

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16784

研究課題名（和文）新規キレート剤の開発による未修飾抗体の汎用的な放射性標識法の確立

研究課題名（英文）Potential of pre-labeling method for preparation of radiolabeled antibody

研究代表者

金井 彩香（Kanai, Ayaka）

群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座等教員

研究者番号：10847495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では未修飾の抗体を簡便に放射標識できる試薬の開発を目的に、pre-labeling法に着目した新規キレート薬剤の設計および合成と、その有用性の検討を行った。新規薬剤を用いたpre-labeling手法は種々の未修飾な抗体と混合するだけで標識が可能であり、さらに新規キレート試薬によって放射標識を施された抗体は従来法によって標識された抗体と比較して、安定性、細胞結合性、マウス体内動態において同等の結果を示した。以上からpre-labeling法に着目して設計された本新規薬剤は、従来法と比較して標識抗体の性質を損なうことなく、より簡便な放射標識を可能にするものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により任意の未修飾な抗体を簡便に金属核種標識することが可能なキレートkit薬剤が開発された。抗体は核医学分野においても重要な標的指向性分子の1つであり、本新規キレート薬剤の開発は抗体標識の効率化を達成し、抗体医薬品開発のさらなる発展に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we designed and synthesized novel chelating compounds based on the pre-labeling method and investigated their usefulness for the development of reagents that can easily radiolabel unmodified antibodies. The pre-labeling method using a new compound enables labeling by simply mixing various unmodified antibodies, and furthermore, antibodies radiolabeled with a new chelating reagent showed comparable stability, cell binding, and pharmacokinetics in mice compared to antibodies labeled by conventional methods.

In conclusion, this new chelating compound, which was designed based on the pre-labeling method, enables efficient radiolabeling without impairing the properties of the antibody, compared to the conventional method.

研究分野：核医学

キーワード：RI標識抗体 キレート試薬 放射性医薬品

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品はその高い特異性と標的集積性から核医学分野においても標的指向性分子として注目されており、特に放射性金属核種で標識した IgG 抗体は核医学診断および放射線治療への展開が進められ、その有用性が明らかにされている。

しかし放射標識抗体の需要が高まる一方で、その作製の煩雑さは難点として挙げられている。抗体を金属核種にて標識する際には一般的に「post-labeling 法」が用いられているが、この従来法では先立って抗体とキレート剤を結合し、これを精製した後に、放射性核種と混合するため、抗体に対して過剰のキレートをクリーンな環境で除去する必要がある。さらに標識操作を抗体キレート複合体に対して行うため液性が極端に限られてしまうなどの制限があり、効率性の高い手法とは言えない。

よって未修飾の抗体を簡便に金属核種で標識できる方法の確立は、核医学分野における抗体医薬品の検討・開発の効率化に寄与するものと考えられる。以上から、本研究では従来法と異なり、先にキレート試薬のみに放射標識を施しそれを抗体に結合する「pre-labeling 法」に着目し、汎用的かつ効率的な抗体標識を達成できるキレート kit 試薬の開発を行うこととした。

2. 研究の目的

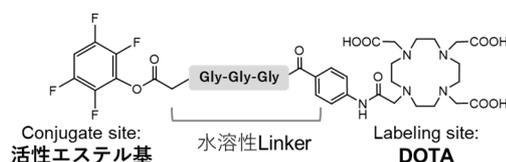
本研究の目的は pre-labeling 法を元に、未修飾の抗体と混合するだけで目的の放射標識抗体を得ることができる新規キレート試薬を開発することである。そのため、本研究においては新たなキレート化合物の設計・合成を行い、併せて本薬剤の実用性および汎用性について、従来法によるキレート試薬や標識抗体との比較検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 新規キレート化合物の設計、合成

新規キレート剤は、キレート骨格部位に DOTA 構造を、抗体との結合部位には活性エステル構造を、そして2つの間に水溶性リンカーとしてトリグリシル構造を選択し、右図のような候補化合物を設計した。

新規キレート試薬の候補化合物



活性エステル部位の構造には N-Hydroxysuccinimide ester (NHS) および Tetrafluorophenyl ester (TFP) の2種類を候補として、それぞれを有機化学的手法によって合成した。

(2) 候補化合物の金属核種による標識

以下の検討に用いる核種には入手が容易な Indium-111 (^{111}In) を選択し、種々の濃度に調製した候補キレート化合物を酸性溶液中で $^{111}\text{InCl}_3$ と混合した。反応溶液の pH、反応温度、反応時間を変化させ、TLC 分析により最も放射化学的収率の良い標識条件を探索した。

(3) 低分子モデルを用いた精製の検討

別途合成した低分子モデル化合物を ^{111}In と錯形成させたのち、得られた ^{111}In -DOTA-GGG-OH を iodine-125 (^{125}I) によって標識した抗体と混合し、その溶液を HitrapTM Desalting 5 ml (GE Healthcare) に注入した。さらにカラムへ毎分 4 ml の流速で D-PBS (-) を送液し、10 秒ずつろ液を採取し、カウンターにてそれぞれの放射活性を測定した。

(4) 抗体標識および精製

0.1 M borate buffer saline (pH 8.0) に溶解した抗体に、 ^{111}In 標識した新規キレート薬剤を混合し、40 にてインキュベートした。その後、反応溶液を(3)と同様に HitrapTM Desalting 5 ml (GE Healthcare) に注入し、D-PBS (-) にて溶出を行い、採取したろ液をカウンターにて測定した。

(5) 標識抗体の安定性検討

(4) の操作によって精製された ^{111}In 標識抗体に EDTA 溶液を加え、EDTA 濃度が 1 mM あるいは 10 mM になるように調製した。それぞれの混合液を 37 にてインキュベートし、3 時間後、24 時間後の未変化率を TLC 分析により算出した。

従来法 (post-labeling 法) によって標識した ^{111}In 標識抗体を別途用意し、同様の操作を行い未変化率を計測した。

(6) 標識抗体の細胞結合性の検討

RPMI-1640 培地あるいは抗 HER2 抗体溶液中にて 37、30 分間インキュベートした SKOV3 細胞株に対して、pre-labeling 法もしくは post-labeling 法によって調製された ^{111}In 標識抗 HER2 抗体を混合し、さらに 37 にて 2 時間インキュベートを行った。懸濁溶液を遠心分離によって

上清とペレットに分離後、それぞれの放射活性を測定した。

(7) 標識抗体のマウス体内動態試験

新規キレート試薬あるいは従来法によって ^{111}In 標識された抗 NuB2 抗体を、それぞれを Balb/c ノードマウスに投与し、1 時間後、2 4 時間後、4 8 時間後に屠殺して関心臓器を採取した。

また、同様の手法によって ^{111}In 標識された抗 HER2 抗体を、SKOV3 細胞株を皮下に移植した担癌モデルマウスに投与し、2 4 時間後、4 8 時間後に屠殺して関心臓器を採取し、それぞれの放射活性の測定から体内動態の比較検討を行った。

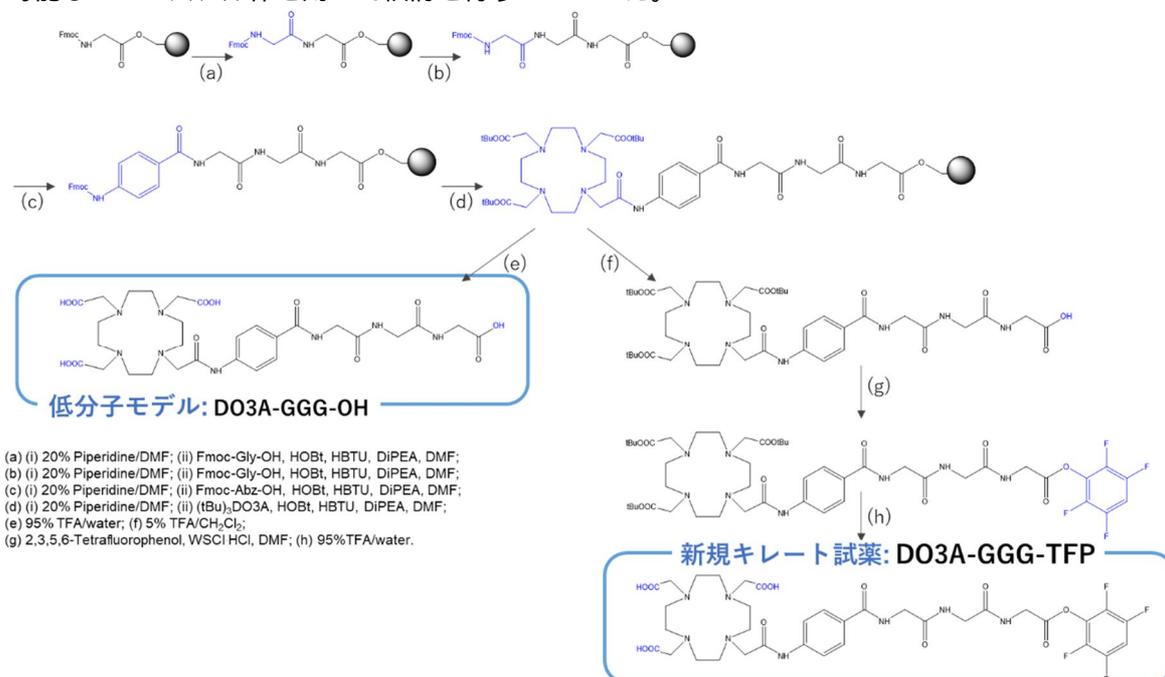
4. 研究成果

(1) 新規キレート化合物の設計、合成

下図に示すように Fmoc-Gly-resin を出発物質として、段階的に Gly、Gly、DOTA 構造を固相合成にて伸長させた。得られた樹脂結合保護ペプチドを 95% TFA 溶液に浸潤させることで脱保護と脱樹脂を同時に行い、ろ液から TFA を減圧留去したのち HPLC 精製によって低分子モデル化合物 DO3A-GGG-OH を得た。

また、樹脂結合保護ペプチドを 5% TFA 処理することで得られた保護化合物に、液相中で活性エステルを縮合させた後に脱保護反応と HPLC 精製を行うことで目的物である新規キレート試薬を合成した。

以上の手法により、候補である NHS エステル体および TFP エステル体を得られたが、NHS エステル体は安定性が低かったため目的の薬剤としての利用は困難であると判断し、以後は保存が可能な TFP エステル体を用いて検討を行うこととした。



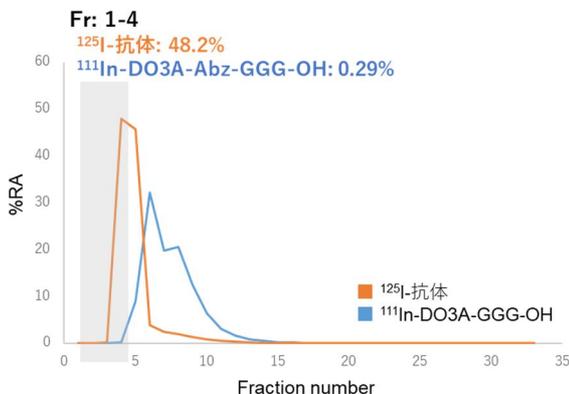
(2) 候補化合物の金属核種による標識

1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) と塩化インジウム注 (日本メジフィジックス) を 1 : 9 で混合し室温にて 5 分間静置させた後、キレート試薬と混ぜ合わせ室温で静置した。キレート試薬の最終濃度、反応時間、pH を変化させて標識率の変化を測定したところ、pH 5.5、キレート濃度 2 mM、反応時間 20 分で標識率 95% を達成した。

(3) 低分子モデルを用いた精製の検討

右図に採取したフラクションとそれぞれの ^{125}I および ^{111}In 放射活性について示す。 ^{125}I 活性はフラクション 4 に最も多く、 ^{125}I 標識抗体の 48.2% がフラクション 1 - 4 の中に溶出していた。

一方で ^{111}In 活性はフラクション 6 に最も多く、フラクション 1 - 4 に溶出した ^{111}In -DOTA-GGG-OH はわずか 0.29% であった。以上から、本検討において Hitrap™ Desalting 5 ml (GE Healthcare) による抗体と残留キレートの分離精製が可能であることが示唆された。

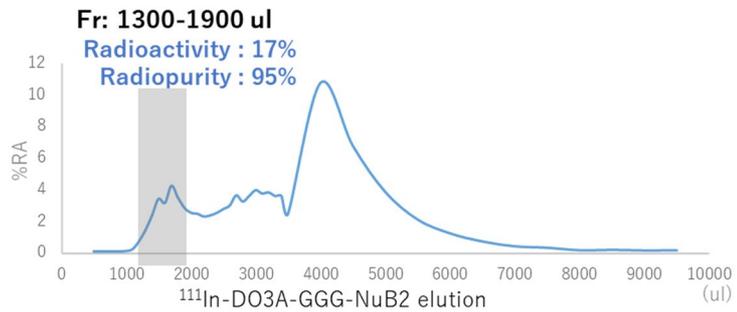


(4) 抗体標識および精製

右図に各フラクションの ¹¹¹In 放射活性について示す。送液した D-PBS が 1300 ul から 1900 ul になるフラクションに放射化活性の 17% が溶出し、TLC 分析の結果からこのときの放射化学的純度は 95% であった。

また、結合に用いる抗体を抗 NuB2 抗体から bevacizumab に変更して同様の操作を行ったところ、放射化学的収率 17%、放射

化学的純度 95% 以上で目的とする標識抗体を得ることができた。



(5) 標識抗体の安定性検討

Pre-labeling 法および post-labeling 法にて調製した ¹¹¹In 標識抗体の EDTA 溶液中安定性について表に示す。2 種の標識抗体はほぼ同程度の安定性であることが確認され、今後の検討を行うにあたり十分な安定性を有していることが明らかとなった。

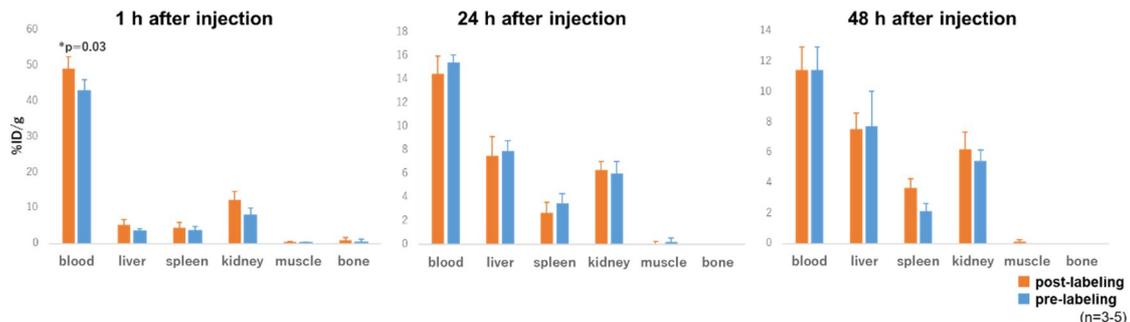
	Pre-labeling法	Post-labeling法
1 mM EDTA溶液中安定性 (3 h incubation, 37°C)	91.6 ± 0.57%	93.7 ± 0.12%
(24 h incubation, 37°C)	86.2 ± 0.49%	89.6 ± 0.39%
10 mM EDTA溶液中安定性 (3 h incubation, 37°C)	87.7 ± 0.06%	86.2 ± 0.34%
(24 h incubation, 37°C)	75.6 ± 1.00%	74.9 ± 0.84%

(6) 標識抗体の細胞結合性の検討

Pre-labeling 法により ¹¹¹In 標識した抗体の SKOV3 細胞株結合率は 81.1 ± 1.0%、阻害群では 18.4 ± 1.4% であった。一方 post-labeling 法により調製した標識抗体は、同条件で結合率 84.1 ± 1.1%、阻害群では 16.3 ± 1.3% となった。2 種の標識抗体はどちらも十分な細胞結合能と特異的結合性を示しており、新規キレート薬剤は抗体としての性質を損なわずに金属核種での標識を可能とするものであった。

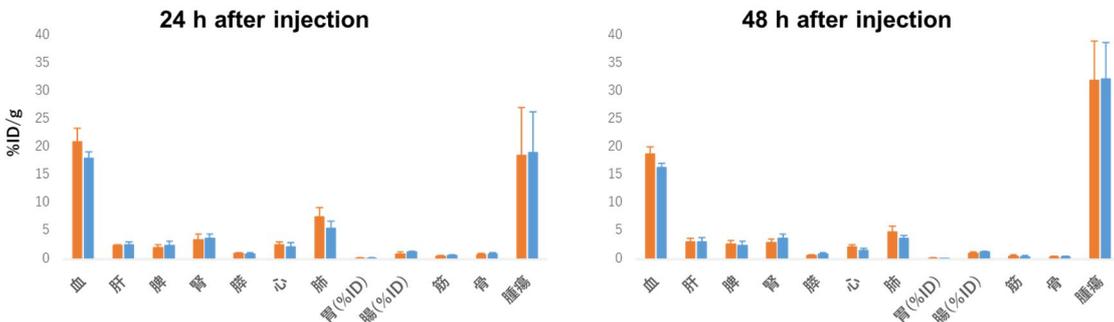
(7) 標識抗体のマウス体内動態試験

Balb/c ノードマウスの関心臓器の放射活性を下図に示す。



Balb/c ノードマウス投与 1 時間後の血液の放射活性のみ pre-labeling 法と post-labeling 法で有意な差が見られたものの、その他の臓器集積では有意な差は観察されなかった。

また、下記に示す担癌モデルマウスでの体内動態試験においても関心臓器への集積は同等であり、特に腫瘍集積に有意差がないことが確認された。



細胞結合性試験では post-labeling 法によるサンプルがわずかに優位であったものの、その差は生体内での分布に影響を与えるものではなかった。よって、新規キレート試薬は抗体の特異的結合性だけでなく、生体内での動態も損なわずに金属核種での標識を可能とするものであった。

以上から、本研究では Pre-labeling 法に利用可能な新規キレート試薬 D03A-GGG-TFP の設計および合成を行い、本試薬が従来法と比較して、標識抗体の性質を損なうことなくより簡便な放射標識を可能とするものであることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花岡 宏史、金井 彩香、対馬 義人
2. 発表標題 プレラベリング法を用いたRI標識抗体作製法に関する検討
3. 学会等名 第62回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------