6.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of compound **4**



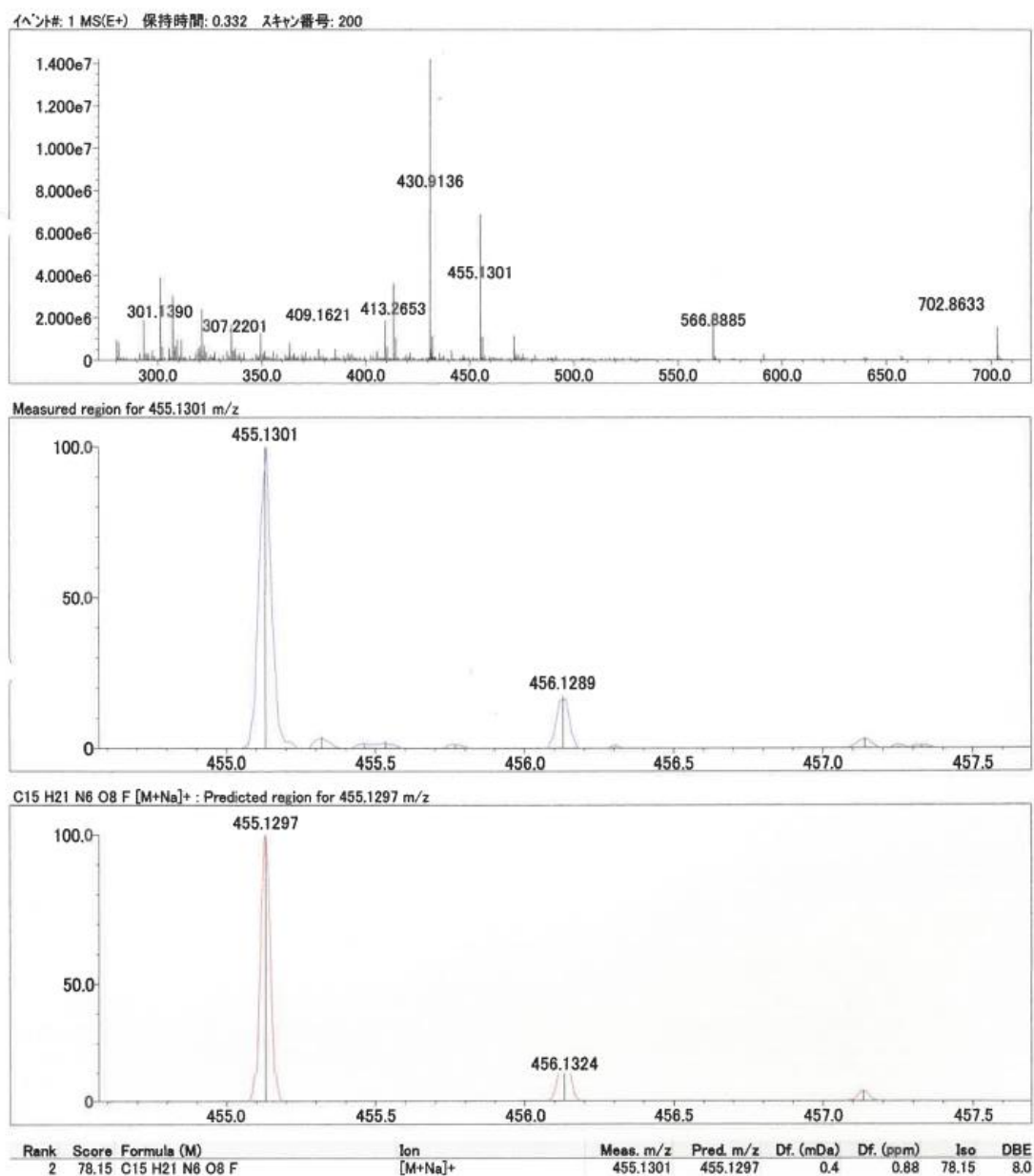
**Figure S7.** <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of compound **4**



**Figure S8.** <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY of compound **4**



**Figure S9.** <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC of compound **4**



**Figure S10.** HR-MS spectra of compound **4**



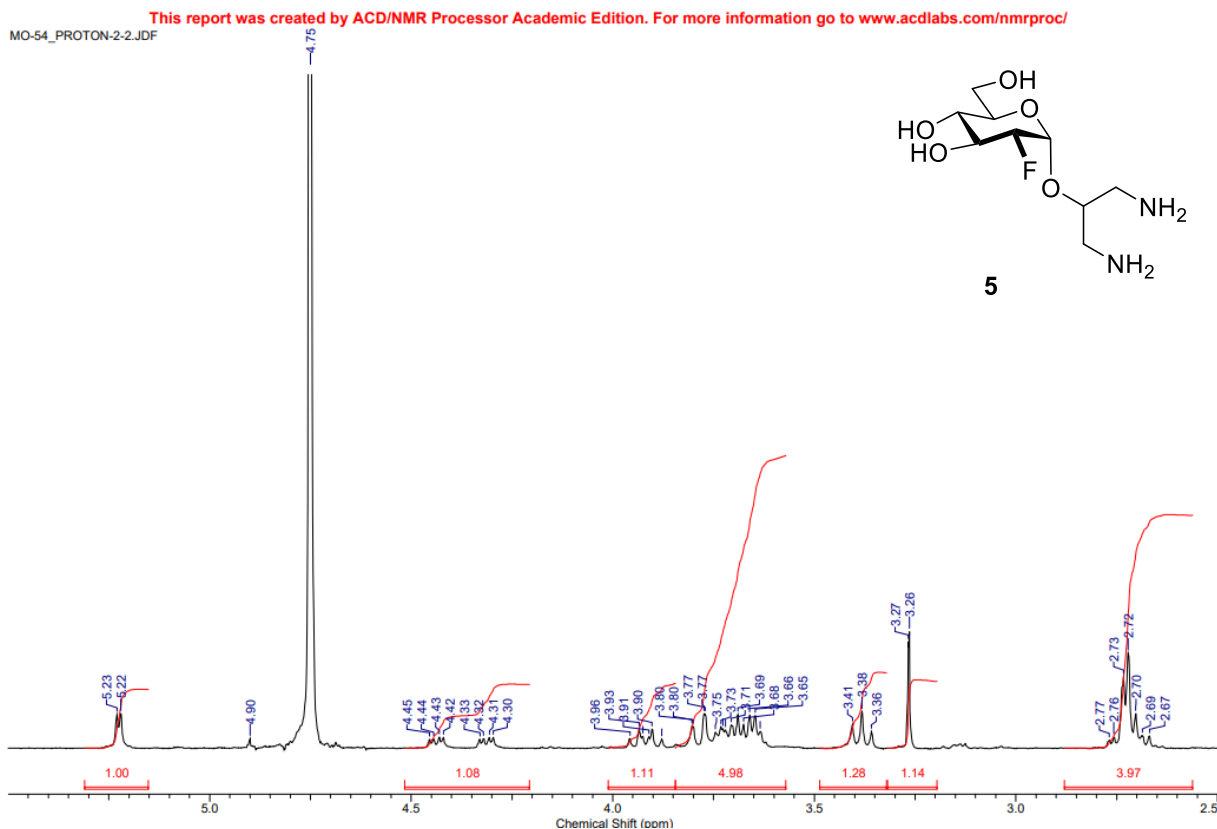


Figure S11.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) of compound 5

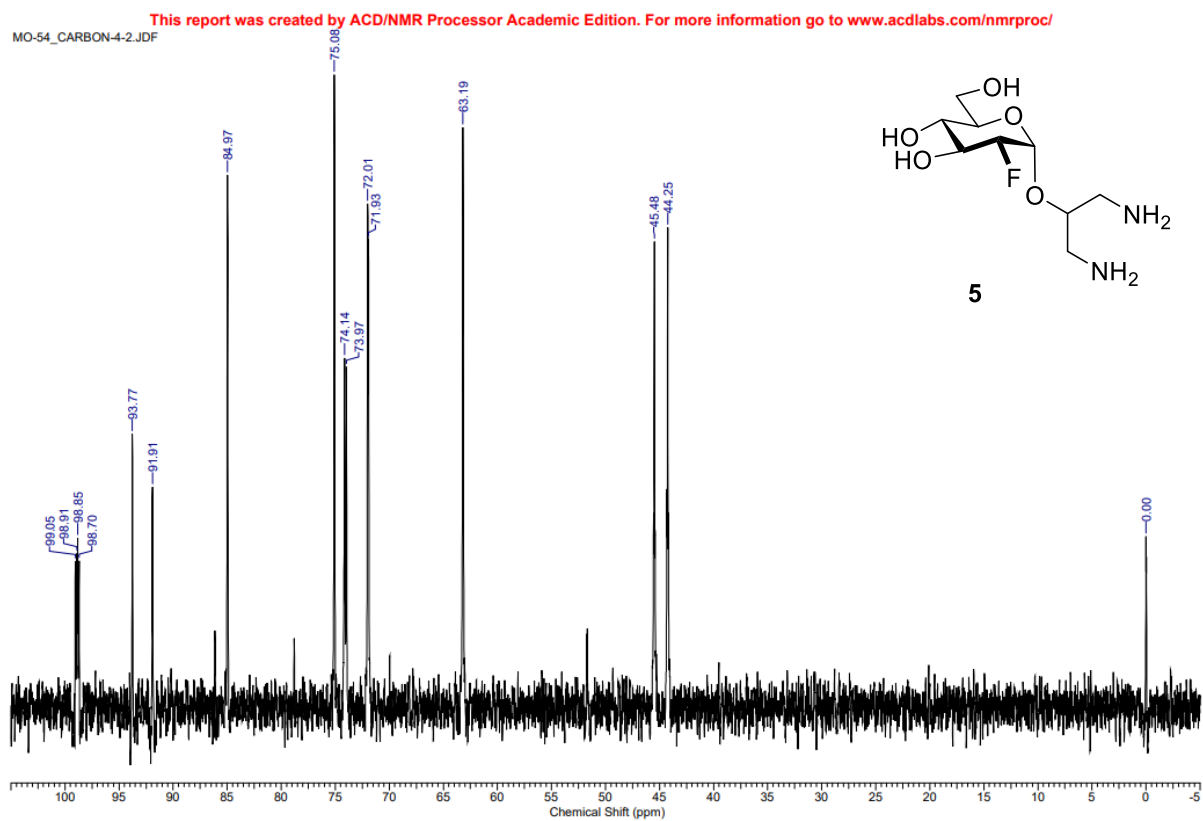
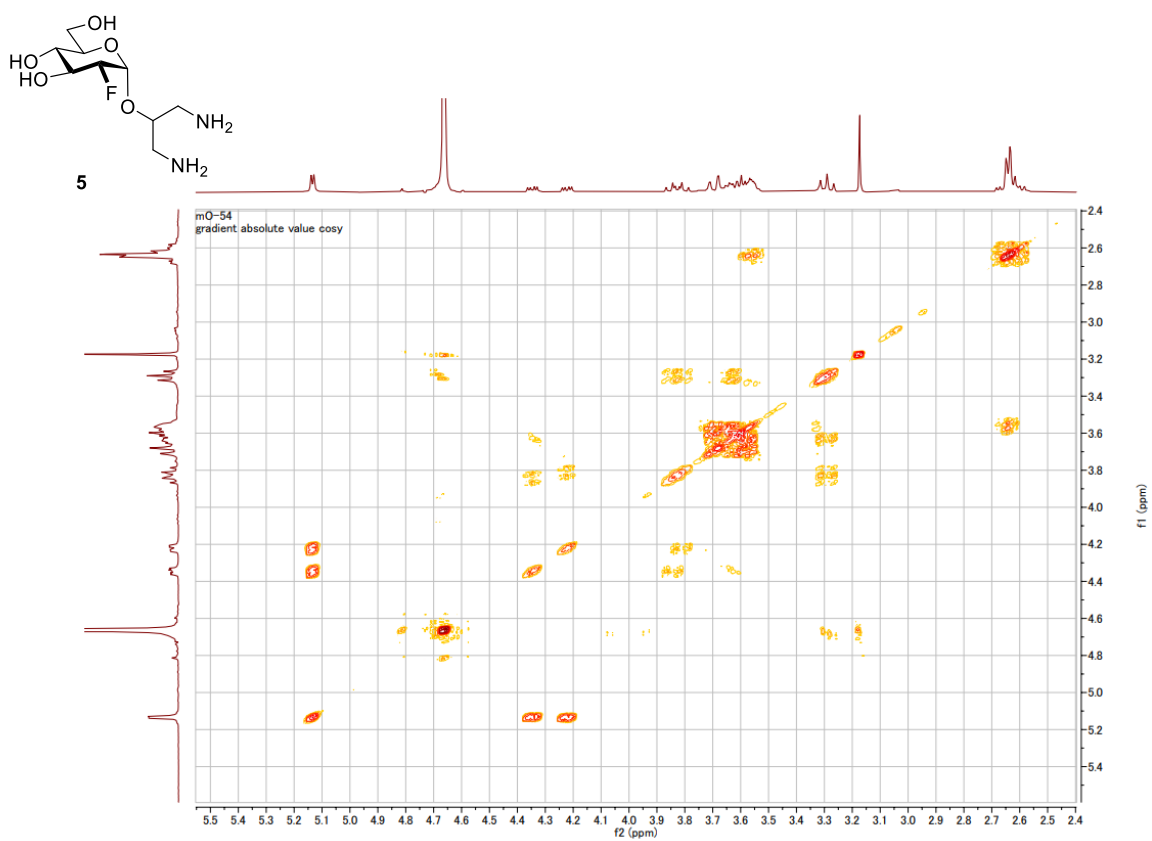
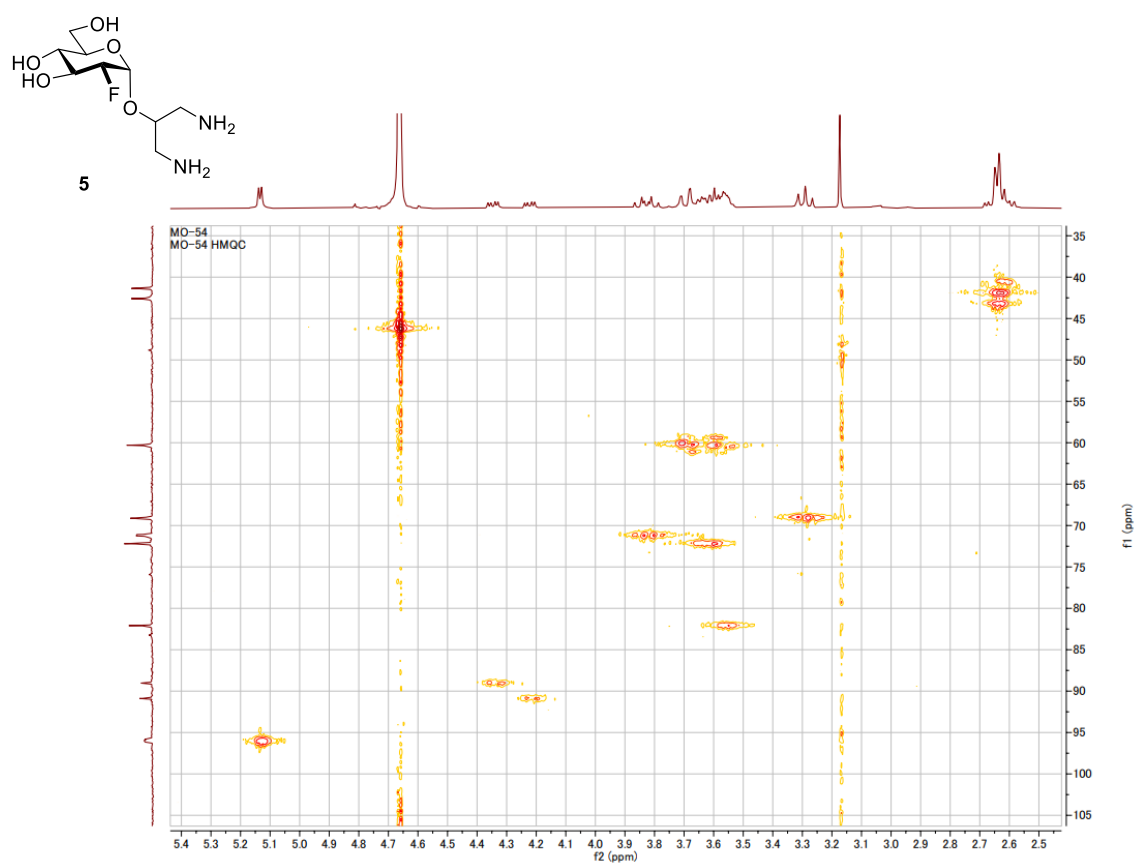


Figure S12.  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) of compound 5



**Figure S13.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY of compound **5**



**Figure S14.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC of compound **5**

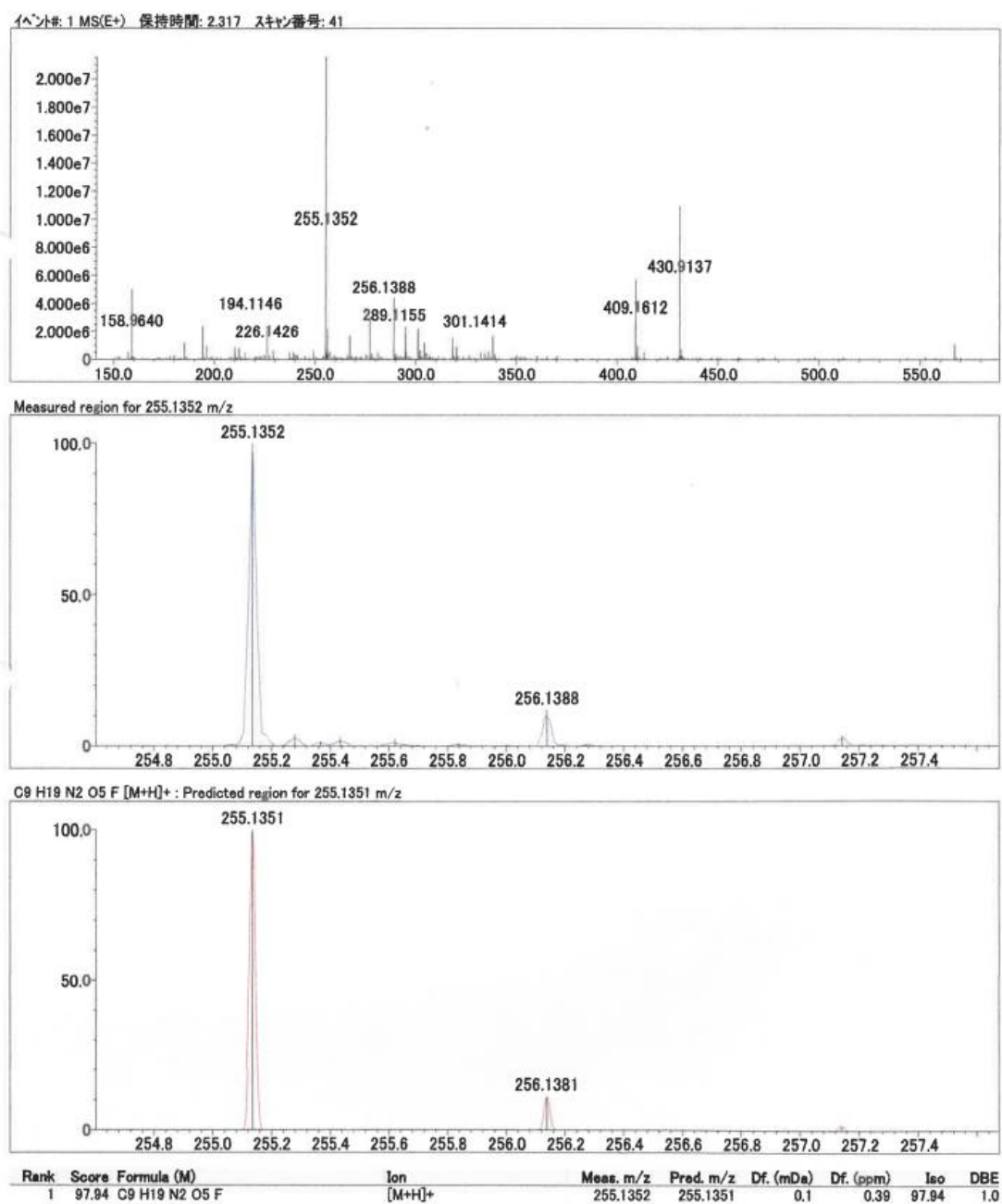
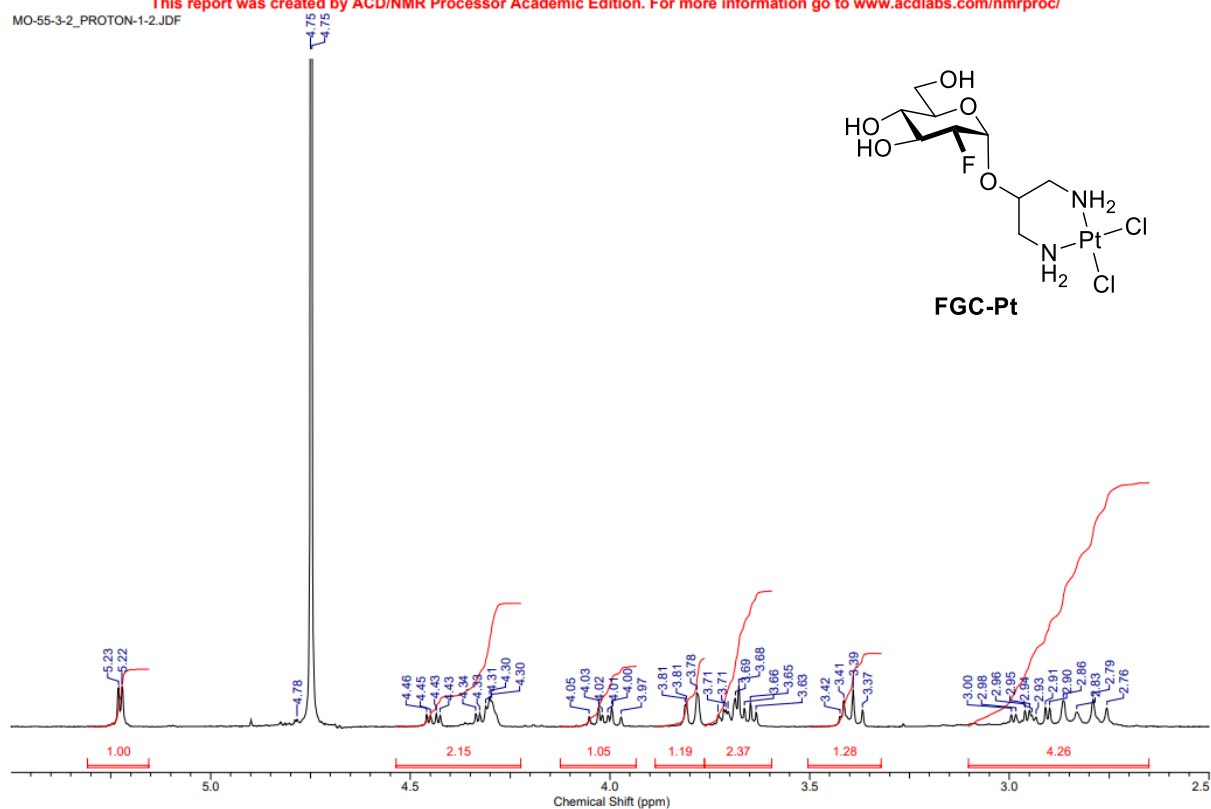
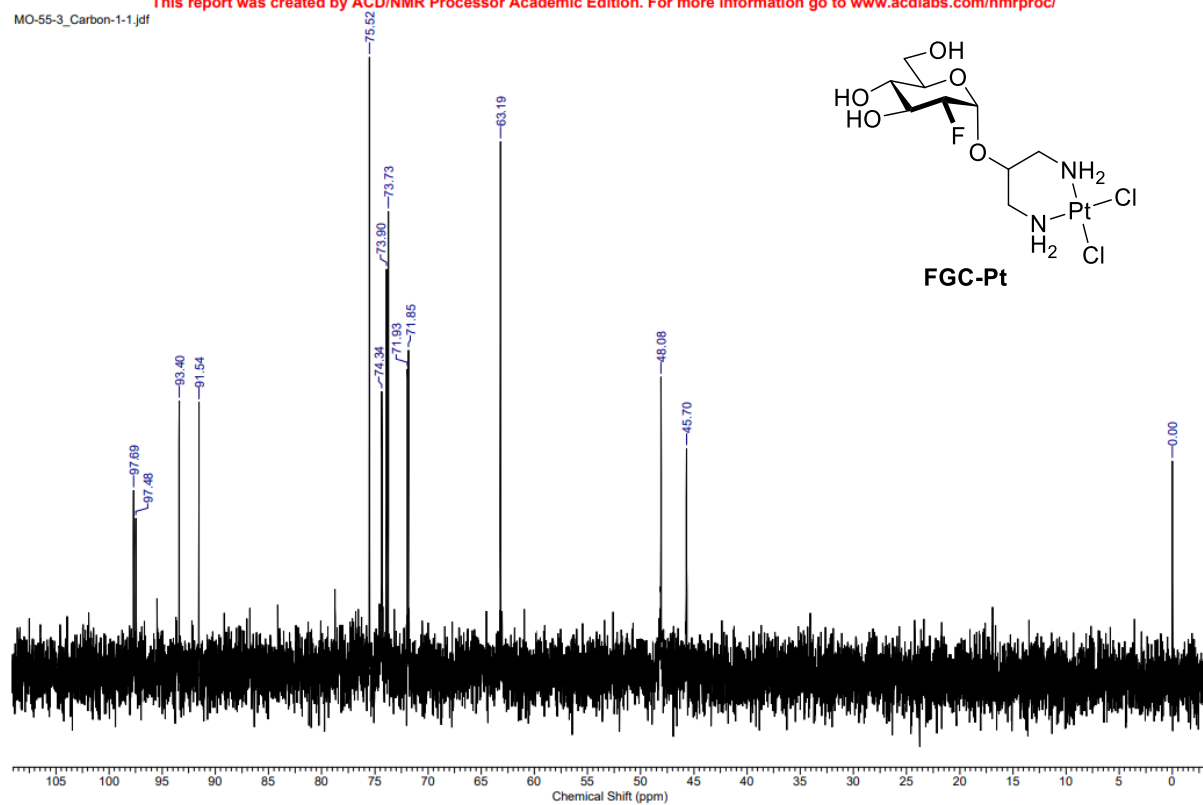


Figure S15. HR-MS spectra of compound 5



**Figure S16.**  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) of FGC-Pt



**Figure S17.**  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) of FGC-Pt

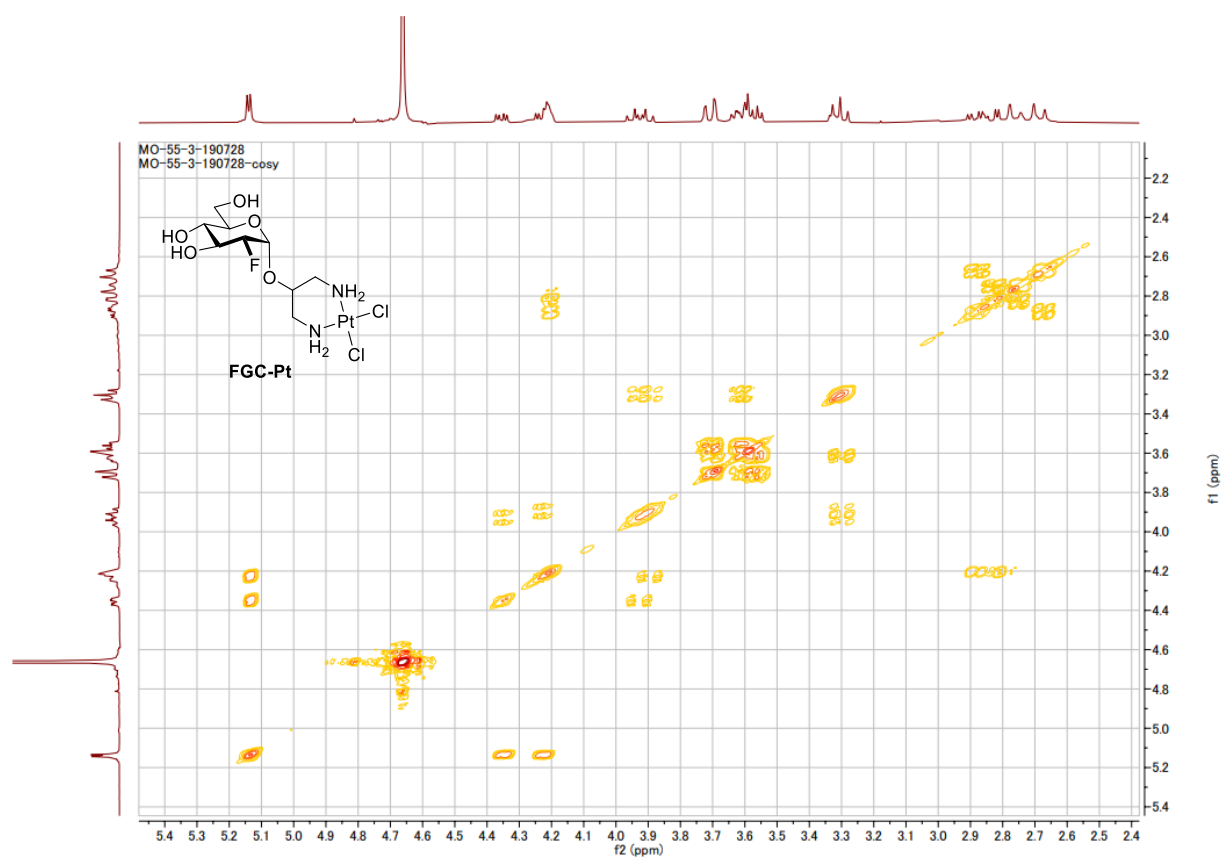


Figure S18.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY of FGC-Pt

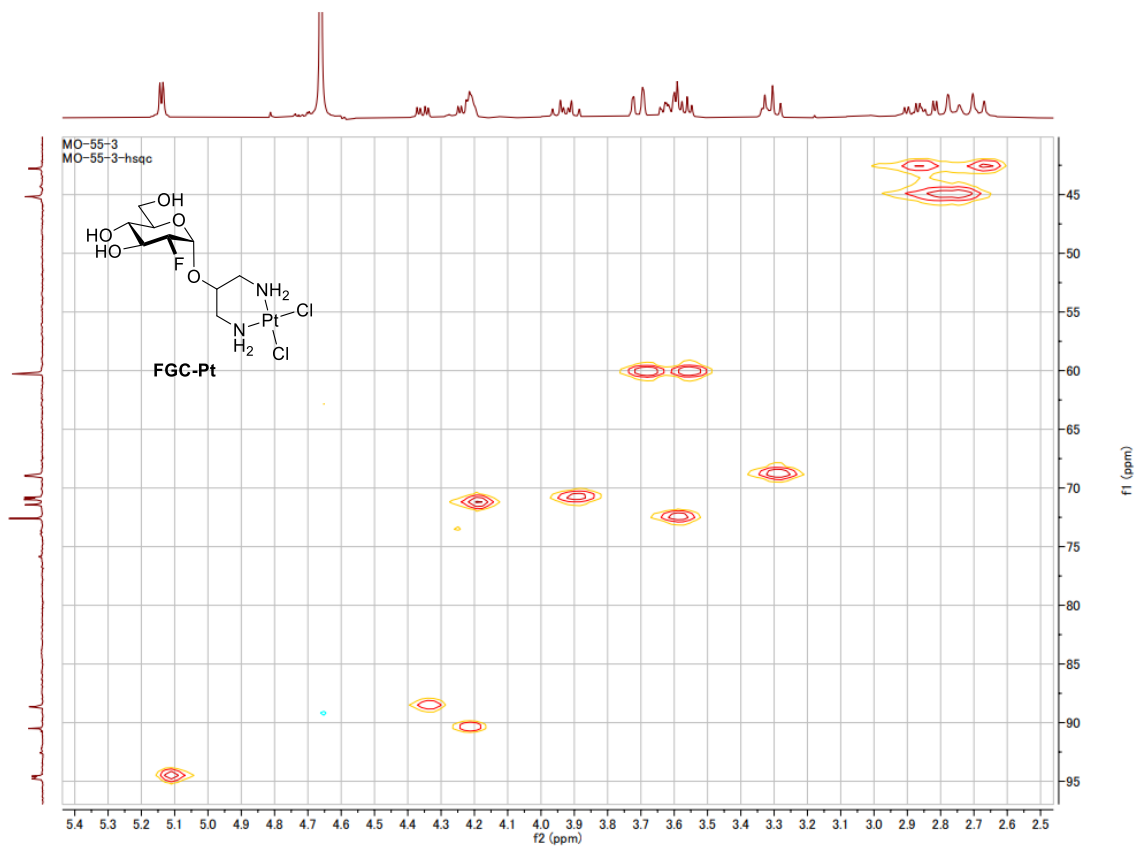
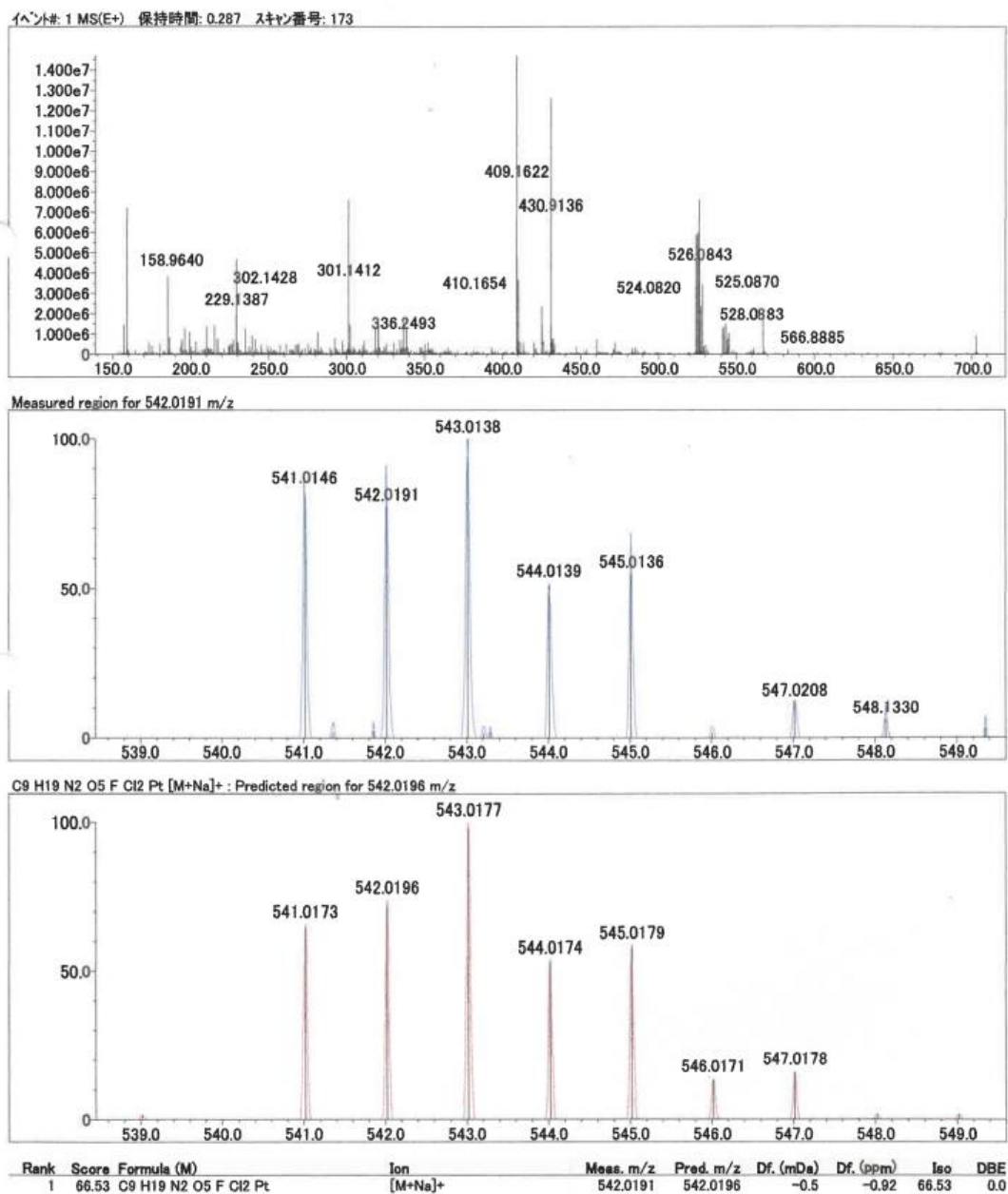


Figure S19.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC of FGC-Pt



**Figure S20.** HR-MS spectra of FGC-Pt

Figure S1-4, 6-9, 11-14, 16-20 は以下の論文を引用した。

Omokawa M, *et al.* *ACS Omega*. **2024**, 9, 879–886.

## 引用文献

1. Wang X, Guo Z. Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 202–224.
2. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The Next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 3436–3486.
3. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg. Chem.* **2019**, 88, 102925.
4. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, 740, 364–378.
5. Aldossary SA. Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomed. Pharmacol. J.* **2019**, 12, 7–15.
6. Odani A. Platinum compounds involving new anti-cancer mechanism. *Biomed. Res. Trace Elements.* **2011**, 22, 22–26.
7. Yonezawa A. Platinum agent-induced nephrotoxicity via organic cation transporter system. *Yakugaku zasshi.* **2012**, 132, 1281–1285.
8. Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P, Kumar S. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *J. Exp. Med.* **2021**, 13, 303–328.
9. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* **2012**, 31, 1869–1883.
10. Uemura M, Komeda S. Present and the future of platinum-based anticancer drugs. *Biomed. Res. Trace elements.* **2015**, 26, 157–165.
11. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467–2498.
12. Cohen SM, Lippard SJ. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, 67, 93–130.
13. Cho HJ, Park SJ, Lee YS, Kim S. Theranostic iRGD peptide containing cisplatin prodrug: dual-cargo tumor penetration for improved imaging and therapy. *J. Controlled Release.* **2019**, 300, 73–80.
14. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* **2009**, 324, 1029–1033.
15. Ancy PB, Contat C, Meylan E. Glucose transporters in cancer – from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J.* **2018**, 285, 2926–2943.
16. Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1835, 164–169.
17. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell Physiol.* **2005**, 202, 654–662.
18. Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism.* **2016**, 65, 124–139.
19. Zambrano A, Molt M, Uribe E, Salas M. Glut 1 in cancer cells and the inhibitory action of resveratrol as a potential therapeutic strategy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 3374.

20. Heydarzadeh S, Moshtaghi AA, Daneshpoor M, Hedayati M. Regulators of glucose uptake in thyroid cancer cell lines. *Cell Commun. Signal.* **2020**, 18, 83.
21. Patra M, Awuah SG, Lippard SJ. Chemical approach to positional isomers of glucose–platinum conjugates reveals specific cancer targeting through glucose-transporter-mediated uptake *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 12541–12551.
22. Mikata Y, Shinohara Y, Yoneda K, Nakamura Y, Brudzińska I, Tanase T, Kitayama T, Takagi R, Okamoto T, Kinoshita I, Doe M, Orvig C, Yano S. Unprecedented sugar-dependent *in vivo* antitumor activity of carbohydrate-pendant *cis*-diamminedichloroplatinum (II) complexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 3045–3047.
23. Gao X, Liu S, Shi Y, Huang Z, Mi Y, Mi Q, Yang J, Gao Q. Mechanistic and biological characteristics of sugar conjugated 2-methyl malonatoplatinum (II) complexes as new tumor targeting agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 125, 372–384.
24. Liu P, Lu Y, Gao X, Liu R, Zhang-Negrerie D, Shi Y, Wang Y, Wang S, Gao Q. Highly water-soluble platinum (II) complexes as GLUT substrates for targeted therapy: improved anticancer efficacy and transporter-mediated cytotoxic properties. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2421–2423.
25. Liu R, Fu Z, Zhao M, Gao X, Li H, Mi Q, Liu P, Yang J, Yao Z, Gao Q. GLUT1-mediated selective tumor targeting with fluorine containing platinum (II) glycoconjugates. *Oncotarget.* **2017**, 8, 39476–39496.
26. Liu R, Li H, Gao X, Mi Q, Zhao H, Gao Q. Mannose-conjugated platinum complexes reveals effective tumor targeting mediated by glucose transporter 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, 487, 34–40.
27. Li H, Gao X, Liu R, Wang Y, Zhang M, Fu Z, Mi Y, Wang Y, Yao Z, Gao Q. Glucose conjugated platinum (II) complex: antitumor superiority to oxaliplatin, combination effect and mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 101, 400–408.
28. Chen Y, Heeg MJ, Braunschweiger PG, Xie W, Wang PG. A carbohydrate-linked cisplatin analogue having antitumor activity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 1768–1769.
29. Fuccio C, Spinapolice EG, Ferretti A, Castellucci P, Marzola MC, Trifirò G, Rubello D. <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT in malignant mesothelioma. *Biomed.* **2013**, 67, 539–542.
30. Calvo MB, Figueroa A, Pulido EG, Campelo RG, Aparicio LA. Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *Int. J. Endocrinol.* **2010**, 205357, 1–14.
31. Kelloff GJ, Hoffman JM, Johnson B, Scher HI, Siegel BA, Cheng EY, Cheson BD, O'shaughnessy J, Guyton KZ, Mankoff DA, Shankar L, Larson SM, Sigman CC, Schilsky RL, Sullivan DC. Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 2785–2808.
32. Aalbersberg EA, de Wit-van der Veen BJ, Zwaagstra O, Codée-van der Schilden K, Vegt E, Vogel WV. Preclinical imaging characteristics and quantification of platinum-195m SPECT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2017**, 44, 1347–1354.
33. Areberg J, Björkman S, Einarsson L, Frankenberg B, Lundqvist H, Mattsson S, Norrgren K, Scheike O, Wallin R. Gamma camera imaging of platinum in tumours and tissues of patients after administration



- of  $^{191}\text{Pt}$ -cisplatin. *Acta Oncol.* **1999**, 38, 221–228.
34. Lange RC, Spencer RP, Harder HC. The antitumor agent cis- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ : distribution studies and dose calculation for  $^{193\text{m}}\text{Pt}$  and  $^{195\text{m}}\text{Pt}$ . *J. Nucl. Med.* **1972**, 14, 191–195.
  35. Shani J, Bertram J, Russell C, Dahalan R, Chen DC, Parti R, Ahmadi J, Kempf RA, Kawada TK, Muggia FM, Wolf W. Noninvasive monitoring of drug biodistribution and metabolism: studies with intraarterial Pt-195m-cisplatin in humans. *Cancer Res.* **1989**, 49, 1877–1881.
  36. Areberg J, Norrgren K, Mattsson S. Absorbed dose to patients from  $^{191}\text{Pt}$ -,  $^{193\text{m}}\text{Pt}$ - and  $^{195\text{m}}\text{Pt}$ -cisplatin. *Appl. Radiat. Isot.* **1999**, 51, 581–586.
  37. Sathekge M, Wagener J, Smith SV, Soni N, Marjanovic-Painter B, Zinn C, Van de Wiele C, D'Asseler Y, Perkins G, Zeevaert J R. Biodistribution and dosimetry of  $^{195\text{m}}\text{Pt}$ -cisplatin in normal volunteers. Imaging agent for single photon emission computed tomography. *Nuklearmedizin.* **2013**, 52, 222–227.
  38. Owens SE, Thatcher N, Sharma H, Adam N, Harrison R, Smith A, Zaki A, Baer JC, McAuliffe CA, Crowther D, Fox BW. In vivo distribution studies of radioactively labelled platinum complexes; cis-dichlorodiammine platinum(II), cis–trans-dichlorodihydroxy-bis-(isopropylamine) platinum(IV), cis-dichloro-bis-cyclopropylamine platinum(II) in patients with malignant disease, using a gamma camera. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1985**, 14, 253–257.
  39. Obata M, Tsuji AB, Sudo H, Sugyo A, Minegishi K, Nagatsu K, Ogawa M, Zhang MR. Precise quantitative evaluation of pharmacokinetics of cisplatin using a radio-platinum tracer in tumor-bearing mice. *Nucl. Med. Commun.* **2022**, 43, 1121–1127.
  40. Jonson R, Börjesson J, Mattsson S, Unsgaard B, Wallgren A. Uptake and retention of platinum in patients undergoing cisplatin therapy. *Acta Oncol.* **1991**, 30, 315–319.
  41. Mikata Y, Shinohara Y, Yoneda K, Nakamura Y, Esaki K, Tanahashi M, Brudzińska I, Hirohara S, Yokoyama M, Mogami K, Tanase T, Kitayama T, Takashiba K, Nabeshima K, Takagi R, Takatani M, Okamoto T, Kinoshita I, Doe M, Hamazawa A, Morita M, Nishida F, Sakakibara T, Orvig C, Yano S. Sugar pendant diamines. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 3783–3789.
  42. Bucher C, Gilmour R. Fluorine-directed glycosylation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 8724–8728.
  43. Zhao J, Gou S, Sun Y, Yin R, Wang Z. Nitric oxide donor-based platinum complexes as potential anticancer agents. *Chemistry.* **2012**, 18, 14276–14281.
  44. Andersson A, Ehrsson H. Stability of cisplatin and its monohydrated complex in blood, plasma and ultrafiltrate - implications for quantitative analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1995**, 13, 639–644.
  45. Takahashi K, Seki T, Nishikawa K, Minamide S, Iwabuchi M, Ono M, Nagamine S, Horinishi H. Antitumor activity and toxicity of serum protein-bound platinum formed from cisplatin. *Jpn. J. Cancer Res.* **1985**, 76, 68–74.
  46. Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, Inui K. Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 74, 477–487.
  47. Eiseman JL, Beumer JH, Rigatti LH, Strychor S, Meyers K, Dienel S, Horn CC. Plasma pharmacokinetics and tissue and brain distribution of cisplatin in musk shrews. *Cancer Chemother.*

48. Dikhoff ThGMH, De Goeij JJM, Mcvie JG. Long-term body retention and tissue distribution of platinum in cisplatin treated cancer patients. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1998**, 236, 81–86.
49. Esteban-Fernández D, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. Accumulation, fractionation, and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin administration. *J. Anal. Toxicol.* **2018**, 32, 140–146.
50. Johnsson A, Olsson C, Nygren O, Nilsson M, Seiving B, Cavallin-Ståhl E. Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, 37, 23–31.
51. Komatsu Y, Ishii T. Drug-induced kidney injury of anticancer chemotherapeutic drugs. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.* **2016**, 58, 1064–1068.
52. Yonezawa A. Molecular mechanism underlying delivery of platinum agents to the cancer and kidney. *Drug Deliv. Syst.* **2012**, 27, 381–388.
53. Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1–3 and multidrug and toxin extrusion family). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 319, 879–886.
54. Chaves C, Campanelli F, Chapy H, Gomez-Zepeda D, Glacial F, Smirnova M, Taghi M, Pallud J, Perrière N, Declèves X, Menet MC, Cisternino S. An interspecies molecular and functional study of organic cation transporters at the blood-brain barrier: from rodents to humans. *Pharmaceutics.* **2020**, 12, 308.
55. Ma J, Wang Q, Huang Z, Yang X, Nie Q, Hao W, Wang PG, Wang X. Glycosylated Platinum(IV) Complexes as Substrates for Glucose Transporters (GLUTs) and Organic Cation Transporters (OCTs) Exhibited Cancer Targeting and Human Serum Albumin Binding Properties for Drug Delivery. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 5736–5748.
56. Nagai Y, Hashimoto K, Hatsukawa Y, Saeki H, Motoishi S, Sato N, Kawabata M, Harada H, Kin T, Tsukada K, Sato TK, Minato F, Iwamoto O, Iwamoto N, Seki Y, Yokoyama K, Shiina T, Ohta A, Takeuchi N, Kawauchi Y, Sato N, Yamabayashi H, Adachi Y, Kikuchi Y, Mitsumoto T, Igarashi T. Generation of radioisotopes with accelerator neutrons by deuterons. *J. Phys. Soc. Jpn.* **2013**, 82, 064201.
57. Kováč, P. A short synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Carbohydr. Res.* **1986**, 153, 168–170.

## 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（現、金沢大学疾患モデル総合研究センター疾患解析プローブ・ケミカル分野 アイソトープ総合研究施設 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 有光健治 助教（現、大阪大谷大学薬学部薬学科 助教）、同代謝分析学分野 内藤行喜 助教、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）に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、核種の製造を行って戴き、有益な御助言とご協力を戴きました、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター 初川雄一 専門業務員、国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 原子力科学研究部門 先端基礎研究センター 塚田和明 研究主席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 臨床薬学分野 西口工司 教授、同薬品物理化学分野 斎藤博幸 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。

そして、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、学部生および同卒業生の諸氏、友人に感謝申し上げます。

最後に、4年間の大学院生活を送るに当たり、生活面ならびに精神面で支えてくれた家族に深く感謝いたします。