

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：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
3. 研究開発代表者：伊東祐二
4. 研究開発の成果

本研究は、IgG 結合ペプチドをベースに開発した、ヒト IgG1 の Fc への特異的な修飾試薬 (IgG 修飾試薬) を用いて、容易にしかも迅速・定量的に多様な機能を持つエフェクタードメインを IgG の Fc に連結させる技術 CCAP 法 (Chemical conjugation by affinity peptide) により、従来にない多様な機能性抗体医薬を創出することを目標としている。

分担研究項目として、以下の 6 つの項目を上げており、各項目の主たる分担をカッコ内に示した。このうち (1) は、IgG 修飾試薬の改良技術であり、残りの 5 つが異なる機能ドメインによる機能性抗体の創出研究である。

- (1) IgG1 抗体修飾ペプチド試薬の改良技術 (鹿児島大学)
- (2) 放射性標識診断治療抗体の作製技術 (東京薬科大学、理化学研究所、鹿児島大学)
- (3) 抗体 ADC 化プラットフォーム技術 (東京薬科大学、鹿児島大学)
- (4) 中枢を標的化できる抗体医薬開発技術 (協和発酵キリン (株)、鹿児島大学)
- (5) 細胞内を標的化できる抗体医薬開発技術 (協和発酵キリン (株)、鹿児島大学)
- (6) IgA 様の好中球をエフェクター細胞として利用できる抗体医薬技術 (鹿児島大学)

平成 27 年度での、各分担研究項目での特筆すべき成果として以下のものが挙げられる。

- (1) IgG1 抗体修飾ペプチド試薬の改良技術

IgG 結合ペプチドへの機能性リガンドの連結反応を多様な結合反応に対応させるため、分子内ジスルフィド結合の種々の結合への変換研究を行った結果、IgG 結合ペプチド (アセトン体) を開発した。このアセトン体は、元のペプチドに比べ IgG/Fc への親和性が低下するものの、還元条件下でも還元されないため、IgG 結合ペプチドと機能性リガンドの連結において、例えば、チオール/マレイミドの反応系を使用することが可能になった。また、抗体と IgG 結合ペプチド、機能性リガンドとのコンジュゲート反応をワンポッドで行える手法を開発し、これらの成果を踏まえ、PCT 出願を行った。

- (2) 放射性標識診断治療抗体の作製技術

抗体と IgG 結合ペプチドの放射性核種診断技術である PET、SPECT への応用として、金属キレート剤である DOTA を 4 つ結合させた IgG 結合ペプチドを調製し、IgG 抗体医薬 Trastuzumab (抗 HER2 ヒト化 IgG1 抗体) とのコンジュゲートを作製した。放射性 $^{64}\text{Cu}^{2+}$ による標識後、担癌マウスを使った癌の PET イメージングを実施した結果、IgG に 1 つ IgG 結合ペプチド (キレターは 4 つ) 結合したものでは、HER2 陽性癌細胞への特異的な抗体の集積が見られ、従来の標識法に比較しても、優良な集積画像を得ることができた。一方、IgG に 2 つ IgG 結合ペプチド (キレターは 8 つ) を連結した Trastuzumab では、迅速な肝臓への移行が見られ、標的の HER2 陽性癌細胞への集積は結果として高まらないことが分かった。IgG 結合ペプチドを使った標識法は、迅速かつフレキシブルな抗体の修飾が可能であり、多様な放射性核種による標識抗体診断薬の開発が期待できる。

- (3) 抗体 ADC 化プラットフォーム技術

Plinabulin (チューブリン重合阻害剤) の抗体薬物複合体 (ADC) 開発に向けたプロドラッグ化を検討し、Plinabulin—IgG 結合ペプチド—IgG 抗体のコンジュゲートの調製において反応の進行を確認し

た。一方で、ADC 化において優れた抗体修飾能を有する IgG 結合ペプチドの改良を行い、それらを用いた、市販の抗がん剤の抗体コンジュゲート (ADC) を作製し、癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を確認した。今後、この手法による新たな ADC の開発が期待できる。

(4) 中枢を標的化できる抗体医薬開発技術

抗体医薬を中枢移行させるシステム開発のため、中枢移行素子の探索を、アルパカ VHH ファージライブラリーならびにナイーブ単鎖 Fv ヒト抗体ファージライブラリーを使った *in vivo* パンニングによる手法で検討した。いずれの場合にも、数百倍以上、脳内への移行・濃縮が見られる低分子抗体断片の配列が見いだされた。一方、BBB もしくは CSF (脳脊髄液) に存在するタンパク質を標的にした抗体の取得も進めており、既知の脳移行機能を持つ抗体の評価も合わせて検討した。これらの低分子抗体を、IgG 結合ペプチドを用いた CCAP 法によりコンジュゲート化することで、脳移行機能をもった抗体医薬品の開発を来年度以降、推進する。

(5) 細胞内を標的化できる抗体医薬開発技術

抗体を細胞内に移行させる素子開発のためのスクリーニング系を、フローサイトメータと次世代シーケンサー解析を組み合わせた方法で構築した。すなわち、標的細胞として Jurkat 細胞を用い、これに、ランダムペプチド T7 ファージライブラリーを 0-24 時間反応させ、フローサイトメータによる細胞分取後、各細胞分画から回収したファージのペプチド配列を次世代シーケンサーで解析した。この方法により、細胞内への大きな濃縮が起こっているペプチド配列が見いだされたことから、細胞内移行機能を持ったペプチドの特定を進めている。

(6) IgA 様の好中球をエフェクター細胞として利用できる抗体医薬技術

IgG 抗体医薬を、IgA 様に好中球をエフェクター細胞として利用できる抗体への変換を行う技術の開発を目標に、IgA 受容体に結合する VHH 抗体断片を、アルパカ VHH 抗体ファージライブラリーから単離した。得られた VHH 抗体を、IgG 結合ペプチド試薬を介して、ワンポッドの反応で、IgG 抗体医薬 (Trastuzumab) とコンジュゲートする手法を確立した。得られた、Trastuzumab-IgG 結合ペプチド-抗 IgA 受容体 VHH 抗体のコンジュゲートは、HER2 陽性細胞並びに、IgA 受容体を発現する細胞への結合活性を示したことから、想定した機能を有するコンジュゲートが得られたことを確認した。

上記のように、平成 27 年度の成果として、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に向け、各項目とも順調な進展を見せており、並行して、これらの技術の各分野での企業への技術導出を進めている。