

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative  
Biological Medicine

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Development of a series of advanced functional antibody drugs using  
techniques of specific modification to human IgG antibody

研究開発担当者 (日本語) 鹿児島大学 大学院理工学研究科・教授 伊東 祐二  
所属 役職 氏名： (英語) Yuji Ito, Professor, Graduate School of Science and Engineering,  
Kagoshima university

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

研究開発分担者 (日本語) 東京薬科大学・薬学部・教授 林 良雄  
所属 役職 氏名： (英語) Yoshio Hayashi, Professor, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員  
金山 洋介  
所属 役職 氏名： (英語) Yousuke Kanayama, Research Scientist, Center for Life Science  
Technologies, RIKEN

研究開発分担者 (日本語) 協和発酵キリン株式会社・創薬基盤研究所・グループ長 高橋 信明  
所属 役職 氏名： (英語) Nobuaki Takahashi, Group leader, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

## II. 成果の概要（総括研究報告）

本プロジェクトは、IgG結合ペプチド試薬を用いたCCAP(Cheical conjugation by affinity peptide)法によるヒトIgG抗体標識技術を基盤として、以下の5つの項目の研究を推進することにより、新しい抗体医薬品の開発を推進している。28年度の進捗状況について、以下、項目ごとにまとめる。

### 1. IgG1抗体修飾ペプチド試薬の改良技術（鹿児島大、東薬大）

IgG1抗体修飾ペプチド試薬の改良を行うため、CCAP法に用いるIgG結合ペプチド試薬の分子内ジスルフィド結合を変換し、還元剤に対する抵抗性の獲得を目指した。アミド結合への変換も検討したが、最終的に、分子内の2つのCysのチオールをジクロロプロパノンで架橋したIgG結合ペプチドが、調製も容易で、実際にCCAP法による抗体コンジュゲートの作製にも利用できることから、この架橋方法を、先願の特許に加え、PCT出願を行った。また、IgG結合ペプチド試薬の高機能化に向け、構造活性関連研究を実施し、非天然型のアミノ酸の導入による親和性増強やペプチド長のコンパクト化を行った。

### 2. 放射性標識診断治療抗体の作製技術（理学研究所、東薬大、鹿児島大）

昨年度実施した分岐鎖型キレーター抗体複合体による結果と比較するため、キレーター修飾の分子構造が異なる2種類の直鎖型IgG結合ペプチドを用いて作製されたトラスツズマブ・キレーター抗体複合体に<sup>64</sup>Cu標識を行い、担がんマウスを用いたPETイメージング試験により体内動態、腫瘍集積について評価した。結果として、直鎖型が分岐型よりも優れた腫瘍集積性を有することが明らかとなり、IgG結合ペプチドに導入する修飾構造が体内動態、組織分布に影響を与えることが示された。以上の結果を踏まえ、抗体の放射性標識分野において、CCAP法の特許の企業へのライセンス導出を行った。

### 3. 抗体ADC化プラットフォーム技術（東薬大、鹿児島大）

独自の抗癌剤を用いた抗体薬物複合体(ADC)の合成研究では、本年度の成果として目的物をMALDI-TOFMSにて確認するに至った。現在、in vitro系における抗腫瘍活性を評価中である。また、本技術の改良にむけ、抗体結合ペプチド誘導体を37種類合成し、表面プラズモン共鳴法により抗体結合能を評価した。その結果、抗体薬物複合体形成の効率向上に繋がる新しい知見を見出した。一方、市販の抗癌剤(DM-1等)を使ったCCAP法によるADCの調製を進め、乳癌細胞株に対する細胞選択的な抗腫瘍効果がin vitro実験で得られたことから、現在in vivo実験を展開している。

### 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、鹿児島大）

中枢神経系への抗体医薬の送達技術の構築に向け、既に構築している抗体の中枢移行の評価系を用い、抗体ファージライブラリーからラット並びにマウスを使ったin vivo panningによって濃縮したファージ由来の抗体の脳移行性を検証した。また、標的とする脳発現蛋白質に対する抗体の取得と評価を行った。取得された候補抗体について協和発酵キリン社内でのFeasibility studyを開始した。

### 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、鹿児島大）

前年度に確立した細胞内移行素子のスクリーニング系を用いて、ランダムペプチドT7ファージライブラリーから、神経細胞ならびにT細胞リンフォーマ細胞内に移行するファージを濃縮し、次世代シーケンサーによる解析手法にて候補配列を特定した。蛍光ラベル化した合成ペプチドを調製し、細胞内移行の確認を行うとともに、抗体とのコンジュゲートを作製し、抗体の細胞内移行を検証している。

### 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（鹿児島大）

好中球をエフェクター細胞として抗腫瘍効果を発現する抗体医薬の開発に向け、CCAP法によるヒト抗体医薬と抗Fc $\alpha$ 受容体VHH抗体コンジュゲートを作製した。HL60誘導好中球様細胞では、抗腫瘍活性は見られなかったため、現在、ヒト末梢血由来の好中球を使って検討を行っている

This project promotes the development of a series of advanced functional antibody drugs through five research areas shown below, using techniques of specific modification to human IgG antibody called CCAP (chemical conjugation by affinity peptide). The progress of the researches conducted in 2016 is summarized below. The abbreviations of organizations are Kagoshima University: KU, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences: TUP, RIKEN Center for Life Science Technologies: RIKEN, and Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd: KHK.

1. Improvement of peptide reagent (by TUP and KU)

To improve the peptide reagent used for CCAP method, we converted the intramolecular disulfide (SS) bond to other bonds, including amide, to provide resistance against reducing agents. We decided to use the formula that cross-linked two cysteine thiols with dichloropropanone. This molecule is easy to prepare and possesses enough ability to modify IgG. PCT application was done for this technique. We further performed structure/activity relationship studies of IgG-binding peptide to improve affinity by introducing unnatural amino acids and to minimize the peptide in length.

2. Radioisotope-labeling of diagnostic and therapeutic agents (by RIKEN TUP, and KU)

We evaluated the *in vivo* distribution and tumor-specific accumulation of Cu-64 labeled trastuzumab, which was conjugated with two structurally different types of straight-chain chelating-peptide complexes. The straight-chain complexes showed greater tumor uptake than the branched-chain type. It was indicated that the linker structure between the chelators and IgG-binding peptide may affect tissue accumulation and retention in circulating blood. Based on the above results, the patent of CCAP method was licensed to an enterprise in the research area of radio-isotope labeling of antibody.

3. Antibody-drug conjugates (by TUP and KU)

In the preparation of antibody-drug conjugates (ADC) with a unique antitumor drug, we succeeded in confirming the generation of the desired ADC by MALDI-TOF MS. Subsequent evaluation of cellular cytotoxicity of the ADC is under progress. In addition, to improve the present ADC method, 37 kinds of antibody-binding peptide derivatives were synthesized and their antibody binding affinity was evaluated by surface plasmon resonance assay. Thus, we found a clue to making significant improvements in efficient ADC preparation. We promoted ADC preparation by CCAP method using commercially available anticancer drugs (e.g. DM-1) and assessed their antitumor effect on breast cancer cell lines. *In vivo* evaluations of these conjugates as anticancer drugs are under progress.

4. Delivery of antibody drugs to the brain (by KHK and KU)

To establish a delivery system for the delivery of antibody drugs to the central nervous system (CNS), we verified the migration of antibodies to the brain, which was identified by *in vivo* panning in rats and mice using an antibody phage library. We started a feasibility study in KHK.

5. Intracellular targeting (by KHK and KU)

Using the screening system developed last year, the phages that migrated intracellularly towards neuronal and T cell lymphoma cell lines from random peptide T7 phage library were concentrated, and several candidates were identified by next-generation sequencing analytical method. We have not only initiated the synthesis of fluorescent peptides and assessment of their migration, but also

proceeded with the preparation of peptide antibody conjugates and verification of their intracellular migration.

#### 6. Neutrophil-dependent ADCC (by KU)

To develop antibody drugs that exert antitumor activity by employing neutrophils as effector cells, we prepared conjugates of antibody therapeutics and anti-human Fc $\alpha$ R VHH by CCAP method. As antitumor activity was not observed in HL60-derived neutrophil-like cells, we continued our experiments using neutrophils from human peripheral blood mononuclear cells.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2件、国際誌 5件）

1. 伊東祐二. ヒト IgG 特異的化学修飾技術による機能性抗体医薬の創出 (特集: 抗体医薬の進歩). 細胞. 2016, 48, 172-176.
2. Nakayama H, Kenjyou N, Shigetoh N, Ito Y. Fluorescence Immunoassay for Cocaine Detection. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2016, 35, 83-85.
3. Muguruma K, Yakushiji F, Kawamata R, Akiyama D, Arima R, Shirasaka T, Kikkawa Y, Taguchi A, Takayama K, Fukuhara T, Watabe T, Ito Y, Hayashi Y. Novel Hybrid Compound of a Plinabulin Prodrug with an IgG Binding Peptide for Generating a Tumor Selective Noncovalent-Type Antibody-Drug Conjugate. Bioconjug Chem. 2016, 27, 1606-13.
4. Ito Y. High-Throughput Sequencing on a Next Generation Sequencer to Identify Specific Binders from a Phage Library. Asia-Pacific Biotech News. 2016, 20, 17-19.
5. 瀧真清, 伊東祐二. ネオバイオ分子: 未知なるバイオ分子との遭遇—人工コアのフェージ上での分子進化—. 生物工学会誌. 2016, 94, 473-476.
6. Nakayama H, Murakami A, Yoshida M, Muraoka J, Wakai J, Kenjyou N, Ito Y. Characterization and Selection of 3-(1-Naphthoyl)-Indole Derivative-Specific Alpaca VHH Antibodies Using a Phage Display Library. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2016, 35, 231-234.
7. Abe Y, Kubota M, Takazaki S, Ito Y, Yamamoto H, Kang D, Ueda T, Imoto T. Effect on catalysis by replacement of catalytic residue from hen egg white lysozyme to Venerupis philippinarum lysozyme. Protein Sci. 2016, 25, 1637-1647.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. CCAP 法による抗体薬物複合体の作製とその機能評価, 口頭, 横田璃里, 前田祐加, 橋本駿, 辻井温子, 加藤太一郎, 伊東祐二, 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 2016/5/14, 国内.
2. CCAP 法によるヒト IgG 抗体への部位特異的な Fc $\alpha$ R 特異的 VHH の導入とそのコンジュゲートの機能評価, 口頭, 岸本聡, ABDOR RAFIQUE, 佐竹貴莉子, 宮本結花, 藤崎奏, 加藤太一郎, 伊東祐二, 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 2016/5/14, 国内
3. 抗体, ペプチドライブラリーからの機能分子の特定における次世代シーケンサーの活用, 口頭, 伊東祐二, 第 5 回 ネオバイオ分子研究会, 2016/6/10, 国内.
4. 固相ジスルフィド架橋試薬を用いた Plinabulin-オクタアルギニン架橋体の合成研究, ポスター, 六車共平, 白坂拓也, 秋山大地, 田口晃弘, 高山健太郎, 薬師寺文華, 林良雄, 日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会, 京都, 2016/6/15, 国内.
5. 固相担持型ジスルフィド化試薬を応用した腫瘍指向性ペプチド-Plinabulin 架橋体の創生研究, ポスター, 白坂拓也, 六車共平, 秋山大地, 田口晃弘, 高山健太郎, 林良雄, 長野, 創薬懇話会 2016 in 蓼科, 2016/6/30, 国内.
6. Application of Fc-binding peptide Z33 to the preparation of non-covalent-type antibody-drug conjugate, 口頭, Muguruma K, Kawamata R, Akiyama D, Arima R, Shirasaka T, Taguchi A,

- Takayama K, Hayashi Y. The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-pacific International Peptide Symposium, Nanjing, China, 2016/7/4, 国外.
7. A covalent conjugation of antibodies through Fc-specific affinity peptide reagents to generate new types of antibody therapeutics, 口頭, Ito Y, The 2nd ASK (Antibody Society of Korea) summer workshop, 2016/7/8, 国外.
  8. Fc $\alpha$ R 特異的 VHH 抗体 の IgG 抗体 Fc 領域への部位特異的コンジュゲート作製と機能評価, ポスター, 岸本聡, ABDOR RAFIQUE, 佐竹貴莉子, 宮本結花, 藤崎奏, 加藤太一郎, 伊東祐二, 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2016/8/26, 国内.
  9. CCAP 法による新規抗体薬物複合体の作製とその腫瘍細胞成長阻害活性評価, ポスター, 横田璃里, 前田祐加, 橋本駿, 辻井温子, 加藤太一郎, 馬場昌範, 伊東祐二, 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2016/8/26, 国内.
  10. デラセミ化反応を用いるホタル生物発光のキラルフリー化戦略, ポスター, 前田樹里, 加藤太一郎, 奥田真利, 武尾正弘, 根来誠司, 伊東祐二, 丹羽一樹, 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2016/8/26, 国内.
  11. Solid phase-assisted synthesis of plinabulin-octaarginine conjugate as a disulfide-type prodrug, ポスター, Shirasaka T, Muguruma K, Akiyama D, Taguchi A, Takayama K, Yakushiji F, and Hayashi Y, The XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2016), Manchester, UK, 2016/8/28, 国外.
  12. Specific Chemical Modification of Human Antibodies by a Reagent based on Fc-specific Affinity Peptide, 口頭, Ito Y, Kishimoto S, Kato D, Hayashi Y, Takayama K, Muguruma K, Kanayama Y, Takahashi N, Nakano R, Takagi S, 34th European Peptide Symposium (8th International Peptide Symposium), 2016/9/5, 国外.
  13. Evaluation of Peptide-mediated Fc Region-specific Radiolabeling on Antibody Distribution by using PET with Tumor-bearing Mice, ポスター, Kanayama Y, Zochi R, Hayashinaka E, Wada Y, Muguruma K, Takayama K, Hayashi Y, Ito Y, Watanabe Y, 2016 World Molecular Imaging Congress 2016, 2016/9/10, 国外.
  14. Application of fc-selective Z33-peptide to the preparation of non-covalent-type antibody-antimicrotubule plinabulin conjugate, 口頭, Muguruma K, Kawamata R, Akiyama D, Arima R, Shirasaka T, Kikkawa Y, Taguchi A, Takayama K, Fukuhara T, Ito Y, Hayashi Y. The 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium, Leipzig, Germany, 2016/9/4, 国外.
  15. ヒト IgG 抗体への Fc 部位特異的な抗 Fc $\alpha$ R VHH のコンジュゲート構築と機能評価, ポスター, 岸本聡, ABDOR RAFIQUE, 佐竹貴莉子, 宮本結花, 藤崎奏, 加藤太一郎, 伊東祐二, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内.
  16. 抗体薬物複合体の創製に向けた癌細胞特異的単鎖 Fv-Fc の修飾法, ポスター, 前田祐加, 榎元友里恵, 吉川大和, 橋本駿, 辻井温子, 加藤太一郎, 伊東祐二, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内.
  17. O 型糖鎖結合性一本鎖抗体 (scFv) 固定化蛍光性ナノ粒子を用いた成人 T 細胞白血病 (ATL) 診断ツールの開発, 口頭, 松本光, 新地浩之, 吉満誠, 若尾雅広, 伊東祐二, 隅田泰生, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内.

18. 血液脳関門の通過を目指したトランスフェリンレセプター特異的 VHH 抗体の単離, 口頭, 宮本結花, 岸本聡, 佐竹貴莉子, 藤崎奏, 加藤太一郎, 中野了輔, 高木さやか, 高橋信明, 伊東祐二, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内.
19. 抗原免疫したアルパカ VHH 抗体ファージライブラリからの抗体フラグメント特異的 VHH 抗体の単離と特性解析, ポスター, 佐竹貴莉子, 宮本結花, 岸本聡, 加藤由貴子, 加藤太一郎, 萩原義久, 赤澤陽子, 松田知成, 宮崎誠生, 清瀬紀彦, 伊東祐二, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内.
20. ヒト抗体ファージライブラリを用いた抗体医薬品の抗原性解析システムの構築, ポスター, 三重野亮子, 加藤由貴子, 伊東祐二, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内.
21. Covalent conjugation of a variety of functional ligands to antibody through Fc-specific affinity peptide in a symposium: Potential of antibodies at new frontiers, 口頭, Ito Y, Kanayama Y, Hayashi Y, Takahashi N, The 89th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 2016/9/26, 国内.
22. Evaluation of In-111 labeled trastuzumab using a novel site-specific conjugation technique of human IgG, ポスター, Nakata N, Shoyama Y, Hayashi A, Tsujii A, Hashimoto S, Ito Y, 日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016/10/13-15, 国内.
23. Synthesis of a plinabulin-IgG binding peptide hybrid: possibility of new cancer treatment strategy using non-covalent-type antibody-drug conjugate, 口頭, Muguruma K, Shirasaka T, Kawamata R, Akiyama D, Arima R, Kikkawa R, Taguchi A, Takayama K, Taniguchi A, Ito Y, Hayashi Y, The 53th Japanese Peptide Symposium, 2016/10/26, 国内.
24. Development of fibronectin-based small protein harboring a structurally constrained HER2-binding peptide, ポスター, Kitazawa M, Kadonosono T, Shiozawa T, Yimchuen W, Kuchimaru T, Taki M, Ito Y, Kondoh S, The 53th Japanese Peptide Symposium, 2016/10/26, 国内.
25. Construction of Cryptand Library via the Gp10 Based-Thioetherification (10BASE (10BASEd-T)), ポスター, Mochizuki K, Ito Y, Minami M, Taki M, The 53th Japanese Peptide Symposium, 2016/10/26, 国内.
26. Site-specific chemical modification of antibody by affinity peptide for development of new antibody drugs, 口頭, Ito Y, Kishimoto S, Kato D, Hayashi Y, Takayama K, Muguruma K, Kanayama Y, Takahashi N, Nakano R, Takagi S, The 53th Japanese Peptide Symposium, 2016/10/27, 国内.
27. Affinity Purification of IgY from Egg Yolk by IgY-binding Peptide Developed with T7 Phage Display Screening, ポスター, Khan K, Himeno A, Rafique A, Imamura A, Hatanaka T, Ito Y, The 53th Japanese Peptide Symposium, 2016/10/27, 国内.
28. Development of a high-affinity anti-PD-1 small protein harboring a constrained PD-1-binding peptide, ポスター, Shiozawa T, Kadonosono T, Kitazawa M, Yimchuen W, Kuchimaru T, Taki M, Ito Y, Kondoh S, The 53th Japanese Peptide Symposium, 2016/10/27, 国内.
29. Covalent Labeling of Immunoglobulin G by a Reagent Derived from a Human IgG-specific Affinity Peptide, ポスター, Himeno A, Khan K, Kato K, Ito Y, The 53th Japanese Peptide

Symposium, 2016/10/27, 国内.

30. NGS 網羅的配列解析による機能的 VHH 抗体の単離同定と革新的バイオ医薬品創製への応用, 伊東祐二, 大阪大学蛋白質研究所セミナー～抗体創薬の最前線～「バイオ医薬品開発の鍵となる分子設計技術」, 2016/11/1, 国内.
31. Identification of functional antibodies from antibody phage display library using next generation sequencer, 口頭, Okawa (Enomoto) Y, Kikkawa Y, Umemura U, Fujiyama F, Mieno R, Kato Y, Kato D, Ito Y, The Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2016/12/1, 国内.
32. ファージライブラリーと NGS による網羅的配列解析を組み合わせた手法による機能性抗体・ペプチドのデザイン (シンポジウム: バクテリオファージの最前線と展望), 口頭, 伊東祐二, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
33. IgG 抗体への新規機能付加を目的とした Fc 部位特異的な VHH コンジュゲートの作製と機能評価, 口頭, 岸本聡, Abdor Rafique, 宮本結花, 佐竹貴莉子, 宮本結花, 藤崎奏, 加藤太一郎, 伊東祐二, 第 23 回日本生物工学会九州支部 飯塚大会, 2016/12/3, 国内.
34. Development of IgY purification system using IgY binding peptide isolated by T7 phage display technology, 口頭, Khan K, Himeno A, Rafique A, Imamura A, Hatanaka T, Ito Y, 第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会, 2016/12/3, 国内.
35. CCAP 法による新規抗体薬物複合体の作製とその腫瘍細胞成長阻害活性評価, 口頭, 横田璃里, 前田祐加, 橋本駿, 辻井温子, 加藤太一郎, 馬場昌範, 伊東祐二, 第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会, 2016/12/3, 国内.
36. KPU-300 を基盤とした微小管重合阻害剤の構造活性相関研究, 口頭, 久保木里衣, 林良樹, 中澤大樹, 知念拓実, 田口晃弘, 谷口敦彦, 高山健太郎, 臼井健郎, 林良雄, 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017/3/25, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 機能性ペプチドのデザインと医薬への応用, 伊東祐二, 第 48 回若手ペプチド夏の勉強会－特別講演, 2016/7/31, 国内.

### (4) 特許出願

公開を希望しない