

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659578

研究課題名（和文） RI 標識後に抗体へ導入可能な新規キレート剤の開発と汎用的な標識抗体作製法の構築

研究課題名（英文） Development of a novel chelating agent suitable for the prelabeling to establish a generic method for preparation of radiolabeled antibodies.

研究代表者

花岡 宏史 (HANAOKA HIROFUMI)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：50361390

研究成果の概要（和文）：簡便に放射性同位元素（RI）標識抗体を作製することを目的として、RI 標識後に抗体に導入可能な新規キレート剤の開発を計画した。キレート部位として CHX-DTPA を選択し、骨格炭素からベンゼン環を介してグリシンを結合した CHX-DTPA-Bn-Gly を設計・合成した。本誌薬は低濃度でインジウム-111 標識が可能であり、投与後、速やかに尿中に排泄された。以上より CHX-DTPA-Bn-Gly は新規キレート試薬の母体として有望である。

研究成果の概要（英文）：We planned to develop a novel chelating agent suitable for the prelabeling to establish a generic method for preparation radiolabeled antibodies. CHX-DTPA was selected as a chelate group, and then CHX-DTPA-Bn-Gly, which conjugated Gly via benzene ring attached to backbone carbon, was designed and synthesized. The chelating agent could be radiolabeled with indium-111 at low concentration, and it showed rapid urinary excretion. These results indicated that CHX-DTPA-Bn-Gly is a promising mother compound of the novel chelating agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：抗体、放射性同位元素、有機化学

1. 研究開始当初の背景

抗体に放射性同位元素（RI）を結合させた『RI 標識抗体』は標的分子に対して高い親和性を有し、がんを選択的に集積することから、RI による特異度の高い診断、副作用の少ない治療が期待できる。しかし RI 標識するためには、抗体にキレート剤を導入する必要があり、臨床応用に際して煩雑な無菌操作を行わなければならないことを考えると、汎用的であるとはいえない。そこで、RI 標識抗体の研究開発を加速させるためには、抗体自体に修飾を加えることなく、簡便に RI 標識することが可能な手法が必要であると考

え、抗体と混合するだけで標識可能な RI 標識試薬と標識法の開発を計画した。タンパク質を簡便に修飾する方法は多数報告されており（Baslé E et al. Chem Biol 2010; 17: 213-27）、これらの知見と代表者が有する RI、キレート剤、抗体に関する知識と技術を融合することにより、「RI 標識後に抗体に導入可能な新規キレート剤の開発」と「それを用いた汎用的な標識抗体作製法の構築」が可能ではないかと考えた。RI 標識後のキレート剤を抗体に導入するという標識法の研究は、国内外においてほとんど行われておらず、そのような方法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

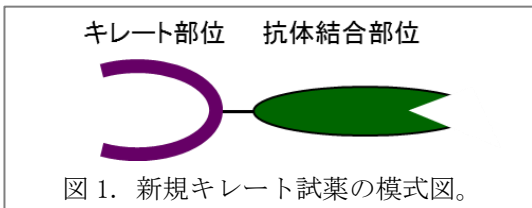
本研究では、煩雑な無菌操作無しに簡便に RI 標識抗体を作製可能な手法を開発することを目的として、RI 標識後に抗体に導入可能な新規キレート剤の開発とそれを用いた新規標識抗体作製法を構築することを計画した。

具体的には

- (1) 低濃度で標識可能であり、安定性の高いキレート骨格の選定
 - (2) 抗体との結合反応が速く、収率の高い抗体結合部位の選定
 - (3) 抗体と結合しなかった場合に速やかに体外に排泄されるような修飾
- の3つの検討を基に新規キレート剤を設計・合成し、その有用性を評価する。

3. 研究の方法

本研究で開発するキレート試薬は、①RI と錯体を形成するための『キレート部位』と、②抗体と簡便に結合するための『抗体結合部位』の2つの部位に大別され、両者の間にリンカーを挿入することができる。



(1) 『キレート部位』の選定・合成

できるだけ少量のキレート剤を用いて標識を行うことで、RI 標識後に加える抗体量を少なく抑えることが可能となる。そこでキレート部位としては低濃度で RI 標識可能な、cyclohexyl 基を有する diethylenetriamine pentaacetic acid (CHX-DTPA) を選定する。CHX-DTPA は診断用の RI であるインジウム-111 (^{111}In) や治療用の RI であるイットリウム-90 と安定な錯体を形成するが、DTPA の5つのカルボン酸のどれか1つでも錯形成ではなく抗体との結合に利用してしまうと、安定性および錯形成反応収率が低下することが知られている。そこで抗体との結合部位として、DTPA の5つのカルボン酸ではなく、新たなカルボン酸を DTPA の骨格炭素からベンゼン環を介して伸ばした化合物 (CHX-DTPA-Bn-COOH) を設計・合成した (図2)。

(2) クリアランスを速くするための修飾

臨床使用の際は、標識操作後の精製が必要ないことが重要である。一般的に95%以上の放射化学的収率 (今回の場合はプレラベリン

グの標識率+抗体との結合率) であれば精製は必要ないが、その達成は容易ではないと予想される。そこで、できるだけ高い放射化学的収率が得られるように標識および結合条件の最適化を行うだけでなく、抗体と結合しなかった RI 標識キレート剤が速やかに体外に排泄されるような修飾を行った (図2のX)。

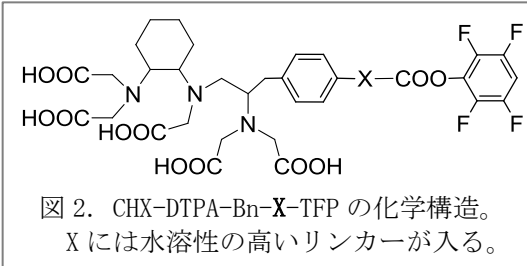


図2. CHX-DTPA-Bn-X-TFP の化学構造。
Xには水溶性の高いリンカーが入る。

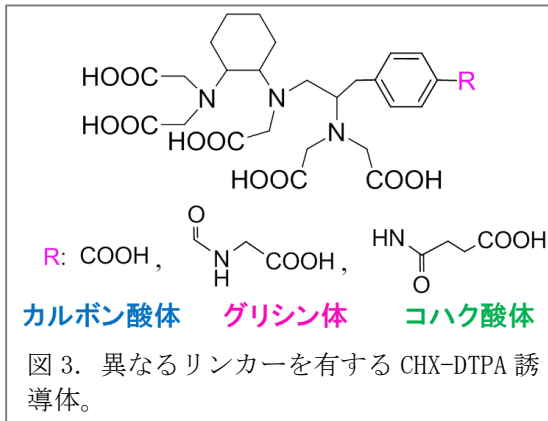
抗体と未反応の RI 標識キレート剤が速やかに体内からクリアランスされることで、抗体の体内動態の画像化の際に支障とならず、また治療時の副作用の増強も起こりにくくなると考えられる。一般的に水溶性が高い化合物の方が速やかな尿排泄性を示すことから、図2において末端がカルボン酸の、水溶性の異なる CHX-DTPA-Bn-COOH 誘導体を作製し、各 ^{111}In 標識体をノーマルマウスの尾静脈より投与し、体内動態の検討を行った。また水溶性と体内動態の関係を明らかにする目的で各 ^{111}In 標識体の pH 7.4 におけるオクタノール/水 分配係数を求め、体内動態との比較を行った。

(3) 『抗体結合部位』の選定

抗体と簡便に結合する「抗体結合部位」としては、抗体との結合反応が速く収率の高い一方で、酸性の脱保護条件下においても安定なためキレート試薬の合成を容易に行うことが可能である、テトラフルオロフェノール (TFP) エステルを選択した (図2)。(2) の検討において優れた体内動態を示したリンカーを有する CHX-DTPA-Bn-X-TFP を合成した。

4. 研究成果

キレート部位の標識率および安定性、またクリアランスを速くするための修飾について検討を行う目的で、上記図2において TFP が結合していないカルボン酸誘導体を実験・合成した。候補化合物としては、ベンゼン環にカルボン酸を導入した CHX-DTPA-Bn-COOH (カルボン酸体)、このカルボン酸にリンカーとして Glycine を結合した CHX-DTPA-Bn-Gly (グリシン体)、パラ位にアミノ基を有する CHX-DTPA をコハク酸で修飾した CHX-DTPA-Bn-succinic acid (コハク酸体) の3つを選択した (図3)。



上記において合成したグリシン体を用いて、 ^{111}In 標識する際の標識濃度、標識 pH について検討を行ったところ、pH 4.5 ~ 6.5 の範囲において 1 μM という低濃度で放射化学的収率 99 % 以上で ^{111}In 標識体を与えた (図 4)。 ^{111}In 標識抗体の比放射能は標識試薬の比放射能に依存することから、低濃度で標識可能な CHX-DTPA-Bn は結合に用いる抗体量を少なくできると考えられ、本薬剤設計の基本骨格として妥当であると考えられる。

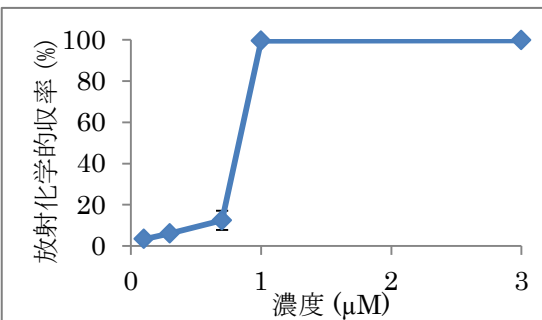


図 4. 各標識濃度におけるグリシン体の ^{111}In 標識の放射化学的収率。(pH5.5、37°C、1 h)

次に各 ^{111}In 標識体のノーマルマウスにおける体内動態を比較検討したところ、血液からの消失はどの誘導体も速やかではあったが、 ^{111}In 標識カルボン酸体が最も速やかであり、ついでグリシン体、コハク酸体の順であった (図 5)。

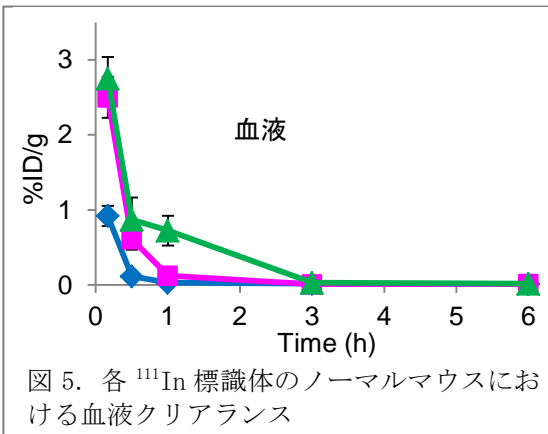
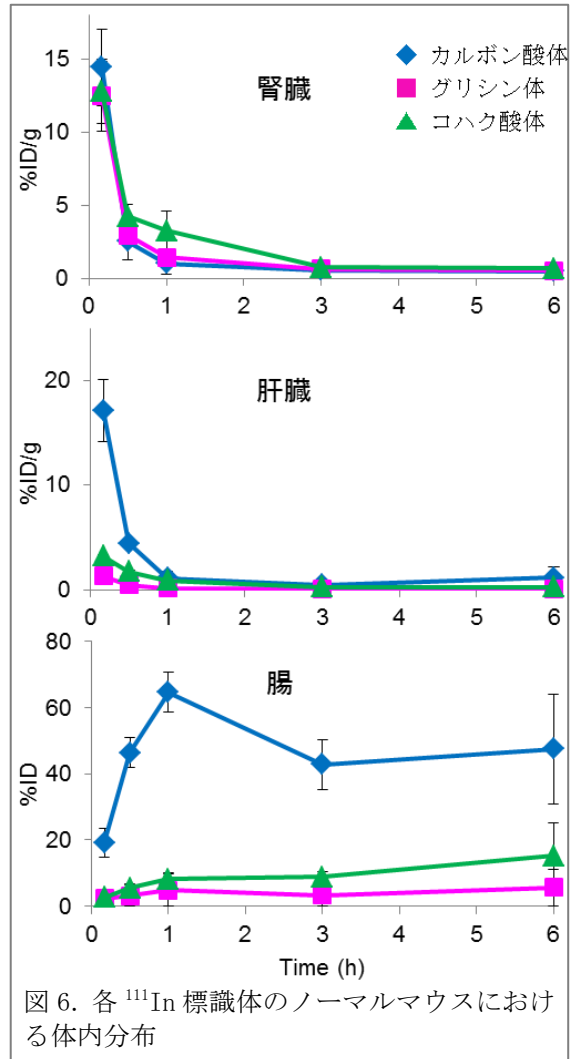


図 5. 各 ^{111}In 標識体のノーマルマウスにおける血液クリアランス

各 ^{111}In 標識体の血液以外の各臓器への集積およびクリアランスを図 6 に示す。 ^{111}In 標識カルボン酸体は投与早期より肝臓に高く集積し腸管へと排泄された。一方、 ^{111}In 標識グリシン体および ^{111}In 標識コハク酸体は、肝臓への集積そして腸管への排泄は比較的少なかった。腎臓への集積は 3 つの化合物ではほぼ同様であったが、6 時間後までに尿中に排泄された放射活性は、 ^{111}In 標識カルボン酸体で投与放射活性のうちの 27.1 % と低く、 ^{111}In 標識グリシン体および ^{111}In 標識コハク酸体でそれぞれ 80.2 %、70.0 %ID と高かった。



つまり ^{111}In 標識グリシン体および ^{111}In 標識コハク酸体は、投与後速やかに腎臓から尿中へと排泄されると考えられる。一般的に脂溶性の高い化合物は腎排泄よりも胆汁排泄を受け易いことが知られている。そこで各 ^{111}In 標識体の脂溶性を検討する目的で、オクタノール/水 分配係数を測定したところ、下の表 1 のように ^{111}In 標識カルボン酸体が最も高い脂溶性を示した。

表 1. 各 ^{111}In 標識体のオクタノール/水分配係数

	Log D _{7.4}
カルボン酸体	-3.05
グリシン体	-4.73
コハク酸体	-3.36

このことから、3種類の ^{111}In 標識体の体内動態の相違は、これまでの報告通りそれぞれの脂溶性に起因すると考えられる。抗体と結合しなかった ^{111}In 標識キレート試薬の長時間にわたる放射活性の滞留は、RI 標識抗体の体内動態の画像化における障害および治療における副作用の増強につながることから、速やかに体内から消失することが望ましい。従って血液クリアランスおよび腎クリアランスが早く、また肝臓および腸管への集積が少ないグリシン体が、本研究課題で開発を行った RI 標識試薬の母体骨格として最も適していると考えられた。

そこで、DTPA の 5 つのカルボン酸を tBu 基で保護した CHX-DTPA(tBu)₅-Bn-Gly のグリシンのカルボン酸とテトラフルオロフェノールを縮合し、トリフルオロ酢酸で脱保護することで CHX-DTPA-Bn-Gly-TFP の合成を行った。その結果、少量ではあるが CHX-DTPA-Bn-Gly-TFP の合成することができた。

以上より、CHX-DTPA-Bn-Gly は本研究での開発を計画した新規キレート試薬の母体として適しており、CHX-DTPA-Bn-Gly-TFP は RI 標識後に抗体に導入可能な新規キレート試薬として有用であると考えられる。本研究成果は簡便な抗体の RI 標識試薬および簡便に RI 標識することが可能な手法の開発に有用な知見を与えるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 鈴木博元, 金井彩香, 上原知也, 花岡宏史, 荒野 泰:
優れた尿排泄性を有する ^{111}In 標識馬尿酸誘導体の合成と基礎的評価.
日本薬学会第 133 回総会、2013 年 3 月 30 日、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花岡 宏史 (HANAOKA HIROFUMI)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 5 0 3 6 1 3 9 0

(2) 研究分担者

山下 光明 (YAMASHITA MITSUAKI)
近畿大学・農学部・講師
研究者番号: 2 0 4 3 3 6 4 1

(3) 連携研究者

なし