

《原著》

スペーサ含有および非含有二官能性キレート剤を用いた¹¹¹In 標識モノクローナル抗体の比較研究 —(I) 標識法および in vitro での安定性の検討—

孫 保 福*

(主任: 久田 欣一 教授)

要旨 ジエステルスペーサを含むキレート剤 succinimido-EGS-DTPA (EGS-DTPA) および炭化水素スペーサを含むキレート剤 1-[4-(10-maleimidopropyl)amidobenzyl]ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (C10-Bz-EDTA) と、これらの対照としてスペーサを含まないキレート剤 cyclic DTPA dianhydride (cDTPAA) および isothiocyanatobenzyl-EDTA (SCN-Bz-EDTA) を用い、A7 抗体をモデルとしてモノクローナル抗体との反応条件、¹¹¹In 標識、免疫活性、in vitro 安定性を検討した。

EGS-DTPA と抗体をモル比 10:1 で反応させた場合、抗体と結合した放射能標識率 (標識率) は 90 % であり、cDTPAA と抗体をモル比 2:1 で反応させた場合の標識率は 95.5 % であった。また、SCN-Bz-EDTA、C10-Bz-EDTA をともにモル比 1:1 で抗体と結合反応させた場合、標識率はおのおの 70%，80% であった。EGS-DTPA と cDTPAA 結合抗体は、ともに血清中で放射能のトランスフェリンへの移行が認められ、さらに EGS-DTPA 結合抗体では In-DTPA の形で抗体から放射能の解離が認められた。一方、SCN-Bz-EDTA と C10-Bz-EDTA 結合抗体は血清中で非常に安定であり、168 時間までは、ほとんどの放射能は IgG に相当する分子量分画に溶出された。以上、C10-Bz-EDTA を用いて他のキレートと同様に、免疫活性を保ちかつ十分高い比放射能の標識抗体を得ることが可能であった。また、C10-Bz-EDTA 結合抗体の血中での安定性から、本キレート剤の EGS-DTPA に対する優位性が示唆された。

(核医学 31: 459-471, 1994)

I. はじめに

癌組織に特異性の高いモノクローナル抗体を放射性核種で標識し、癌の放射免疫診断 (Radioimmunoscintigraphy, RIS) あるいは放射免疫治療 (Radioimmunotherapy, RIT) に用いる試みが臨床応用されるようになってきた。RIS に用いられる核種としては、二官能性キレート剤を利用した標

識法が開発されて以来、¹¹¹In が多用されている^{1~4)}。¹¹¹In は半減期やガンマ線エネルギーの点でガンマカメラによる撮像に適した性質を有している。しかし、従来の二官能性キレート剤を用いてモノクローナル抗体を¹¹¹In 標識した場合には、癌組織への特異的な集積に加え、肝、腎、脾等の正常組織への非特異的な集積が認められるため、腹部癌病巣の検出に障害をきたす欠点がある^{5~10)}。この非特異的集積を減少させるために種々の方法が試みられてきた^{10,11~15)}。その中には新たな二官能性キレート剤の開発^{16~20)}や抗体とキレート剤の間に体内で代謝されうるスペーサを挿入する方法^{21~25)}などが報告されている。現在まで種々

* 金沢大学医学部核医学科

受付: 6年2月18日

最終稿受付: 6年3月3日

別刷請求先: 金沢市宝町13-1 (番号920)

金沢大学医学部核医学科

孫 保 福

のスペーサが考案されており、ジエステルスペーサ(diester spacer)を含むキレート剤 succinimido-EGS-DTPA (EGS-DTPA) はそのひとつである。このキレート剤を用いることにより正常組織の放射能摂取を低減可能であることが報告されているが^{23,26)}、これらのデータをみると、ジエステルスペーサは血中でも解離していると類推され、このため腫瘍への放射能摂取も減少しているものと考えられる。そこで、本研究では、新しい炭化水素スペーサ(hydrocarbon spacer)を含むキレート剤 maleimido-C10-benzyl-EDTA (C10-Bz-EDTA) で標識された抗体と、ジエステルスペーサを含むキレート剤 EGS-DTPA で標識された抗体とを比較した。また、これらのキレート剤の対照として、スペーサを含まないキレート剤 cyclic DTPA dianhydride (cDTPAA), isothiocyanatobenzyl-EDTA (SCN-Bz-DTPA) で標識された抗体を用いた。本報ではキレート剤と抗体の結合の最適条件、¹¹¹In 標識方法、標識抗体の免疫活性の変化、in vitro における安定性などについて検討した。

II. 材料および方法

1. 材 料

1) モノクローナル抗体

抗大腸癌モノクローナル A7 抗体(以下 A7 抗体)は、京都府立医大第一外科のご好意により提供を受けた。A7 抗体はマウス IgG₁ で、ヒト大腸癌関連糖蛋白抗原(分子量 45000)を認識する²⁷⁾。

2) キレート剤と他の試薬

2-(4-Aminophenyl)ethylamine (APE) は Aldrich 社 (Milwaukee, USA), ethylene glycolbis(succinimidyl succinate) (EGS) は Sigma 社 (St. Louis, USA), cyclic DTPA dianhydride (cDTPAA), 1-[4-(10-maleimidopropyl)amidobenzyl]ethylene diamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (C10-Bz-EDTA) および isothiocyanatobenzyl-EDTA (SCN-Bz-EDTA) は 倍同仁化学研究所(熊本), human immunoglobulin(HIG) は Cappel 社 (West Chester, USA), 2-mercaptopethanol (2-ME), dimethyl

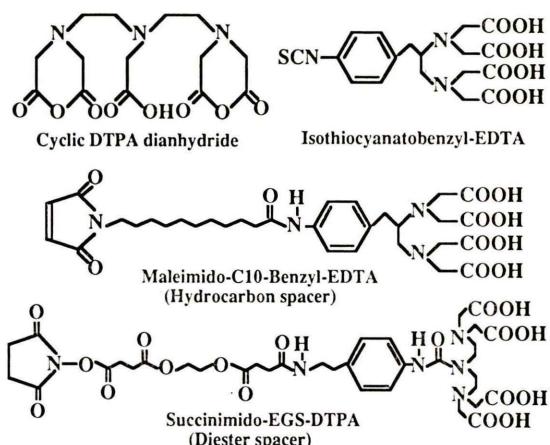


Fig. 1 Chemical structures of four bifunctional chelates.

sulfoxide (DMSO) は 倍和光純薬(大阪)より購入した。本研究で使用したキレート剤の化学分子式を Fig. 1 に示した。緩衝液としてはリン酸(PB), ホウ酸(BB), クエン酸(CB)緩衝液およびリン酸緩衝生食液(PBS)を用いた。

3) 放射性核種

塩化インジウム(¹¹¹InCl₃)は日本メジフィジックス社(西宮)より提供を受けた。過テクネチウム酸ナトリウム-99m(^{99m}Tc)は第一ラジオアイソトープ研究所(東京)より購入した。

2. キレート抗体の合成

1) ジエステルスペーサを含む DTPA 結合 A7 抗体(EGS-DTPA-A7)の合成

EGS-DTPA は Paik らの報告した方法の変法で合成した²³⁾。まず、0.1 M の CB(pH 5) 5 ml に溶解した APE(70 mg) と cDTPAA 700 mg を同時に、CB(pH 5) 20 ml を含むフラスコ中に少量ずつ加えて、35 分間軽く攪拌しながら反応させた。ついで、未反応の DTPA を分離せずに、生成物(DTPA-p-(aminoethyl)anilide)溶液 50 μl と同モル比の EGS(100 μl, DMSO に溶解)を 850 μl の 0.1 M PB(pH 7.0)と混合し、室温で 5 分間反応させて、succinimido-EGS-DTPA を作成した。本研究では A7 抗体(15 mg/ml, pH 7.0 の 0.1 M PB で調製)とモル比 3:1, 6:1 および 10:1 の

succinimidio-EGS-DTPA との結合を検討した。結合反応は 4°C, 12 時間で行い、作成した EGS-DTPA 結合 A7 抗体の免疫活性 (Immunoreactivity) 変化の有無についても検討した。なお、標識前に未反応の DTPA を centricon-30 (Amicon 社, Beverly, USA) を用いて遠心除去した。

2) サイクリック無水 DTPA 結合 A7 抗体 (DTPA-A7) の合成

DTPA 結合 A7 抗体の合成は Paik らの方法に基づいて合成した²⁸⁾。A7 抗体 (15 mg/ml, pH 8.4 の 0.1 M 重炭酸緩衝液で調製) とモル比 2:1 の cDTPAA (DMSO に溶解) を混合し、室温で 1 時間反応させた後、未反応の DTPA を centricon-30 を用いて遠心除去した。キレート結合 A7 抗体の免疫活性も検討した。

3) イソチオシアニ酸 Bz-EDTA 結合 A7 抗体 (SCN-Bz-EDTA-A7) の合成

SCN-Bz-EDTA (DMSO に溶解したもの) 対 A7 抗体 (15 mg/ml, pH 8.5 の BB) をモル比 1:1, 2:1, 5:1, 37°C で 1 時間、2 時間、4 時間で反応させた後に、¹¹¹In と 30 分、60 分、120 分間反応させ、条件検討を行った。次に、pH 7.4 の PBS, pH 8.5 あるいは pH 9.5 の BB を用いて、SCN-Bz-EDTA 対 A7 抗体をモル比 1:1 で、37°C 2 時間、4 時間、8 時間インキュベートし、至適な緩衝液を決定した。また、モル比 1:1, 37°C 4 時間で反応させた結合 A7 抗体の免疫活性も検討した。

4) 炭化水素スペーサを含む Bz-EDTA 結合 A7 抗体 (C10-Bz-EDTA-A7) の合成

還元剤 2-ME を用いて、抗体の還元を Mather らの方法²⁹⁾に基づいて行った。A7 抗体 (15 mg/ml, pH 7.0 の 0.1 M PB で調製) とモル比 1000:1 の 2-ME を室温で 30 分間反応させた。その後、セファデックス G-50 ゲル濾過カラム (2×8 cm, Pharmacia 社, Uppsala, Sweden) を用い室温で 1 ml/min (0.1 M PB, pH 7.0) の流速で還元 A7 抗体を精製し、centricon-30 を用いて遠心濃縮したものをキレート剤との結合反応に使用した。まず、C10-Bz-EDTA 対還元 A7 抗体 (15 mg/ml, pH 6.0

の 0.1 M PB で調製) をモル比 1:1, 室温と 37°C, 1 時間あるいは 2 時間で反応させ、反応条件を検討した。次に、pH 6.0, 7.0, 8.0 の PB を用いて、C10-Bz-EDTA 対抗体をモル比 1:1 で反応させ、至適な pH を決定した。さらに PB の適切な pH 値および至適温度、時間を決めた後、キレート剤対還元 A7 抗体のモル比が標識率に及ぼす影響について、1:2, 1:1, 5:1, 10:1 のモル比で検討した。2-ME で還元した A7 抗体およびキレートと結合した A7 抗体について免疫活性の変化を検討した。

3. 方 法

1) キレート結合 A7 抗体の¹¹¹In 標識

まず、¹¹¹InCl₃ 溶液 (159.2 MBq/ml) およびキレート結合 A7 抗体溶液を 0.3–0.03 M 酢酸一クエン酸緩衝液 (pH 5) でそれぞれ pH 4.8, 6.0 に調整したのち、混合して 4°C で 30 分間反応させ¹¹¹In 標識した。酢酸一クエン酸緩衝液の最終濃度は 0.1–0.01 M であった。ついで、モル比 500~1000 倍過剰の cDTPAA を加え、5 分間反応させて抗体と結合していない¹¹¹In を除去した。¹¹¹In 標識後、シリカゲル薄層クロマトグラフィ (Thin layer chromatography, TLC) (SILICAGEf-S200, 東京化成) (展開溶媒は 10% ギ酸アンモニウム: メタノール: 0.5 M CB=2:2:1) で抗体と結合した放射能標識率 (標識率) を求めた。またペーパークロマトグラフィ (2×40 cm, 東洋漉紙) (展開溶媒、0.15 M 塩化ナトリウム) により水酸化インジウム (コロイド) 形成の有無を検討した。さらに、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により標識抗体を精製した。HPLC は、ゲル漉過用 TSK gel-G3000SWXL カラム (7.8 mm×30 cm, 東ソー, 東京) を用い、0.1 M PB (pH 7.4) により 1 ml/min の流速で溶出した。蛋白量のピークの検出には紫外線分光光度計 (280 nm) を用いた。また、蛋白ピークの放射能はキュリーメータで測定した。

2) 免疫活性の評価

キレート結合による A7 抗体の免疫活性低下の有無を評価するために、細胞結合アッセイを行った。一定量 (5 ng) の¹¹¹In-A7 抗体と種々量のヒ

ト大腸癌 LS180 細胞 ($0.25\sim6\times10^6$ 個) を総量 $200\mu l$ に調製し、室温で 1 時間インキュベートした。アッセイは triplicate で行い、また抗体の非特異的な細胞への結合を評価するため、各細胞の濃度で過剰量 ($25\mu g$) の未標識 A7 抗体を加えてインキュベートした。インキュベートの後、冷 0.1% BSA 加 0.01M PBS $3ml$ を加え遠心 ($1,500\text{ rpm}$, 5 分間) して上清を吸引し、細胞を分離して、細胞と結合した放射能 (B) を測定した。非特異的結合放射能 (B_0) を差し引いて求められた特異的結合放射能 ($B-B_0$) の総放射能 (T) に対する割合を算出した。特異的結合率の逆数 ($T/B-B_0$) を縦軸に細胞数の逆数 ($1/10^6$ 細胞) を横軸にしてプロット³⁰⁾ を行い、免疫活性を求めた。

モル比 $1000:1$ の 2-ME で還元して ^{99m}Tc 標識した A7 抗体 (Mather らの方法²⁰⁾)、ならびにモル比 $1:1, 5:1$ の C10-Bz-EDTA と反応させ、 ^{111}In 標識した (以下同) 還元 A7 抗体、また EGS-DTPA をモル比 $3:1, 6:1, 10:1$; cDTPAA をモル比 $2:1$; SCN-Bz-EDTA をモル比 $1:1$ で結合させた A7 抗体の免疫活性を検討した。

3) ^{111}In 標識キレート結合 A7 抗体の血清中および PBS 中における安定性の評価

in vitro の安定性については、 ^{111}In 標識 A7 抗体をヒト血清中で 37°C または PBS 中 (0.01M , pH 7.4) で 4°C インキュベートし、HPLC あるいは TLC を用いて経時的に分析した。ヒト血清の分離は血液を $37^\circ\text{C}, 5\% \text{CO}_2$ のもとで 1 時間インキュベートして血液を凝固させ、これを $1,500\text{ rpm}$ で 5 分間遠心して分離した。ヒト血清 $1ml$ 中に ^{111}In 標識 A7 抗体 $25\sim35\mu l$ ($70\sim90\mu g$)、抗生物質セフメタゾン (cefmetazon, $100\mu g/ml$) を混合し、pH 7.4 に調整してインキュベートした。インキュベートの直後、3, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 時間後にサンプルを HPLC で分析し、溶出液を 0.5 ml ずつ採取し、ガンマカウンタで放射能を測定した。また、キレート剤の競合反応により標識 A7 抗体の安定性について、 $1ml$ の PBS 中に標識 A7 抗体 ($70\sim90\mu g/25\sim35\mu l$) とモル比 1000 倍過剰の DTPA ($167\sim214\mu g/10\sim13\mu l$, DMSO に溶解)

あるいは C10-Bz-EDTA ($310\sim396\mu g/10\sim13\mu l$, PBS に溶解) を加えた場合、および加えなかった場合、 4°C でインキュベートした後、標識率の経時的变化を TLC を用いて比較評価した。

4) キレート結合 HIG の標識率の経時的变化

キレート結合抗体の保存条件が ^{111}In 標識率に及ぼす影響について、キレート結合 HIG を用いて検討した。キレート対 HIG のモル比として、C10-Bz-EDTA, SCN-Bz-EDTA の場合にはともに $1:1$, EGS-DTPA では $10:1$, DTPA では $2:1$ とした。結合反応後、4種類のキレート結合 HIG をおのおの $200\mu g/40\mu l$ ずつ 4°C あるいは -85°C の超低温条件で保存し、3日、1, 2, 3, 8, 12 週間後に ^{111}In 標識を行い、TLC を用いて標識率の経時的な変化を測定した。

III. 結 果

1) A7 抗体の ^{111}In 標識

緩衝液の種類、pH 値、結合反応時間の変化が結合抗体の標識率に及ぼす影響を検討した結果を Table 1 にまとめて示した。EGS-DTPA の場合には、キレート対 A7 抗体のモル比が増加につれ、標識率は徐々に上昇し、3倍では 12.8% 、6倍では 50.8% 、10倍では 90% を示した。

cDTPAA の場合には、キレート対 A7 抗体の2倍モル比で標識率は 95.5% を示した。

SCN-Bz-EDTA 対 A7 抗体をモル比 $1:1$, 37°C の条件で 1, 2, 4 時間反応させた後に、30 分、60 分、120 分間で ^{111}In 標識し、TLC で標識率を検討したところ、結合反応時間が長くなるにつれて標識率はおのおの $30\%, 45\%, 55\%$ と増加した。しかし、標識時間を 30 分から 120 分に延長しても標識率は変化しなかった。キレート対 A7 抗体のモル比が $1:1, 2:1, 5:1$ と増加するにつれて、標識率は逆に低下する傾向を示した。SCN-Bz-EDTA 対 A7 抗体をモル比 $1:1$ で反応させた場合、PBS 中の標識率は 2 時間、4 時間、8 時間でおのおの $21.6\%, 32.3\%, 52.3\%$ を示し、pH 8.5 の BB の場合には標識率はおのおの $45.1\%, 54.5\%, 66.2\%$ を示した。しかし、pH 9.5 の BB

Table 1 Effect of conjugation conditions on the labeling efficiency and immunoreactivity of A7 MoAb

Chelate : MoAb (Mole : Mole)	Buffer	Conjugation		L.E. (%)	I.R. (%)
		T (°C)	Time (hr)		
Maleimido-C10-Bz-EDTA					
10: 1	0.1 M PB (pH 7.0)	R.T.	2	44.7	
5: 1	„	R.T.	2	86.5	69.0
1: 1	„	R.T.	2	80.0	87.0
1: 2	„	R.T.	2	10.4	
Isothiocyanatobenzyl-EDTA					
1: 1	0.01 M PBS (pH 7.4)	37°C	2	21.6	
1: 1	„	37°C	4	32.3	Original A7 MoAb: I.R. 83.0%
1: 1	„	37°C	8	52.3	
1: 1	0.05 M BB (pH 8.5)	37°C	2	45.1	
1: 1	„	37°C	4	54.5	2-ME reduced A7 MoAb (2-ME: MoAb=1000:1)
1: 1	„	37°C	8	66.2	
1: 1	0.05 M BB (pH 9.5)	37°C	2	67.9	I.R. 81.0%
1: 1	„	37°C	4	70.8	
1: 1	„	37°C	8	70.5	
Succinimido-EGS-DTPA					
3: 1	0.1 M PB (pH 7.0)	4°C	12	12.8	72.0
6: 1	„	4°C	12	50.8	73.0
10: 1	„	4°C	12	90.0	82.0
Cyclic DTPA dianhydride					
2: 1	0.1 M NaHCO ₃ (pH 8.4) R.T.		1	95.5	91.0

T: Temperature, L.E.: Labeling Efficiency, I.R.: Immunoreactivity, R.T.: Room Temperature

の場合には 2, 4, 8 時間の結合反応とともに標識率は約 70% のほぼ一定値を示した。

C10-Bz-EDTA 対 A7 抗体のモル比を 1:1 として、室温と 37°C, 1 時間あるいは 2 時間で反応させ¹¹¹In 標識したところ、温度の差は標識率に大きな影響を及ぼさなかったが、反応時間 1 時間の標識率は 72% であったのに対し、2 時間の標識率は 80% とやや高い値を示した。それ故、以後の検討は室温、2 時間の反応条件で行った。一方、pH 6.0, 7.0, 8.0 の間で¹¹¹In 標識率に大きな差は認められなかった。したがって、還元 A7 抗体の精製およびキレートと A7 抗体の結合反応においても PB の pH を 7.0 にして A7 抗体の還元に用いた pH 値と一致させた。上記の結合反応条件、すなわち pH 7.0 の PB、室温と 2 時間反応におけるキレート対 A7 抗体のモル比の増加による標識率の変化を Table 1 に示した。モル比が 1:2 の場合には、標識率は 10.4% ときわめて低値を示したが、モル比 1:1, 5:1, 10:1 の場合には標識

率はおのおの 80%, 86.5%, 44.7% であった。

2) 免疫活性

キレート剤と結合していない A7 抗体、還元 A7 抗体およびキレート剤と結合した A7 抗体の免疫活性の変化は Table 1 で示した。キレート剤と結合していない A7 抗体の免疫活性は 83.0% であり、モル比 1000:1 の 2-ME で還元した A7 抗体の免疫活性は 81.0% であった。さらに還元 A7 抗体とモル比 1:1, 5:1 で C10-Bz-EDTA と反応させた場合、免疫活性はおのおの 87%, 66% となり、モル比 5:1 の方が A7 抗体の免疫活性はわずかな低下を示した。

モル比 3:1, 6:1, 10:1 の EGS-DTPA と反応させた A7 抗体の免疫活性はおのおの 72%, 73%, 82% であった。また、SCN-Bz-EDTA および cDTPAA と結合した¹¹¹In 標識の A7 抗体では免疫活性の低下は認められず、おのおの 85%, 91% であった。

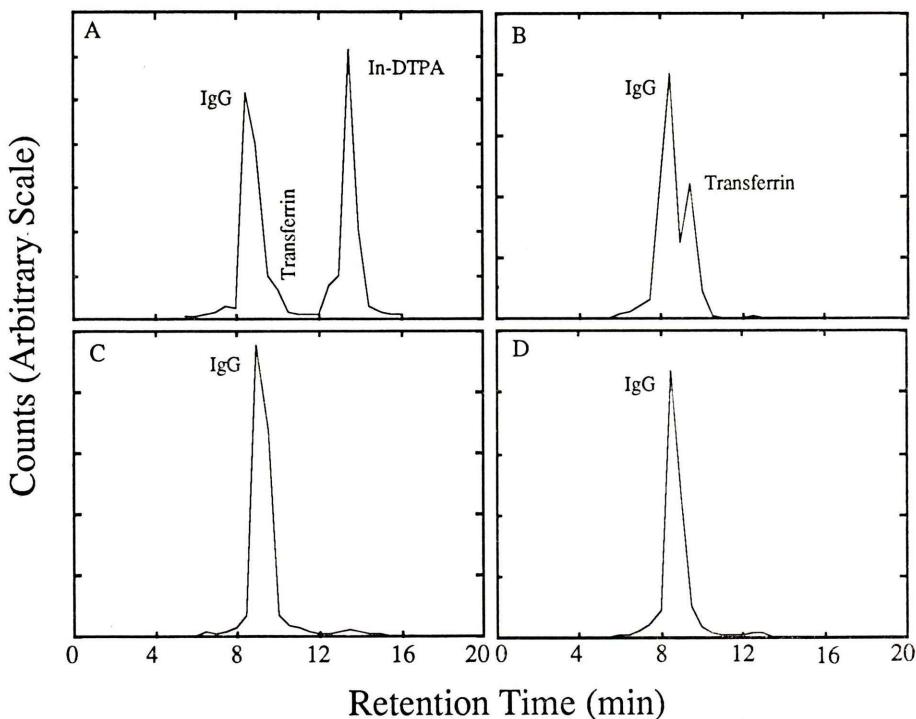


Fig. 2 HPLC profiles of ^{111}In labeled four immunoconjugates, incubated in human serum at 37°C. EGS-DTPA-A7 (A) showed radioactivity associated with IgG fraction (retention time: 8–9.5 min), transferrin containing fraction (9.5–10.5 min) and In-DTPA fraction (12–14 min) at 12 hrs. DTPA-A7 (B) demonstrated radioactivity associated with IgG fraction and transferrin containing fraction at 168 hrs. C10-Bz-EDTA-A7 (C) and SCN-Bz-EDTA-A7 (D), however, only showed radioactivity associated with IgG fraction at 168 hrs.

3) ^{111}In 標識キレート結合 A7 抗体の血清中および PBS 中における安定性の評価

^{111}In 標識キレート結合 A7 抗体を 37°C のヒト血清中でインキュベートした後の HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示した。溶出された放射能を IgG に相当する分子量分画（溶出時間 8 分～9.5 分）、トランスフェリンに相当する分子量分画（同 9.5 分～10.5 分）および In-DTPA に相当する分子量分画（同 12 分～14 分）の 3 部分に分けて分析した。 ^{111}In -EGS-DTPA-A7 の場合 IgG と結合した放射能は経時に速やかに減少し 168 時間後わずか 4.9% (n=4) の放射能が認められるにすぎず、血清中で非常に不安定であった (Fig. 3)。一方、トランスフェリンおよび In-DTPA の分子量に相当

する分画中の放射能はおのおの 12.6%, 82.5% 増加した。また、抗体とキレート間の解離は著しく速く、12 時間後すでに 48.2% の放射能が In-DTPA に相当する分画中に溶出された (Fig. 2A)。 ^{111}In -DTPA-A7 の場合血清中でのインキュベート時間が延長するにつれて、IgG 分画中の放射能は漸減し、24, 72, 168 時間にはおのおの 90.6%, 85.4%, 79.8% (n=4) であったが、トランスフェリンに相当する分画中の放射能は漸増して 24, 72, 168 時間にはおのおの 9.4%, 14.6%, 20.3% であった (Fig. 4)。しかしながら、 ^{111}In -DTPA-A7 については ^{111}In -EGS-DTPA-A7 と異なり In-DTPA に相当する分画は認められなかった (Fig. 2B)。一方、 ^{111}In 標識 C10-Bz-EDTA 結合 A7 抗体

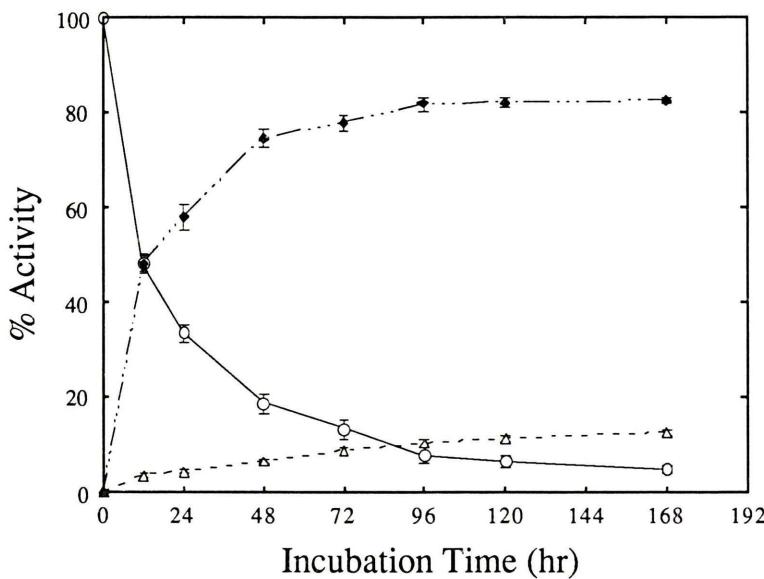


Fig. 3 HPLC analysis of ¹¹¹In-EGS-DTPA-A7 incubated in the human serum at 37°C. ¹¹¹In activity in IgG fraction (—○—) decreased rapidly to only 4.9% at 168 hrs, while ¹¹¹In activity in transferrin containing fraction (—△—) and In-DTPA fraction (—◆—) increased to 12.6% and 82.5%, respectively (Mean±SD, n=4).

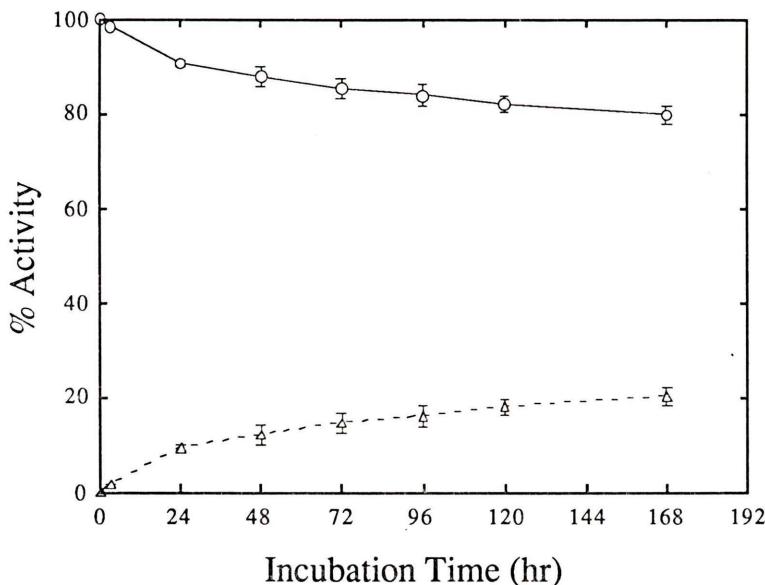


Fig. 4 HPLC analysis of ¹¹¹In-DTPA-A7 incubated in the human serum at 37°C. ¹¹¹In activity in IgG fraction (—○—) decreased gradually to about 79.8% at 168 hrs, while transferrin containing fraction (—△—) increased to 20.3% (Mean±SD, n=4).

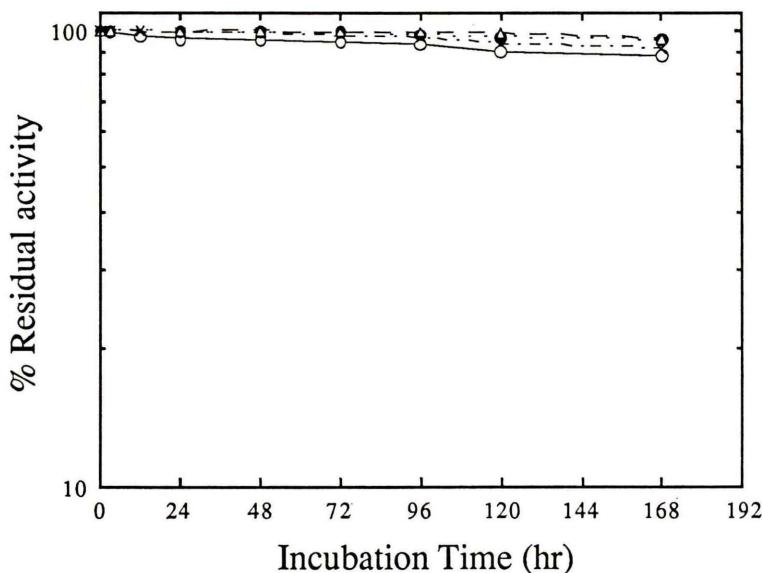


Fig. 5 Stability of ^{111}In labeled four immunoconjugates. The samples were incubated in PBS at 4°C and analyzed by thin layer chromatography (TLC). —○— EGS-DTPA-A7, —△— DTPA-A7, —×— C10-Bz-EDTA-A7, —●— SCN-Bz-EDTA-A7.

および SCN-Bz-EDTA 結合 A7 抗体については、HPLC の経時的な放射能溶出曲線の変化がなく、いずれの時間においても放射能は IgG 分画にのみ認められた (Fig. 2C, D).

^{111}In 標識キレート結合 A7 抗体を 4°C の PBS 中でインキュベートし、TLC で抗体および DTPA と結合した放射能の経時的変化を検討した。 ^{111}In -DTPA-A7, ^{111}In -SCN-Bz-EDTA-A7 および ^{111}In -C10-Bz-EDTA-A7 の場合には、抗体の放射能の経時的な変化はほとんど認められなかった。しかし、 ^{111}In -EGS-DTPA-A7 の場合には抗体結合の放射能の割合が軽度減少する傾向を示し、168 時間後には 88.4% となった (Fig. 5)。さらに、4 種類のキレート結合 A7 抗体にモル比で 1000 倍過剰の cDTPA あるいは C10-Bz-EDTA を加えてインキュベートした場合の放射能変化は、PBS 中に cDTPA あるいは C10-Bz-EDTA を加えないで得られた結果とほぼ同じであった。

4) キレート結合 HIG の標識率の経時的变化

キレート結合した HIG を 4°C あるいは -85°C

で保存し、一定時間後に ^{111}In 標識を行い、TLC を用いて標識率の経時的変化を検討した。 -85°C の条件で保存した 4 種類の結合 HIG は 3か月後でも ^{111}In の標識率は低下を示さず、いずれも 90% 以上を示した (Fig. 6A)。また、 4°C で保存した場合にも、cDTPA, SCN-Bz-EDTA および C10-Bz-EDTA 結合 HIG の標識率の経時的な低下は認められず、いずれも 90% 以上を示した。しかし、EGS-DTPA 結合 HIG の場合には、保存時間が長くなるにしたがって標識率は低下し、3 か月後には 57% となった (Fig. 6B)。

IV. 考 察

RIS による癌の検出能には種々の要因が影響を及ぼすことが知られている^{30~32)}。癌への特異的な放射能集積を増加させるためには、より高い免疫活性、親和性を有する抗体を使用することはもちろんのこと^{30,31)}、抗体とキレートの結合および ^{111}In 標識の操作過程において抗体の免疫活性を保つことが重要である^{4,32)}。本研究では、スペー

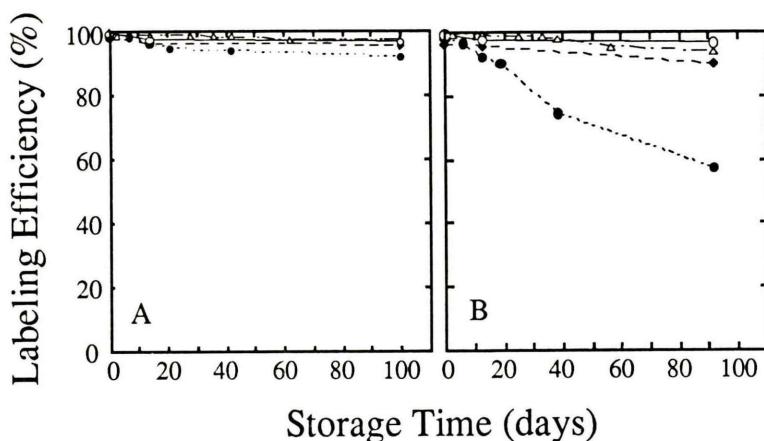


Fig. 6 Effect of storage conditions on the labeling efficiency (LE) of four HIG-chelate conjugates. The samples were analyzed by TLC at various time points. A and B: conjugates were stored at -85°C and 4°C , respectively. The LE for DTPA-HIG ($-\triangle-$), SCN-Bz-EDTA-HIG ($-\circ-$) and C10-Bz-EDTA-HIG ($-\blacklozenge-$) conjugates remained unchanged when stored both at -85°C or 4°C for 12 weeks. The LE for EGS-DTPA-HIG ($-\bullet-$) conjugate was remained high when stored at -85°C , but it was decreased while stored at 4°C with time.

サを含む EGS-DTPA, C10-Bz-EDTA およびスペーサを含まない cDTPAA, SCN-Bz-EDTA を用いて、A7 抗体との結合反応の至適条件、¹¹¹In 標識方法、操作過程における標識抗体の免疫活性の低下の有無、および標識抗体のヒト血清中での安定性などについて検討した。

EGS-DTPA の場合にはキレート対抗体のモル比が 3 から 10 まで増加するにつれ、¹¹¹In の標識率も増加し、モル比 10:1 における標識率は 90% で、かつ免疫活性も良好に保持された。また、cDTPAA の場合にはキレート対抗体のモル比を 2:1 とすると、標識率は 95% 以上となり、免疫活性も保たれ、これが至適条件と考えられた。

SCN-Bz-EDTA と抗体の結合反応に関する報告は見られた^{11,33)}が、本研究では標識率が高く、かつ抗体の免疫活性が保存される至適反応条件を求めるためにキレート対抗体のモル比、キレートの結合反応に用いる緩衝液、反応の時間などについて検討した。SCN-Bz-EDTA の場合には、緩衝液の種類および緩衝液の pH 値は標識率に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち

PBS 中で抗体とキレートを結合させた場合よりも、BB 中で結合させた場合の方が高い標識率が得られた。さらに pH 8.5 の BB よりも pH 9.5 の BB を用いた場合の方が、高い標識率が得られた。キレート対抗体のモル比が標識率に及ぼす影響では、モル比が 1:1 以下の場合には抗体分子当たりに導入されるキレート数が少なくなるため、標識率は低下した。一方、モル比が 5:1 以上の場合には、抗体と結合しない未反応のキレート剤が反応液中に多く残るため、抗体の標識率が低下した。モル比 1:1, 37°C , 4 時間で結合反応させた場合、標識率 70% が得られ、かつ抗体の免疫活性も 85% とよく保たれ、これが至適条件と考えられた。

新しいキレート剤 C10-Bz-EDTA に関する研究報告がまだ見られていないため、C10-Bz-EDTA と A7 抗体の結合反応についてキレート対抗体のモル比、リン酸緩衝液の pH、反応時間と温度など結合反応の至適条件を検討した。C10-Bz-EDTA はマレイミド基を介して抗体と結合し、Bz-EDTA を介して ¹¹¹In と配位結合する仕組みとなっている (Fig. 1)。この際、C10-Bz-EDTA のマレイミド

基と抗体を結合させるためには、抗体の disulfide bond を還元しチオール基を導入する必要がある。この還元操作による A7 抗体の免疫活性の低下は認められなかった。また、PB の pH 値は結合抗体の標識率に大きな影響を及ぼさなかった。しかし、キレート対抗体のモル比の増加は SCN-Bz-EDTA と同様、結合抗体の標識率に影響を及ぼした。C10-Bz-EDTA については、抗体とのモル比 1:1 で室温で 2 時間結合反応させた場合、標識率は 80% となり、かつ免疫活性は 87% であったので、この条件が至適条件と考えられた。

キレート結合抗体の血清中での安定性はトレーサーの体内分布に大きな影響を及ぼす^{34,35}。今回の検討では 4 種類のキレート剤について in vitro の安定性にかなりの差が認められた。EGS-DTPA 結合 A7 抗体では血清中で放射能の経時的変化が認められた。すなわち、¹¹¹In 放射能は抗体から解離しトランスフェリンにも移行したが、¹¹¹In 放射能の大部分は ¹¹¹In-DTPA 類似の形で結合抗体から遊離した。EGS-DTPA 結合抗体中に形成されているジエステル結合 (diester spacer) は主に肝臓でエステラーゼにより代謝されると考えられているが^{23~25}、今回の in vitro 安定性検討ではこのジエステル結合が血清中においても代謝されることが明らかとなった。これに対して、DTPA 結合抗体では DTPA の ¹¹¹In 保持力が不十分であり、1 日 2~10% の速度で ¹¹¹In がトランスフェリンへ移行すると報告されている^{34~37}。Hnatowich ら^{34,35,37} は、¹¹¹In 標識 DTPA 結合抗体をマウスおよび患者に投与した後に、マウスでは 24 時間で約 6% の ¹¹¹In、患者では 24 時間で約 9% の ¹¹¹In が抗体からトランスフェリンに移行したと報告している。本研究でも同様の結果が得られ、DTPA 結合抗体については放射能の経時的なトランスフェリンへの移行が確認された。しかし、DTPA 結合 A7 抗体では EGS-DTPA 結合 A7 抗体とは異なり、抗体とキレート間の解離は認められず、少なくとも血中においては抗体と DTPA 間のアミド (Amide) 結合は安定であると考えられた。一方、SCN-Bz-EDTA と C10-Bz-

EDTA 結合 A7 抗体は血清中で非常に安定であり、168 時間のインキュベート後でもほとんどの ¹¹¹In 放射能が IgG に相当する分画に溶出し、トランスフェリンへの放射能の移行や抗体とキレートの解離は認められなかった。したがって、チオウレア基 (Thiourea) による SCN-Bz-EDTA と抗体の結合やチオエーテル基 (Thioether) による C10-Bz-EDTA と抗体の結合は血清中で非常に安定と考えられた。この結果は、Lym-1 抗体を用いて SCN-Bz-EDTA 結合抗体の血清中の安定性について報告した Cole らの結果と一致した^{38,39}。また、A7 抗体の標識率は SCN-Bz-EDTA および C10-Bz-EDTA を用いた場合、HIG より低いことが明らかになった。これは A7 抗体と HIG では結合に与かるリジン基やチオール基 (ジスルフィド結合) の数が異なるためと考えられた。

V. 結 論

スペーサーを含むあるいは含まない二官能性キレート剤と A7 抗体の結合反応の至適条件、結合抗体の ¹¹¹In 標識、および in vitro における安定性の検討などを行い、以下の結論を得た。

- 1) いずれのキレートでも抗体の免疫活性を低下させることなく、臨床上の使用に耐えうる十分高い比放射能標識抗体が得られた。
 - 2) DTPA 構造を有する EGS-DTPA と DTPA 結合 A7 抗体では ¹¹¹In 放射能が標識抗体からトランスフェリンに移行し、ともに血清中で不安定であった。さらに EGS-DTPA 結合 A7 抗体では In-DTPA の形でも標識抗体から放射能が遊離し、ジエステルスペーザーの解離が確認された。
 - 3) Bz-DTPA 構造を有する C10-Bz-EDTA と SCN-Bz-EDTA 結合 A7 抗体では明らかなトランスフェリンへの放射能移行は認められず、血清中できわめて安定であることを見いだした。
- 以上より、in vitro における C10-Bz-EDTA 結合抗体の EGS-DTPA 結合抗体に対する優位性が示されたものと考えられ、C10-Bz-EDTA を用いることにより腫瘍描画の向上が期待される。

謝辞：稿を終えるにのぞみ、ご指導、ご校閲を賜りました恩師久田欣一教授に深く感謝いたします。直接ご指導いただいた金沢大学医学部核医学教室横山邦彦先生、ならびに実験に際しご助力いただいた秀毛範至、絹谷清剛、宮内勉、徳山由紀子諸先生に深謝いたします。またご助言をいただいた金沢大学医学部核医学教室利波紀久助教授、旭川医科大学放射線科学教室油野民雄教授、金沢大学医療技術短期大学部診療放射線学科高山輝彦助教授、さらにご協力をいただいた教室の各先生に厚く御礼申し上げます。モノクローナル抗体 A7 を提供くださいました京都府立医科大学第一外科高橋俊雄教授、山口俊晴先生、塩化インジウム (¹¹¹In) を提供してくださいました日本メジフィジックス社に感謝いたします。

本研究の一部は、平成 2 年度厚生省がん研究助成金(久田班, 1-40)ならびに 3, 4 年度厚生省がん研究助成金(久田班, 3-35), および平成 5 年度厚生省がん研究助成金(小西班牙, 5-31)によったことを付記する。

本論文の要旨は第 39 回米国核医学会(於 Los Angeles, 1992), 第 40 回米国核医学会(於 Toronto, 1993), 第 30 回(於東京, 1990), 第 31 回(於松山, 1991), 第 32 回(於横浜, 1992) および第 33 回日本核医学会総会(於宮崎, 1993)にて発表した。

文 献

- 1) Sundberg MW, Meares CF, Goodwin DA, Diamanti CI: Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA. *J Medicinal Chemistry* **17**: 1304-1307, 1974
- 2) Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL, Lanteigne D, Davis MA, Griffin TW, et al: Radioactive labeling of antibody: A simple and efficient method. *Science* **220**: 613-615, 1983
- 3) Powe J, Pak KY, Paik CH, Steplewski Z, Ebbert MA, Herlyn D, et al: Labeling monoclonal antibodies and F(ab')₂ fragments with (¹¹¹In) indium using cyclic DTPA anhydride and their in vivo behavior in mice bearing human tumor xenografts. *Cancer drug delivery* **1**: 125-135, 1984
- 4) Fawwaz RA, Wang TST, Estabrook A, Rosen JM, Hardy MA, Alderson PO, et al: Immunoreactivity and biodistribution of indium-111-labeled monoclonal antibody to a human high molecular weight-melanoma associated antigen. *J Nucl Med* **26**: 488-492, 1985
- 5) Murray JL, Rosenblum MG, Sobol RE, Bartholomew RM, Plager CE, Haynie TP, et al: Radioimmunoimaging in malignant melanoma with ¹¹¹In-labeled monoclonal antibody 96.5. *Cancer Res* **45**: 2376-2381, 1985
- 6) Pimm MV, Perkins AC, Baldwin RW: Diverse characteristics of ¹¹¹In labeled anti-CEA monoclonal antibodies for tumour immunoscintigraphy: radiolabeling, biodistribution and imaging studies in mice with human tumour xenografts. *Eur J Nucl Med* **12**: 515-521, 1987
- 7) Rainsbury RM, Ott RJ, Westwood JH, Kalirai TS, Coombes RC, McCready VR, et al: Location of metastatic breast carcinoma by a monoclonal antibody chelate labeled with indium-111. *Lancet* **ii**: 934-938, 1983
- 8) Carney PL, Rogers PE, Johnson DK: Dual isotope study of iodine-125 and indium-111-labeled antibody in athymic mice. *J Nucl Med* **30**: 374-384, 1989
- 9) Halpern SE, Dillman RO, Witztum KF, Shega JF, Hagan PL, Burrows WM, et al: Radioimmuno-detection of Melanoma utilizing In-111 96.5 monoclonal antibody: a preliminary report. *Radiology* **155**: 493-499, 1985
- 10) Rosenblum MG, Murray JL, Haynie TP, Glenn HJ, Jahns MF, Benjamin RS, et al: Pharmacokinetics of ¹¹¹In-labeled anti-p97 monoclonal antibody in patients with metastatic malignant melanoma. *Cancer Res* **45**: 2382-2386, 1985
- 11) Brechbiel MW, Gansow OA, Atcher RW, Schlom J, Esteban J, Simpson DE, et al: Synthesis of 1-(p-isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. antibody labeling and tumor-imaging studies. *Inorg Chem* **25**: 2772-2781, 1986
- 12) Wahl RL, Parker CW, Philpott GW: Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')₂. *J Nucl Med* **24**: 316-325, 1983
- 13) Lockshin A, Stehlin JS: Improved tumor localization of ¹¹¹In labeled monoclonal antibody with chelator administration to host nude mice. *Eur J Nucl Med* **12**: 573-575, 1987
- 14) Goodwin DA, Meares CF, McCall MJ, McTigue M, Chaovapong W: Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J Nucl Med* **29**: 226-234, 1988
- 15) Blend MJ, Greager JA, Atcher RW, Brown JM, Brechbiel MW: Improved sarcoma imaging and reduced hepatic activity with indium-111-SCN-Bz-DTPA linked to MoAb 19-24. *J Nucl Med* **29**: 1810-1816, 1988
- 16) Wu C, Virzi F, Hnatowich DJ: Investigations of N-linked macrocycles for ¹¹¹In and ⁹⁰Y labeling of proteins. *Nucl Med Biol* **19**: 239-244, 1992
- 17) Schuhmacher J, Klivenyi G, Hull WE, Matys R, Hauser H, Kalthoff H, et al: A bifunctional HBED-

- derivative for labeling of antibodies with ^{67}Ga , ^{111}In and ^{59}Fe . Comparative biodistribution with $^{111}\text{In-DTPA}$ and ^{131}I -labeled antibodies in mice bearing antibody internalizing and non-internalizing tumors. *Nucl Med Biol* **19**: 809-824, 1992
- 18) Subramanian R, Colony J, Shaban S, Sidrak H, Haspel MV, Pomato N, et al: New chelating agent for attaching indium-111 to monoclonal antibodies: In vitro and in vivo evaluation. *Bioconj Chem* **3**: 248-255, 1992
 - 19) Gansow OA: Newer approaches to the radiolabeling of monoclonal antibodies by use of metal chelates. *Nucl Med Biol* **18**: 369-381, 1991
 - 20) Beatty BG, Paxton RJ, Hawthorne MF, Williams LE, Rickard-Dickson KJ, Do T, et al: Pharmacokinetics of an anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody conjugated to a bifunctional transition metal carborane complex (venus flytrap cluster) in tumor-bearing mice. *J Nucl Med* **34**: 1294-1302, 1993
 - 21) Yokoyama K, Paik CH, Quardi SM, Reynolds JC, Min CY, Shin SY, et al: Amplification of antibody tumor targeting by chemical modification with ester bond. *J Nucl Med* **28**: 572, 1987 (Abstr.)
 - 22) Meares CF, McCall MJ, Deshpande SV, DeNardo SJ, Goodwin DA: Chelate radiochemistry: cleavable linkers lead to altered levels of radioactivity in the liver. *Int J Cancer (Suppl 2)*: 99-102, 1988
 - 23) Paik CH, Yokoyama K, Reynolds JC, Quardi SM, Min CY, Shin SY, et al: Reduction of background activities by introduction of a diester linkage between antibody and a chelate in radioimmuno-detection of tumor. *J Nucl Med* **30**: 1693-1701, 1989
 - 24) Deshpande SV, DeNardo SJ, Meares CF, McCall MJ, Adams GP, DeNardo GL: Effect of different linkages between chelates and monoclonal antibodies on levels of radioactivity in the liver. *Nucl Med Biol* **16**: 587-597, 1989
 - 25) Gestin JF, Faivre-Chauvet A, Mease RC, Sai-Maurel C, Thedrez P, Slinkin M, et al: Introduction of five potentially metabolizable linking groups between ^{111}In -cyclohexyl EDTA derivatives and F(ab')₂ fragments of anti-carcinoembryonic antigen antibody-I. a new reproducible synthetic method. *Nucl Med Biol* **20**: 755-762, 1993
 - 26) Quadri SM, Vriesendorp HM, Leichner PK, Williams JR: Evaluation of indium-111- and yttrium-90-labeled linker-immunoconjugates in nude mice and dogs. *J Nucl Med* **34**: 938-945, 1993
 - 27) Kotanagi H, Takahashi T, Masuko T, Hashimoto Y, Koyama K: A monoclonal antibody against human colon cancers. *Tohoku J Exp Med* **148**: 353-360, 1986
 - 28) Paik CH, Ebbert MA, Murphy PR, Lassman CR, Reba RC, Eckelman WC, et al: Factors influencing DTPA conjugation with antibodies by cyclic DTPA anhydride. *J Nucl Med* **24**: 1158-1163, 1983
 - 29) Mather SJ, Ellison D: Reduction-mediated Technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **31**: 692-697, 1990
 - 30) Yokoyama K, Reynolds JC, Paik CH, Sood VK, Maloney PJ, Larson SM, et al: Immunoreactivity affects the biodistribution and tumor targeting of radiolabeled anti-P97 Fab fragment. *J Nucl Med* **31**: 202-210, 1990
 - 31) Sakahara H, Endo K, Koizumi M, Nakashima T, Kunitatsu M, Watanabe Y, et al: Relationship between in vitro binding activity and in vivo tumor accumulation of radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **29**: 235-240, 1988
 - 32) Larson SM: A tentative biological model for the localization of radiolabeled antibody in tumor: the importance of immunoreactivity. *Nucl Med Biol* **13**: 393-399, 1986
 - 33) Meares CF, McCall MJ, Reardon DT, Goodwin DA, Diamanti CI, McTigue M: Conjugation of antibodies with bifunctional chelating agents: isothiocyanate and bromoacetamide reagents, methods of analysis, and subsequent addition of metal ions. *Anal Biochem* **142**: 68-78, 1984
 - 34) Hnatowich DJ: Label stability in serum of four radionuclides on DTPA-coupled antibodies: an evaluation. *Int J Rad Appl Instrum B* **13**: 353-358, 1986
 - 35) Hnatowich DJ, Griffin TW, Kosciuczyk C, Rusckowski M, Childs RL, Mattis JA, et al: Pharmacokinetics of an indium-111-labeled monoclonal antibody in cancer patients. *J Nucl Med* **26**: 849-858, 1985
 - 36) Wagner SJ, Welch MJ: Gallium-68 labeling of albumin and albumin microspheres. *J Nucl Med* **20**: 428-433, 1979
 - 37) Hnatowich DJ, Childs RL, Lanteigne D, Najafi A: The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radionuclides: an improved method. *J Immunol Methods* **65**: 147-157, 1983
 - 38) Cole WC, DeNardo SJ, Meares CF, McCall MJ, DeNardo GL, Epstein AL, et al: Comparative serum stability of radiochelates for antibody radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* **28**: 83-90, 1987
 - 39) Deshpande SV, Subramanian R, McCall MJ, DeNardo SJ, DeNardo GL, Meares CF: Metabolism of indium chelates attached to monoclonal antibody: minimal transchelation of indium from benzyl-EDTA chelate in vivo. *J Nucl Med* **31**: 218-224, 1990

Summary

Comparative Studies of ^{111}In -Labeled Monoclonal Antibody Using Spacer-Containing and Non-spacer Bifunctional Chelates: (I) Conjugation, Labeling, Immunoreactivity and In Vitro Stability

Baofu SUN

Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University School of Medicine

Bifunctional chelates containing chemical spacer, succinimidio-EGS-DTPA (EGS-DTPA, diester spacer) and 1-[4-(10-maleimidopropyl)amido-benzyl]ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (C10-Bz-EDTA, hydrocarbon spacer) were synthesized and compared in vitro with non-spacer chelates, cyclic DTPA dianhydride (cDTPAA) and isothiocyanatobenzyl-EDTA (SCN-Bz-EDTA). The optimum condition for conjugation with chelates, labeling efficiency, immunoreactivity and stability in the serum were investigated with respect to four chelates. The labeling efficiency for EGS-DTPA-A7 and DTPA-A7 was 90% and over 95%, respectively, when reacted by the chelate to antibody ratios of 10:1 for EGS-DTPA and 2:1 for cDTPAA. The labeling efficiency for SCN-Bz-EDTA and C10-Bz-EDTA was 70% and 80%, respectively, when both of the chelates were conjugated with the antibody in a 1:1 ratio. EGS-DTPA-A7 and DTPA-A7 were unstable when incu-

bated in the human serum at 37°C and showed the transchelation to the transferrin fraction of the ^{111}In activity. Furthermore, the radioactivity from ^{111}In -EGS-DTPA-A7 was also found to be associated with the In-DTPA fraction, indicating that the diester spacer was cleaved in the serum. SCN-Bz-EDTA-A7 and C10-Bz-EDTA-A7 were very stable: there was no evidence of transchelation or any activity was dissociated from the conjugated antibody when incubated in the human serum for 168 hrs. Using C10-Bz-EDTA, immunoconjugate with sufficient specific activity was obtained and high immunoreactivity was maintained. It was considerable that the C10-Bz-EDTA immunoconjugate would produce preferable biodistribution than EGS-DTPA immunoconjugate do.

Key words: Monoclonal antibody, Bifunctional chelate, Diester spacer, Hydrocarbon spacer, Transchelation.