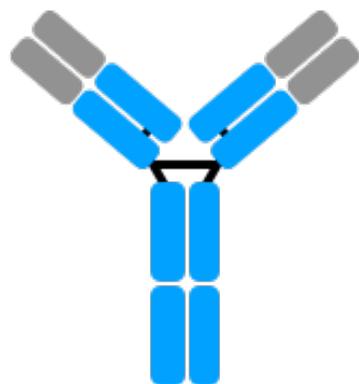


抗体の部位特異的標識用触媒

京都大学 大学院工学研究科 合成・生物化学専攻
講師 田村 朋則

令和3年6月29日

抗体薬物複合体(ADC)



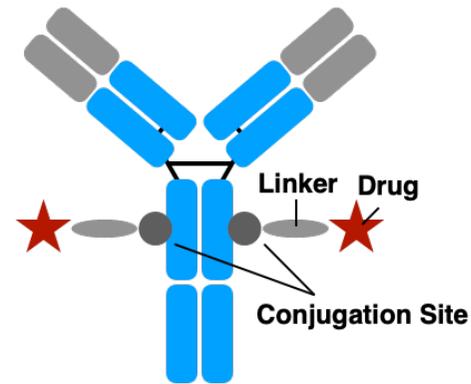
抗体 (Antibody)

+

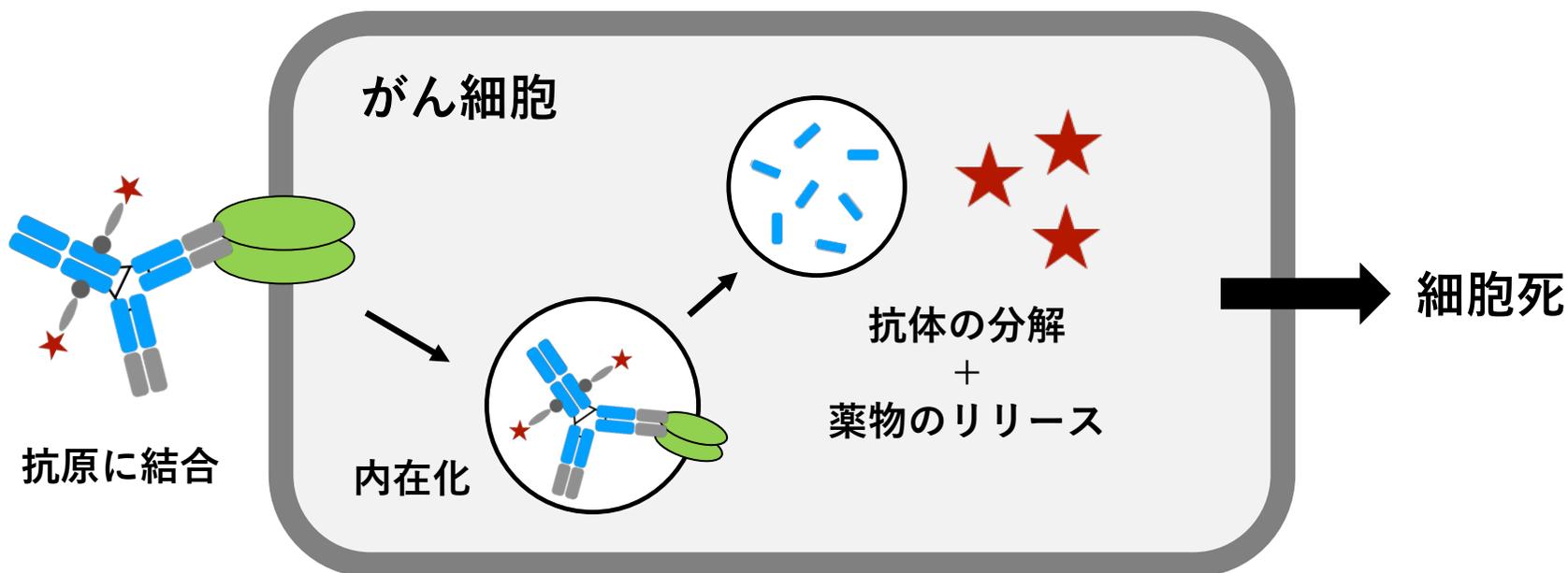


薬物 (Drug)

=

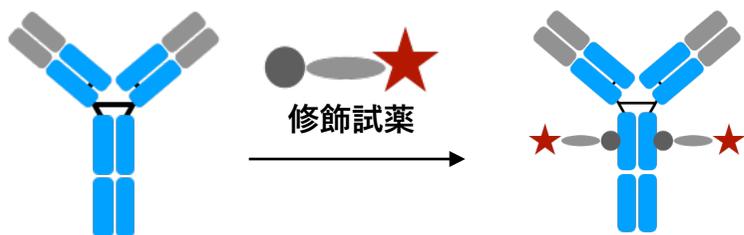


抗体薬物複合体
(Antibody-Drug conjugate: ADC)

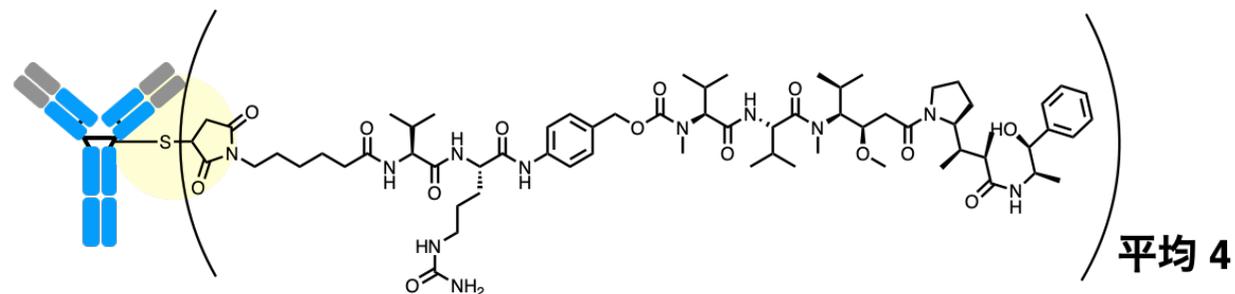


従来技術とその問題点①

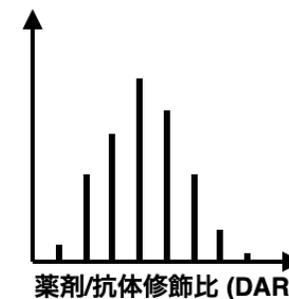
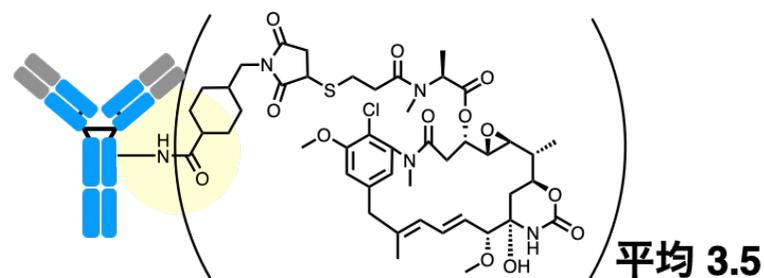
CysやLysへのランダム化学修飾



(a) Cys修飾型 (e.g. Adcetris®)



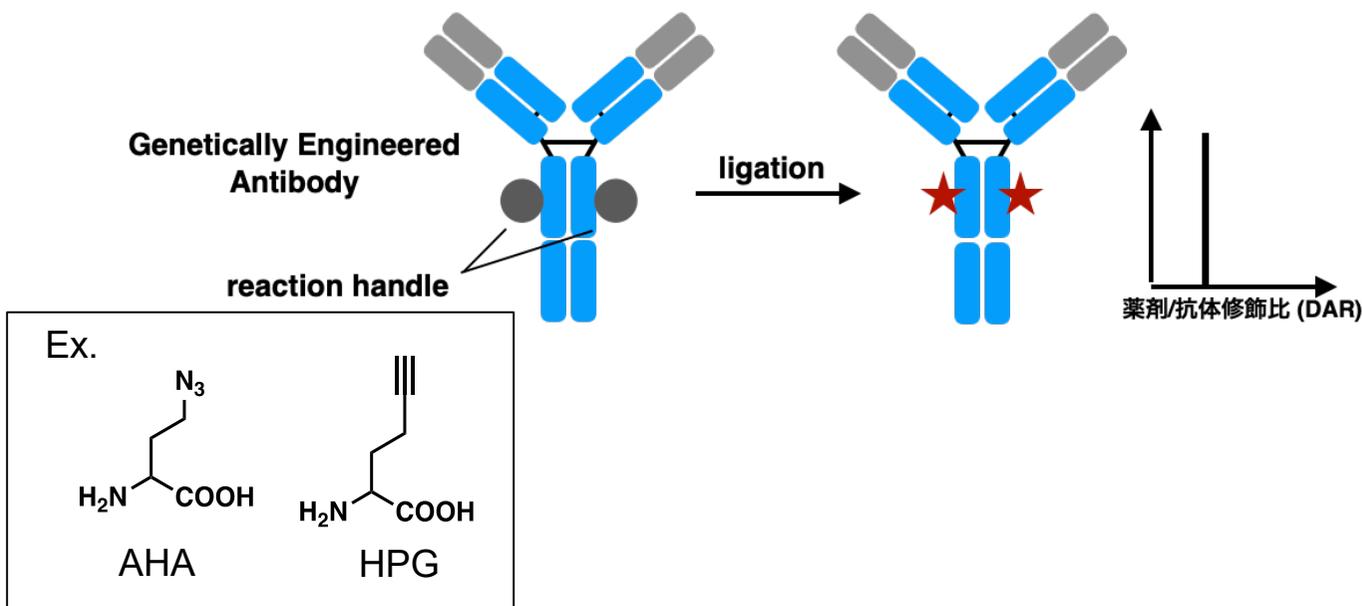
(b) Lys修飾型 (e.g. Kadcyra®)



- ・ 薬剤の修飾部位や個数の制御が困難
- ・ 抗体の安定性・有効性が損なわれる可能性
- ・ ロット間の不均質性 (認可の障害)

従来技術とその問題点②

遺伝子工学によるreaction handleの導入

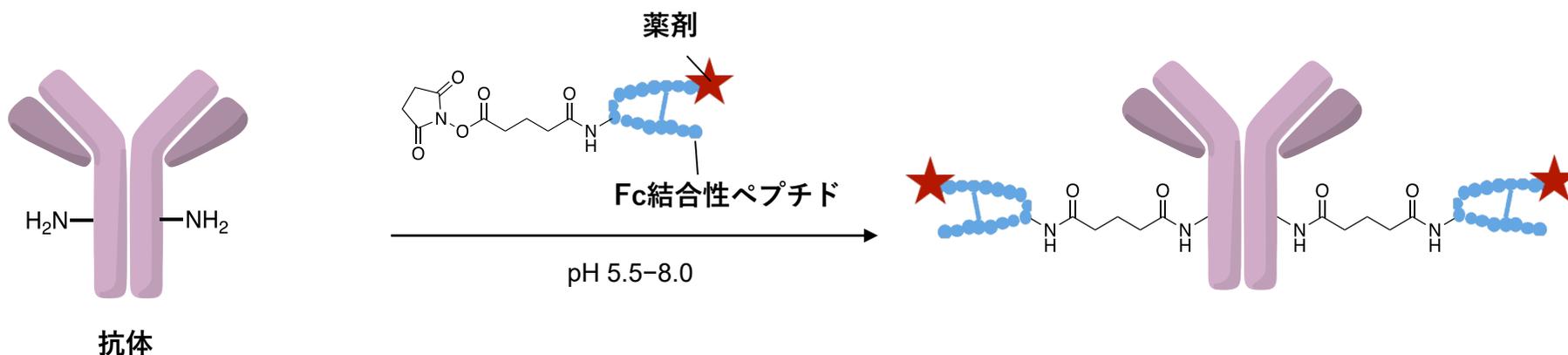


- 天然の抗体を利用できない
- 低い作製効率、高い開発コスト

天然抗体の部位特異的な修飾方の開発が必要

従来技術とその問題点③

CCAP法: Fc結合性ペプチドの親和性を利用した部位特異的修飾



Bioconjugate Chem. 2019, 30, 698-702

Advantage

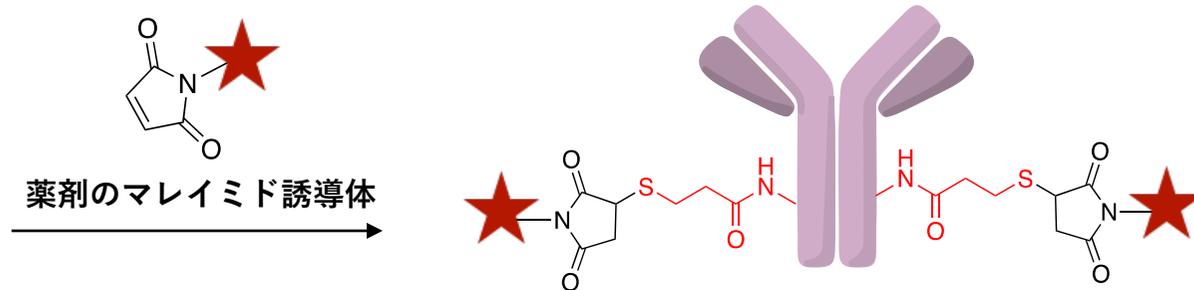
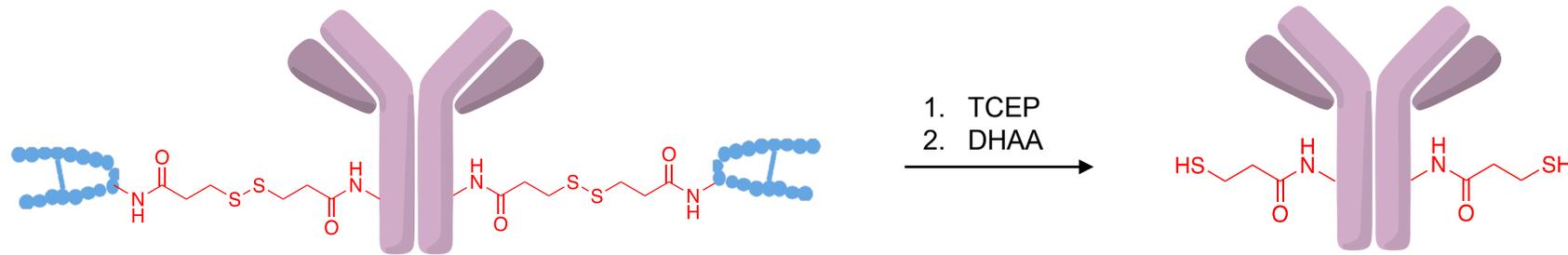
高い部位特異性 (DAR= \sim 2)

Drawback

修飾後に比較的大きなFc結合性ペプチドが残る

従来技術とその問題点④

AJICAP法: CCAP法をベースに切断可能なジスルフィド結合を導入



Angew. Chem. Int. Ed., 2019, 58, 5592-5597

Advantage

高い部位特異性、traceless (ペプチドが残らない)

Drawback

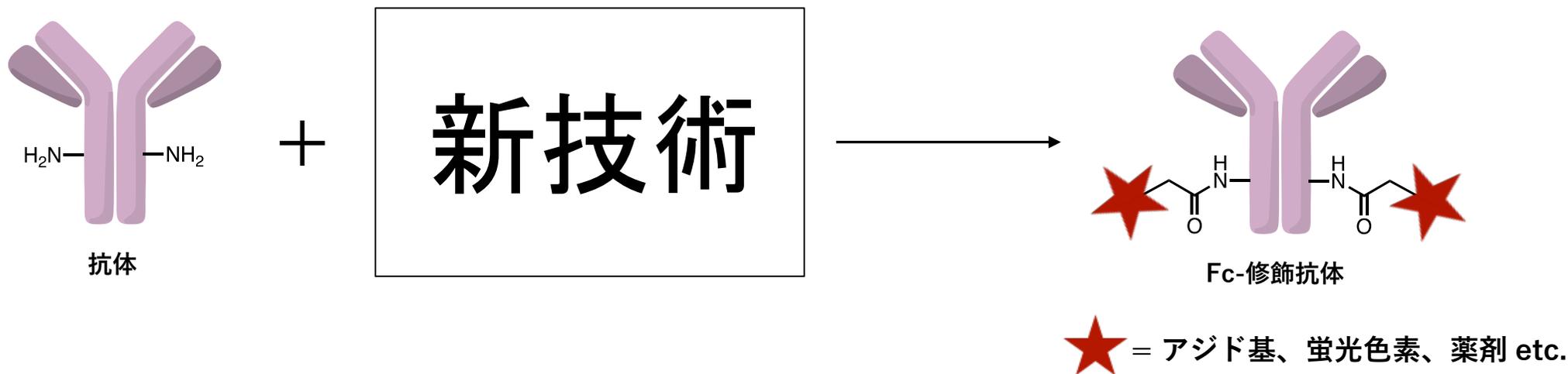
Fc結合性ペプチドの除去に還元処理が必要

(還元処理によって抗体中のジスルフィドも開裂してしまう)

従来技術とその問題点のまとめ

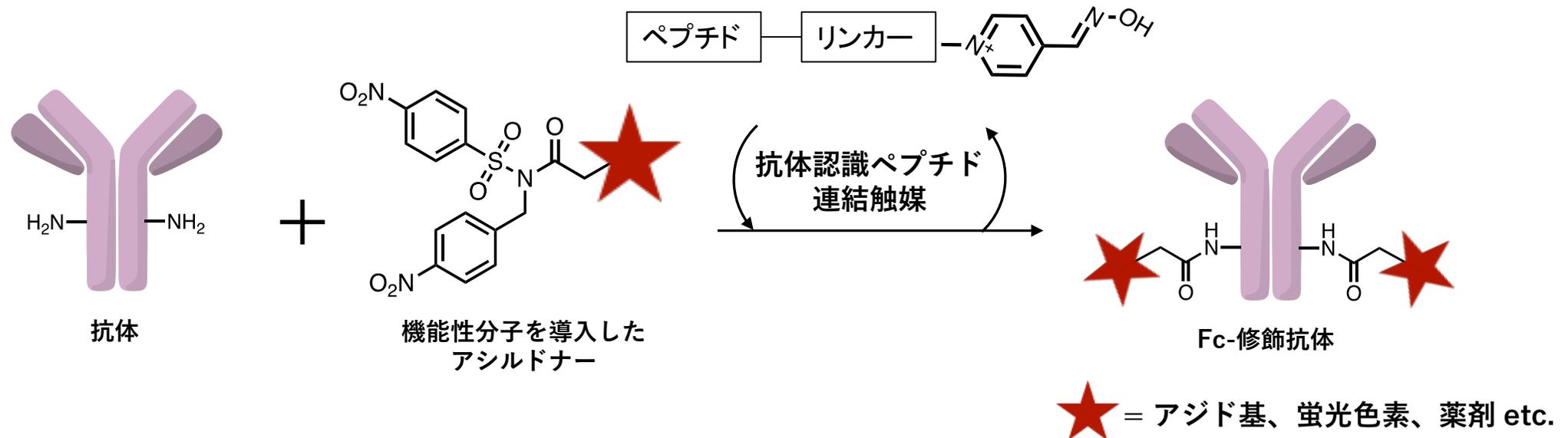
従来技術	問題点
CysやLysへのランダム化学修飾	修飾部位や個数の制御が困難
遺伝子工学による導入	天然抗体を利用できない、開発コスト高い
CCAP	Fc結合性ペプチドが残ってしまう
AJICAP	Fc結合性ペプチドは除去できるが還元処理が必要

新技術:抗体の部位特異的標識用触媒



従来技術の問題点	新技術
ランダム修飾：修飾部位や個数の制御が困難	特定のLys残基に対して特異的に修飾可能
遺伝子工学：天然抗体を利用できない	あらゆる天然抗体に適用可能
CCAP：Fc結合性ペプチドが残ってしまう	余分な部分が残らない
AJICAP：ペプチド除去に還元処理が必要	還元不要

新技術:抗体の部位特異的標識用触媒



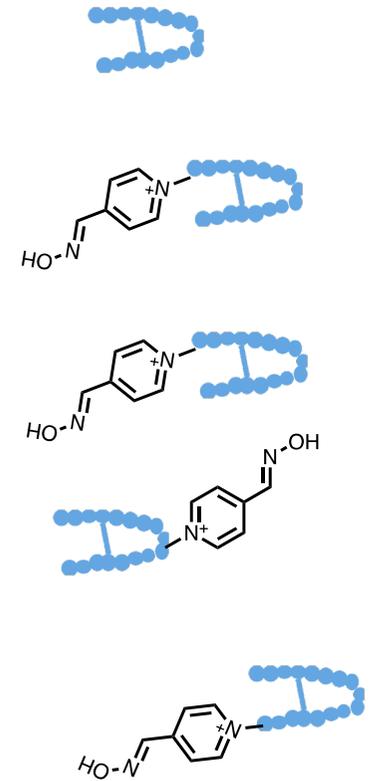
- Fc領域特異的な抗体修飾が可能
- 様々なプローブ分子（Click反応基、蛍光色素、薬剤）を導入可能
- クリック反応基（アジド/アルキンなど）を修飾することで、薬剤や蛍光色素など多様な機能性分子を抗体に修飾できる
(クリック反応を介さずダイレクトに薬剤修飾することも可能)
- 反応に使用するペプチド連結触媒は簡便に除去できるので余計な部分が残らない

ペプチドとPyOxの連結

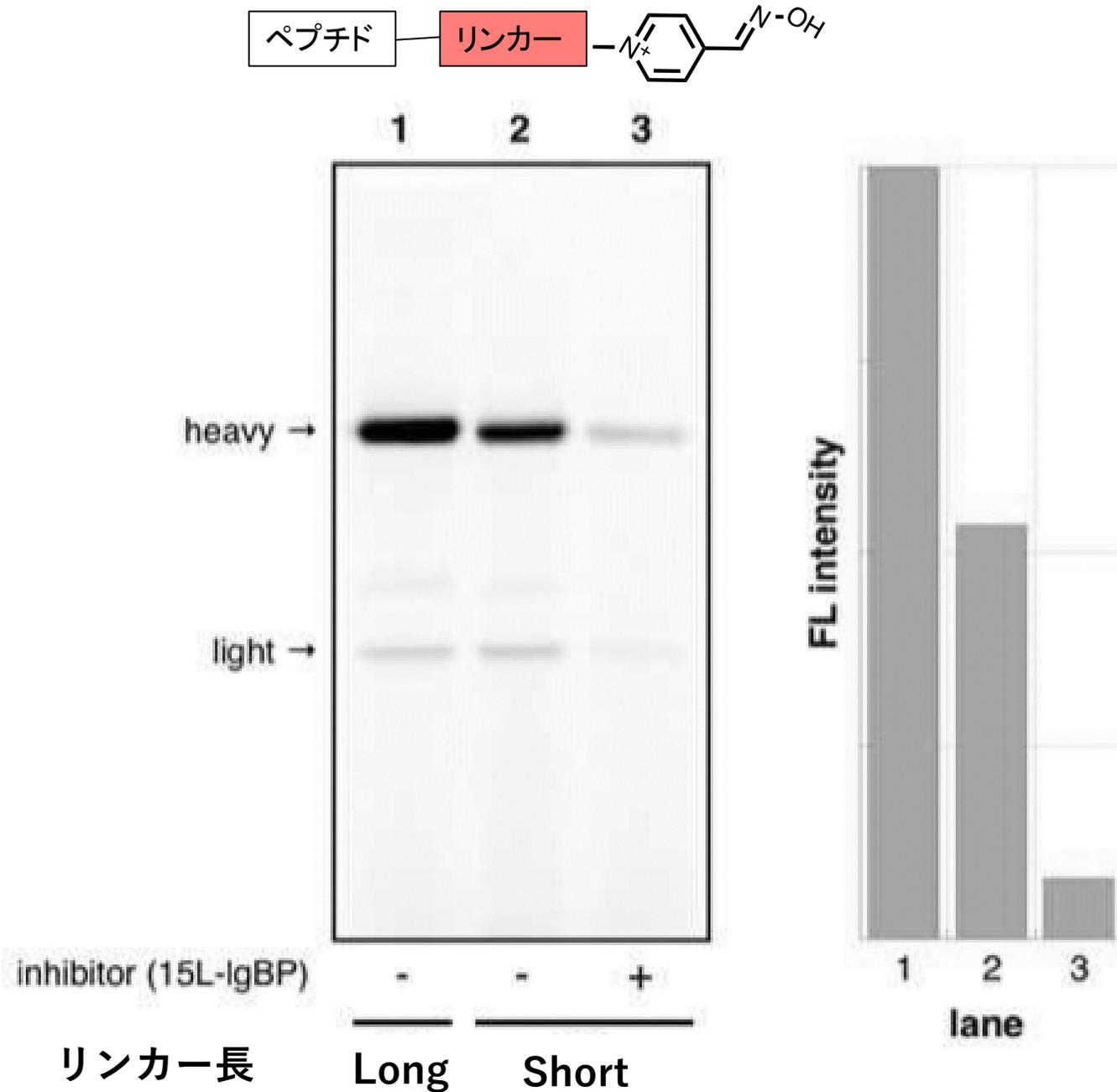
IgBPの異なる部位から触媒を連結した
Cat1-4を作製

合成した触媒ペプチドのアミノ酸配列

15L-IgBP	Ac-DCAYHLGELVWCTFH-NH ₂
15L-XGP	Ac- X GPDCAYHLGELVWCTFH-NH ₂
15L-NtX	Ac- X DCAYHLGELVWCTFH-NH ₂
15L-L8X	Ac-DCAYH X GELVWCTFH-NH ₂
15L-CtX	Ac-DCAYHLGELVWCTFH X -NH ₂



リンカーによる標識率



修飾部位解析

フルオレセイン修飾Herceptinをトリプシン/Lys-Cによってペプチド断片化し、HPLCで解析した。

<Condition>

[FL-Herceptin] = 533 µg

[Trypsin/Lys-C mix] = 20 µg

50 mM NH₄HCO₃ buffer with ProteaseMAX

37 °C, 16h

Herceptin:

(Heavy chain)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP KSCDK**THTCP** **PCPAPELLGG**
PSVFLFPPKP **K**DTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
 MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

(Disulfide bridge: 22-96; 147-203; 264-324; 370-428, Dimer: 229; 232)

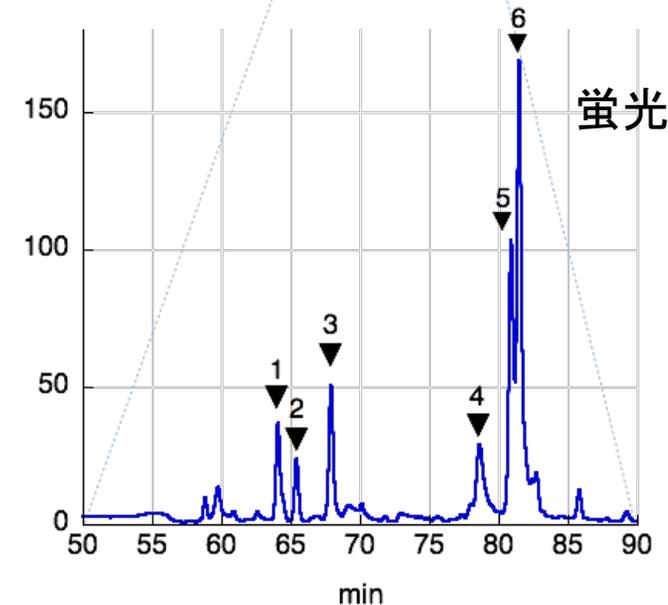
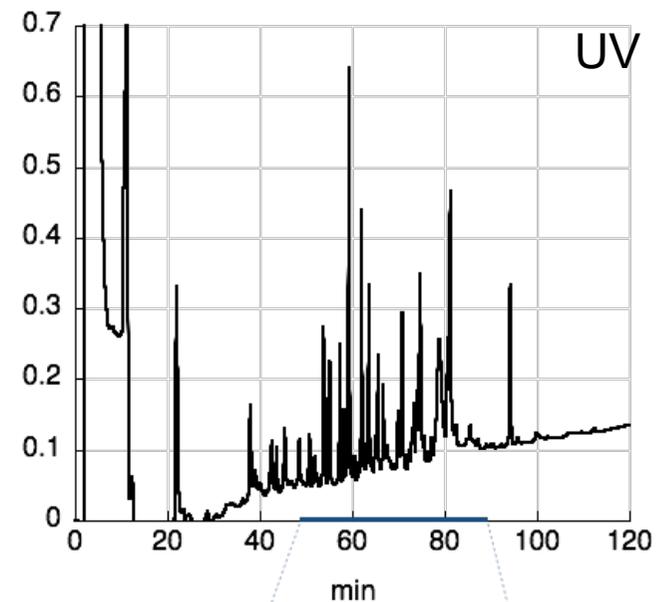
(Light chain)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 RFGSRSRGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

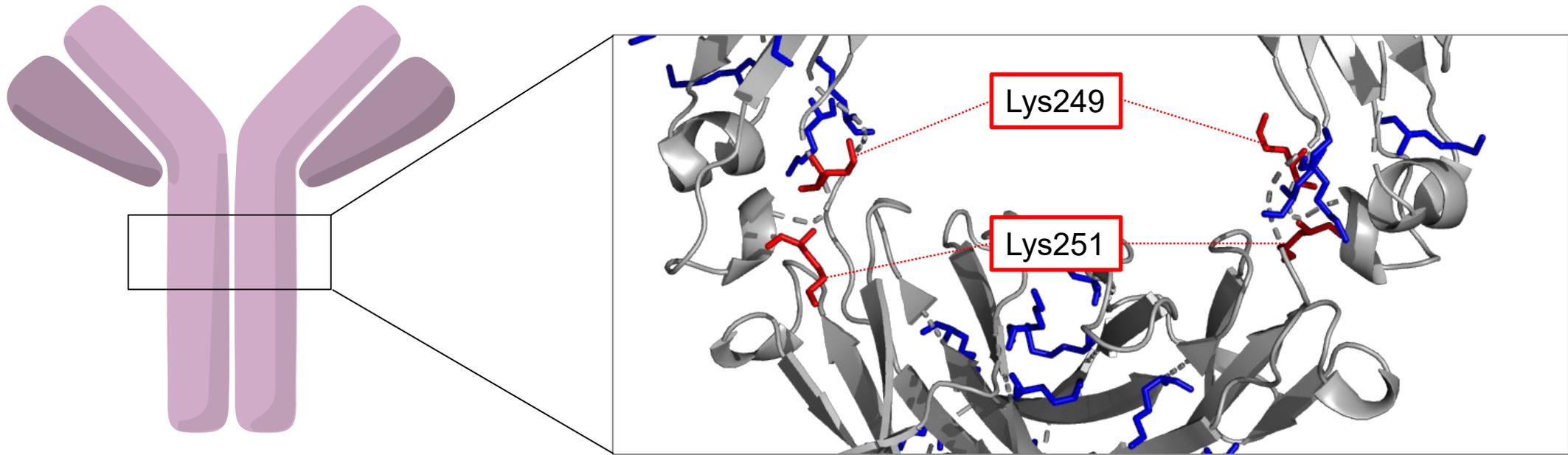
(Disulfide bridge: 23-88; 134-194; H223-L214, Dimer)

フルオレセイン修飾ペプチドに由来する蛍光ピークが2本検出された(右図ピーク5と6)。

MALDI-TOF MS解析から、ピーク5, ピーク6はHerceptin重鎖の赤字で示した配列由来と同定された。



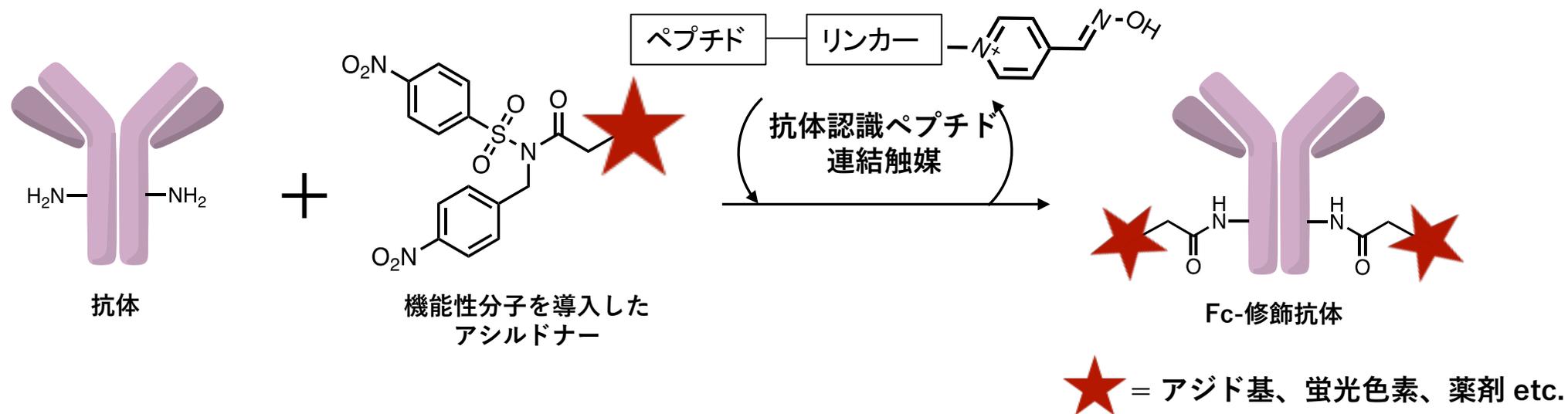
修飾部位解析



青:その他のLys

Herceptinに存在する88個のLys(モノマーあたり44個)のうち、抗体認識物質の結合サイトに存在するLys249, Lys251が選択的に標識された。
(Lys249 : Lys251 = 1 : 2)

新技術:抗体の部位特異的標識用触媒



新技術の特徴	メリット
反応工程	1~2
標識率	156%
修飾部位の特異性	K249/K251
ペプチド切断処理	ペプチド切断処理が不要

新技術の特徴・従来技術との比較

ADCを得るまでの修飾反応条件

	反応 工程数	ペプチド除去方法	部位特異性	修飾効率
本技術	1~2	ゲル濾過	K249/K251	156% (抗体1分子あたり 1.56個修飾)
AJICAP	4	還元処理後、抗体内ジス ルフィドの再結合処理	K246/K248 (本技術と同部位)	190% (抗体1分子あたり 1.9個修飾)
CCAP	1~2	除去不可	K248	120% (抗体1分子あたり 1.2個修飾)

新技術の特徴・従来技術との比較

試薬類

	試薬	安定性	誘導体化の 簡便性	薬剤連結用官能基
本技術	ペプチド連結触媒、 NASAアシルドナー	◎	◎	あらゆる官能基
AJICAP	ジスルフィド結合を含む ペプチド連結NHS活性エステル	△	△	チオール基
CCAP	ペプチド連結NHS活性エステル	△	△	あらゆる官能基

想定される用途

- 本技術は、従来の抗体ランダム修飾技術と比較して修飾数・修飾部位のコントロールが厳密であり、抗体薬物複合体(ADC)製造に適していると考えられる。
- 抗体以外にもあらゆるタンパク質について本技術は適用可能であるため、タンパク質製剤やタンパク質/抗体工学への応用も期待される。

実用化に向けた課題

- 現在、Herceptinなどの抗体医薬にアジド基や蛍光色素、薬剤を導入可能なところまで開発済み。しかし、修飾済み抗体の抗原やFcRnに対する結合活性評価は未実施である。
- 今後、本技術で作製したADCについてHer2結合活性や癌細胞に対する毒性評価などの実験データを取得し、抗体医薬に適用していく場合の条件設定を行っていく。

企業への期待

- 抗体の結合活性評価やin vivo評価についての技術、ノウハウを持つ、企業との共同研究を希望。
- また、ADCを開発中の企業、抗体医薬分野への展開、抗体の部位特異的な機能性分子導入を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

問い合わせ先

**国立大学法人京都大学内
株式会社TLO京都
京大事業部門 技術移転チーム**

TEL 075 - 753 - 9150

FAX 075 - 753 - 9169

e-mail event@tlo-kyoto.co.jp