

## 抗体部位特異的修飾法を用いた放射性医薬品の開発



伊東 祐二

*Ito Yuji*

(鹿児島大学大学院  
理工学研究科)



金山 洋介

*Kanayama Yosuke*

(理化学研究所ライフサイエ  
ンス技術基盤研究センター)



林 良雄

*Hayashi Yoshio*

(東京薬科大学薬学部)



六車 共平

*Muguruma Kyohei*

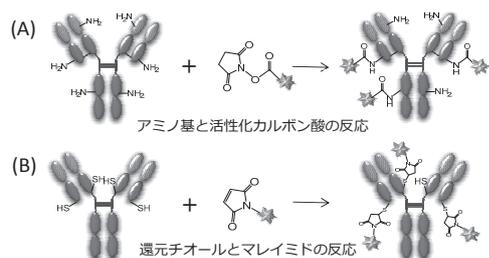
### 1 はじめに

現在、がんや自己免疫疾患を中心に、国内でも既に40種類以上の抗体医薬品が、IgGフォーマットを中心に使用されている(国立医薬品食品衛生研究所ホームページ)。抗体は、標的に対する高い分子標的能により、受容体やリガンド分子のアンタゴニスト(阻害剤)として作用するだけでなく、その2価性の分子構造の特性により、細胞上の受容体を架橋することで細胞へのシグナル伝達を行いアゴニストとしても機能する。更に、Fc領域を介した機能、例えば、NK細胞上のIgG受容体(Fc $\gamma$ RIIIa)との結合による抗体依存的細胞傷害活性(ADCC)や、補体との結合による補体依存性細胞傷害活性(CDCC)によって、がん細胞等を細胞死に導き、死滅させる能力を持つ。これらの抗体の本来の機能に加え、近年注目されているのが、化学修飾により機能性リガンドを抗体に付加させた抗体医薬品である。すなわち、抗体に抗ガン剤を付加した抗体薬物複合体(ADC)、例えば、Trastuzumab emtansine (Kadcyla)<sup>1)</sup>やBrentuximab vedotin (Adcetris)<sup>2)</sup>、更に、キレート剤を結合させた抗体に放射性同位体を標識した放射性標識抗体、例えば、Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)<sup>3)</sup>等である。本稿では、これらの抗体医薬品の作製において用いられている化学的修飾(標識)法に関して、問題点を含め概説すると共に、筆者らが、最近開発した、抗体に対する親和性ペプチドを用いた新規の抗体標識法(CCAP-HIG: Chemical conjugation

by affinity peptide toward human immunoglobulin G)の抗体医薬品開発における有用性について紹介する。

### 2 抗体標識法

抗体の化学修飾法として、一般的に用いられているのが、アミンカップリング法である(図1A)。これは、Trastuzumab emtansine (Kadcyla)や、Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)の調製にも使われている方法で、NHS(N-hydroxysuccinimidyl)基で活性化されたカルボキシル基を持つリガンドを使って、抗体の表面のLys残基のアミノ基をランダムに修飾する方法である<sup>4)</sup>。最も汎用される方法であるが、導入するリガンド個数の制御が難しく、ランダムな部位のアミノ基と反応するため、部位によっては、抗体の抗原結合機能を低下させることになる。一方、抗体のヒンジ部位にあるポリペプチド鎖間のジスルフィド結合(SS結合)を部分的に還元することによって生じるスルフヒドリル基(SH)基に対して、SH基に反応性を有するマレイミド基を持つリガンドで修飾することも行われる(図1B)<sup>5)</sup>。これは、Brentuximab vedotinの調製にも使われている方法であるが、ペプチド鎖間のSS結合は、抗体自身の安定性に寄与しており、SS結合の切断の場合、L鎖とH鎖間若しくは、H鎖間の解離が懸念される。更に近年では、遺伝子工学によるアミノ酸変異によって、新たなCysの導入や、非天然型アミノ酸(例えば、アジド化Lys等)の導入によって、前者では、



	R1	R2	R3
(C)	(Cys)-SH チオール基	 マレイミド基	(Cys)-S- チオエーテル
(D)	-N <sub>3</sub> アジド基	 アルキン	 トリアゾール
(E)	(Lys)-NH <sub>2</sub> Lysの側鎖	H <sub>2</sub> N-(Gln)- Glnの側鎖	(Lys)-NH-(Gln)- イソペプチド

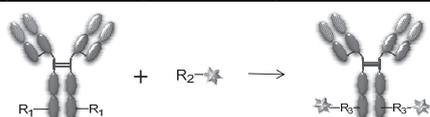


図1 種々の抗体の修飾法

星マークは、導入される機能性リガンドを示す。(C-E)のR1-R3の結合位置については、最下段の図を参照されたい。

マレイミド基を持つリガンドを修飾に用いたり(図1C)、後者では、クリック反応を利用したアルキン(例えばDibenzylcyclooctyne: DBCO)を持つリガンドの導入を行うこと(図1D)ができる<sup>6)</sup>。また、トランスグルタミナーゼを利用して、特定の位置に導入されたGlnにLysの側鎖を有するリガンドを導入する試みも行われている(図1E)<sup>7)</sup>。図1C-Eの方法は、導入する個数や位置を制御できるという利点が存在する一方で、抗体上の目的部位での遺伝子工学によるアミノ酸置換が必要となり、天然の抗体の利用は不可である。

### 3 抗体部位特異的修飾法—CCAP

筆者らは、天然の抗体を用いた部位特異的な修飾を達成するため、CCAP (Chemical conjugation by affinity peptide) 法を開発した<sup>8)</sup>。本手法は、IgG抗体のFcへ特異的に結合するIgG結合ペプチド(IgG-BP)を用いて共有結合を形成させる修飾法である。このIgG-BPは、元々、プロテインAに代わる抗体の精製用リガンドとして開発したものである<sup>9)</sup>。このIgG-BP(配列: GPDCAYHRGELVWCTFH, 分子

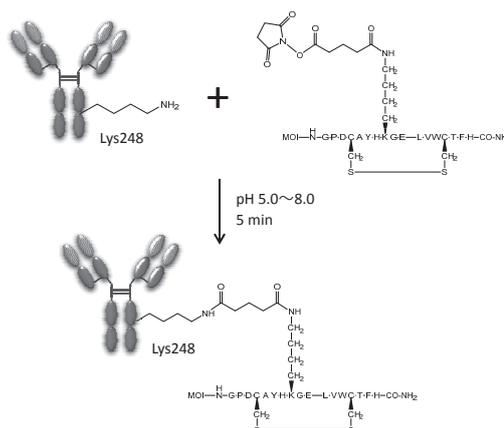


図2 CCAP-HIG法による部位特異的抗体修飾の概要

MOI: Molecule of Interest

内ジスルフィド結合を含む)は、カラム担体に固定化することで抗体の精製に利用できるが、CCAP法では、このペプチドにR8Kの変異を導入することで、ヒトIgG-FcのLys248の側鎖に共有結合(アミド結合)を介してIgG-BPを付加することができる。具体的な手法の概略を図2に示した。IgG-BPのLys8のεアミノ基を2価性の架橋剤DSG(disuccinimidyl glutarate)で修飾し、活性エステル基を導入する。このSuccinimidyl glutararyl(SG)化ペプチド試薬を、抗体の1~5倍のモル比で抗体溶液とpH5.5~8.0の条件下で混合することで、5分以内にヒトIgG抗体(正確には、ヒトIgG1, 2, 4のサブタイプに反応する)を定量的に修飾することが可能である。この反応は極めて部位特異的に進行し、ほぼ100%、Lys248の側鎖のみへのペプチドリガンドを導入できる。

この技術を利用すれば、前もってIgG-BPに抗ガン剤等の機能性リガンドを連結し、得られたIgG-BP試薬を抗体と混合するだけで、部位特異的に抗ガン剤等の機能性分子を抗体へ導入することが可能となる。抗ガン剤だけでなく、抗生物質や蛍光剤等様々な機能性分子を、過剰な修飾による抗体の機能低下を憂慮することなく、定量的かつ迅速に抗体の特定部へ選択的に導入することができる。現在では、このような低分子だけではなく、分子量が大きな抗体フラグメントや酵素等の導入にも成功している。

### 4 CCAP法を用いた抗体の放射性同位体標識

筆者らは、CCAP法による抗体の放射性標識におけ

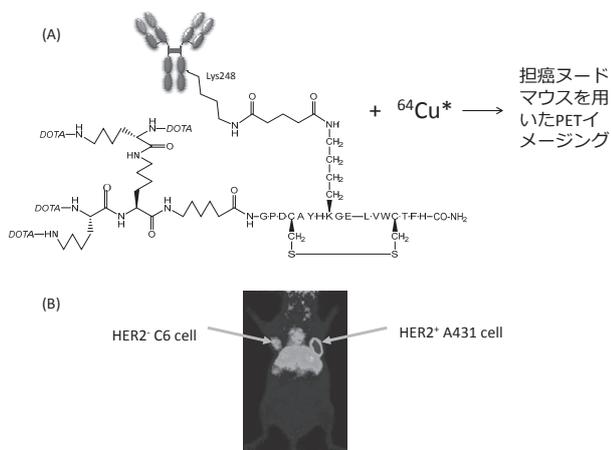


図3 CCAP-HIG法による金属キレート剤DOTAの抗体修飾(A)とDOTA修飾抗体(Trastuzumab)を用いた担ガンマウスモデルによるPET画像

る有用性を評価するため、図3Aに示したような、DOTAを連結したIgG-BP(R8K)を合成し、これをDSGで修飾した。このSG化ペプチド試薬を抗体(Trastuzumab:抗HER2抗体)とモル比1:3で、pH5.5で、30分間反応させた後、陽イオン交換クロマトグラフィーで精製した。抗体のFcは、ホモ2量体の構造のため、2か所のIgG-BP結合サイトを持つ。このため、ペプチド試薬は、1抗体当たり、1個(1価)若しくは2個(2価)の付加体を生成する。ここでは、1価のDOTA-IgG-BP(R8K)付加抗体を、放射性同位体 $^{64}\text{Cu}^*$ で標識し、HER2陽性A431細胞とコントロールとしてHER2陰性C6細胞を移植した担ガンマウスモデルを使って、PETイメージングを行った(図3B)。2日後の撮影像では、通常のアミンカップリングの方法でDOTA標識した抗体に比較して、約2倍の標識抗体のがん組織への集積が見られたことから、本法の有用性が示された。CCAP法では、修飾による抗原への親和性の低下がほとんど起きないことが、DOTA抗体のがん組織への高い集積の理由として挙げられる。

## 5 終わりに

化学修飾による抗体への新たな機能性リガンドの連結は、抗体に新たな機能を付加する上で、極めて有効な方法である。CCAP法は、抗体の抗原結合能を損なうことなく、抗体に機能性分子を部位特異的に付加する上での有用な手段を提供した。今回、紹

介したIgG-BPは、ヒトIgG<sub>1,2,4</sub>のFcに結合するが、げっ歯類のIgGのFcには結合しないため、マウスIgGに修飾には適用できなかったが、筆者らは、最近、別のIgG-BPを用い、げっ歯類の抗体のCCAP修飾技術を開発した。このような親和性ペプチドを介した修飾技術によって、抗体のみならず種々のタンパク質分子のアフィニティペプチドを用いた部位特異的な修飾法の確立によって、新たな医薬品・診断薬の創製を目指していきたい。

なお、本研究は、AMEDの革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業「ヒトIgG特異的修飾技術による多様な機能性抗体医薬の創出」プロジェクトの成果の1つであり、この技術の放射性標識への応用に関しては、日本メジフィジクス(株)へ技術導出していることを申し添えます。

## 引用文献

- 1) LoRusso, P. M., *et al.*, Trastuzumab emtansine: A unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. *Clin. Cancer Res.*, **17**, 6437–6447 (2011)
- 2) Francisco, J. A., *et al.*, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood*, **102**, 1458–1465 (2003)
- 3) Schaefer, N. G., *et al.*, Radioimmunotherapy in non-Hodgkin lymphoma: opinions of nuclear medicine physicians and radiation oncologists. *J. Nucl. Med.*, **52**, 830–8 (2011)
- 4) Boutureira, O., *et al.*, Advances in Chemical Protein Modification. *Chem. Rev.*, **115**, 2174–2195 (2015)
- 5) Hashida, S., *et al.*, More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab' to Horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge. *J. Appl. Biochem.*, **6**, 56–63 (1984)
- 6) Axup, J. Y., *et al.*, Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 16101–16106 (2012)
- 7) Jeger, S., *et al.*, Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angew. Chemie-International Ed.*, **49**, 9995–9997 (2010)
- 8) 伊東祐二(鹿児島大学), 特願2015-103153: IgG結合ペプチドによる抗体の特異的修飾(2015)
- 9) 伊東祐二(鹿児島大学), 特願2013-530055: IgG結合性ペプチド及びそれによるIgGの検出および精製方法(2013)