

博士学位論文

リポ酸リガーゼ A を用いる抗体薬物複合体の
作製法の開発と種々のタンパク質修飾への応用

東京薬科大学 2024 年度

山崎 俊介

目次

緒論.....	6
1 章 リポ酸リガーゼ A を用いる抗体修飾法と分析法の開発	13
1.1 序論	13
1.2 材料及び方法	15
1.2.1 試薬.....	15
1.2.2 LplA の調製	15
1.2.3 Trastuzumab-Cy3 の合成方法	16
1.2.4 SDS-PAGE および蛍光分析による修飾率の算出.....	17
1.2.5 プロテアーゼによる抗体の部分切断.....	17
1.2.6 Protein A 担体による抗体精製.....	18
1.2.7 LC-Q-TOF-MS 分析による Fab 断片の分子量測定.....	18
1.2.8 抗 IL-8 抗体の調製.....	18
1.2.9 抗体への TG による修飾反応	19
1.3 結果	19
1.3.1 Trastuzumab-Cy3 の合成	19
1.3.2 SDS-PAGE と蛍光分析による修飾反応の一次評価	21
1.3.3 修飾反応の最適化.....	23
1.3.4 Fab-Cy3 の調製および修飾反応の一次評価.....	27
1.4 考察	28
1.5 小括	31
2 章 リポ酸リガーゼ A を用いた抗体薬物複合体の合成と分析法の確立	32
2.1 序論	32
2.2 材料及び方法	34
2.2.1 試薬.....	34
2.2.2 ADC 合成	34
2.2.3 QTOF-MS 分析による DAR の算出	35
2.2.4 逆相 HPLC 分析による DAR の算出	35
2.2.5 細胞毒性試験による ADC の評価	35
2.2.6 ADC の胎児性 Fc 受容体との結合性測定	38
2.3 結果	39
2.3.1 ADC 合成および LC-Q-TOF MS による DAR 分析	39
2.3.2 逆相 HPLC による DAR 分析	40

2.3.3	ADC の生物学的評価	42
2.4	考察	47
2.5	小括	51
3 章	リポ酸リガーゼ A を用いた修飾法の展開および多波長検出 HPLC の確立..	52
3.1	序論	52
3.2	材料及び方法	57
3.2.1	試薬.....	57
3.2.2	Protein-Cy3 の合成	57
3.2.3	SDS-PAGE および蛍光分析	57
3.2.4	HPLC-PDA 分析	58
3.2.5	SASA 分析.....	59
3.3	結果	61
3.3.1	Protein-Cy3 の合成と SDS-PAGE 分析.....	61
3.3.2	HPLC カラムスクリーニング.....	63
3.3.3	HPLC-PDA 分析による修飾率の算出	64
3.3.4	SASA 分析.....	70
3.4	考察	76
3.5	小括	80
4.	総括.....	81
5.	謝辞.....	84
6.	研究結果の掲載誌.....	85
7.	引用文献.....	86

略語表

略語	英語表記	日本語表記
ADC	Antibody-Drug Conjugate	抗体薬物複合体
Az	Azide	アジド (基)
BSA	Bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
CFE	Cell Free Extract	無細胞抽出液
DAR	Drug Antibody Ratio	薬物抗体比
DAD	Diode Array Detector	ダイオードアレイ検出器
DPR	Dye Protein Ratio,	色素対タンパク質比
DBCO	Dibenzyl cyclooctyne	ジベンゾシクロオクチンジベンゾシクロオクチン
DM-1	Emtansine	エムタンシン
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamide	ジメチルアセトアミド
DTT	Dithiothreitol	ジチオトレイトール
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
EIC	Extracted Ion Chromatogram	抽出イオンクロマトグラム
ELY	Egg Lysozyme	卵白リゾチーム
FA	Formic Acid	ギ酸
Fc	Fragment crystallizable	抗体の Fc 領域
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FGF	formylglycine-generating enzyme	フォルミルグリシン支援酵素
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid	HEPES
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography	疎水性相互作用クロマトグラフィー
HLY	Human-Lysozyme	ヒトリゾチーム
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HSA	Human Serum Albumin	ヒト血清アルブミン
IPA	Isopropyl alcohol	イソプロピルアルコール
LC	Liquid Chromatography	液体クロマトグラフィー
LplA	Lipoic acid ligase A	リポ酸リガーゼ A
MMAE	Monomethyl auristatin E	MMAE
MPA	Mobile Phase A	溶離液 A
MPB	Mobile Phase B	溶離液 B
MS	Mass Spectrometry	質量分析法

略語	英語表記	日本語表記
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide	<i>N</i> -ヒドロキンスクシンイミド
OVA	Ovalbumin	オボアルブミン (卵白アルブミン)
OVT	Ovotransferrin	オボトランスフェリン
PDA	Photodiode Array	フォトダイオードアレイ
QTOF-MS	Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry	四重極-飛行時間型質量分析法
RP	Reverse Phase	逆相
RPLC	Reverse Phase Liquid Chromatography	逆相液体クロマトグラフィー
SASA	Solvent-accessible surface area	溶媒露出表面積
SEC	Size Exclusion Chromatography	サイズ排除クロマトグラフィー
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面プラズモン共鳴
TF	Transferrin	トランスフェリン
TFA	Trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸
TG	Transglutaminase	トランスグルタミナーゼ
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylamino propanesulfonic acid	トリス

緒論

過去20年にわたり，タンパク質や細胞を選択的に修飾・標識する方法であるバイオコンジュゲーションは，バイオ医薬品開発において有用な方法となってきた¹⁾²⁾。従来のバイオコンジュゲーションでは，天然アミノ酸残基（システイン，リジン，チロシン，トリプトファンなど）との求核置換反応や付加反応に依存していたが，選択的修飾法では，非天然官能基を生体分子に特異的に導入し，その後に機能性物質を用い標識することができる。よって，従来のタンパク質を高機能化させることができるため，これらタンパク質コンジュゲートは近年のバイオ医薬品のなかでも成長している分野の一つである⁴⁾。特に，抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate: ADC，タンパク質の一種である抗体に，高活性な薬物（Payload）をコンジュゲートさせたバイオ医薬品）の市場成長率は著しく，2020年にFDAに承認された第一三共社のエンハーツなど^{5,6)}，ブロックバスターになるポテンシャルを秘めたものが多く存在する。そのような背景の中，有用且つ選択的なバイオコンジュゲーションはますます重要になっている。

選択的なバイオコンジュゲーションの中で，最も古くから知られる方法は，タンパク質に非天然アミノ酸などのタグを導入し，その後の生体直交化学（クリックケミストリーなど）で機能性物質を付加する方法である⁷⁾。しかし，遺伝子工学技術を用いてタグをタンパク質に組み込むことは，実際には修飾率や発現効率の改善など，多くの最適化が必要である。もう一つの優れた方法である，化学結合法は，バイオコンジュゲートを製造するための最もメジャーなアプローチである⁸⁾。この方法は，主にバイオコンジュゲートの化学的性質，製造，および制御を合理化できるため，バイオコンジュゲートの Chemistry Manufacturing and Control（CMC）において一般に信頼性が高く効率的である⁹⁾。実際，市販のバイオコンジュゲート医薬品のかなりの割合がこの方法で製造されている⁸⁾。化学結合法にはいくつかの方法が存在し，それぞれに特有の制約がある。例えば抗体であれば，ドメイン間の連結部に存在するシステイン残基の利用があげられる¹⁰⁾。また，抗体のフラグメントである Fc 領域への修飾であれば，Fc 中のコンセンサス配列との既知の親和性分子（プロテイン A，プロテイン G 等が知られる）の使用も有効である¹¹⁾¹²⁾。いずれの方法でも，非特異的な修飾体をクロマトグラフィーによって排除する必要がある¹³⁾。しかし，抗体に適用可能な方法全てが他のタンパク質に適用できるわけではない。

そのような背景のなか、著者が生体直交化学を達成するためのもう一つの方法として注目したのが、生体直交反応性基を標的タンパク質に酵素的に結合させる方法である^{14,15)} (Fig. 1).

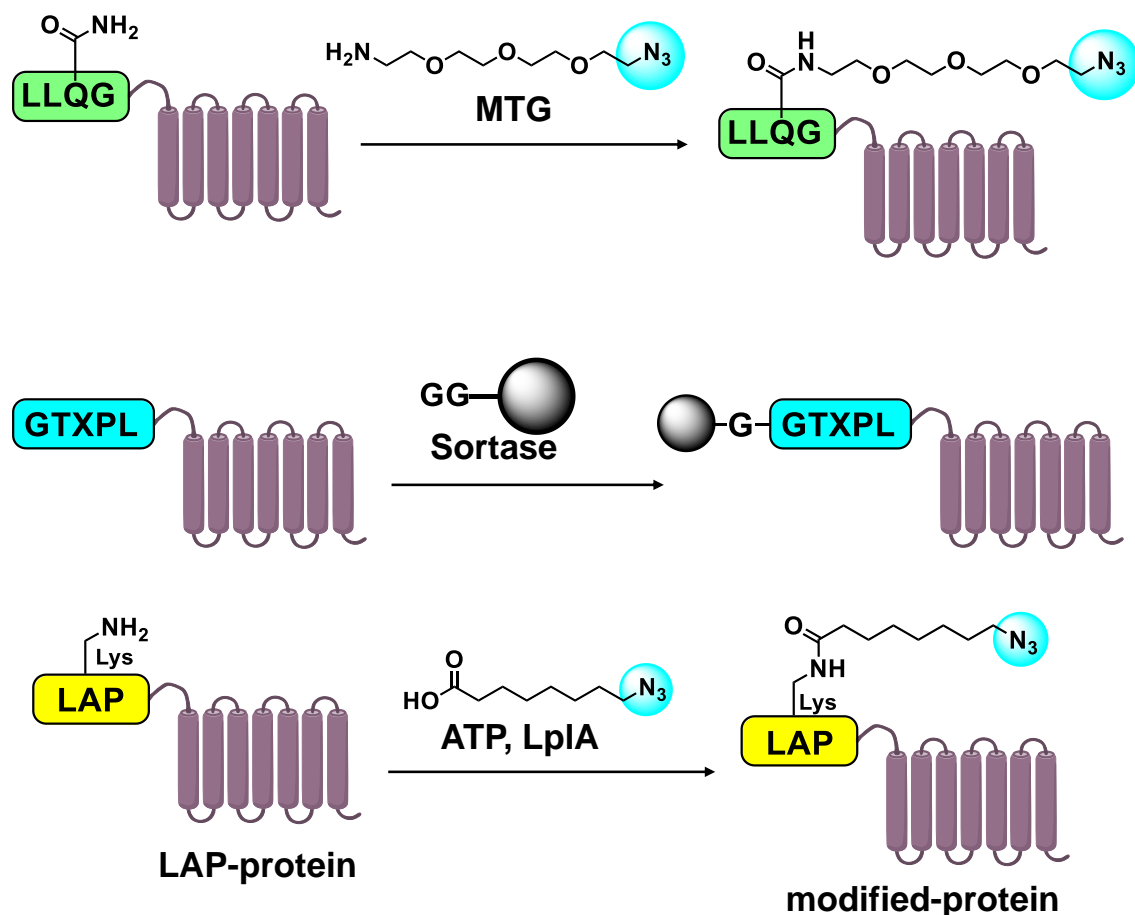


Fig. 1 Representative tag-mediated enzymatic modification.

A) MTG-mediated Gln-tag modification, B) Sortase-mediated Gly-tag modification, C) LplA-mediated LAP-tag modification.

酵素は、高い基質選択性、高い反応速度、さまざまな基質濃度、温度、pH といった条件下でも良好に作用する能力を持つものがあり、このプロセスに適している。酵素修飾は、ATP 依存性ライゲーション反応、グルタミン残基と第一級アミン間のアシル基転移、ペプチド転移など、さまざまなメカニズムによって起こる。特に注目すべき方法に、トランスグルタミナーゼ (TG) を用いる方法¹⁶⁾と Sortase を用いる方法がある¹⁷⁾。それぞれのシステムは、独自の反応メカニズムと基質特異性を有する。これらの要素は、酵素がどの基質を認識し、特定のアミノ酸残基をどのよう

に認識するか決定する．例えば，TG はタンパク質中のグルタミン残基とリジン残基で ϵ -(γ -Glutamine)-Lysine のアミド結合形成を触媒する酵素であり，タンパク質中の Gln 残基に第一級アミンを有するリンカー等の小分子を結合させてタンパク質を修飾することが可能である．TG の認識モチーフとしてよく用いられるのは LLQG 配列であり，このタグを標的タンパク質の N 末端側等に導入する必要がある．(Fig. 1A)．なお，その後の報告により抗体 Fc 部の Gln295 残基への TG による修飾が報告されたが³⁴，修飾される Gln 残基近傍の N 型糖鎖を除去した場合に限定された．同様に，Sortase は C 末端にある LPXTG と N 末端の Gly-Gly 配列とを結合することから，タンパク質の修飾やライゲーションに利用される酵素である．しかし，LPXTG タグと Gly-Gly タグという 2 種類のタグを必要とするため，煩雑な遺伝子工学プロセスを必要とする (Fig. 1B)．このように，各酵素は基質特異性という優れた選択性がある一方で，標的にタグを導入する必要があるという課題がある．

この課題を解決可能な方法の一つとして，著者はリポ酸リガーゼ A (LplA) に注目した (Fig. 1C, Fig. 2)¹⁸⁾．*Escherichia coli*(*E. coli*) LplA は，13 残基からなる LplA 受容体ペプチド (LAP 配列；GFEIDKVWYDLDA) 中のリジン残基 (配列中下線) へリポ酸を共有結合する反応を触媒する¹⁹⁾．この反応は酵素反応前の標的タンパク質の前処理 (糖鎖除去等) が不要であり，比較的温和な条件での反応が可能である^{20) 21)}．LplA がマグネシウムイオンを補因子として ATP を加水分解後に AMP との複合体を形成し，リポ酸を標的タンパク質のリジン残基に受け渡すモデルが提唱されている (Fig. 2A)²²⁾．

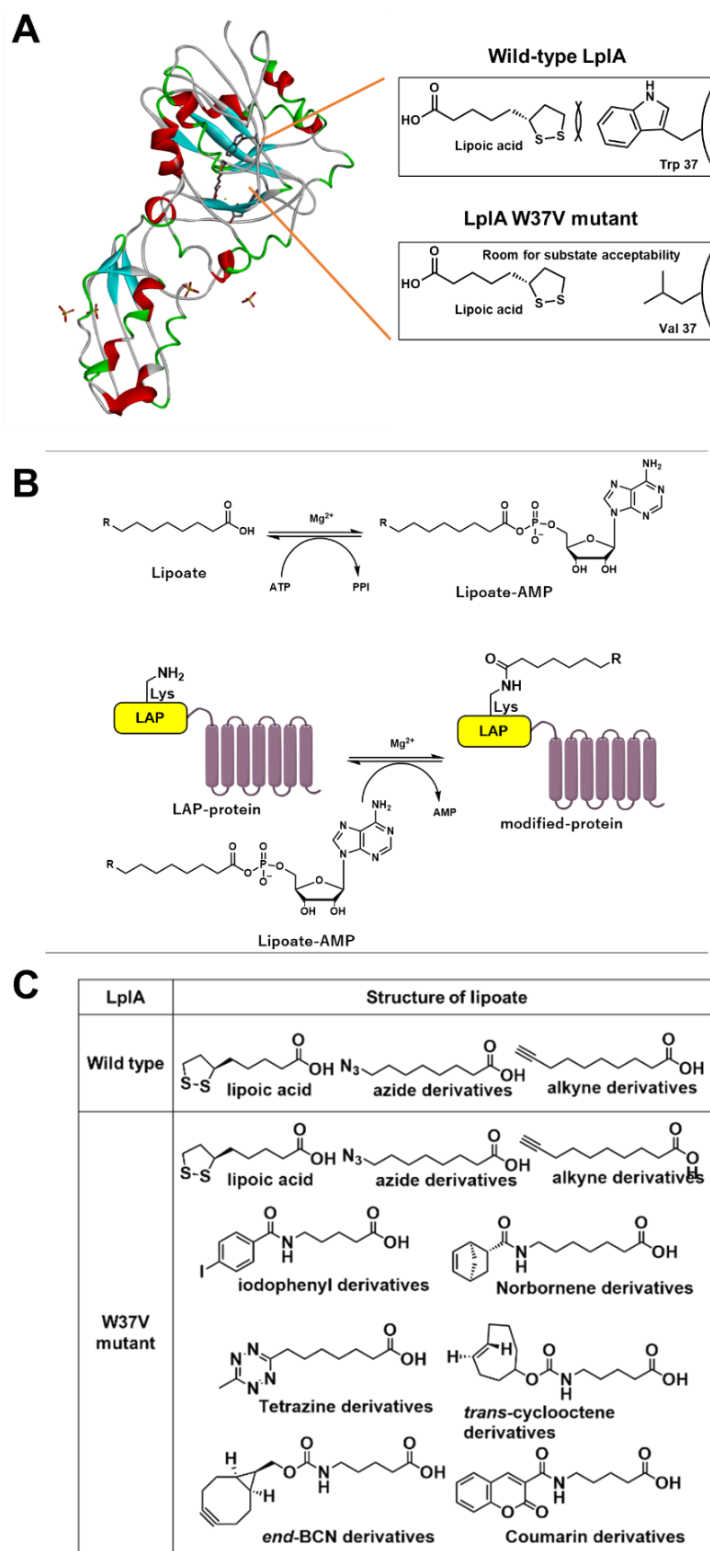


Fig. 2 Overview of LplA ligation.

A) LplA-magnesium-AMP complex (PDB: 3A7R), wild-type LplA (upper) and LplA^{W37V} (lower), B) Lipoate-AMP formation (step-1, upper) and modification of LAP-labeled protein (step-2, lower), C) representative reported examples of lipoate for protein modification.

LplA は、糖代謝に関与する 3 つのアクセプター、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH)、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ、およびグリシンデカルボキシラーゼのリジン残基にリポ酸を共有結合的に結合する酵素である。LplA は、これらデヒドロゲナーゼまたはデカルボキシラーゼのサブユニットの 1 つである E2 タンパク質にリポ酸を付加し、活性化させる。

E. coli の PDH の場合、リポ酸は酵素の基質認識部位近傍に結合し、補酵素として機能する。LplA による反応はマグネシウムイオン依存的に触媒され、3 つの酵素サブユニットの複数のコピーからなる PDH が関与する。PDH は、ピルビン酸の酸化的脱炭酸に関与し、アセチル CoA と CO₂ を生成する。リポ酸は、そのカルボニル基とタンパク質中のリジン残基の ε-アミノ基との間のアミド結合によってタンパク質に結合する。従来の *E. coli* 由来の LplA は、セレノリポ酸、6-チオオクタン酸、アジドアルキルカルボン酸、アルキンカルボン酸など、リポ酸類似基質に対して狭い範囲での選択性しかなく、LplA のバイオコンジュゲーション分野への展開を考えるにおいて、課題となっていた。しかしながら、LplA/LAP システムには、酵素の活性部位に変異を導入することが比較的容易という他の酵素にはない利点があり、酵素変異による機能性の最適化研究が盛んにおこなわれ、改良された機能を持つ LplA 変異体が生み出された。例えば、Uttamapinant らによって発見された LplAW37V 変異体は、様々な非天然基質に応用可能であった^{20) 23)} (Fig. 2B, C)。この知見を応用して、蛍光タンパク質 GFP の LplA によるシリカ表面への固定化、細胞膜タンパク質の修飾、タンパク質-タンパク質コンジュゲートの作成などの報告がある。

LplA を用いたバイオ医薬品の調製も、近年注目されている。先駆けとなったのは 2019 年の Alabi らの報告である²⁴⁾。このグループは、LplA と TG の二つの酵素をそれぞれ段階的に用いることで、抗体に二つの異なる機能性物質を導入することに成功した。これは LplA による抗体分子の修飾の初めての例である。その後、Baalmann らは Anti-HER2 抗体である trastuzumab に対し Fc 部への LAP-タグを導入後、LplA による反応にて MMAE を導入し、ADC を合成した (Fig. 3A)²⁵⁾。この ADC は HER2 陽性細胞である SKBR-3 に対して細胞毒性を示し (IC₅₀ = 0.31 nM)、HER2 陰性細胞である CHO-K1 に対して毒性を示さなかった。この結果により、Trastuzumab の抗原認識は、LplA による修飾後も変化しないことが明らかになり、ADC 製造における LplA を介した抗体修飾の現実性が増したことになる。

しかし、これまでに報告された LplA 修飾反応において、最適な部位特異性と修飾効率を達成するためには 13 残基にもなる LAP-タグが不可欠であるという課題も

浮き彫りになった。遺伝子改変をともなうタグ挿入においては、前述の通り発現効率や、導入したタグ部分の生物物理学的特性は、抗体によって異なる可能性がある²⁶⁾。したがって、この方法では、それぞれの抗体に合わせ個別なプロセスの最適化が必要になると予想される。さらに、LplAにおけるタンパク質修飾におけるもう一つの課題は、分析法の最適化である。例えば、前述の Baalman らは細胞毒性試験の結果から ADC の調製には成功したと思われるものの²⁵⁾、具体的な薬物抗体比率 (Drug Antibody Ratio, DAR)²⁷⁾などを示しておらず、更なる研究の必要性が示唆される。

以上の背景から、著者はバイオコンジュゲーション分野において有用と思われるタグ無しでの LplA 修飾反応の開発と、その分析法の確立を目的として、下記の 3 章にわたる研究を実施した (Fig. 3B)。

第 1 章では、タグ分子を有さない非改変の抗体に対して、LplA を作用させ、タグ無しで修飾が進行するかを確かめた²⁸⁾。さらに、蛍光分子である Cy3 とのクリック反応により抗体-蛍光分子コンジュゲートを調製することで分析の難易度を下げ、これを用いて分析法の確立を行った。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) と蛍光検出を組み合わせることで、修飾率を算出し、この方法を用いて更なる修飾条件の最適化を行った²⁹⁾。

第 2 章では、実際のバイオ医薬品である ADC を合成し、DAR を算出するための分析法を確立した³⁰⁾。結果的に、LC-Q-TOF MS、および逆相 HPLC-DAD による分析が DAR 算出に有効であった。さらに、ADC の生物学的評価を行い、細胞毒性試験による抗原選択的な活性発現、血漿中の安定性、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) を用いて胎児性 Fc 受容体 (FcRn) への優れた結合性を確認した。

第 3 章では、LplA によるタグ無し修飾法の汎用性を確認するため、様々なタンパク質の修飾を行った³¹⁾。修飾率を算出するための分析法を確立すべく、SDS-PAGE に加えて LC カラムの検討を行った。ポリフェニルレジンをベースにした逆相 HPLC 分析が、汎用性が高く使用できることを見出した。さらに、タンパク質間での修飾率の違いに注目し、solvent-accessible surface area (SASA) 分析を実施した。その結果、LplA によるタグ無し修飾法は修飾されるリジンへの酵素のアクセシビリティに依存する可能性を見出した。

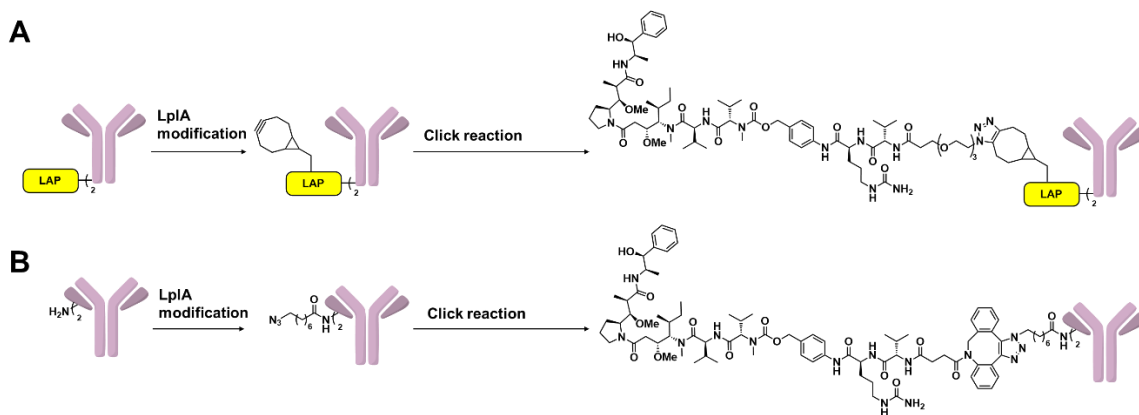


Fig. 3 Comparison of LplA ligation for ADC synthesis.

A) LAP- mediated LplA mediated ADC synthesis (previous work) ²⁵⁾, B) Tag-free LplA mediated ADC synthesis (this study).

1 章 リポ酸リガーゼ A を用いる抗体修飾法と分析法 の開発

1.1 序論

酵素による修飾は、タンパク質に対して生体直交性官能基を部位特異的に導入する方法として重要である。しかし、従来の方法では、タンパク質の修飾には酵素が認識するためのタグと呼ばれる特定部位を予め導入する必要がある。このタグは通常、タンパク質工学的方法を用いて挿入されるが、その位置の最適化には膨大な時間と労力が要求される。このプロセスの複雑さと時間消費は、より迅速かつ効率的な方法の必要性を浮き彫りにしている。従って、タグを必要としない酵素的コンジュゲーション方法の開発が強く求められている³²⁾。このような方法は、タンパク質の機能を損なうことなく、より自然で直接的な修飾を可能にし、薬学研究への新規の展開が期待されている。これまでに、タグ無しで酵素修飾を行った例は極めて少なく、例えば多くの研究者によって精力的に開発されている TG ですら、いくつかの報告例があるのみである^{16) 33)}。この、TG の成功例においては、酵素の一部のアミノ酸に変異を加えることによって、基質認識能を高めることに成功している。

一方で、前述の通り、LplA は基質の許容幅が広い酵素として知られている。例えば、認識配列である LAP-タグであっても、ある程度の許容性が認められている (Table 1)。

Table 1 Summary of Known recognition sequence of LplA.

Protein or subunit name recognized by LplA	Lipoylation sequence												homology
<i>E. coli</i> E2p1 (AceF)	V	E	G	D	K	A	S	M	E	I	P	S	100%
<i>E. coli</i> E2p2 (AceF)	L	E	G	D	K	A	S	M	D	V	P	A	67%
<i>E. coli</i> E2p3 (AceF)	V	E	G	D	K	A	S	M	E	I	P	S	100%
<i>E. coli</i> E2o (SucB)	I	E	T	D	K	V	V	L	E	V	P	A	41%
<i>B. subtilis</i> E2o (sucB)	L	E	T	D	K	V	N	V	E	L	T	A	33%
<i>B. strearothrmophilus</i> E2	V	Q	N	D	K	A	V	V	E	I	P	S	66%
<i>L. mesenteroides</i> E2	V	Q	N	D	K	L	M	Q	E	I	L	S	50%
<i>T. cruzi</i> E2	I	E	S	D	K	L	N	V	D	V	R	A	25%
LAP1	I	E	T	D	K	A	V	L	E	V	P	G	50%

また、Uttamapinant らによって報告された LplAW37V 変異体は高い反応性を示すことで知られている²³⁾。この LplA を用いて ADC 合成を行った Baalman らは、37°C で 15 分の反応条件にてタグ部位に 90% 以上の変換率でリポ酸を導入できることを報告している²⁵⁾。これは、ATP の濃度依存的に反応を進行できるためだと考察されている。

このことから、著者は、基質許容性の高い変異体の LplA を用いれば、タグ無しでタンパク質修飾を行えるのではないかと仮説を立て、本研究に着手した。いくつかの発現系で LplA を調製し、至適 pH、反応時間、ATP 量の最適化などのパラメータ検討を、モデルタンパク質である抗 HER2 ヒト化モノクローナル抗体 trastuzumab を用いて行うことにした。また、この検討を行う際、解析の律速となるのがスクリーニングに最適な分析方法の確立であった。LplA は基質許容性が高いとはいえ、分子量 200 程度のリポ酸を中心としたアナログ分子しか修飾分子として認識しないため、基質のタンパク質と修飾タンパク質を分離することが困難であった。そこで、簡便な分析法の確立も同時に行うことにした。

1.2 材料及び方法

1.2.1 試薬

- 糖鎖除去抗体の作成

trastuzumab はハーセプチン®注射用 150 (中外製薬, 東京, 日本) を使用した. 本製品を日局注射用水 7.2 mL に溶解し, Sephadex G25 (M) 24cc (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) で 20 mM tris(hydroxymethyl)methylamino propanesulfonic acid-HCl (Tris-HCl) (pH 7.6) へとバッファー交換した. この 1.96 mg/mL trastuzumab 溶液に対し 1 U/mL となるよう PNGase F (500,000 U/mL) を添加した反応溶液を 37°C, 17 時間反応し, 糖鎖除去抗体を調製した.

- 購入試薬

ATP ニナトリウム塩 (オリエンタル酵母株式会社, 東京, 日本), オクタン酸ナトリウム (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) および 8-アジドオクタン酸 (OA-Az, Sundia MediTech Company, 上海, 中国) を使用した. ペプチドリンカーである KGF-アジドリンカー (KGF-Az) はアルテア技研 (横浜, 日本) での合成委託に依頼し入手した. クリック反応による蛍光標識試薬としてジベンゾシクロオクチン (DBCO) -Cy3 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)) を使用した. TG として Activa® (味の素社, 東京, 日本) を使用した.

1.2.2 LplA の調製

- 細菌株と培養条件

E. coli JM109 株を使用した. *E. coli* 株は, LB 培地 [1.0% (w/v) トリプトン (Becton, Dickinson, Sparks, MD), 0.5% (w/v) 酵母エキス (Becton, Dickinson), 1.0% NaCl (Junsei, Tokyo, Japan)] に 100 µg/mL のアンピシリンを加え, 37°C で振盪条件 (120 rpm) 下の試験管内で培養した.

- 発現プラスミドの構築

LplA 断片は, *E. coli* K-12 (MG1655 株) のゲノム DNA を鋳型とし, フォワードプライマー:

5'-ACCCTTCGAGGGATCCATGTCCACATTACGCCTGCT-3' および

リバースプライマー:

5'-AGGTCGACAAGCTTGTAACCTTACAGCCCCCCCCCGCCA-3' を使用して PCR

により調製した. PCR には PrimeStar ポリメラーゼ (Takara Bio, 滋賀, 日本) を用

い, PCR 反応は次のように実施した: 94°C で 5 分間, 98°C で 5 秒間, 55°C で 10 秒

間、72°Cで2分間を30サイクル行い、最後に4°Cに保持した。増幅した断片は、プライマーに導入した同じ制限部位を使用して pCold GST ベクター (TaKaRa Bio) にライゲーションした。本ベクターは可溶化およびグルタチオン樹脂による精製用に GST タグと、金属キレートカラムによる精製要にヒスチジンタグを有する。結果として得られた発現プラスミドを pCold-lplA と名付け、野生型 LplA (タンパク質 ID, NP_418803) 発現用に用いた。

- LplA の調製

pCold-lplA を導入した *E. coli* JM109 は、以下の条件で培養した²⁰⁾。LB 培地 (3 mL, 試験管) にて一晩培養後、培地を 1 L の LB 培地に接種し、最終的な OD₆₆₀ が 0.03~0.05 になるようにした。この培地は適切な容量のフラスコに 100 mL ずつ分配した。フラスコは 3.0~3.5 時間インキュベートされ、OD₆₆₀ が 0.5~0.7 に達した時点でインキュベーションを中断し、フラスコを室温の水中に 30 分間浸した。この冷却ステップの後、最終濃度が 1.0 mM になるようにイソプロピル β-D-チオガラクトピラノシドを加え、15°C で 16 時間培養を再開した。細胞を遠心分離によって回収し、10 mL の冷 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) にて 2 回洗浄した。続いて沈殿画分にこのバッファー 50 mL を加えて細胞を再懸濁した。洗浄した細胞は、直ちに使用しない場合、-80°C で保存した。洗浄した細菌懸濁液は、INSONATOR 201 M (KUBOTA Corporation, 東京, 日本) を使用して、170~180 W, 4°C で 10 分間の条件で超音波破碎した。固形分を除去するために 9100×g で 10 分間遠心分離し、上清を細胞フリー抽出物 (CFE) として使用した。得られた抽出物は NAP-10 脱塩カラム (GE Healthcare Japan) での簡易精製を行った。

- LplA の更なる精製

その後の操作は 4°C で行った。45 mL の CFE を、平衡化バッファー (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5.0 mM イミダゾール, pH 7.6) で事前に平衡化した His TALON Superflow カートリッジ (5.0 mL, Clontech Inc., Palo Alto, CA) に装填した。カラムは 20 mL の平衡化バッファーにて洗浄した。次に、平衡化バッファーに 300 mM イミダゾールを加えた溶出バッファーをカラムに通し、分画を分離して精製した LplA を得た。各分画のタンパク質濃度はブラッドフォード法によって測定した。

1.2.3 Trastuzumab-Cy3 の合成方法

1.0 mg/mL の trastuzumab を、25 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0), 3.2 mM の硫酸マグネシウム, 0.5 mM のオクタン酸ナトリウム (または OA-Az) および 2.5

mM の ATP を含む条件下で、50 µg/mL の精製した LplA を添加し、30°C で 24 時間反応した。その後、DBCO-Cy3 を添加し、30°C で 5 時間蛍光修飾した。ここに 2 µL の 1M EDTA-2Na を加え、20°C で 25 分間保温して反応停止させた。最終的なコンジュゲートは、Protein A column (HiTrap Protein A HP Column, 1 mL, GE Healthcare Japan, 東京, 日本) を使用して精製したのち、バッファー交換によって 20 mM の PBS (pH 7.4) に置換した。

1.2.4 SDS-PAGE および蛍光分析による修飾率の算出

タンパク質の分離は、Mini-PROTEAN TGX プリキャストタンパク質ゲルシステム (4-20%, Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて SDS-PAGE によって行った。タンパク質の分子量は、スタンダードとして XL-Ladder Broad (APRO Life Science Institute, Inc., 徳島, 日本) を使用して決定した。タンパク質の分析には、Bio-safe Coomassie Brilliant Blue G-250 染料 (Bio-Rad) による染色を行った。画像の記録と分析は、Amersham Imager 600 (GE Healthcare Japan) によって行い、蛍光検出を、570 nm の励起/蛍光波長にて行った。タンパク質の修飾率は、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色によって可視化されたタンパク質バンドの信号強度に対する 570 nm での蛍光信号強度の比率を用い、下記の式にて定量化した。

$$\text{タンパク質修飾率(\%)} = \frac{\text{570 nm での蛍光信号強度}}{\text{CBB 染色によるタンパク質バンドの信号強度}} \times 100$$

1.2.5 プロテアーゼによる抗体の部分切断

Trastuzumab を以下の手順にて酵素パパインで部分的に消化した。最終濃度 0.75 mg/mL Trastuzumab, 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 10 mM EDTA-2Na, 20 mM システイン溶液, pH 7.0, 1.5 mL にビーズ固定化パパイン (Immobilized Papain, Pierce, Waltham, MA) 0.5 mL を加え、合計 2.0 mL にした後、37°C で穏やかに振盪しながら 6.5 時間保温し消化した。その後、下記の方法で Protein A カラムを使用し、通過画分で Fab 断片を、溶出画分で Fc 断片を確認した。Fab 断片は限外濾過ユニットで濃縮し、終濃度 3.0 mg/mL となるよう調製した。

1.2.6 Protein A 担体による抗体精製

Protein A HP Spin Trap 同梱のマニュアルに従い、下記条件にて実施した。

Protein A 担体容量	: 100 μ L
抗体サンプル添加量	: 20 μ L
温度	: 室温
Protein A 平衡化液	: 20 mM NaPi buffer (pH7.0) 20 Vol%エタノール, 300 μ L 2 回
平衡化方法	: 遠心分離機にて送液, 900 \times g, 1 min
Protein A 洗浄液	: 平衡化液を使用. 300 μ L 2 回
Protein A 溶離液	: 100 mM Gly-HCl (pH2.7), 200 μ L 1 回, 溶出サンプル溶液に直ちに 15 μ L の 1.0 M Tris-HCl (pH9.0)を添加し, サンプルが長時間酸性溶液に触れるのを防いだ. (最終的に pH8.5 付近となった.)

1.2.7 LC-Q-TOF-MS 分析による Fab 断片の分子量測定

LC-Q-TOF-MS 分析は下記のように行った。カラムに PLRPS 1000 Å 2.1 x 150 mm, 8 μ m (Agilent, Santa Clara, CA), LC システムに Agilent 1260 HPLC を使用した逆相 HPLC によりサンプル分離後, 接続した Agilent 6550 LC-Q-TOF-MS にて検出した。溶離液 A (MPA) には 0.1%ギ酸水溶液 (v/v) を使用した。溶離液 B (MPB) には 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (v/v) を使用した。カラム温度は 50°C, 流速は 0.3 mL/min とした。ADC サンプル (1 mg/mL, 10 μ L) をシステムに注入し, 20% MPB にて 2 分間ホールドした後, 20% MPB から 95% MPB への 15 分間のリニアグラジエントにて ADC を溶出させた。溶出後に 95% MPB の組成で 2 分間カラムを洗浄し, 20% MPB に戻すことで 3 分間カラムの再平衡化を行った。

データ解析には, MassHunter BioConfirm ソフトウェア (Agilent) を使用した。デコンボリューション処理は 100,000-180,000 の質量範囲, 1,000-5,000 の限定された m/z 範囲を使用した。

1.2.8 抗 IL-8 抗体の調製

本章では記載が無ければ, 抗体として trastuzumab を用いた。ただし, 1.3.1 に記載した TG との反応においてのみ, 下法により調製した抗 IL-8 抗体を用いた。

抗 IL8 抗体は CHO 細胞株 ATCC® CRL-12445 (CHO DP-12 clone#1934) の培養上清より調製した。20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 150 mM NaCl, pH 7.4 で十分平衡化したアフィニティカラム HiTrap MabSelect SuRe 5 mL (GE Healthcare) に培養上清 1.0 L を流速 1.0 mL/min で供した。流速 5.0 mL/min に設定し, 20 mM リン酸ナトリウム, 150 mM NaCl, pH 7.4 で再平衡化後, 280 nm の吸収 (A₂₈₀) を指標に pH 7.4→pH 3.0 (100 mM クエン酸) の pH グラジエント勾配にて溶出してくるタンパク質画分を 1.0 mL ずつ分画した。酸変性を回避するため, 溶出画分を回収する容器に 2 M Tris-HCl, pH 8.5 200 μL 添加し, 溶出時の抗体サンプルが pH 7.5 近傍になるようにした。なお, アフィニティクロマトグラフィーは 4°C にて行った。アフィニティカラムで精製した抗体サンプルは Sephadex G-25 Medium 24cc (GE Healthcare) で 1.0 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0 にバッファー交換した。

調製した抗 IL-8 抗体の濃度は, 10 mg/mL IgG の溶液を光路長 1 cm の石英セルを用いて測定した 280 nm の吸収 (A₂₈₀) の値 13.8 を用いて算出した。1.0 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH6.0 にて溶液交換した抗体を 2.0 mg/mL になるように同緩衝液で希釈したのち, -80°C で凍結保存した。酵素反応実験で使用する際には適宜氷上で融解し, 4°C で保存した。TG との反応の際は, 1.2.1 記載の方法にて糖鎖除去し使用した。

1.2.9 抗体への TG による修飾反応

1.0 mg/mL の糖鎖除去済み抗 IL8 抗体に対し, 50 μg/mL の TG, 0.1 mM KGF-Az リンカー, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6 (サンプル容量 100 μL) になるようにサンプル調製し, 37°C で反応した。

反応後は 1.2.3 記載の方法にて蛍光修飾, 抗体の精製操作を行い, SDS-PAGE へ供した。

1.3 結果

1.3.1 Trastuzumab-Cy3 の合成

TG を用いた抗体修飾法の開発において, 抗体重鎖 Asn297 に結合する糖鎖を除去すると TG による抗体 Gln295 における修飾体生成量が増加することが知られている³⁴⁾。また, 抗体における糖鎖は, 抗体の不均一性を増す要因となり, その分析法の確立が課題となる可能性がある。そこで, LplA 修飾の基礎段階においては, 存在しないほうが望ましいと考え³⁵⁾, 最初に LplA 反応に対する糖鎖の影響を確認することにした。また, 基質特異性の高さのために反応性が低い可能性を考慮し, 酵素反応の時間を 3 時間と 24 時間の 2 つの条件にて検討した。

前述の通り, LplA 修飾反応において, LplA で抗体に導入できる分子の分子量が潜

在的な課題となっている。一方で、LplA はリポ酸だけでなく、構造が類似性したオクタン酸も認識し、タンパク質の修飾が可能であることが知られている³⁶⁾³⁷⁾。そこで、オクタン酸に後の蛍光標識のためにアジド基を付加したオクタン酸アジドで抗体を修飾した後、クリック反応で蛍光分子を導入し、最終的に抗体-蛍光分子コンジュゲートを合成する方針で研究を開始した (Fig. 4)。

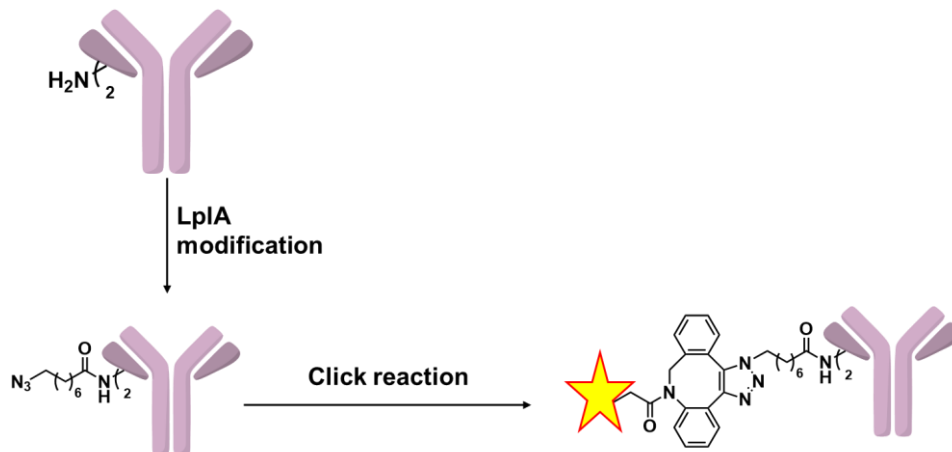


Fig. 4 Schematic overview of LplA-mediated antibody-fluorescent conjugate production.

これにより、分子量や物性の変化が期待でき、SDS-PAGEやHPLCにおいて未反応の抗体との分離が容易になることを期待した。一方で、一般的な蛍光分子は芳香環が多く存在し、疎水性が高いため、抗体とのコンジュゲートを作成した際に物性が急激に変化し、凝集体の発生などのリスクがあると考えられた。このため、親水性の高いスルホン酸を二つ有するシアニン系の蛍光分子である Cy3 を用いることにした。Cy3 はオレンジ色の蛍光 ($\sim 550/570$ nm) を発することで知られ、タンパク質の特有の波長 (280 nm) と重ならないことから、検出が容易であるとされる³⁸⁾。これらの色素は、核酸やタンパク質分子に化学的に結合できるように設計されており、多くが市販品として入手可能である。今回の検討では、DBCO-Cy3 を用いることにした。クリック反応は味の素社の ADC 合成の知見を参考に³⁹⁾、 30°C で 5 時間処理することにした。

1.3.2 SDS-PAGE と蛍光分析による修飾反応の一次評価

この反応条件（酵素反応：30°Cで3または24時間、クリック反応：30°C，5時間）を用い LplA の基質認識を比較検討した（Table 2）。

Table 2 Summary of LplA reaction for antibody modification.

Enzyme	Source	Substrate	Modification
EcLplA	<i>E. coli</i>	Intact-IgG	Occurred
EcLplA	<i>E. coli</i>	Deglycosylated-IgG	Occurred

修飾反応の陽性コントロールとして抗 IL-8 抗体に対し TG による KGF-Az リンカーの反応条件を設定した。TG によりアジド基を導入した抗体が Cy3 により蛍光修飾されることが確認された。LplA に関してはタグ分子を導入していない N 型糖鎖を除去した抗体 trastuzumab を基質とする反応が進行し、SDS-PAGE で trastuzumab-Cy3 と思われるバンドが確認できた（Fig. 5A）。また、この修飾反応は、N 型糖鎖を有する trastuzumab（未処理 IgG）に対しても、進行することが示された。蛍光標識量を指標に修飾体生成量を見積もると両条件共に同程度の修飾量であると示された（Fig. 5B）。また、24 時間の反応だけでなく、3 時間後であっても蛍光修飾のバンドを確認することができた。

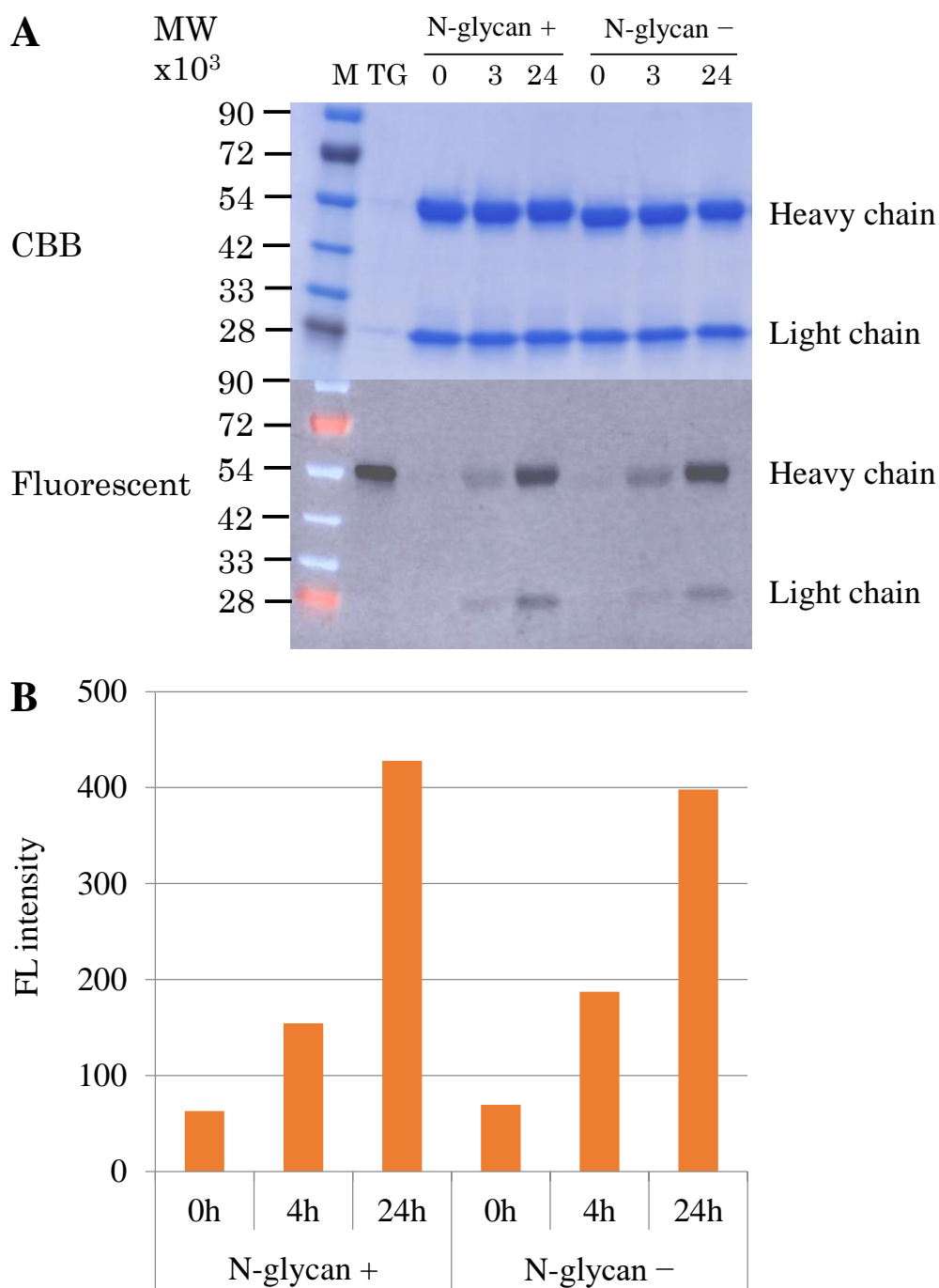


Fig. 5 Modification of trastuzumab by the LplA and the effect of the N-glycan on LplA activity.

A) SDS-PAGE of ADC mimic produced by TG and LplA modification. The protein band around molecular weight 54×10^3 is heavy chain, and the band around 30×10^3 is light chain. TG in the figure shows a control for modification of IgG. The number indicates the reaction time.

B) The fluorescence intensity was detected at several time points.

以上の結果より N 型糖鎖は LplA 反応への影響が少ないと判断されたため、今後の検討には、分析用途に合わせて、両方の抗体を使い分けることにした。

このように、オクタン酸アジドでの修飾に続く、DBCO-Cy3 でのクリック反応によって酵素反応の一次スクリーニングが可能なこと、および SDS-PAGE と蛍光分析の組み合わせにより修飾反応の進行を評価できることが示された。

1.3.3 修飾反応の最適化

大腸菌由来の LplA を用いた Cy3 コンジュゲートから得られた初期結果は、有望であったものの、バイオ医薬品の製造プロセスの確立を見据え、さらなる反応の最適化が必要であった。従って、追加的なパラメータ研究を実施すべく、LplA による酵素修飾を最適化した。まず、変換収率の pH 依存性を評価した (Table 3, Fig. 6)。

Table 3 pH dependency for LplA modification.

pH of enzymatic modification	Fluorescence intensity (Average) ^[a]	Standard deviation ^[a]
6.0	1.08×10^3	0.21×10^2
6.5	8.13×10^3	1.14×10^2
7.0	22.7×10^3	3.89×10^2
7.5	22.0×10^3	2.74×10^2
8.0	22.3×10^3	1.23×10^2

[a] Experiments were performed in triplicate

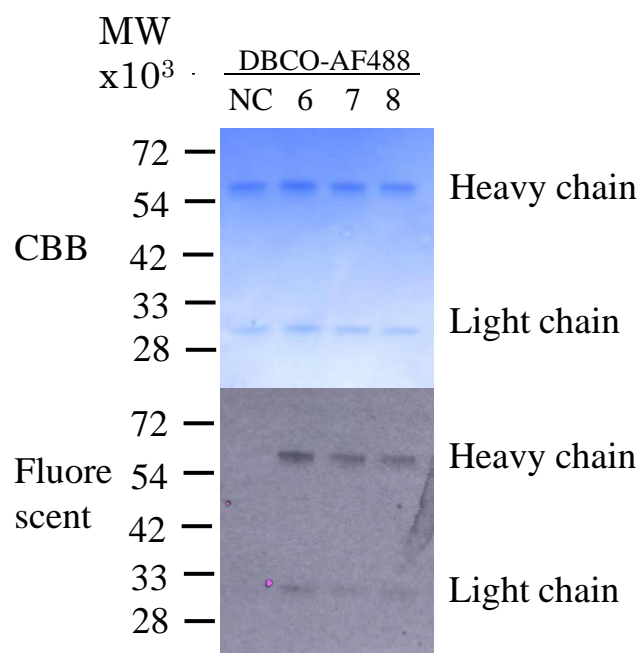


Fig. 6 Modification of trastuzumab by the LplA and pH dependency.
SDS-PAGE of modified IgG by LplA. Alexa Fluor (described “AF” in the image) 488 was used as a fluorescent label. “NC” stands for negative control. The number indicate pH of reaction solution.

また、著者が所属する味の素社⁴⁰⁾や LplA の先行研究例である Alabi ら²⁴⁾の知見から、抗体の修飾に関しては、ローダミン系の蛍光分子がより適している可能性が示唆された。そこで、今回はローダミン系の蛍光分子である DBCO-Alexa fluor 488 を用いて検討を実施した。なお、クリック反応は Cy3 の時と同様に、30°C で 5 時間処理することにした。

ここでは LplA による修飾反応に対する pH の影響を、pH を 0.5 ずつ変化させた範囲 (6.0-8.0) で調べた。LplA で修飾したアジドコンジュゲートをゲル精製して指定の pH に調整した後、コンジュゲートに対して十分量の DBCO- Alexa fluor 488 を添加したクリック反応により、すべてのアジド修飾コンジュゲートを抗体-蛍光コンジュゲートに変換し、蛍光強度を測定した。LplA とのインキュベーション時間が長いほど、修飾抗体量に相当する pH7.0-8.0 での最大蛍光強度は $22.0-22.7 \times 10^3$ となった。産生された修飾抗体の量は、酸性条件下 (pH7.0 未満) では著しく減少した。修飾抗体の量は pH6.5 では約 36%、pH6.0 では 4.7%まで減少した。

続いて、LplA 修飾の補因子として考えられる ATP の量を評価した⁴¹⁾ (Table 4)。

これまでの研究では、抗体基質（1 mg/mL, 6.7 μ M）に対して過剰の ATP が加えられた。しかし、本研究では、反応中の ATP の安定性と基質阻害の可能性を考慮し、過剰な ATP が修飾効率に与える影響を調査した。その結果、24 時間の反応時間点で 2.5 mM の条件が最大の抗体修飾の変換を示した。しかし、5.0 mM 以上では抗体修飾量が減少した。

Table 4 Effect of excess ATP amount on modification efficiency.

Initial ATP amount (mM) (pre modification)	Final ATP amount (mM) (post modification)	Fluorescence intensity (Average) ^[a]	Standard deviation) ^[a]
0.0	0.0	0.36×10^3	0.14×10^2
0.5	0.37	26×10^3	2.92×10^2
1.0	0.86	34×10^3	3.86×10^2
2.5	2.6	42×10^3	4.18×10^2
5.0	5.0	22×10^3	1.77×10^2
10	10	12×10^3	1.17×10^2
20	20	0.17×10^3	0.20×10^2

[a] Experiments were performed in triplicate

上記の検討の結果、LplA での抗体修飾反応を下記のように最適化した (Table 5)。

Table 5 Optimized condition for antibody modification by LplA.

NaPi buffer concentration	25	mM
MgSO4 concentration	3.2	mM
Azide-octanoic acid	0.5	mM
ATP	2.5	mM
Trastuzumab	1.0	mg/mL
LplA	50	μ g/mL
total	100	μ L

Reaction condition: 30°C, pH7.0, 24 h

この条件を用いて、再度 trastuzumab を修飾し、蛍光強度を測定した (Fig. 7)。

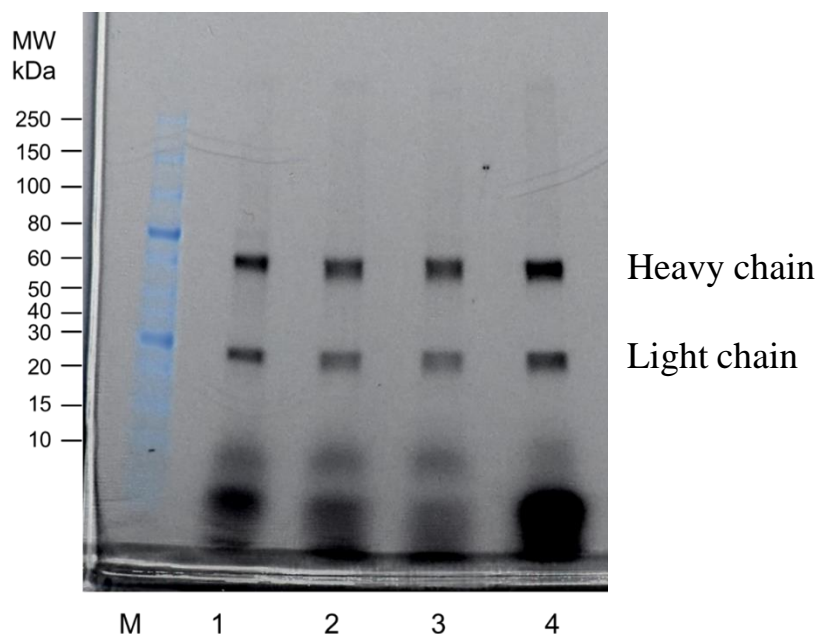


Fig. 7 Fluorescent analysis of t trastuzumab-Cy3 produced by the LplA and click reaction.

M: molecular marker, Lane-1: 2017-09-14 batch, Lane-2: 2018-01-11 batch, Lane-3: 2023-05-23 batch, Lane-4: 2023-05-23 batch treated with excess amount of DBCO-Cy3.

3つの調製ロットが異なる LplA を独立して用いて、Fig. 5 と同様に SDS-PAGE を用いた蛍光分析を実施した。Lane-1 はバッチ 2017-09-14 の LplA を用いた酵素反応に続く DBCO-Cy3 とのクリック反応、Lane-2 はバッチ 2018-01-11 の LplA を用いた酵素反応に続く Cy3-DBCO とのクリック反応、Lane-3 はバッチ 2023-05-23 の LplA を用いた酵素反応に続く Cy3-DBCO とのクリック反応、Lane-4 も同様にバッチ 2023-05-23 の LplA を用いた酵素反応であるが、DBCO-Cy3 を大過剰用いた。どの条件においても、trastuzumab-Cy3 コンジュゲートが高い収率で得られた。また、分子量が約 2 倍違う抗体重鎖（55 kDa 程度）と抗体軽鎖（25 kDa 程度）において、それぞれのバンドの蛍光強度は同程度であった。つまり、抗体軽鎖への修飾の方が進みやすい傾向があると推察された。

1.3.4 Fab-Cy3 の調製および修飾反応の一次評価

上記の通り，抗体軽鎖の修飾が進みやすい傾向が見られたため，本方法を Fab 断片の修飾へと応用した．Fab を準備するために，Fab と Fc 領域の間のヒンジをパパイン消化によって切断した⁴²⁾．次に，Fab へのオクタン酸アジドによる修飾を実施した (Fig. 8)．未修飾の Fab (分子量 47,638) に対し，オクタン酸アジドの分子量 167 が増加した 47,805 の分子量を確認した (Fig. 9)．蛍光標識後，結果として得られた Fab-Cy3 コンジュゲートは先に確立した蛍光 SDS-PAGE によって分析され，アジドオクタン酸を介した LplA 依存性の蛍光標識が可能であることが示された．

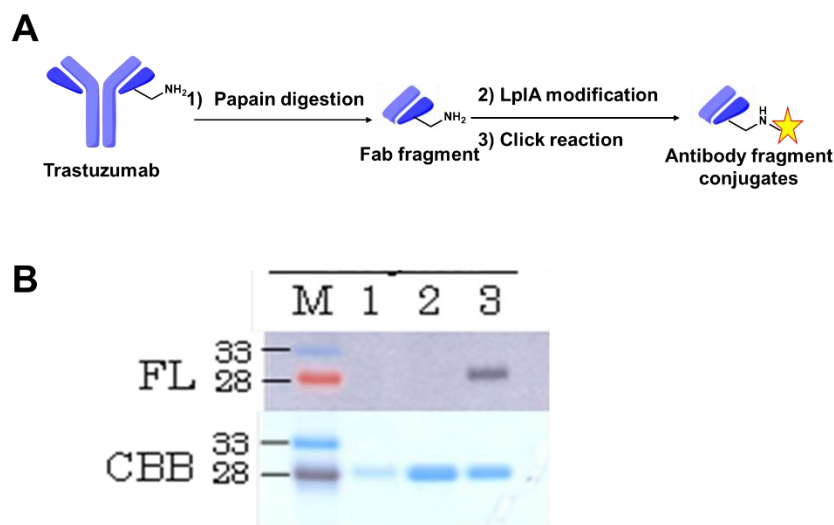


Fig. 8 Fab-Cy3 conjugates produced by LplA modification.

a) Schematic process of papain digestion and conjugation. b) SDS-PAGE analysis. M: marker, 1: Untreated Fab, 2: Fab-azide octanoic acid produced by LplA, 3: Fab-Cy3 conjugate. The protein band around molecular weight 28×10^3 was Fab light chain and heavy chain. The band around 30×10^3 was Fc fragment that did not adsorb to Protein A was detected.

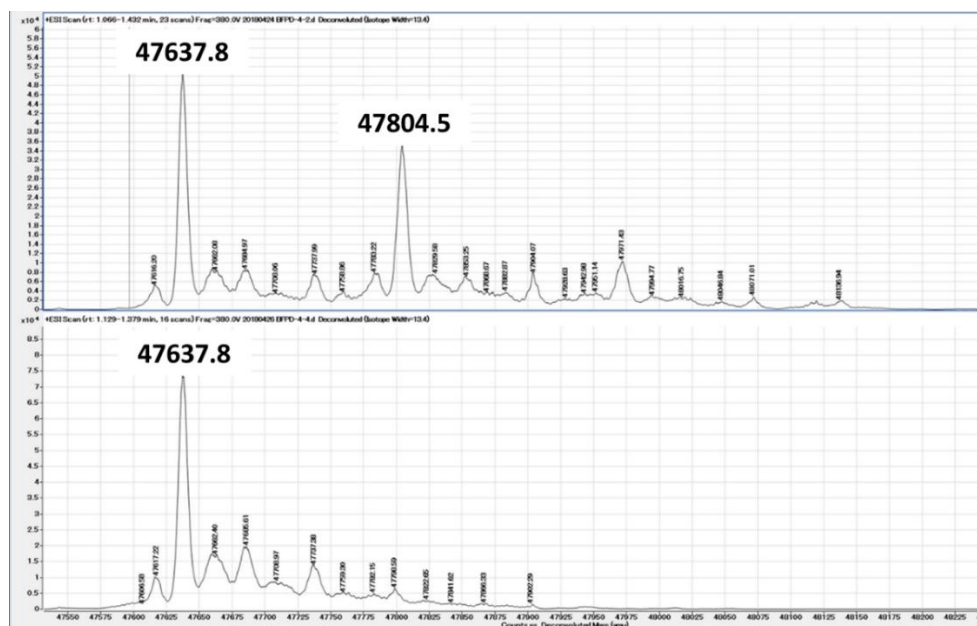


Fig. 9 Deconvoluted spectra of Fab conjugates.

Upper: modified Fab fragment of Trastuzumab; Lower: Fab fragment of Trastuzumab

1.4 考察

従来、酵素反応はその基質特異性の反面、反応条件などが厳しく制限されることが多い。また、酵素自体もタンパク質であるため、温度や pH の変化による変性や、失活が起こることもある。さらに、TG のように活性が高い酵素を用いた場合、酵素自身を基質として認識し副反応が起こることがある¹⁾。しかし、今回の LplA ではそのような副反応は一切見られなかった。さらに、TG では問題となる N 型糖鎖の存在も LplA では問題とならなかった。一方で、Table 3 や Table 4 にあるように pH や ATP の変化には、LplA はある程度の許容幅をみせた。これは実際のバイオ医薬品の製造を見据えるうえで、重要な知見となる。抗体は配列により等電点が異なり、等電点付近ではバッファーへの溶解性が著しく損なわれる。従って、最適バッファーの pH は抗体によって異なり、等電点付近では酵素反応を用いることが難しい。しかし、LplA は広範囲の pH に対して許容幅を持つため、等電点の異なる様々な抗体修飾を可能にすると考えられる。また、今回の検討で最も注目すべき点として、最適化した反応条件によって、抗体軽鎖の修飾率が著しく高まった点が挙げられる。予備実験の段階 (Fig. 5) においては、分子量の違いに応じた蛍光強度が確認できたのに対し、最適条件 (Fig. 7) においては、抗体重鎖と抗体軽鎖それぞれのバンドの蛍光強度は同程度であった。これは、LplA によって抗体軽鎖に対する選択的な修飾が

進行している可能性を示唆するものであった。味の素社の別のグループであり、著者の共同研究者の敷田らは、LplA でオクタン酸を導入した trastuzumab に対するペプチドマッピング分析を詳細に行い、LplA で抗体軽鎖のリジン 188/190 部位が選択的に修飾されていることを見出した (Fig. 10 に引用)⁴³⁾。さらに、このリジン 188/190 位は抗体軽鎖の定常領域 (CL 領域) に位置する。従って、trastuzumab に限らず、多くの抗体に共通して存在するアミノ酸となり、ここを位置選択的に修飾することができれば、ADC を始めとする抗体コンジュゲートの開発に LplA が有用であることを示すことができる。

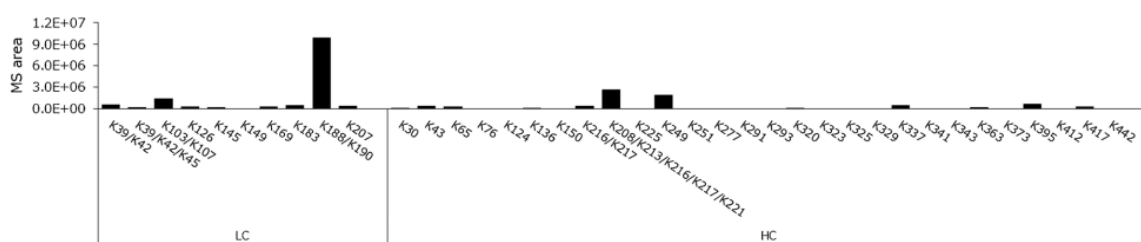


Fig. 10 Summary of MS area of each peptide fragment obtained by chymotrypsin peptide mapping. A MS area of modification modificati lysine by LplA-mediated modification.

また、このリジン 188/190 への選択性の発見により、著者はこの抗体修飾法を、IgG 抗体だけではなく、フラグメント抗体にも適応できるのではないかと考えた。Fab および scFv タンパク質は、分子量が IgG 抗体よりも小さいため、腫瘍細胞への取込が効率的に行われる可能性があるため、フラグメント抗体-薬物複合体にとって有望な分子である⁴⁴⁾。上述のペプチドマッピング分析は、これまで報告されていなかった特異的な方法で Fab 断片が修飾されたことを明らかにした。さらに、パパイン消化して得られた trastuzumab の Fab フラグメントが LplA にて効率的に修飾されることが明らかとなり (Fig. 8)、更なる展開が期待される。

本研究を支えたのが、SDS-PAGE と蛍光分析の組み合わせによる修飾率の算出法である。蛍光ラベリングで用いられる方法がよく用いられるが、シアニン系、ローダミン系などの蛍光分子を用いることでハイスループットなスクリーニングを可能とした。クリック反応との二段階での誘導化となるため、正確なアジドオクタン酸の導入率はわからないものの、反応条件のスクリーニング段階においてはコントロールとの相対評価さえできれば、目的は達成できるため、現時点ではこの分析法が

確立できたことに意義があると考えられる。なお、より定量的な分析は3章で述べる。

1.5 小括

著者は、タグ分子の挿入を必要としない、LplAによる抗体修飾法を開発することに成功した。これは著者の知る限り、世界初の方法である。E coli由来のLplAは、抗体trastuzumabを基質として認識し、修飾することができた。抗体の修飾に加えて、抗体フラグメントであるFabもLplAによって修飾された。これらの結果は、LplAが、ネイティブ抗体およびネイティブ抗体断片の両方の修飾が可能であることを示す。

これらの知見において、蛍光標識法が有効であり、細かいパラメータ検討において強力なスループットを有する分析法であることが明らかになった。

2 章 リポ酸リガーゼ A を用いる抗体薬物複合体の作製と特性評価

2.1 序論

前章では、大腸菌由来の LplA を活用して、抗体や抗体フラグメントに対するタグ無しでの LplA 修飾を初めて達成し、その修飾率の算出において Cy3 などの蛍光ラベリングが有力な分析ツールであることを示すことができた。この修飾抗体は、味の素社の別のグループによる研究成果であるペプチドマッピング分析により、特定のリジン、特に軽鎖のリジン 188 部位が優先的に修飾されることが示された²⁸。この部位は抗体の Fab ユニットの定常領域内に位置し、ネイティブ抗体の Fab 部分に対する酵素特異的修飾の初例と考えられ、更なる研究開発が求められた。

一方、バイオ医薬品の製造を考慮すると、前章で用いた蛍光分子のように特徴的な吸収波長を持つ分子をコンジュゲートすることは稀で、蛍光分析が利用可能な範囲は限られると考えられる^{45) 46)}。さらに、この LplA による修飾反応は抗体表面のリジンを標的としている。リジンは抗体表面に 80 個以上存在し、Kadcyla などのリジン・コンジュゲートで調製される市販の ADC は DAR を算出するのに困難が伴う⁴⁷⁾。一般的には、LC を用いて算出するが⁴⁸⁾、この方法は Kadcyla の payload である DM1 には有効なもの、一般的ではない (DM1 は 252 nm の吸収極大があるため有効であるが、すべての payload が同様の吸収を持つわけではない)。さらに、UV-Vis の分析方法では平均の DAR は算出できるものの、DAR の分布を知ることはできない²⁷⁾。従って、LC-DAD や LC-Q-TOF MS で DAR 分布を分析できるほうが望ましいと考えられる。このような分析法は、コンジュゲーションの方法に依存するところが大きく、LplA で調製する ADC においても、専用の分析方法の開発が必要であると考えられた。

さらに、リジン・コンジュゲーションにより調製した ADC は物性上のリスクも存在している。当然ながら、この方法ではリジン残基を修飾するため、抗体の表面電荷が変化する。その結果、物性が大きく変わる可能性があり⁴⁹⁾、しばしば ADC の血中安定性の低下や活性の低下を引き起こす可能性がある⁵⁰⁾。例えば、Baalmann らの先行研究では、LAP-タグを用いた LplA 修飾による ADC の合成には成功しているが、その評価検証は十分になされていなかった²⁵⁾。細胞毒性試験の結果から ADC の調製には成功したと思われるものの、具体的な DAR などは示されていない。ま

た、この先行研究の ADC は DAR = 2 で、payload である monomethyl auristatin E (MMAE)をコンジュゲートさせているが⁵¹⁾、HER2 陽性細胞である SKBR-3 に対して活性は、決して強いとは言えなかった (IC₅₀ = 0.31 nM)⁵¹⁾。さらに、コントロール ADC との比較が報告されておらず、市販の ADC と比較した際の利点が見積もり難かった。さらに、安定性試験などの結果も示されておらず、さらなる研究の必要性が感じられた。著者は、この中程度にとどまった活性は、LAP-タグ部位の不安定性にあるのではないかとの仮説を立て、タグ無しでの LplA 修飾法で得た ADC であれば、その課題を解決し得るのではないかと考えた。このように、LplA-ADC の分析と生物学的評価の両方のニーズから、本研究に着手することにした。

本章では、大腸菌由来の LplA を使用して、抗 HER2 抗体 trastuzumab と抗 CD20 抗体 rituximab の 2 抗体に対して、LplA 修飾後に payload を付加した ADC を調製し、その DAR 分析法を確立した。さらに、LplA を用いて合成した ADC の生物学的評価も実施した。Trastuzumab に LplA を用いオクタン酸アジドを導入し、DBCO-VA-PAB-MMAE を用いたクリック化学により ADC を得た後、HER2 陽性の SKBR-3 細胞を用いてその毒性を評価した。HER2 陰性 MCF-7 細胞をコントロールとして使用し、FDA が承認済みの ADC である Kadcyla を陽性コントロールとした。また、LplA 修飾を用いて生産された rituximab 由来の ADC を陰性コントロールとして使用した。さらに、ラット及びヒトの血漿中での ADC の安定性を評価し、新生児 Fc 受容体 (FcRn) との親和性を SPR により評価した。

2.2 材料及び方法

2.2.1 試薬

抗 HER2 抗体 trastuzumab (Herceptin®) と抗 CD20 抗体 rituximab (Rituxan®) は中外製薬から購入した。8-アジドオクタン酸は Sundia MediTech Company から購入した。DBCO-VC-PAB-MMAE (CAS#: 2768446-73-5), MMAE (CAS#: 474645-27-7) は NJ Biopharmaceuticals LLC (Princeton, NJ) から購入した。Kadcyla は Genentech (San Francisco, CA) から入手した。DBCO 誘導体はクリック反応前に 0.1 mM DMA 溶液に調製した。ATP 二ナトリウム塩はオリエンタル酵母から購入した。本文中で特に言及されていないその他の化学試薬は、東京化成工業 (東京, 日本) から購入した。MCF-7 細胞系統は apanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (東京, 日本) から、SKBR-3 細胞系統は Memorial Sloan Kettering Cancer Center (New York, NY) から入手した。

2.2.2 ADC 合成

- LplA による抗体修飾

Trastuzumab もしくは rituximab (1.0 mg/mL, pH 7.0) の 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に 50 µg/mL の精製 LplA, 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 10 v/v% の 3.2 mM MgSO₄, 20 当量の 20 mM 8-アジドオクタン酸 (DMSO 溶解), 10 v/v% の 2.5 mM ATP を加えた。この反応混合物 (最終 mAb 濃度 0.8 mg/mL) を 30°C で軽く振盪 (100 rpm) しながら 24 時間インキュベートした。24 時間後, 残存酵素を 2 µL の 1M EDTA-2Na を加え反応停止した。最終反応混合物を製造元のプロトコルに従い NAP-10 脱塩カラム (GE Healthcare Japan) を使用して精製し, 精製製品を 20 mM PBS 溶液 (pH 7.4) で溶出した。

- ADC 合成

アジド修飾抗体 (0.53 mg/mL) の PBS 溶液 (pH 7.4) を, 0.1 mM DBCO-VC-PAB-MMAE10 当量と混合し, 30°C で振盪しながら 5 時間インキュベートした。反応完了後, 混合物を PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare Japan) を使用して精製し, 粗精製 ADC を得た。これらは第 1 章で示した方法に従ってプロテイン A 親和性クロマトグラフィーによって精製した。抗体の濃度は Nanodrop を用いた A₂₈₀ 法にて抗体のモル吸光係数を元に算出し, 収率等を計算した。

2.2.3 LC-Q-TOF MS 分析による DAR の算出

LC-Q-TOF MS 分析は下記のように行った。カラムに PLRPS 1000 Å 2.1 x 150 mm, 8 µm (Agilent) , LC システムに Agilent 1260 HPLC を使用した逆相 HPLC-DAD によりサンプル分離後, 接続した Agilent 6550 LC-Q-TOF MS にて検出した。溶離液 A (MPA) には 0.1%ギ酸水溶液 (v/v) を使用した。溶離液 B (MPB) には 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (v/v) を使用した。カラム温度は 50°C , 流速は 0.3 mL/min とした。ADC サンプル (1 mg/mL, 10 µL) をシステムに注入し, 20% MPB の組成で 2 分間ホールドした後, 20% MPB から 95% MPB への 15 分間のリニアグラジエントにて ADC を溶出した。溶出後に 95%MPB の組成で 2 分間カラムを洗浄し, 20% MPB に戻すことで 3 分間カラムの再平衡化を行った。

データ解析には, MassHunter BioConfirm ソフトウェア (Agilent) を使用した。デコンボリューション処理は 100,000-180,000 の質量範囲, 1,000-5,000 の限定された *m/z* 範囲を使用した。さらに, DAR Calculator ソフトウェア (Agilent) を使用して DAR を決定した。

2.2.4 逆相 HPLC-DAD 分析による DAR の算出

逆相 HPLC-DAD 分析は下記のように行った。Sepax Proteomix RP-1000 5 µm 2.1 × 50 mm column カラム (Sepax Technologies, Inc., USA) を Agilent 1260 HPLC システムに接続して使用した。MPA には 0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を用い, MPB には 0.1% TFA アセトニトリル溶液を用いた。カラム温度は 80°C, 流速は 0.5 mL/min とし, 280 nm (参照波長 450 nm) で吸光度をモニタリングした。各 ADC サンプル (1.0 mg/mL, 20 µL) をシステムに注入し, 30% MPB の組成で 1 分間ホールドした後, 30% MPB から 45% MPB への 15 分間のリニアグラジエント溶離にて ADC の各フラグメントを溶出した。溶出後に 95% MPB の組成で 3 分間カラムを洗浄し, 30% MPB に戻すことで 3 分間カラムの再平衡化を行った。

2.2.5 細胞毒性試験による ADC の評価

細胞毒性試験は, 既報の方法に従って実施した⁵²⁾。MCF-7 細胞と SKBR-3 細胞をそれぞれ 1000 細胞, コラーゲン I でコートされた 96 ウェル細胞培養プレート (IWAKI, 日本) に 50 µL の培養液 (10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイ

シンを含む D-MEM) を用いて添加し, 5% CO₂ の下, 37°C で 24 時間培養した. ADC (trastuzumab-LplA-MMAE, Kadcyla, rituximab-LplA-MMAE) を 50 μL ずつ培養液に加え, 各細胞に対して 6 日間培養した. 細胞数は, メーカーのプロトコルに従って CellTiter-Glo® 発光細胞生存率アッセイ (Promega, Madison, WI) を使用して計数し, 発光は Nivo プレートリーダー (PerkinElmer, Waltham, MA) を使用して分析した.

2-2-6 ADC の血漿中安定性試験

Trastuzumab-LplA-MMAE をラットまたはヒトの血漿 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) に 0.1 mg/mL の最終濃度になるように添加した. その後, 混合物を 0.45 μm フィルター (メルクミリポア社, 東京, 日本) にてろ過 (滅菌) した. 調製した溶液は慎重に 6 つの別々のエッペンドルフチューブに 50 μL ずつ分注した. これらの分画のうち 3 つは, 4 日間 37°C で保温した. 同時に, 残りの 3 つのチューブは同じ期間 -80°C で保管した (これらのサンプルは Day 0 サンプルとして使用した). 4 日後, 各サンプルに 100 μL のアセトニトリルを加えボルテックスした後, サンプルを遠心分離し, 沈殿物を分離した. 各チューブから得られた上清を分取し, LC-MS へ注入した. ADC から脱落した payload は LC-MS によって抽出イオンクロマトグラム (EIC) を測定し, 定量した. MMAE 標品の EIC から検量線を作成し, 各 ADC の EIC から MMAE 濃度を求めた. Day 0 濃度を 100% のベンチマークとして使用して, イオンクロマトグラムの差を計算し, payload 脱落率を決定した. LC-MS 条件を下記にまとめた (Table 6) .

Table 6 Detailed analytical method for detached MMAE analysis.

LC	
System	UFLC system (Shimadzu Access Corporation, Tokyo, Japan)
	Controller CBM20A
	Pump LC30AD
	Auto Sampler SIL30ACMP
	Column Oven CTO20
Column	InertSustain C18, 3 μ m, 2.1 mm \times 50 mm (GL science , Yokohama, Japan)
Solvent	A : 0.1%(v/v) formic acid in water
	B : 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile
Flow rate	0.3 mL/min
Column temp.	50°C
Autosampler temp.	4°C
Injection vol.	1 μ L
MS	
System	X500 (SCIEX, Tokyo, Japan)
Ion source	ESI Positive
Scan	SRM (Selected Reaction Monitoring)
Software	Analyst 1.7.1
	MultiQuant™ 3.0.3

溶離プロファイルには、35%、2 分間での洗浄工程ステップワイズに 95% MPB に上昇し、0.5 分間の溶出、そしてふたたび 35% MPB での 2.5 分間の再平衡を行った。

2.2.6 ADC の胎児性 FcRn との解離定数測定

Sensor SA チップ, Biotin Capture キット, および 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, および 0.005% Tween-20 を含む HBS-EP バッファーは, Cytiva (東京, 日本) 社から取得した. ビオチン化された FcRn は, Immunitrack 社 (København, デンマーク) から入手した. 抗体の結合親和性は, Cytiva の Biacore T-200 表面プラズモン共鳴システムを使用して評価した. FcRn 結合実験には, ストレプトアビジンチップを使用した. 抗体は一連の濃度 (0.62-50 nM) で, 一定の流速 30 μ L/min で, シングルサイクルキネティクス法を用いて分析した. 解離定数の算出は, Cytiva の BIA 評価ソフトウェアを使用し, 分析には二価結合モデルを採用した.

2.3 結果

2.3.1 ADC 合成および LC-Q-TOF MS による DAR 分析

本章では、異なる等電点を持つ 2 種類の抗体 (trastuzumab および rituximab) と、ADC で主要な payload である MMAE を組み合わせて得られた 2 種類の異なる ADC を調製した。MMAE に対してクリック反応に対応する官能基である DBCO と、カテプシン B による切断性ジペプチドリンカーを導入した DBCO-VC-PAB-MMAE を payload リンカーとして選択した。この payload-linker は、DBCO や PAB などの芳香族官能基の影響で、第 1 章で使用した蛍光分子よりはるかに疎水性が高く、溶解性が課題となる可能性があった⁵³⁾。しかし、DBCO-VC-PAB-MMAE は、LplA により修飾されたアジド付加 trastuzumab とのクリック反応によりコンジュゲートを生成した。A₂₈₀ を元に算出した一連のプロセスの総収率は 80% 以上であった。さらに trastuzumab よりも不安定とされる rituximab を使用した場合でも、総収率 70% にて反応した。

DAR を算出するために、まず Q-TOF MS 分析を実施した (Fig. 11)。

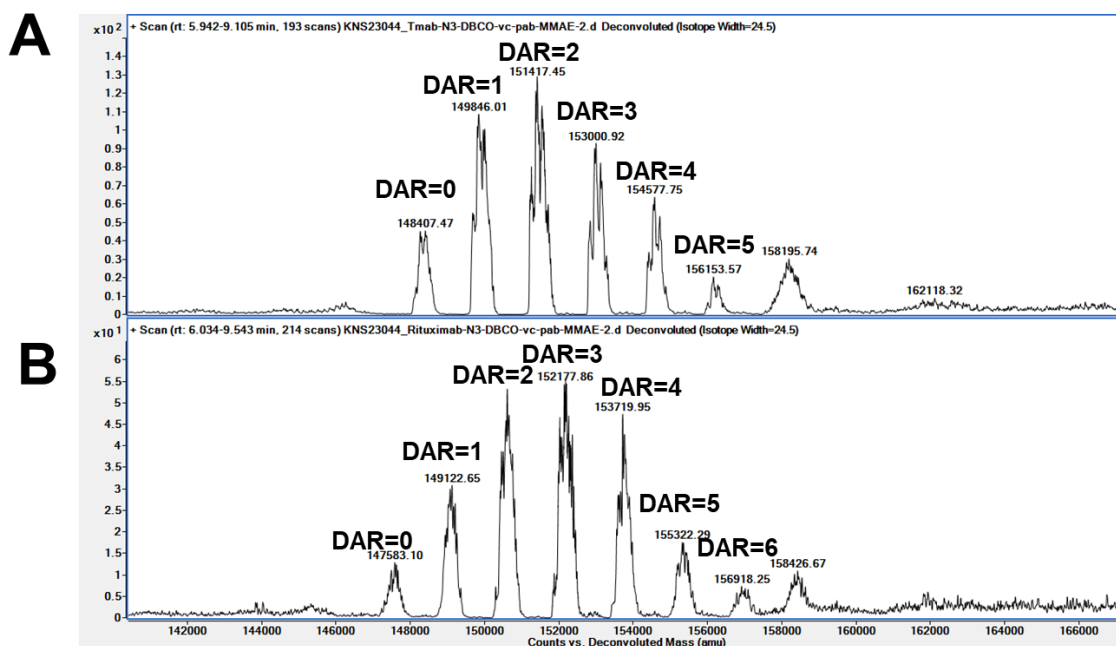


Fig. 11 LC-Q-TOF MS analysis for LplA-ADCs.
A) trastuzumab-LplA-MMAE; B) rituximab-LplA-MMAE.

既報の方法^{54, 55)}では、イオン化が十分にできず、デコンボリューションピークを得ることができなかつたため、条件を変更した。まず、カラムを後述の逆相 HPLC 分

析検討で良い結果を与えたスチレンージビニルベンゼンポリマーをマトリックスとした PLRP-S 1000Å カラム (Agilent 製) とした. さらに, ADC の注入量を 10 µg へと増やした. さらに, 溶離液の変更も行った. 今回の ADC の分析においては, ギ酸のみを酸として使用した際に, 弱いながらもイオン化が確認でき, デコンボリューションピークを得ることができた.

2.3.2 逆相 HPLC-DAD による DAR 分析

続いて, HPLC-DAD 分析を実施した. 実際に ADC の分析で普遍的に使用されている HIC⁵⁶⁾ で高幅化したピークが観察されることが明らかになった.

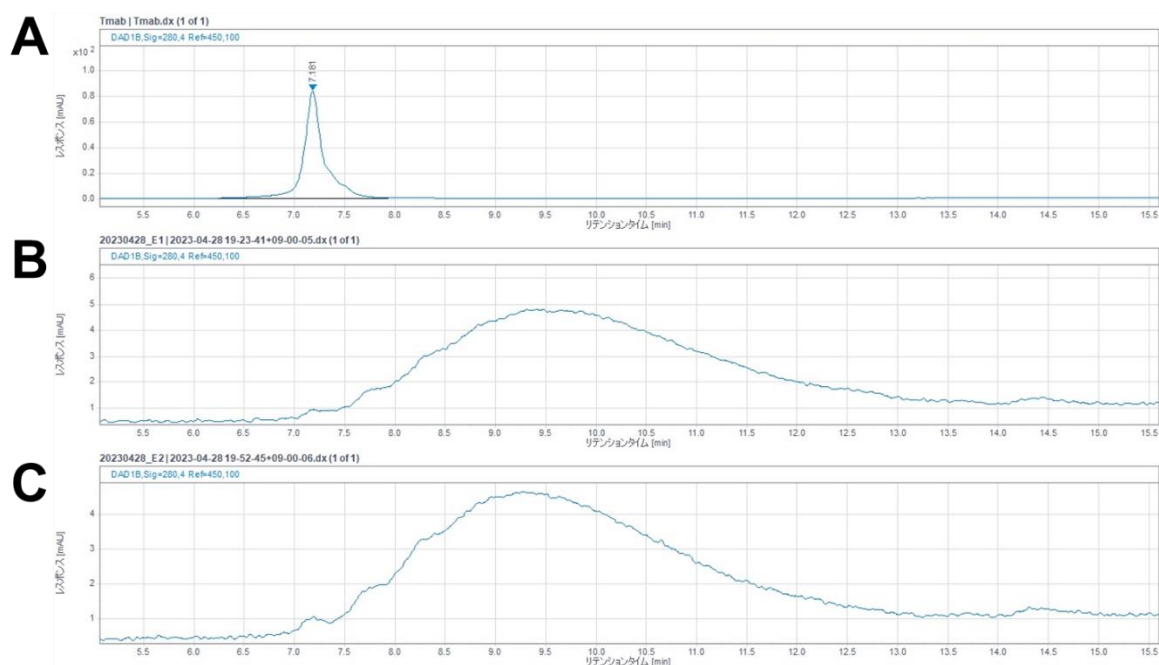


Fig. 12 HIC-DAD analysis for LplA-ADCs.

A) Trastuzumab; B) Trastuzumab-LplA-MMAE; C) Rituximab-LplA-MMAE.

HIC分析では, 原料の trastuzumab (Fig. 12A) と比べ trastuzumab-LplA-MMAE (Fig. 12B) はリテンションタイムが遅くなることは確認できたものの, DAR を算出するような明確なデータを得ることはできなかった. Rituximab-LplA-MMAE (Fig. 12C) も同様に高幅化したピークを与えるのみであった.

そこで, 著者は, 近年いくつかの報告があるサンプルの前処理を行わない (イン

タクト) 逆相 HPLC 分析を実施した^{57, 58) 59)}. 逆相 HPLC は通常, サンプルの前処理を行い, 抗体を重鎖と軽鎖に分離させて分析する. これはシステイン修飾型の ADC で特によく使用され, HIC-HPLC 分析と並んで一般的な分析方法となっている. 一方で, 2016 年に, Yin らはインタクト逆相 HPLC 分析が, DAR 種を良好に分離し, その分析に有用であることを初めて報告した⁵⁷⁾. さらに, 2021 年には松田, Mendelsohn らによって様々な抗体, payload-linker に幅広く使用できることが明らかになった⁵⁹⁾. 2023 年には松田, 藤井らによってインタクト逆相 HPLC 分析がクリック化学結合を持つサイト特異的 ADC の分析に有効であることが明らかになった³⁹⁾. LplA の ADC もクリック反応によって payload-linker と結合しているため, この方法を試すことは意義があると考えた.

いくつかの逆相 HPLC 向けに販売されているカラムを評価に使用したが, 一般的に使用される Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl (樹脂マトリックス: ジフェニル) や Zorbax RRHD EclipsePlus C18 (樹脂マトリックス: C18) では LplA-ADC は溶出されないか, 高幅化するのみであった. そこで, Wirth らの報告にあった Proteomix RP-1000 カラム (樹脂マトリックス: スチレン-ジビニルベンゼンポリマー) を使用して分析を実施した (Fig. 13).

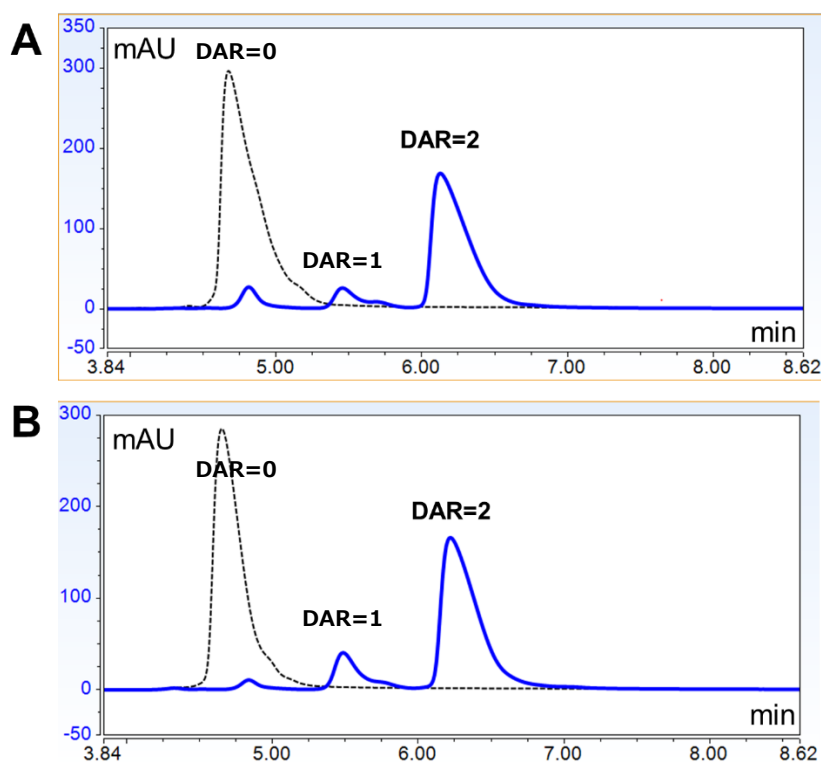


Fig. 13 RP-HPLC-DAD analysis of intact ADCs.

A) Trastuzumab (black) and trastuzumab-MMAE (blue); B) rituximab (black) and rituximab-MMAE (blue).

逆相 HPLC-DAD 分析により、どちらの ADC も DAR = 2 がメインピークであることが示唆された。また、DBCO-VC-PAB-MMAE の高い疎水性により、原料の抗体との分離は良好であった。

2.3.3 ADC の細胞毒性評価

続いて、得られた ADC の *in vitro* 評価を行い、ADC の生物学的評価を行った。HER2 陽性 (SKBR-3) および HER2 陰性 (MCF-7) の細胞株を用いた LplA-ADC の細胞毒性試験を実施した (Fig. 14)。比較のため、市販の Kadcyla と LplA で結合した rituximab-ADC をそれぞれ陽性および陰性のコントロールとして使用した。

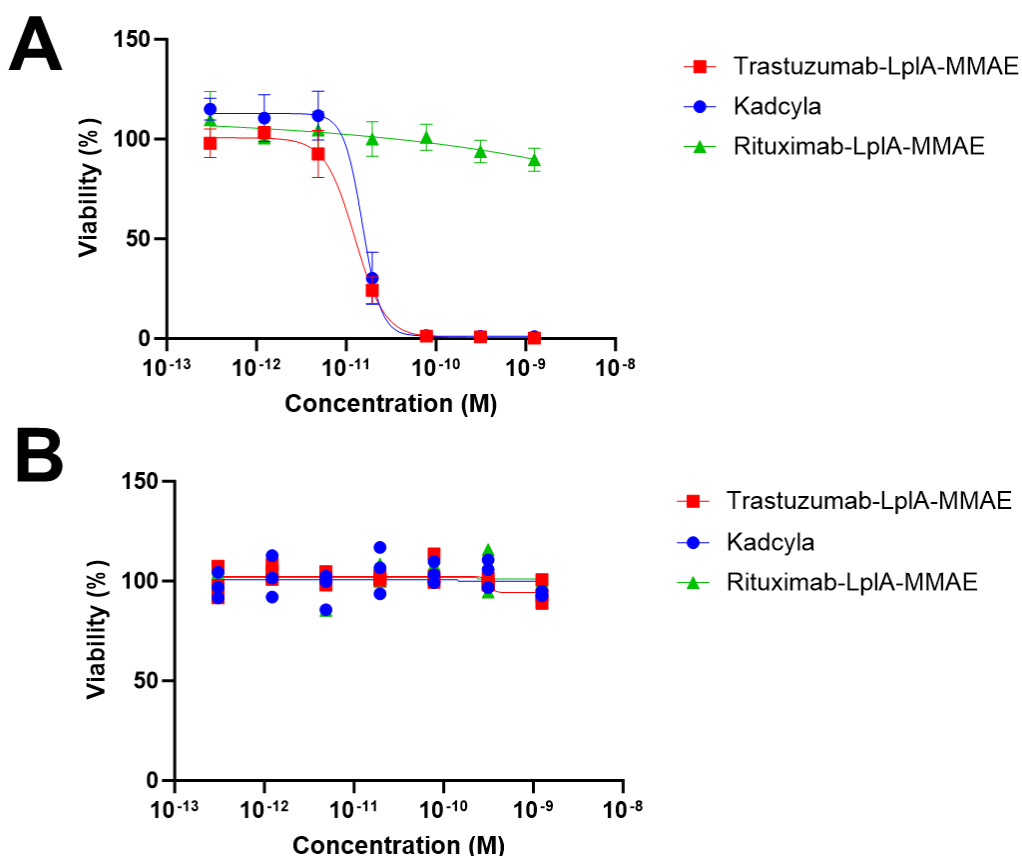


Fig. 14 *in vitro* cell killing assay.

A) HER2 expressing cell line (SKBR-3) and **B)** HER2-low expressing cell line (MCF-7) were treated with 0.31 pM–1.25 nM of trastuzumab-LplA-MMAE (red squares), Kadcyla (blue circles), or rituximab-LplA-MMAE (green triangles) for 6 days. The viability assessment was conducted using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, with the results being derived solely from the data obtained through this method. The mean and individual values are shown from the results of triplicate experiments.

SKBR-3 細胞株においては、すべての ADC に対して類似した半最大効果濃度 (IC50) 値が得られた。Kadcyla の IC50 は 15 pM, trastuzumab-LplA-MMAE の IC50 は 12 pM であり、これらの ADC は HER2 陽性細胞に対して同等の効力を示した。しかし、rituximab-LplA-MMAE では検出可能な活性は観察されなかった。これらの結果から、これらの ADC は HER2 への結合後、細胞に取り込まれ HER2 陽性細胞に対して細胞毒性を示したことが示唆された。さらに、HER2 陰性の MCF-7 細胞において

は、いかなる ADC 活性も観察されなかったことから、標的選択性がさらに支持された。

2.3.4 ADC の血漿中安定性試験

薬効評価に続き、LplA-ADC の安定性評価をするため、ラットおよびヒトの血漿を用いた安定性試験を行った(Fig. 15, Table 7).

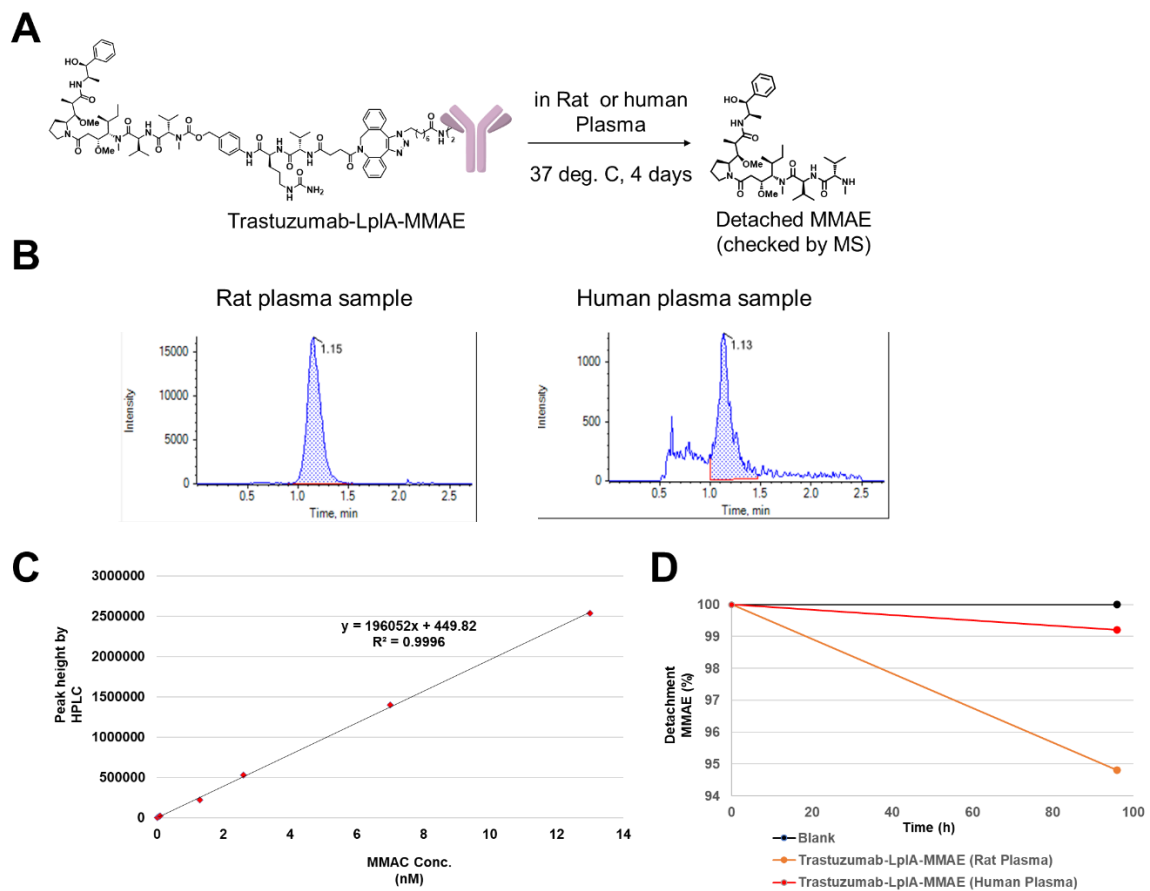


Fig. 15 Plasma stability studies.

A) schematic procedure of plasma stability; B) EICs showing a comparison of detached MMAE in rat plasma (left) and human plasma (right) with m/z of 718.0 (M+); C) Calibration curve with free MMAE; D) Percentage of MMAE dissociation from trastuzumab-LplA-MMAE, measured by LC-MS.

Table 7 MMAE detachment from three ADC samples using LC-MS analysis.

	Detached MMAE (nM)				
	1	2	3	Average	SD
Rat plasma	78.1	85.1	81.2	81.4	3.5
Human plasma	5.5	5.6	4.4	5.2	0.7

ここでは、MMAE 溶液の濃度範囲を使用して検量線を作成し、その後、血漿サンプルを LC-MS 分析した。ラットの血漿中で 4 日間のインキュベーションをした後、LC-MS の EIC 分析を実施したところ、4% の MMAE の脱落が認められた。一方で、ヒトの血漿での試験では、ADC は顕著に向上した安定性を示し、特に 4 日間のインキュベーション期間の後、ADC から MMAE が解離したのは 1% 未満であった (Fig. 15 D)。

2.3.5 ADC の胎児性 Fc 受容体との解離定数測定

同時に、ADC が FcRn への親和性を維持していることを確認した (Fig. 16, Table 8)。本実験では、0.62-50 nM の範囲で抗体の濃度を段階的に上げた結果を示した。一般に、IgG は細胞にエンドサイトーシス (細胞が物質を取り込む過程) によって取り込まれ、その後、細胞の小胞 (弱酸性環境) 内で FcRn 受容体と結合する。FcRn と結合することで、IgG はリソソームによる分解を回避し、細胞表面 (血液と同じ弱塩基性環境) へと戻され、最終的には血液中へと放出される。この循環により IgG は長い半減期を獲得している。この機能は ADC においても重要であり、特に、FcRn との親和性を保持することは医薬品としての実用化にも重要な要素となる。この SPR 分析では、trastuzumab と trastuzumab-LplA-MMAE とが、固定化された FcRn と相互作用する際に類似の結合活性を示すことが明らかになった。これは、LplA で抗体を修飾した後も、抗体の半減期に大きな影響を与える FcRn への親和性は保たれていることを意味する。

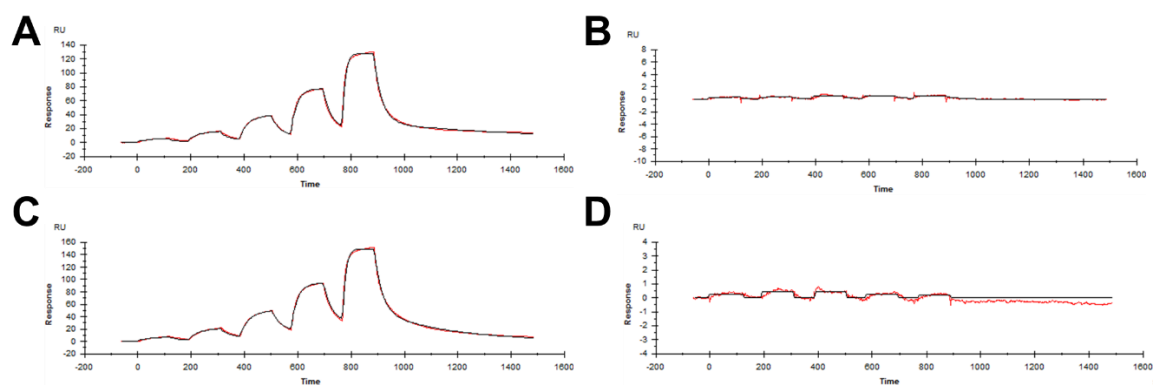


Fig. 16 SPR analysis.

A) sensorgram of trastuzumab (pH 6.0), B) sensorgram of trastuzumab (pH 7.4), C) sensorgram of trastuzumab-LplA-MMAE (pH 6.0), D) sensorgram of trastuzumab-LplA-MMAE (pH 7.4).

Table 8 Binding kinetics against human FcRn by SPR assay

Entry	Analyte	Ligand	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
1	Trastuzumab	FcRn (pH 6.0)	5.69×10^{-8}	5.42×10^5	3.08×10^{-2}
2	Trastuzumab	FcRn (pH 7.4)	—	—	—
3	Trastuzumab-LplA-MMAE	FcRn (pH 6.0)	5.71×10^{-8}	5.46×10^5	3.12×10^{-2}
4	Trastuzumab-LplA-MMAE	FcRn (pH 7.4)	—	—	—

2.4 考察

本研究の ADC 合成では、LplA の酵素活性を利用してオクタン酸アジドをトラスツズマブに導入し、その後 payload リンカーである DBCO-VC-PAB-MMAE をクリック反応により結合させている。先行研究²⁵⁾で、LplA 反応によりシクロアルキンの一種である BCN⁶⁰⁾をタグ改変した trastuzumab に導入し、さらに azide-PEG-VC-MMAE を結合させていた。しかし、著者は特許により保護されている Basic cupric nitrate や PEG が導入された MMAE の使用を避けるため、意図的にこれらを使わない方法を選択した。長い PEG は結合の柔軟性をもたらす一方で、抗体とのコンジュゲーション反応の収率を低下させることも知られており、知的財産と実験の両面を考慮しても、PEG の使用を避けることが望ましいと考えられた。研究当初の懸念は、親水性である PEG 不使用のリンカーを使う場合に ADC の疎水性の増加であったが、実際には抗体の物性は顕著に変化することなく、維持され、幸運にも凝集などは確認されなかった。今回の検討からは、高疎水性な payload リンカーであっても、DAR は 2 程度を示しており、影響が少ないことが示唆された。また、LplA 反応は trastuzumab に限らず rituximab でも進行が確認された。酵素反応は通常、高い基質特異性を持つが、この結果は LplA の広い基質特異性を示している。

本章の主要な要素は DAR 分析であり、そのためには多くの検討が必要であった。特に、LC-Q-TOF MS の測定条件を確立できたことは有益であった。特に重要であったのはカラム内での ADC 種の分離と、イオン化のバランスであった。今回の ADC は、疎水性の高いシクロアルキンを有する payload リンカーの存在から、ADC 自体の疎水性も高く、カラムへの吸着も強くなると考えられ、ピーク分離も容易ではないと予想された。また、LplA による基質特異性（抗体の修飾部位に対する位置選択性）が十分でないため、ADC は複数の位置異性体を含む可能性があり、それらのイオン化強度が異なることが検討を複雑化させたと考えられる。そこで、溶離液を変更し、よりイオン化を起こしやすい酸組成に変更した。通常、味の素社では HPLC で良好なピーク分解能を高めるために、HPLC カラム内の二次相互作用を減少させる TFA を溶離液として使用していた。しかし、この疎水性の高い酸はイオン化効率を低下させるという欠点がある。そこで、イオン化を抑制させないためには、ギ酸との組み合わせで使用していた（水/ACN/ギ酸/TFA 混液 (98:2:0.1:0.01, v/v) および ACN/ギ酸/TFA 混液 (99.9:0.1:0.01, v/v) の組み合わせ）。しかし、ギ酸と混液としたとしても TFA は依然として ADC のイオン化を阻害すると考えられたため、今回の分析法開発に関しては、あえて TFA を除去し、ギ酸のみを溶離液に添加し使

用した。TFA を使用しないことで HPLC での分離能低下が懸念されたが、それをスチレンージビニルベンゼンポリマーをマトリックスとしたカラムを使用することでこれを補った。スチレンージビニルベンゼンポリマーは物理的・化学的な安定性が高く、高速高温に対する耐性が高いことで知られる。また、負荷量の増加や高速分離にも耐えるため、HPLC の条件設定の面で有利であった。これまで使用してきた標準条件に比べて、流速およびカラム温度も上げることができ、許容可能なカラム分離を達成した。その結果、弱いながらもイオン化が確認でき、デコンボリューションピークを得ることができた (Fig. 12)。スチレンージビニルベンゼンポリマーはインタクト逆相 HPLC 分析でも効果的であった (Fig. 13)。続いて、得られた DAR を下記にまとめて比較した (Table 9)。

Table 9 Peak area ratios and DARs of trastuzumab-LplA-MMAE .

	Trastuzumab-LplA-MMAE		Rituximab-LplA-MMAE	
	Intact RP-HPLC	LC-Q-TOF MS	Intact RP-HPLC	LC-Q-TOF MS
DAR = 0	0.05	0.14	0.03	0.10
DAR = 1	0.11	0.22	0.12	0.14
DAR = 2	0.84	0.28	0.85	0.21
DAR = 3	-	0.18	-	0.24
DAR = 4	-	0.14	-	0.17
DAR = 5	-	0.04	-	0.11
DAR = 6	-	-	-	0.05
Average	1.79	2.10	1.82	2.77

以上のように、2つの分析方法間で平均 DAR 値も DAR の分布にも大きな差異があった。どちらが真の値であるかは判断が難しい部分であるが、著者はインタクト逆相 HPLC-DAD の値が真値に近いと考えている。2019年に松田, Mendelsohnらは ADC の不均一性が LC-MS を使った DAR の結果に大きく影響することを明らかにした⁵⁴⁾。タンパク質精製のクロマトグラムシステムである AKTA によって ADC の精製を行い、単一の DAR 種とした ADC の場合、不純物の含量が少ないため、不純物のイオン化による ADC のイオン化への影響が小さく、得られるシグナルは ADC に選択的となり、デコンボリューション処理の結果は ADC の含量を反映したものになるとされている。一方、不均一性の高い ADC の場合、LC-Q-TOF MS 測定は、イ

オン化効率の違いや不純物の影響を受けやすい。特に、この傾向はギ酸を溶離液に添加した場合に顕著であるとされる⁵⁴。今回は、溶離液中のギ酸の含有量を増やしたことにより、デコンボリューションピークが得られた一方で、不純物の影響も強く出てしまったのではないかと考えられる。また、一般的にも、イオン化の影響を受けないUV検出の結果を基にDARを算出できるHPLC-UVのほうが信頼性が高いと考えられる²⁷。DBCO-VC-PAB-MMAEの280 nmの吸収は抗体に比べ極めて小さく、ほぼ無視できることは先行研究により明らかになっている。すなわち、DAR種間の280 nmでの誤差はほとんどないため、(Fig. 13)のエリア面積は、そのままDARの分布を反映できている可能性が高いと考えられる。複数のDAR種が重なり合っただけのピークとなっている可能性は排除できないが、疎水性の高いDBCO-VC-PAB-MMAEでは考えにくいと思われる。

イオン化効率の違いや不純物の影響を受けやすいLC-Q-TOF MS測定は、測定サンプルの不均一性や不純物の影響を受けやすい可能性が示唆された。これらの原因を突き止めるためには、イオン化条件の最適化など、さらなる検討が必要である。

本章に記載したADCの生物学的評価は非常に有益なものであった (Fig. 14)。細胞毒性試験においては、市販のADCであるKadcylaとIC50が同程度であった (12 pM) ことは特筆すべきであり、KadcylaのDARが3~4程度であることを考慮すると⁶¹、Payloadの活性が異なるものの (KadcylaはEmtansine (DM1)、本検討のADCはMMAE)、有望な結果であると考えられる。また、先行研究であるBaalmannらがLAP-タグを導入したtrastuzumabを用いたLplA修飾によるADCは、著者と同様のSKBR-3細胞に対してIC50値が310 pMであった²⁵。しかも、このADCは100 nMという高濃度でも20%程度の細胞が生存しており、最大抑制効果に達しなかった。その一方で、タグ無しで調製したLplA-ADCはほぼ100%の細胞を死滅させた (Fig. 14)。これら2つのLplA-ADCを直接同じロットの細胞で比較できていないため、詳細な議論は難しいが、現時点でのデータは本検討で作成したADCが有力であることを支持するものである。

また、血漿中安定性試験も、今後の薬物動態試験や安全性試験を考えるうえで有望な結果を示した (Fig. 15)。最終的な医薬品開発を考える際には、ヒト血漿での安定性が最も重要であると考えられるが、ラット血漿も薬物動態研究の初期段階において重要な示唆を与える。LplA-ADCは、ラット血漿中では4%程度のMMAEの脱落を確認したが、ヒト血漿中ではLplA-ADCは顕著に向上した安定性を示し、特に4

日間のインキュベーション期間の後、ADC から MMAE が解離したのは 1%未満であり、LplA で導入した修飾部位はヒト血漿中で安定して存在できることが分かった。

さらに、FcRn との親和性についても、本章にて作製した LplA-ADC は非修飾抗体である trastuzumab と同等の親和性を示した。FcRn は抗体のリサイクリング機能に重要な寄与をしており、抗体がコンジュゲート化されるとしばしばこの FcRn との親和性が失われることがあるが、本 LplA-ADC ではそのような現象は認められなかった。これは、LplA で修飾される位置が抗体の CL 領域（抗体の軽鎖、Fab の定常領域）であることが大きな要因と考えられる。

以上の結果から、LplA-ADC による抗体薬物複合体の開発は ADC 製法として有望であると考えられる。ただし、イオン化効率の違いや不純物の影響を受けやすい DAR 測定に際しては TOF-MS 測定など、さらなる最適化が必要であるという課題も認識された。これらを解決するためには、イオン化条件の最適化など、さらなる検討が必要となる。

2.5 小括

本研究では、LplA によってアジドを導入された抗体と payload-linker である DBCO-VC-PAB-MMAE から 2 種類の ADC 合成した。得られた ADC の DAR 分析法を確立すべく、LC-Q-TOF MS の条件検討を実施し、デコンボリューションスペクトルが得られる分離条件を見出した。また、ADC の分析ではあまり例がない、インタクト逆相 HPLC-DAD 分析も実施し、DAR を算出することに成功した。

更に、生物学的評価も実施した。細胞毒性試験において、市販の ADC である Kadcyla より DAR は低いにもかかわらず、LplA-ADC は顕著な活性を示した。また、血漿中安定性試験や FcRn への親和性試験においても、良好な結果を得た。これらの *in vitro* の結果は、LplA 由来の ADC の医薬品としての使用可能性を支持するものであり、さらなる *in vivo* 試験が望まれる。

3 章 リポ酸リガーゼ A を用いる種々のタンパク質修飾法の開発

3.1 序論

酵素による修飾プロセスは、酵素の基質特異性により、部位特異的な修飾を可能にするため、バイオコンジュゲートの作製において重要な手段となっており、多数のバイオ医薬品の生産に大きく寄与している。例えば、アメリカ食品医薬品局（FDA）は、酵素的な方法によって生産されたバイオ医薬品である、Abciximab（Reopro）⁶²⁾と Lipegfilgrastim（Lonquex）⁶³⁾を承認している。これらは酵素的結合法によって PEG を導入することで、血中安定性を向上しており、研究から生産まで詳細が報告されている。これら酵素によって生産された薬剤の上市は、バイオ医薬品製造分野におけるこの技術の可能性を示している⁶⁴⁾。酵素を使用する利点は多岐にわたり、その基質選択性や一般的に化学結合法より穏やかな反応条件が適用可能な点が挙げられる。これらの利点により、多くのプロセスにおいて酵素が好まれる選択肢となっているが、これらのプロセスにおける共通の障害は、タグ分子を導入するためのタンパク質の遺伝子工学的な改変が必要なことである。

これまでの章では、酵素的タンパク質修飾への市場ニーズの高まりに応じて、LplA を用いたタグ無しでの修飾反応の開発を記載した。抗体修飾においては、リジン 188/190 位への選択的な修飾に成功し、ADC の合成や生物学的評価まで完了したが、他のタンパク質への展開は未達成であった。タンパク質は、配列や二次構造の違いによる構造的多様性から、疎水性や等電点など異なる特性を示す⁶⁵⁾。これらの微細な特性の差異は、バイオコンジュゲーションの領域で反応性に大きく影響を及ぼすことが知られている。例えば、タンパク質への化学結合法による修飾は、一般的には広範な基質許容性を持つとされるが、反応のスケール、温度、基質の等電点の細かな違いが変換率に大きな効果を及ぼすことがある^{66) 67)}。酵素結合法は、化学結合法と比較して、極めて狭い基質特異性を持つことが一般的であり、上記のタンパク質の性質の差が反応性に大きな影響を及ぼすことが予想される。一方で、他の酵素とは違い LplA は前章までの抗体修飾の開発において明らかになったように、比較的広い反応条件許容性を示している。このことから、抗体だけでなく広範なタンパク質に対しても、化学的な修飾反応のように、修飾が可能なのではないかと考えた。

LplA を用いた抗体以外のタンパク質の修飾はいくつか報告がある⁶⁸⁾。2015年、Kaarらは、緑色蛍光タンパク質 (GFP) に LAP-タグを付加し、アジドデカン酸を LplA 反応で導入した⁶⁹⁾。このアジド導入体に対して、シリカに表面処理加工で導入されたシクロアルキンとの間でクリック反応を行い、Green fluorescent protein (GFP)の固定化の検討に用いられた³⁷⁾ (Fig. 17A)。近年では、この固定化を連続フローシステムで実施する例も報告されており⁷⁰⁾、低分子だけではなくフローシステムがバイオ医薬品にも徐々に応用されていることを示唆している⁷¹⁾。GFPだけでなく、Maltose-binding protein (MBP) への応用例もあり、GFPとMBPを用いたタンパク質-タンパク質コンジュゲートの合成も報告されている (Fig. 17B)²⁵⁾。しかし、どの例であってもLAP-タグを必ず使用しており、タグ無しシステムで修飾に成功した報告はない。

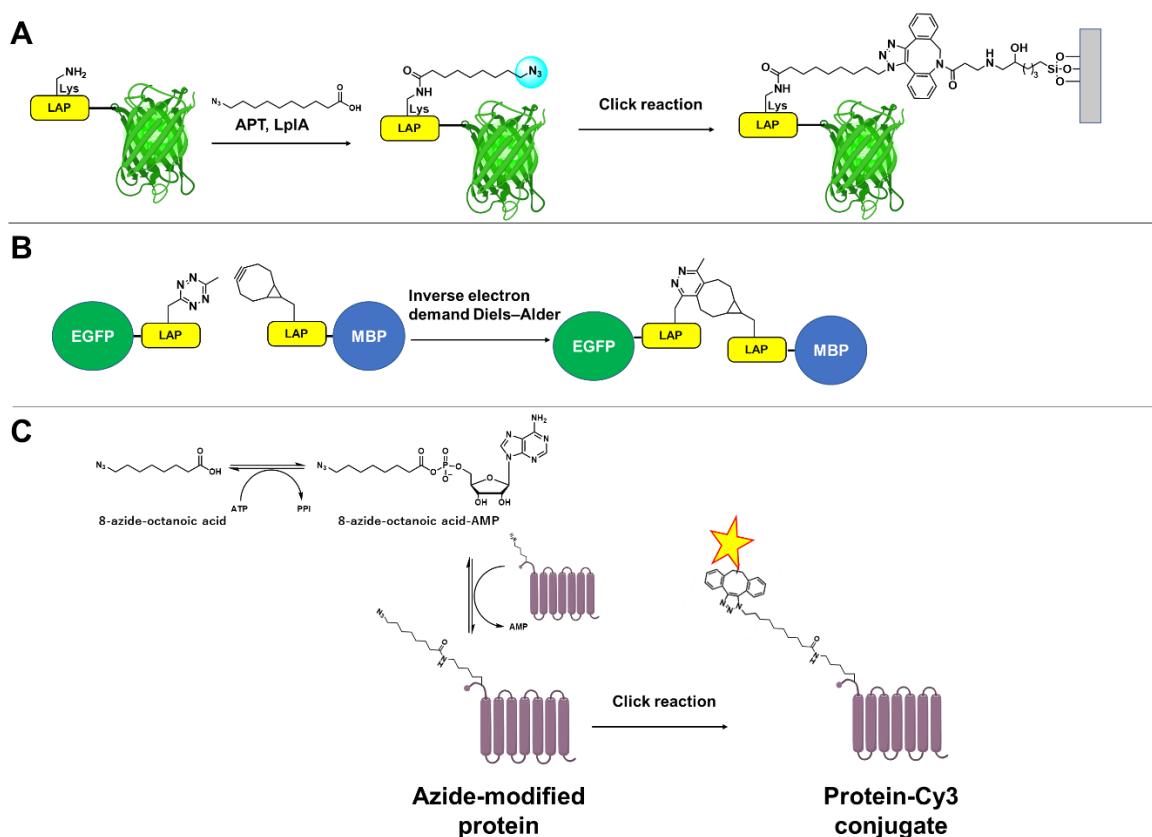


Fig. 17 LplA-mediated protein modifications.

a) Solid-supported GFP production mediated by LAP/LplA system, b) protein-protein conjugation mediated by LAP/LplA system, c) tag-free protein-Cy3 conjugate production (present work).

本章では、タグ無し LplA 修飾反応の基質特異性、コンジュゲートの分析方法、広範な応用の可能性を評価することを目指した。具体的には、様々なタンパク質にアジド基を系統的に導入し、第 1 章で使用した蛍光分子 Cy3 を用いてクリック反応によりタンパク質蛍光コンジュゲートを調製し、基質特異性を確認した。検討したタンパク質には機能性食品もしくは医薬品用途を志向し、かつ比較的入手しやすいものを選択した。また、LplA の修飾反応は、タンパク質中のリジンの数、タンパク質の等電点 (pI) 、高次構造にも影響を受けることを想定し、できるだけこれらの特徴が異なるものを選択した。以上の観点から、Human lysozyme (HLY) ⁷²⁾、Egg lysozyme (ELY) ⁷³⁾、Ovalbumin (OVA) ⁷⁴⁾、Ovotransferrin (OVT) ⁷⁵⁾、Bovine serum albumin (BSA) ⁷⁶⁾、Human serum albumin (HSA) ⁷⁷⁾、Beta-lactoglobulin (BLG) ⁷⁸⁾、

Transferrin (TF) ⁷⁹⁾を選択した. これらの主な用途 (Table 10) および, 構造的特徴 (Table 11 を下記に示す.

Table 10 Summary of protein for this study.

Entry	Protein	Primary applications
1	Human-Lysozyme (HLY)	Antimicrobial enzyme in human
2	Egg-Lysozyme (ELY)	Antimicrobial enzyme in egg white
3	Beta-lactoglobulin (BLG)	Major whey protein of cow and sheep's milk
4	Ovalbumin (OVA)	Main protein found in egg white
5	Bovine serum albumin (BSA)	Serum albumin protein derived from cows
6	Human serum albumin (HSA)	Serum albumin protein derived from human blood
7	Ovotransferrin (OVT)	Glycoprotein in egg white
8	Transferrin (TF)	Glycoproteins found in vertebrates

Table 11 Summary of protein characteristics.

Entry	Protein	Molecular Weight	pI	Number of lysines	Structural characteristics
1	HLY	16.3 kDa	11.0	5	Seven helices and one beta sheet consisting of three strands
2	ELY	16.2 kDa	10.7	7	Four helices and five beta strands
3	BLG	19.6 kDa	5.1	30	Unusual protein fold, composed of two slabs of antiparallel β -sheet
4	OVA	42.5 kDa	5.2	40	Four subunits of identical primary structure
5	BSA	66.8 kDa	5.0	118	Three homologous but structurally different domains
6	HSA	67.0 kDa	5.1	66	Homologous helical domains each split into A and B subdomains
7	OVT	75.5 kDa	6.0	59	Two lobes (N- and C- terminals) dividing into two domains
8	TF	76.8 kDa	5.8	58	Alpha helices and beta sheets that form two domains

本章の検討において, 重要だったのが分析法の開発である. 第 1 章で確立した SDS-PAGE と蛍光分析の組み合わせによって, 修飾率を算出したが, 今回の検討では, より定量的な分析を目指し, フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 による吸

光分析を用いて修飾率を算出した。また、将来的に非蛍光物質への応用を考慮して、適切な溶出プロファイルを与えるカラム条件を見出すことも検討した。

3.2 材料及び方法

3.2.1 試薬

Ovalbumin (OVA), Ovotransferrin (OVT), Egg Lysozyme (ELY), Human-Lysozyme (HLY), Bovine serum albumin (BSA), Human serum albumin (HSA)および Transferrin (TF)は Sigma-Aldrich から購入した。HSA はナカライテスクから購入した。BLG は東京化成工業から購入した。8-アジドオクタン酸は Sundia から購入した。アデノシン三リン酸 (ATP) 二ナトリウム塩はオリエンタル酵母 (東京, 日本) から購入した。特に本文中で言及されていない他の化学試薬は全て東京化成工業から購入した。

3.2.2 Protein-Cy3 の合成

- LplA の調製

LplA の調製は, 細菌株, 培養条件, 発現プラスミドの構築を含み, 第 1 章 (1.2.2) 記載の方法に従って実施した。

- Cy3 付加タンパク質の調製

終濃度 1.0 mg/mL タンパク質溶液に, 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液中の精製 LplA 50 µg/mL, 3.2 mM MgSO₄, 20 mM アジドオクタン酸 (DMSO 溶解), 2.5 mM 水溶性 ATP, pH 7.0 を加えた。この反応混合物を 30°C でインキュベートした。24 時間のインキュベーション後, 残存酵素は終濃度 20 mM EDTA-2Na となるよう水溶液を加え反応停止した。精製した生成物は, Centriprep P50 で 20 mM PBS 緩衝液 (pH 7.4) にバッファー交換した。その後, 第 1 章 (1.2.3) 記載の方法に従って DBCO-Cy3 とのクリック反応により Cy3 コンジュゲートを調製した。

3.2.3 SDS-PAGE および蛍光分析

タンパク質の分離は SDS-PAGE を用いて行い, Mini-PROTEAN TGX プリキャストタンパク質ゲルシステム (ゲル濃度 4–20%, Bio-Rad, Hercules, CA) を使用した。タンパク質の分子量は APRO Life Science Institute, Inc. (徳島, 日本) の XL-Ladder Broad を標準として決定した。タンパク質の可視化のため, ゲルは Bio-safe Coomassie Brilliant Blue G-250 染料 (Bio-Rad) で染色した。画像のキャプチャと解析は Amersham Imager 600 (GE Healthcare Japan) を使用し, ベンダーのプロトコルに従って行った。蛍光検出の際は励起, 蛍光波長として 570 nm を用いた。タンパク質修飾率は, 570 nm での蛍

光信号強度と CBB 染色によるタンパク質バンドの信号強度の比率を使用して定量化した。

$$\text{タンパク質修飾率(\%)} = \frac{\text{570 nm での蛍光信号強度}}{\text{CBB 染色によるタンパク質バンドの信号強度}} \times 100$$

3.2.4 HPLC-PDA 分析

BioResolve RP mAb ポリフェニル 2.7 μm 2.1 \times 150 mm カラム(Waters, Inc., Milford, MA)を使用し, Agilent 1260 HPLC システムで行われた。このシステムには, バイナリーグラジエントポンプ, 温度制御カラムコンパートメント, オートサンプラー, ダイオードアレイ検出器が装備されている。運用条件は以下の通り設定した: 流速 0.4 mL/min, 70°C, MPA は 0.1% TFA 水溶液を用い, MPB は 0.1% TFA アセトニトリル溶液を用いた。吸光度は 280 nm でモニターし, 参照波長は 450 nm を使用した。別途, Cy3 標識タンパク質は 570 nm で検出した。この吸収波長は, フォトダイオードによる波長解析において, Cy3 の吸光度を最も高く示した波長であったため選択した。修飾されたタンパク質 20 μL を分析毎にシステムに注入した。溶離プロファイルには, 5%から 30% MPB への 2 分間のリニアグラジエント, 30%から 95% MPB への 22 分間のリニアグラジエント, 95% MPB での 3 分間の洗浄, そして 5% MPB での 8 分間の再平衡が含まれた。

タンパク質修飾率は以下の式を使用して計算した:

$$\text{タンパク質修飾率(\%)} = \frac{\text{HPLC-PDA における } A_{570} \text{ 値から換算した修飾 Cy3 の量 (nmol)}}{\text{HPLC へインジェクションしたタンパク質の量 (nmol)}} \times 100$$

Cy3 の濃度は 3.3.3 項に記述した蛍光分子の検量線を用い算出した。インジェクションしたタンパク質の濃度は, Nanodrop システム (Thermo Scientific) で測定した吸光度 (A_{280}) を用いて決定した。それぞれのモル吸光係数として下記の値を利用した (Table 12)。

Table 12 Summary of molar extinction coefficient for this study.

Entry	Protein	Molar extinction coefficient
1	Human-Lysozyme (HLY)	38,940 M ⁻¹ cm ⁻¹
2	Egg-Lysozyme (ELY)	37,970 M ⁻¹ cm ⁻¹
3	Beta-lactoglobulin (BLG)	17,600 M ⁻¹ cm ⁻¹
4	Ovalbumin (OVA)	30,590 M ⁻¹ cm ⁻¹
5	Bovine serum albumin (BSA)	43,824 M ⁻¹ cm ⁻¹
6	Human serum albumin (HSA)	35,700 M ⁻¹ cm ⁻¹
7	Ovotransferrin (OVT)	83,451 M ⁻¹ cm ⁻¹
8	Transferrin (TF)	87,000 M ⁻¹ cm ⁻¹

なお、本来であれば蛍光分子の A₂₈₀ 吸収を考慮して、修飾タンパク質の濃度は下記の式に基づいて計算する必要がある。

$$\text{修飾タンパク質の HPLC インジェクション時の濃度[M]} = (A_{280} - (A_{570} \times \text{CF})) / \epsilon_{\text{protein}}$$

A₂₈₀: 蛍光修飾タンパク質による 280 nm における吸収 [実測値-1]

A₅₇₀: Cy3 の最大吸収波長における吸収 [実測値-2]

$\epsilon_{\text{protein}}$: タンパク質のモル吸光係数 [M⁻¹ cm⁻¹]

CF(Correction Factor): 補正係数 [Cy3 の補正係数]

しかし、Cy3 の補正係数 (CF) が 0.073 ととても小さいこと、また、実際の測定において得られた A₂₈₀ の値が、リーズナブルなものではなかった (サンプルによっては、添加した DBCO-Cy3 以上の値となった) ことから、Cy3 の影響を考慮せずに修飾タンパク質の濃度を求めることにした。すなわち、下記の式の通り原料のタンパク質の A₂₈₀ の値をそのまま修飾タンパク質の濃度計測に用いた。

$$\text{修飾タンパク質の HPLC インジェクション時の濃度[M]} = A_{280} / \epsilon_{\text{protein}}$$

3.2.5 SASA 分析

SASA の計算は、Bioluminate ソフトウェアスイート (Bioluminate, バージョン 2022-2, Schrödinger, Inc.) を使用して実施した⁸⁰⁾。この計算には、Protein data bank (PDB) より、各タンパク質の構造情報を入手し、使用した。今回 PDB 番号は下記のとおり

である (Table 13).

Table 13 Summary of protein data bank references for this study.

Entry	Protein	PDB information
1	Human-Lysozyme (HLY)	1IWT
2	Egg-Lysozyme (ELY)	135L
3	Beta-lactoglobulin (BLG)	1B0O
4	Ovalbumin (OVA)	1OVA
5	Bovine serum albumin (BSA)	3V03
6	Human serum albumin (HSA)	4BKE
7	Ovotransferrin (OVT)	1AIV
8	Transferrin (TF)	3V83

すべてのタンパク質はプロトン化され、最小化された後に、解析用アルゴリズムとして Bioluminate (Schrödinger 社, ベルリン, ドイツ) の calculate SASA by residue プログラムを用い SASA スコアを計算した. プローブ半径の設定値は 1.4 Å とした.

この方法により, LplA を用いたタンパク質の効率的な修飾を達成したことが示された. 特に, LplA による修飾後に DBCO-Cy3 とのクリック反応を行うことで, タンパク質の修飾率を定量的に評価することができた. この研究では, 複数のタンパク質 (OVA, OVT, lysozyme, BSA, HSA, transferrin) に対してこの方法が適用され, 修飾後のタンパク質の蛍光強度の増加が観察された. この結果は, LplA を用いたタンパク質修飾の有効性と, クリック化学を用いた蛍光ラベリングの適用可能性を示している.

3.3 結果

3.3.1 Protein-Cy3 の合成と SDS-PAGE 分析

本章では、まずアジドオクタン酸を用いて LplA によるタンパク質修飾を第 1 章で最適化した方法に従って実施した。ここでは、分子量が 15–80 kDa の間の 8 つのタンパク質を用いている。なお、酵素反応を完結させるために、酵素反応時間を延長（64 時間）した。マグネシウムイオンをキレートすることで反応停止したのち、低分子を除去するためにゲルろ過を行った。さらに、第 1 章で最適化した方法に従ってクリック反応により DBCO-Cy3 と反応することで、Protein-Cy3 コンジュゲートを得た。タンパク質修飾反応はまず、第 1 章で実施した通り SDS-PAGE の CCB 染色と蛍光分析の組み合わせによって修飾率を評価した (Fig. 18)。修飾されたタンパク質の量を示す 570 nm での蛍光強度と、全タンパク質量を反映する 280 nm での吸光度信号の比率によって評価された。なお、比較をしやすいするため、SDS-PAGE にアプライするタンパク質の量は、一律 20 µg とした。このアプライ量を決定するために、それぞれのタンパク質濃度を Nanodrop システムで分析した。

OVA, 両リゾチーム, BLG は低い修飾率を示したのに対し, OVT, BSA, HSA, およびトランスフェリンは高い修飾率を示した。

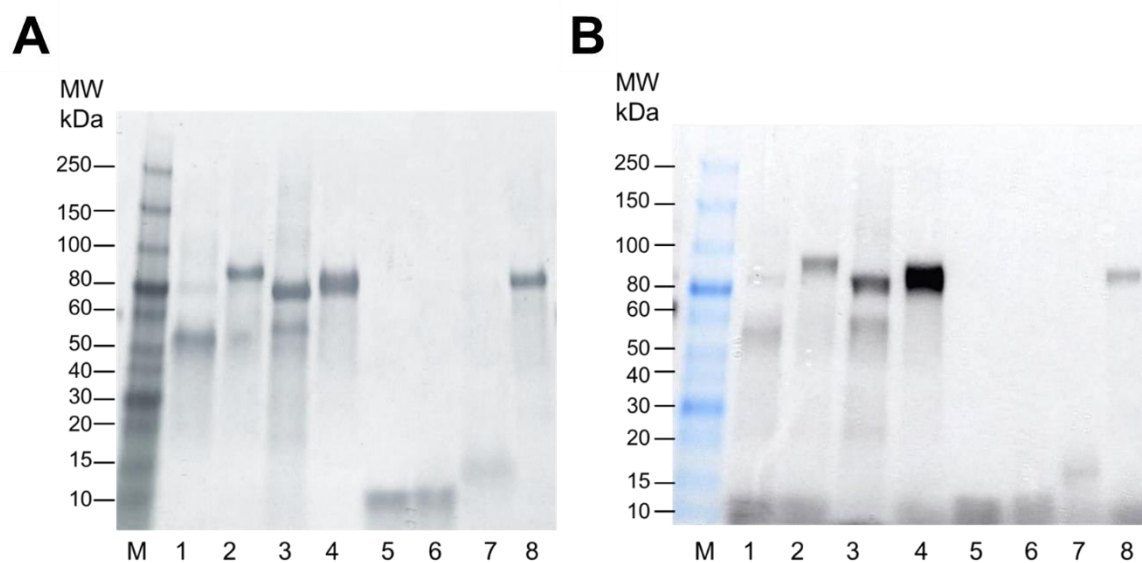


Fig. 18 SDS-PAGE analysis of LplA-modified proteins.

A) Coomassie stain treatment B) fluorescent. M: Protein ladder Lane-1: OVA, Lane-2: OVT, Lane-3: BSA, Lane-4: HSA, Lane-5: Lysozyme (Egg-derived), Lane-6: Human lysozyme, Lane-7: BLG, Lane-8: Transferrin.

続いて、下記式を用いて、修飾率を概算した (Table 14).

$$\text{タンパク質修飾率(\%)} = \frac{\text{570 nm での蛍光信号強度}}{\text{CBB 染色によるタンパク質バンドの信号強度}} \times 100$$

Table 14 Fluorescent intensity of Cy3-protein conjugates produced by LplA.

	Substrate	Intensity	Modification rate
1	OVA	2.43E+05	7.7%
2	OVT	1.59E+06	50.3%
3	BSA	2.92E+06	92.5%
4	HSA	9.43E+06	298.6%
5	ELY	1.03E+04	0.3%
6	HLY	7.27E+03	0.2%
7	BLG	2.92E+05	9.2%
8	TF	8.42E+05	26.6%
9	Control Cy3	3.16E+06	100.0%

その結果, OVTやTFでは30-50%程度の修飾率. BSAに関してはほぼ100%の修飾率, HSAに至っては300%近くの修飾率となった. これは, BSAはタンパク質に対してCy3がほぼ1分子コンジュゲートしていることを意味し, HSAに関してはCy3がほぼ3分子コンジュゲートしていることを示している.

3.3.2 HPLC カラムスクリーニング

さらに, 修飾体をより定量的に評価するため, HPLCの分析方法を確立することにした. そこでまず, 異なるタンパク質間で汎用的に使用できるカラムを見つけることを目的として, 様々な種類のカラムをスクリーニングした. ここでは分子量が違う2種 (Human Lysozyme-Cy3とHSA-Cy3) を選択した.

Table 15 Summary of column screening study.

	Bonded Phase	Column	Analyte	Results
1	C18	Xbridge Shield RP 18, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm	HLY	Not eluted
2	C18	Xbridge Shield RP 18, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm	HSA	Not eluted
3	C8	YMC-Triart C8, 3.0 × 150 mm, 1.9 mm	HLY	Not captured
4	C8	YMC-Triart C8, 3.0 × 150 mm, 1.9 mm	HSA	Not captured
5	C4	YMC-Triart C4, 3.0 × 150 mm, 1.9 mm	HLY	Not captured
6	C4	YMC-Triart C4, 3.0 × 150 mm, 1.9 mm	HSA	Not captured
7	PS/DVB	Sepax Proteomix RP-1000 2.1 × 150 mm, 5 μm	HLY	Not captured
8	PS/DVB	Sepax Proteomix RP-1000 2.1 × 150 mm, 5 μm	HSA	Partially Captured
9	Polyphenyl	BioResolve RP mAb, 2.1 x 100 mm, 2.7 μm	HLY	Effective elution
10	Polyphenyl	BioResolve RP mAb, 2.1 x 100 mm, 2.7 μm	HSA	Effective elution

TFA水溶液とTFAアセトニトリル溶液からなる移動相系では, HSAもHLYもC18カラムでは過剰な吸着が観察され, 100%アセトニトリル-TFAの組成となる洗浄工程で溶出してくるのみであった (Table 15, Entries 1-2). 一方で, C8カラムやC4カラムでは付着せず, 保持なしでの素通りが観察された (Table 15, Entries 3-6). この

現象は、第2章で紹介したADCの逆相HPLC分析で効果があったスチレンージビニルベンゼンカラムでもほぼ同様であった (Table 15, Entries 7-8) . しかし、ポリフェニル樹脂の選択により、HSA と HLY の両者において良好な溶出プロファイルを与えた。よって、ポリフェニルカラムを今後の検討に使用した。

3.3.3 HPLC-PDA 分析による修飾率の算出

続いて、前項で見いだしたポリフェニルカラムを使って修飾率を算出することにした。570 nm の吸光で得られるエリア面積から蛍光物質のモル濃度を求め、それをHPLCへインジェクションしたタンパク質のモル濃度で除することで修飾率を算出する方法を構築した。そのためには、蛍光物質のモル濃度とHPLC-PDAのエリア面積の相関を出すため、検量線を作成する必要がある。この検量線の作成は、異なる濃度のDBCO-Cy3溶液 (5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM) をポリフェニルカラムにインジェクションし、その570 nmのスペクトルで得られるエリア面積との相関を算出した。濃度とエリア面積には大変良い相関が見られ、回帰分析における決定係数 (R^2) は0.997であった (Fig. 19) . また、Cy3はこの分析系において保持時間10分に溶出し、他のタンパク質とは分離していることも確認できた。

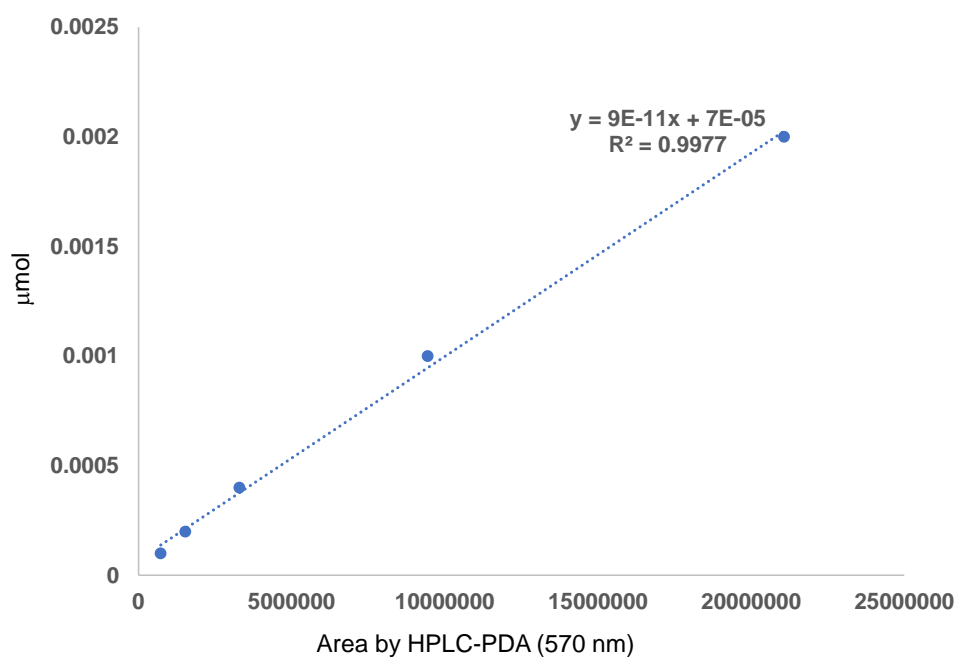


Fig. 19 Calibration curve with free Cy3 detected by 570 nm.

続いて、このカラムを用いて、原料のタンパク質と修飾体を分析した (Fig. 20-Fig. 27) .

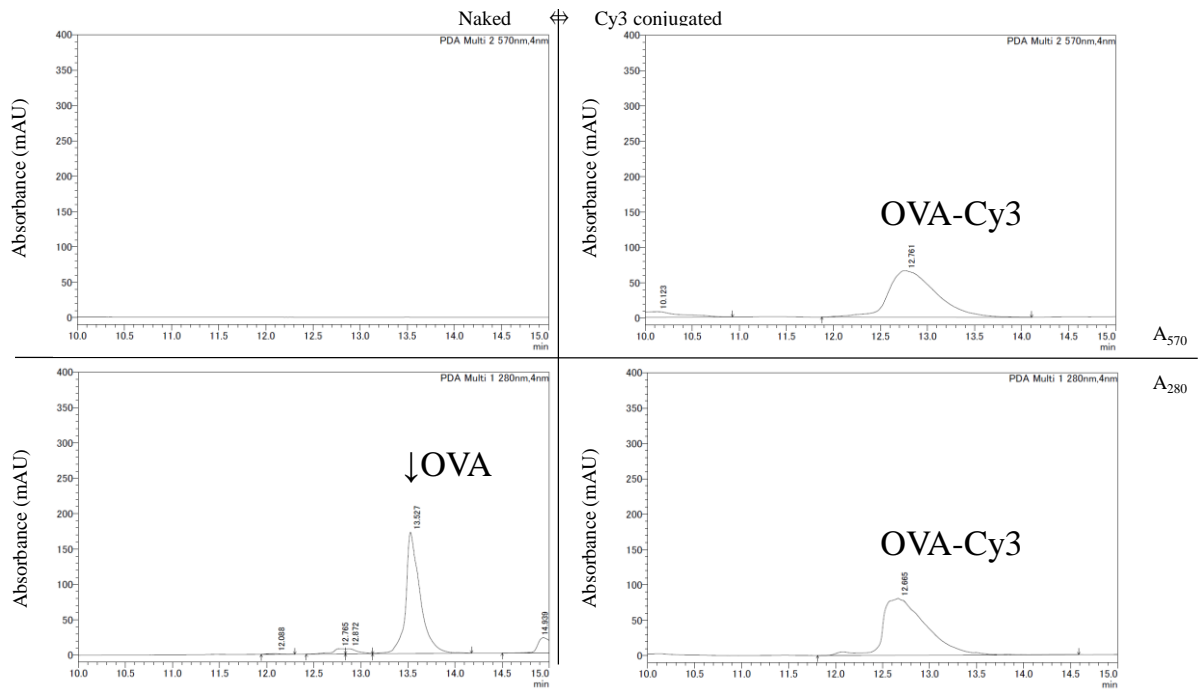


Fig. 20 HPLC-PDA analysis of OVA.

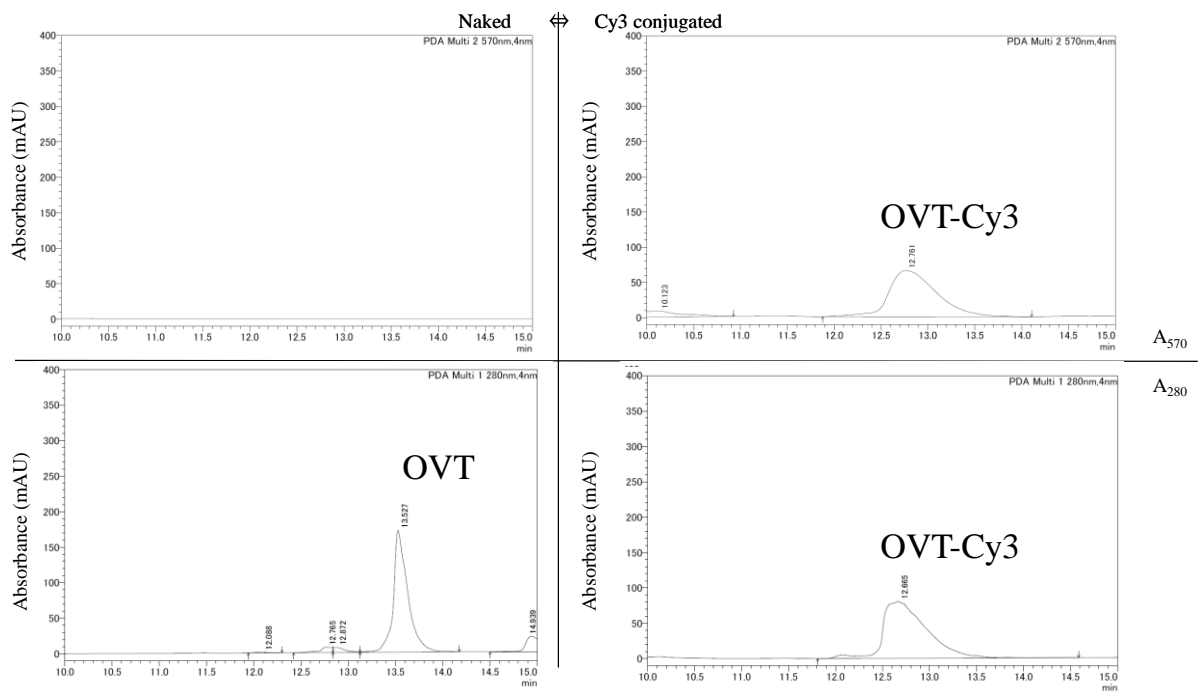


Fig. 21 HPLC-PDA analysis of OVT.

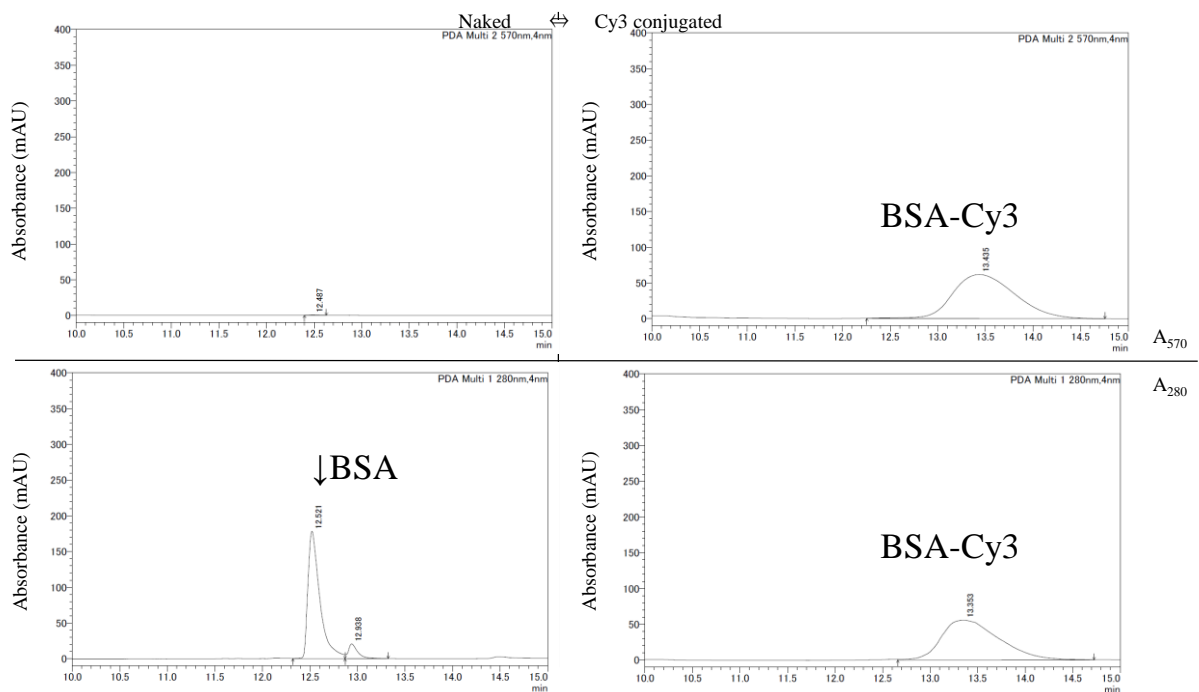


Fig. 22 HPLC-PDA analysis of BSA.

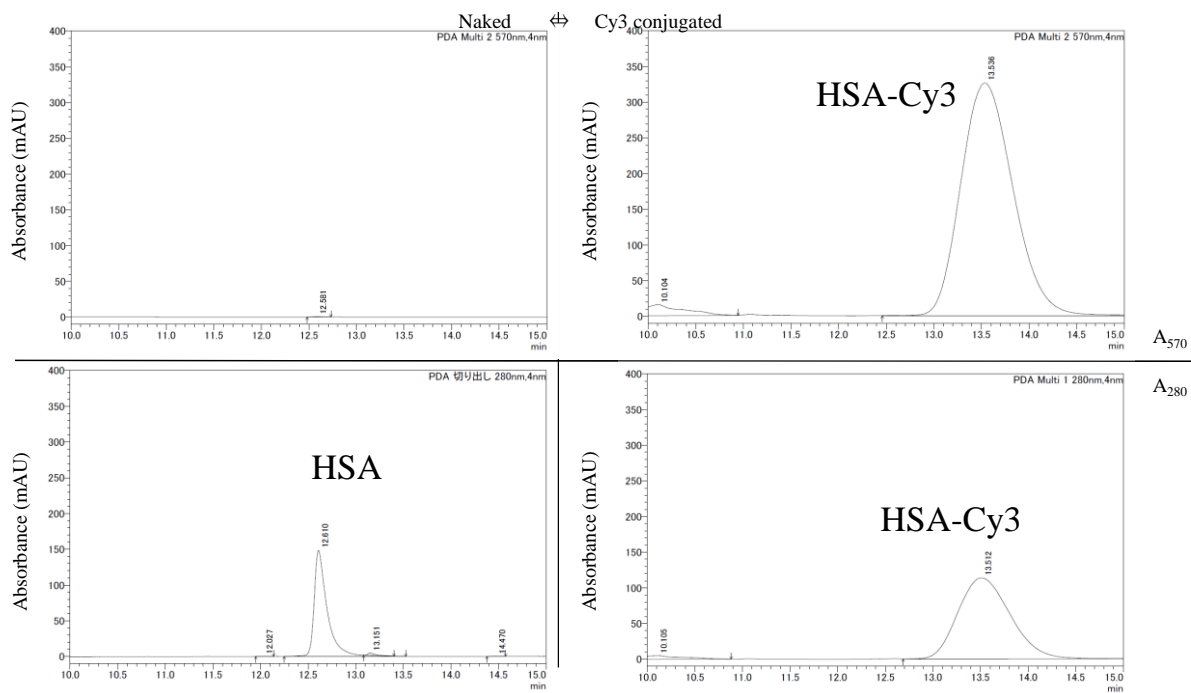


Fig. 23 HPLC-PDA analysis of HSA.

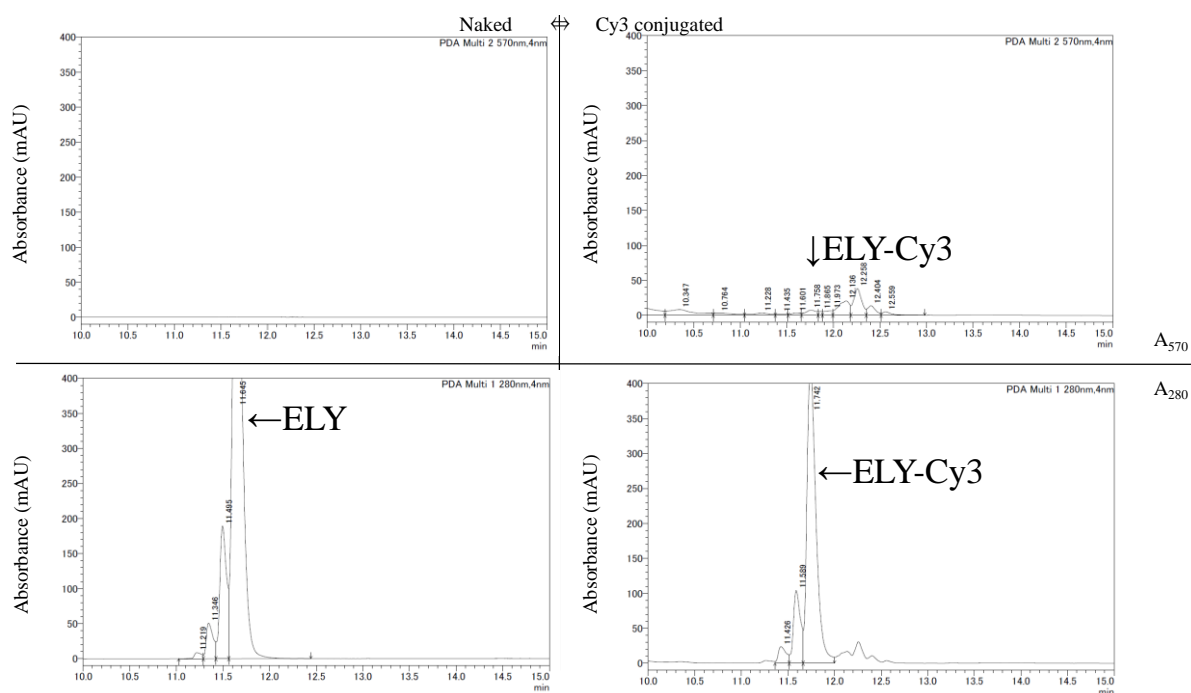


Fig. 24 HPLC-PDA analysis of ELY.

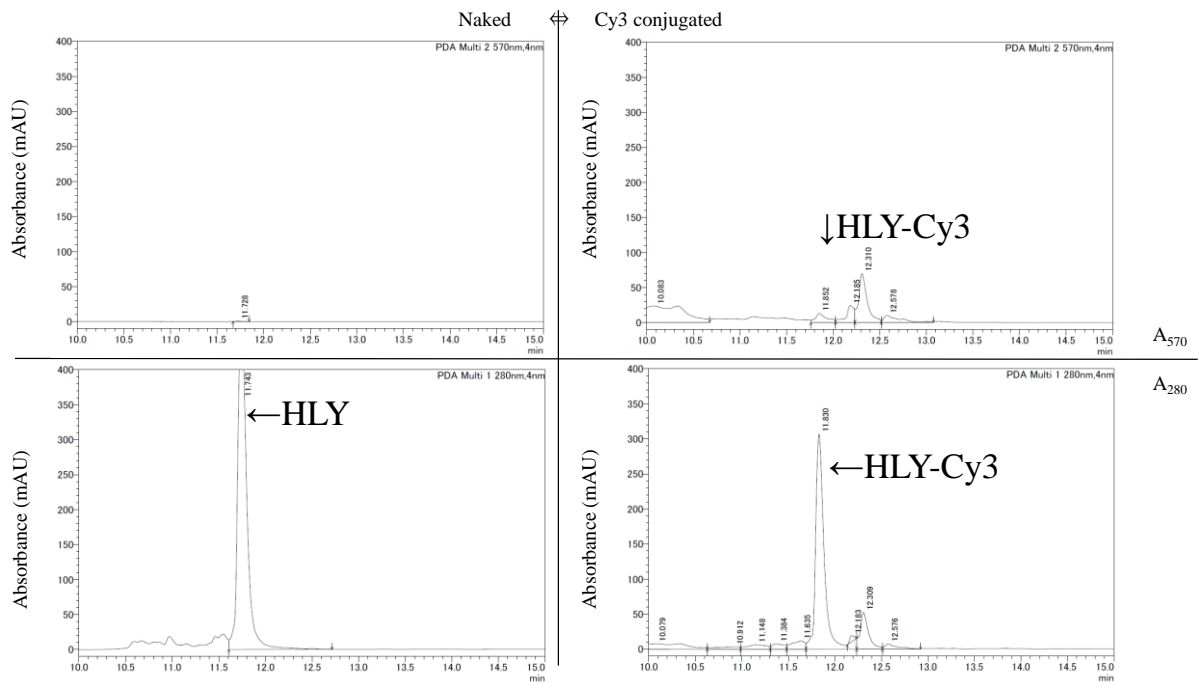


Fig. 25 HPLC-PDA analysis of HLY.

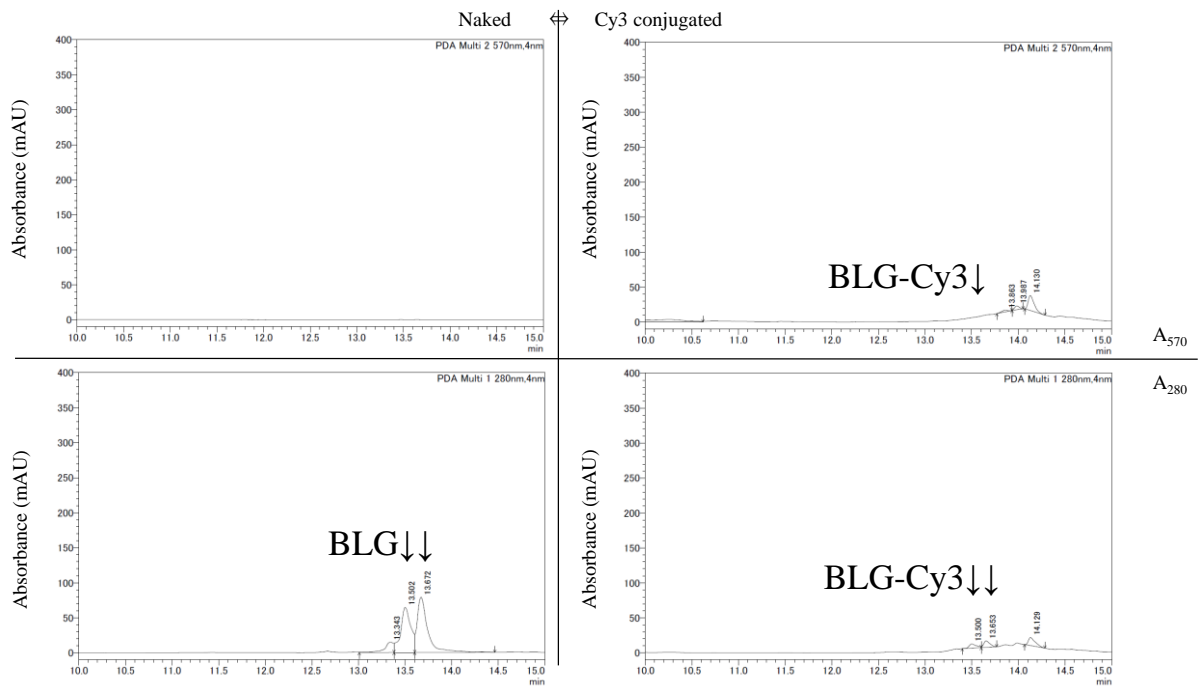


Fig. 26 HPLC-PDA analysis of BLG.

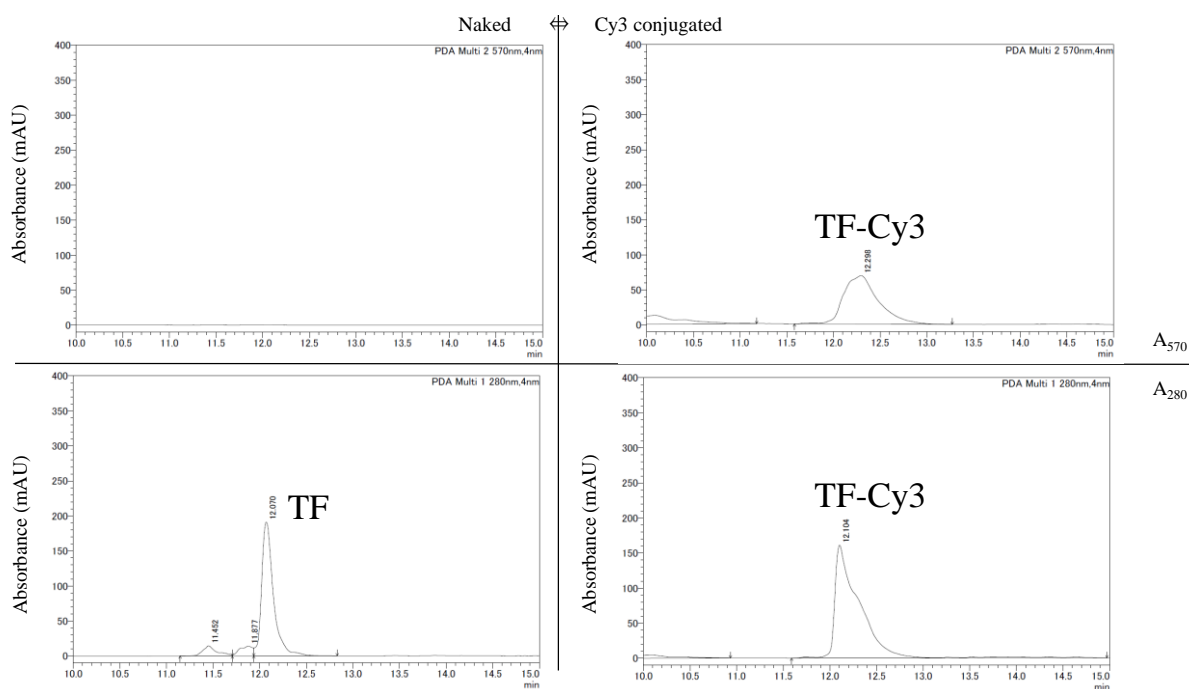


Fig. 27 HPLC-PDA analysis of TF.

Table 16 Summary of HPLC-PDA analysis of protein-Cy3 produced by LplA.

	Substrate	Area (570 nm)	Modification rate
1	OVA	9.45×10^5	15.0%
2	OVT	2.32×10^6	55.4%
3	BSA	2.80×10^6	73.3%
4	HSA	1.25×10^7	274%
5	Egg-Lysozyme	1.20×10^4	4.60%
6	Human-Lysozyme	1.91×10^4	3.90%
7	BLG	2.92×10^5	5.30%
8	TF	1.81×10^6	39.4%
9	Control Cy3	3.16×10^6	93.8%

その結果、OVTやTFでは40-50%程度の修飾率。BSAやHSAはそれよりも高い修飾率を示し、HSAに至っては300%近くの修飾率となった（Table 16）。SDS-PAGEとHPLC-PDAの両方の分析方法とも、似通った結果が得られた。

3.3.4 SASA 分析

本章では、LplA による様々なタンパク質の修飾率を色素対タンパク質比 (Dye Protein Ratio, DPR) 値に変換した。最も高い DPR は、HSA で約 3、次に BSA が 1、OVT が 0.7、トランスフェリンが 0.5 であった。続いて、これらの修飾率の違いと、タンパク質間での LplA の基質選択性について検討した。以前の研究によって、LplA が trastuzumab のリジン 188/190 を優先的に修飾することが、3 種類の異なる酵素消化によるペプチドマッピングで明らかにされていた⁸¹⁾。これに基づき、アミノ酸残基の露出度を表す SASA に注目して解析を行った。トラスツズマブのリジン 188 の SASA は 168 \AA^2 であり⁷¹⁾、空間的に露出したリジンとして修飾が進行するには十分な値であると考えられた。この値を指標に、今回の修飾反応に利用した全タンパク質の包括的な SASA 分析を実施した (Table 17)。

Table 17 Summary of SASA of proteins.

Entry	Protein	Conversion by HPLC-PDA	Highest SASA score (\AA^2)	Number of high SASA lysines ($>160 \text{\AA}^2$)
1	OVA	15%	189	3
2	OVT	55%	230	7
3	BSA	73%	198	16
4	HSA	274%	192	6
5	ELY	5%	140	0
6	HLY	4%	144	0
7	BLG	5%	225	6
8	TF	39%	184	7

この分析によって、Human および Egg の Lysozyme に存在するリジンの SASA が 160\AA^2 を超えることはなく、最大で約 145\AA^2 であることが明らかになった。これは、Lysozyme が一般に LplA の修飾に適していないことと矛盾しない。しかし、OVA と BLG では、SASA が 160\AA^2 を超えるリジンがいくつか特定された。特に、BLG には SASA が非常に高い 225\AA^2 のリジンが含まれていた。したがって、続いてリジンの周囲の 3 残基の SASA も検討することにした (Table 18)。

Table 18 Summary of SASA of lysines in protein.

Entry	Protein	LplA modification	High SASA lysines (>160 Å ²)	Neighboring groups with high SASA (>130 Å ²)
1	BSA	Successful	Lys76 ^a , Lys166 ^a , Lys131 ^a , Lys275 ^a , Lys312 ^a , Lys396 ^a , Lys504 ^a , Lys537 ^a , Lys544 ^a , Lys76 ^b , Lys131 ^b , Lys312 ^b , Lys316 ^b , Lys396 ^b , Lys504 ^b , Lys556 ^b	Glu276 ^a , Glu395 ^a , Glu395 ^b
2	HSA	Successful	Lys313, Lys466, Lys538, Lys541, Lys560, Lys573	Glu465, Glu542, Lys574
3	OVT	Successful	Lys4, Lys73, Lys179, Lys279, Lys290, Lys352, Lys554	Pro178, Lys291
4	TF	Successful	Lys4, Lys414, Lys489, Lys545, Lys557, Lys657, Lys664	Arg663
5	BLG	Unsuccessful	Lys8 ^a , Lys77 ^a , Lys141 ^a , Lys8 ^b , Lys77 ^b , Lys141 ^b	None
6	OVA	Unsuccessful	Lys78, Lys83, Lys292	None

a: domain A, b: domain B.

OVA と BLG の両方で、高い SASA を持つリジンの隣接残基が同様に高い SASA (130 Å² 以上) を持つことはなかった。一方、効率的に修飾が進行しているタンパク質 (OVT, BSA, HSA, TF) では、リジンとその隣接残基が高い SASA を持つ例が複数見つかった (Fig. 28 に BSA, HSA を例示した)。従って、LplA のタグ無し修飾を考慮する上で、ターゲットとなるリジンとその周辺残基の SASA が重要であると考えられた。

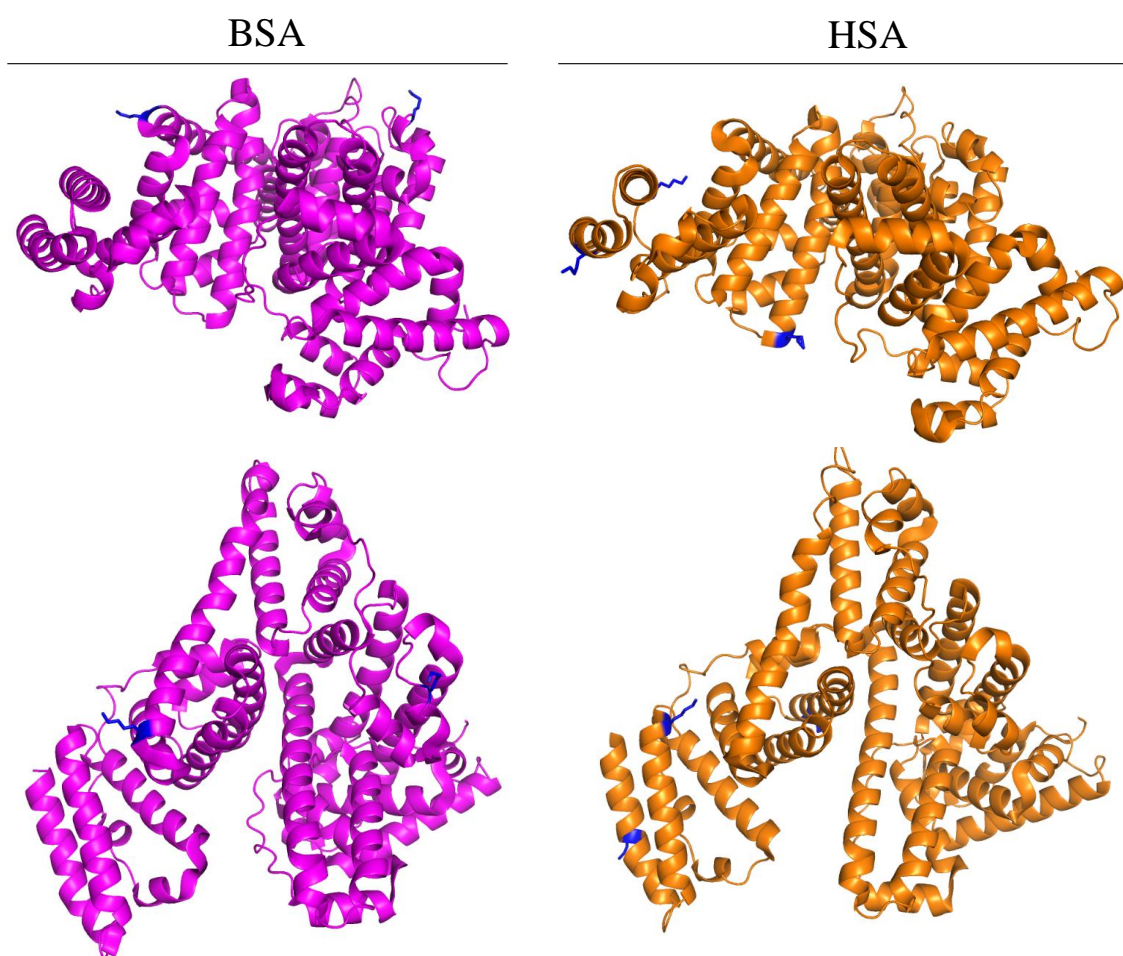


Fig. 28 Crystal structure of BSA and HSA.

Paymol was used for drawing. Left: BSA (magenta). Right: HSA (orange). The pictures are rotated 90 degrees. SASA >130 Å² on consecutive Glu or Lys residues and SASA >160 Å² on Lys are highlighted in blue.

以上の解析では、LplA と基質タンパク質との相互作用に着目し、アジドオクタン酸が結合する残基であるリジン残基及びその近傍のアミノ酸残基の SASA を評価した。続いて、基質タンパク質とアジドオクタン酸-AMP 複合体 (**Fig. 2B** 中で Lipoate-AMP と記載) との相互作用に注目し、以下の SASA 解析を行った。一般に、相互作用に特異性を与える要因として、タンパク質表面の形状だけでなく、静電相互作用、アミノ酸主鎖や側鎖の水素結合やファンデルワールス力などが挙げられる⁸²⁾。このため、対象タンパク質の正の電荷を持つ塩基性アミノ酸 (アルギニン、リジン、ヒスチジン) 側鎖の存在を調べた。その結果、上述の(1) リジンが 160 Å² 以上の SASA を持ち、かつ隣接する 3 アミノ酸残基も高い SASA (130 Å² 以上) を

有すること (Table 18 記載), または(2) リジンの 1 残基隣接に塩基性の側鎖であるアルギニン, リジン, ヒスチジンを有すること, いずれかの特徴を満たす場合に LplA 反応が進行しやすいことが分かった (Table 19). LplA の反応が特に進行した IgG 軽鎖においては特徴(1)を満たすリジンは存在しないが, MS area (オクタン酸による修飾を受けたペプチド断片の LC-MS 分析の面積値. 敷田らのペプチドマッピング分析の結果を引用⁴³⁾した) が高い値 (9.37×10^6) であると報告されているリジン 188/190 はヒスチジン 189 と隣接しており, 特徴(2)を満たすことが分かった. IgG 重鎖も同様に調べたところ, 特徴(1)を満たすリジンは存在しなかったが, 特徴(2)について以下が示された. ヒスチジン 204 とリジン 205 は隣接しているが, ヒスチジン 204 の SASA はほぼ 0 \AA^2 と非常に低く, アジドオクタン酸-AMP 複合体との相互作用には不適であると推測された. 続くリジン 222 はヒスチジン 224 から 2 残基離れており, ペプチドマッピング分析でもリジン 222 への修飾は確認されなかった (MS area = 0). また, リジン 246/248 の近傍の 245~249 番目のアミノ酸配列中には自身のリジン以外の塩基性アミノ酸が存在せず, MS area も 1.87×10^6 と低い値が報告されている.

次に, SASA が 160 を超えるリジンを有するタンパク質 (Table 18 に示した) が特徴(2)を満たすか IgG と同様に調査した (Table 19). 3.3.3 にて高修飾率と判断した BSA, HSA については特徴(1)に加え, リジンの近傍にヒスチジンが存在し (BSA の場合はヒスチジン 3 およびヒスチジン 378, HSA の場合はヒスチジン 3), それらの SASA も 100 \AA^2 以上と高いことが分かった. OVT, TF についても修飾が確認されており, 特徴(1)に加え, 特徴(2)を示す塩基性アミノ酸 (OVT のリジン 291 およびアルギニン 614, TF のリジン 490, アルギニン 663. リジンが連続する場合は SASA の高いリジンが優先的にオクタン酸付加を受けると考え, もう一方のリジンの位置を示した) の存在が明らかになった. これらの塩基性アミノ酸はアジドオクタン酸-AMP 複合体と静電的相互作用することによって, 反応が進行しやすかったものと考えられた. その一方で OVA については特徴(2)を満たすリジンは見られず, LplA 修飾率が低い傾向と一致した. ところが, BLG についてはリジンが連続する箇所が 2 つ存在しており, 特徴(2)を満たすことと, LplA 修飾率が低い結果との関係性が見出せなかった. BLG については考察の項で述べる.

Table 19 SASA around lysines of protein which LplA reaction proceeds.

Protein	Sequence	MS area	SASA (Å ²)	(1)	(2)
IgG-LC	Lys188His189Lys190	9.37×10 ⁶	129(Lys), 64(His), 91(Lys)	–	+
	His204Lys205	2.99×10 ⁶	0(His), 111(Lys)	–	–*
IgG-HC	Lys222(Thr223)His224	0.00	168(Lys), (93Thr), 129(His)	–	–
	Lys246(Pro247)Lys248	1.87×10 ⁶	139(Lys), (44Pro), 42(Lys)	–	–
BSA	His3Lys4	N.D.	150(His), 153(Lys)	–	+
	Lys275Glu276	N.D.	166(Lys), 137(Glu)	+	–
	Lys377His378	N.D.	133(Lys), 118(His)	–	+
	Glu395Lys396	N.D.	152(Glu), 198(Lys)	+	–
HSA	His3Lys4	N.D.	223(His), 152(Lys)	–	+
	Glu465Lys466	N.D.	139(Glu), 176(Lys)	+	–
	Lys541Glu542	N.D.	175(Lys), 130(Glu)	+	–
	Lys573Lys574	N.D.	166(Lys), 149(Lys)	+	+
OVT	Pro178Lys179	N.D.	138(Pro), 181(Lys)	+	–
	Lys290Lys291	N.D.	215(Lys), 149(Lys)	+	+
	Lys613Arg614	N.D.	142(Lys), 96(Arg)	–	+
TF	Lys489Lys490	N.D.	164(Lys), 102(Lys)	–	+
	Arg663Lys664	N.D.	144(Arg), 164(Lys)	+	+
BLG	Lys69Lys70	N.D.	67(Lys), 155(Lys)	–	+
	Lys100Lys101	N.D.	158(Lys), 114(Lys)	–	+
OVA	Lys375His376	N.D.	16(Lys), 4(His)	–	–*

SASA of IgG (light chain, heavy chain) and other protein used in this study. Sequence shows lysine and neighbor(s). MS area of each peptide fragment conducted in peptide mapping analysis using octanoic acid–modified IgG (trastuzumab) is described. N.D. means not determined. Feature 1: SASA > 160 Å² on lysine and > 130 Å² on neighbor amino acid is shown in (1). Feature 2: arginine, lysine and histidine within one amino acid from lysine is shown in (2). Asterisk (*) means considered unsuitable as (2) because the lysine(s) are positioned next to arginine, lysine and histidine with low SASA.

3.4 考察

本章では、SDS-PAGE と HPLC の二つの方法によって、各タンパク質の修飾率を比較した。両方の分析方法ともに近い結果が得られた (Fig. 29)。SDS-PAGE は簡便でサンプルの必要量も少ないため、初期スクリーニングに適した分析法である。しかし、修飾率を測るには蛍光強度を観測した後、画像認識ソフトで解析する必要があり、サンプルの分析に2段階 (シグナル観測, 画像認識) を経るため、データの信頼性が損なわれるリスクがある。HPLC-PDA による分析では、Cy3 の 570 nm の吸収を直接確認出来るため、SDS-PAGE よりデータの信頼性は高いと考えられる。特に、本実験の場合、タンパク質の 570 nm の吸収はほとんどなく、また、未反応の DBCO-Cy3 の保持時間はタンパク質と3分近く離れているため、測定波長 570 nm でタンパク質の保持時間中出现するピークは Cy3 修飾体であると考えられる。これらの結果から、本章において LplA 修飾タンパク質の HPLC-PDA を確立したことは、今後の製造および品質管理などを見据えたときに有用なデータになると考えられる。

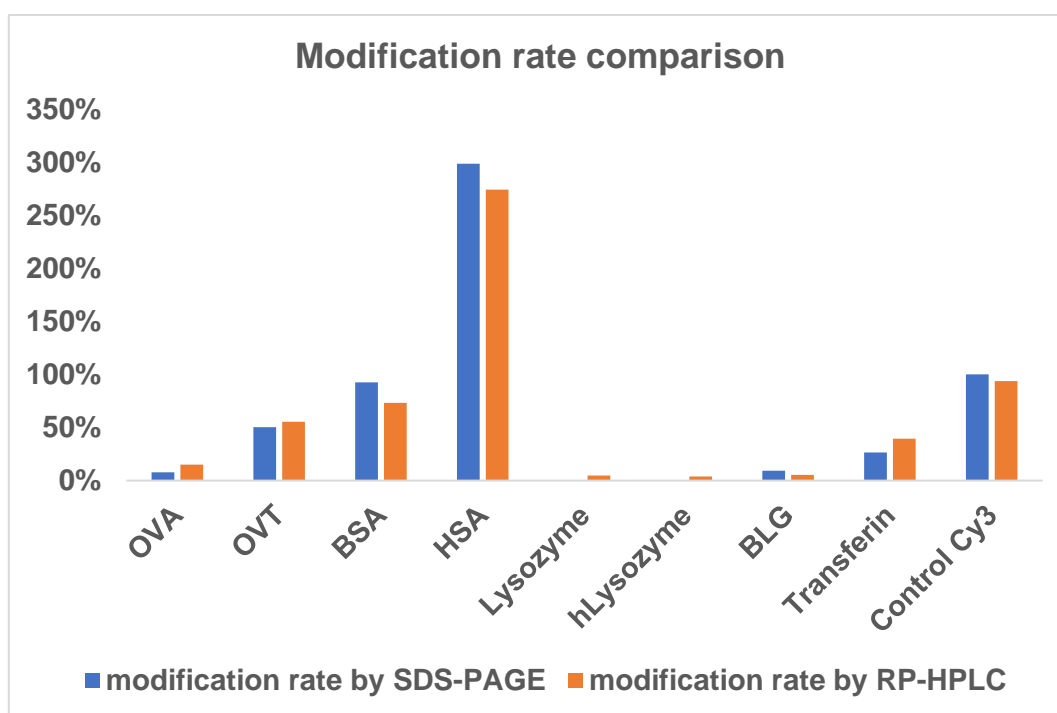


Fig. 29 Comparative analysis of modification rates.

Fluorescent as measured by SDS-PAGE (blue bars) versus area at 570 nm wavelength as determined by HPLC (orange bars).

次に、種々のタンパク質の分離に使用可能であったポリフェニルカラムについて考察した。Table 20 にまとめた通り、カラム選択の指標となる物理化学的性質にはいくつかの特徴がある^{48) 83) 84)}。例えば、疎水性相互作用は、すべての逆相カラムで支配的な保持メカニズムとされ、炭素骨格で表面修飾されたカラム充填剤の中で最も重要な相互作用である。C18 カラムは一般的にペプチドなど、中分子を中心に用いられる充填剤だが、その強い疎水性相互作用のため、高分子であるタンパク質修飾体の分析には不向きであったと考えられる。その代わりに、比較的温和な疎水性相互作用を持つ C8 カラムやポリフェニルカラムは、適用できる可能性がある。特に、今回の分析では π - π 相互作用が重要であったと予想される。ポリフェニルカラムはその芳香族性によって、タンパク質の保持に寄与するが、C8 カラムでは不適だった。また、ポリフェニルは中程度の立体選択性を有していたことも利点だった可能性がある (Table 20)。

Table 20 Summary of the interactions for typical reversed-phase bonded phases.

	Bonded Phase	Hydrophobicity	π - π interaction	Steric selectivity
1	C18	Very strong	No	Weak
2	C8	Strong	No	Weak
3	C4	Weak	No	Weak
4	PS/DVB	Moderate	Strong donor	Moderate
5	Polyphenyl	Strong	Strong donor	Moderate

本章では、種々のタンパク質の分離に使用できる LC 条件を見いだすことができた。また、LplA での修飾のしやすさがタンパク質によって変わることが確認できた点も興味深い。タンパク質のどのような性質が反応の進行しやすさに影響を与えるか考察するため、以下のような検討を行った。

まずは、オクタン酸付加を受けるリジン残基における水素結合の有無を調査した。解析の結果、ペプチドマッピング分析によって得られたオクタン酸修飾のされやすさと、そのリジン残基の水素結合の強弱とは関連が低いことが推測された (Table 21)。例えば、Lys188/190 はペプチドマッピング解析の結果、LplA による反応が最も進行しやすいと分かっているリジン残基だが、水素結合は弱いことが分かった。他のリジン残基をみると、同様に弱い水素結合を持つリジン 205, 222 の LplA 修飾率は低く、逆に強い水素結合を持つリジン 246 の LplA 修飾率も低いことが分かった。

次に、温度因子 (B-factor) を調査した。タンパク質には構造的なゆらぎがあり、ゆらぎ易さを高低で示したものが B-factor である。修飾されるリジン残基周辺が動きやすいほど、酵素基質ポケットとの相互作用も起こりやすいと考えられる。解析の

結果、B-factor の値も LplA 修飾率との関連が見出されなかった (Table 21). IgG は長鎖と軽鎖それぞれ 2 つずつのタンパク質が結合 (合計で 4 量体を形成) しているため、各リジン残基番号について 2 つの B-factor が算出されるが、そのどちらも LplA 反応の進行しやすさと関係性が見られなかった。

Table 21 Hydrogen bond and B-factor of IgG lysine.

Protein	Sequence	MS area	Residue number	Hydrogen bond on lysine	B-factor*	
IgG-LC	Lys188His189Lys190	9.37×10 ⁶	Lys188	Week	69	43
			Lys190	Week	44	36
	His204Lys205	2.99×10 ⁶	Lys205	Week	57	37
IgG-HC	Lys222(Thr223)His224	0.00	Lys222	Week	59	32
			Lys246	Strong	50	41
			Lys248	Week	56	38

IgG (light chain, heavy chain) was analyzed. MS area of each peptide fragment conducted in peptide mapping analysis using octanoic acid-modified IgG (trastuzumab) is described. Asterisk (*): two calculated value is shown because IgG is dimerized protein.

一連の検証を経て、アミノ酸残基の露出度を表す SASA を指標とするモデルが LplA の反応しやすさを説明するのに適していると考えた。結果の項でも論じたように、LplA の修飾を受けるためには、ターゲットのリジンの SASA が高い必要があるためである (160 Å²以上と考えられる)。一方で、LplA で修飾されなかった両 Lysozyme においては SASA の高いリジンがタンパク質に存在しないため、LplA が Lysozyme に対し構造的に近づくことが出来ないと考えられた。OVA と BLG に関しては SASA の高いリジンが存在するものの、周辺 3 残基の SASA (αヘリックスの一巻き分に相当し、その分のスペースがあれば、酵素の基質ポケットとの反応がしやすいと言われている) を確認したところ、高い SASA を持つリジンの隣接残基が同様に高い SASA (130 Å²以上) を持つことはなかった (特徴(1))。また、LplA での修飾がある程度観察されたタンパク質の中で、TF はリジンの SASA が比較的低い (約 160 Å²程度) ため、修飾は完全に進行しなかったのではないかと考えた。以上のように、SASA と LplA の修飾されやすさとは相関がある可能性が示唆された。特に DPR が最も高かった HSA (約 3) では、ターゲットのリジンとその隣接残基が高い SASA を持つ例が 3 つ見つかって SASA 分析の妥当性を支持した。しかし、同様に

修飾率の高かった BSA の場合、ターゲットリジンと隣接残基が高い SASA を持つ例が複数あったにもかかわらず、DPR は約 1 に過ぎなかった。この事実は、SASA だけで無く、さらなる調査が必要であることを示唆している。

本研究ではさらに LplA の反応が特に進行した IgG 軽鎖および HSA, BSA をモデルに、リジンの周辺に塩基性の側鎖を持つヒスチジン、リジンを見出した（特徴(2)）。これらの塩基性アミノ酸はアジドオクタン酸-AMP 複合体と静電的相互作用を持つために、反応が進行したと考えられた。これは trastuzumab を用いたペプチドマッピング分析で IgG 軽鎖のリジン 188, リジン 190 は有効な修飾残基であることが明らかになっており、信頼性の高い推測と考えている。実際に、本章で LplA による修飾率が高かったタンパク質では特徴(1)だけでなく(2)を満たすリジンを有することが示された。ところが、結果の項で触れた通り、BLG についてはオクタン酸が付加されるアミド基を有する塩基性アミノ酸であるリジンが 2 残基連続する課所が存在しており、特徴(2)を満たしている。SASA が極端に低いということもなく、オクタン酸付加が確認されている IgG 軽鎖のリジン残基周辺の SASA と大きな違いも見られないものの、本検討では BLG は修飾が進行しにくいタンパク質に分類されている。以上については仮説の域を出ない考察であるが、リジンが他の塩基性アミノ酸（アルギニン、ヒスチジン）と比較してオクタン酸-AMP 複合体との静電相互作用が起きにくいためではないかと考えている。実際に、BSA, HSA, OVT, TF ではリジンに隣接したアルギニンやヒスチジンの存在が確認されている。これらの考察が成り立つかどうか、今回解析した他のタンパク質について修飾部位の同定を含むさらなる分析が必要である。

3.5 小括

本章では、遺伝的に導入されたアミノ酸を必要としないタグ無しのタンパク質を、LplA を用いて修飾することに成功した。物性や分子量の異なる種々のタンパク質の修飾率を比較するため、SDS-PAGE と HPLC による修飾率の分析法を開発した。検量線を使わずに、定性的に評価していた第 1 章に対し、570 nm のモル吸光係数を利用し、Cy3 分子で検量線を作成し、定量的に修飾率を決定できた。さらに、各種マトリックスの逆相カラムを比較し、ポリフェニルカラムが汎用的に多くのタンパク質に使用できることを明らかにした。

加えて、LplA による修飾反応はタンパク質によって反応性に違いがあることを明らかにし、その原因の一つが、対象リジン残基の SASA、および対象リジン残基の周辺アミノ酸残基の SASA であること、更に対象リジン残基の周辺の塩基性アミノ酸残基の存在が関連している可能性を見いだした。

4. 総括

近年のモダリティ分野で注目されている、バイオコンジュゲーションによるタンパク質の高機能化であるが、製造までを見据えた際に現行法は課題が多く、高い基質認識能力の観点から、酵素結合法は注目されている。しかし、現存するほとんどの酵素はタグと呼ばれるアミノ酸残基をタンパク質に予め導入する必要があり、その検討やタグ分子自体の安定性の懸念などが議論されていた。そこで著者は、汎用性の高い基質認識能を持つと予想した LplA に注目し、それを用いたタグ無しシステムでのバイオコンジュゲーションの開発に従事した。同時に、特に生成物の分析法はこれまで全く確立されていなかったため、本研究でその開発にも取り組んだ。本論文の第1章から第3章で述べた結果を以下に総括する。

第1章

まず、スクリーニングを目的として、SDS-PAGEと蛍光分析を組み合わせた分析系を考案し、それを用いてタグ無しシステムでの LpLA での抗体修飾の検討を行った。LpLA は抗体の N 型糖鎖の存在に関わらず反応が進行し、広範囲の pH でも触媒として働くことが明らかになった。また、長時間の反応で副反応が進行することで知られる TG を初めとする他の酵素とは違い、LpLA は長時間でも基質との反応のみが進行する、クリーンな反応であることが分かった。よって、反応時間を適切に設定すれば、タグ無しシステムでも抗体修飾を行えることが分かった。また、SDS-PAGEと蛍光分析を組み合わせた分析系は、定性的ながらも少量の資料の反応のモニタリングに適していることが分かった。

第2章

第2章では LpLA を用いた ADC の合成を行い、その分析法の確立と、作成した ADC の基礎的な特性の評価に取り組んだ。蛍光物質とコンジュゲートさせた第1章とは違い、蛍光吸収をもたない DBCO-VC-PAB-MMAE とのコンジュゲートであったため、分析法を変更する必要があった。結果的に、FA 存在下での LC-Q-TOF MS 分析と、スチレンジビニルベンゼンポリマーをマトリックスとしたインタクト型の RP-HPLC 分析で、良好に DAR を測定することが出来た。また、調製した ADC は既存の ADC

である Kadcylla と同等程度の細胞傷害活性を示し、ラットやヒト血漿をもちいた安定性試験や FcRn の親和性試験においても良好のプロファイルを与えた。

第 3 章

第 1 章の結果から、定性的にコンジュゲートの修飾率を算出することには成功していたものの、より定量的な分析法の確立が望まれていた。また、基質認識能が比較的高いと考えられる LplA の他のタンパク質への展開も期待できたため、LplA の反応の許容性を理解すべく、7 種類のタンパク質を用いて修飾反応の比較と、それらを定量評価するための分析法の確立に取り組んだ。HSA、BSA といったタンパク質は非常に高い効率で LplA によって修飾され、特に HSA に至っては 3 分子の蛍光分子がコンジュゲーションできることが明らかになった。さらに、HPLC を利用して UV 検出および 570 nm の吸収をモニタリングすることにより、HPLC での分析を可能とした。カラムのスクリーニングにより、ポリフェニルカラムが汎用的に様々なタンパク質コンジュゲートの分析に使用できることを明らかにした。さらに、タンパク質の各リジンや周辺アミノ酸の SASA が LplA 修飾反応に影響を及ぼす可能性が明らかになった。

このように本研究は、新規の酵素反応であるタグ無しシステムで LplA を用いたタンパク質修飾反応の基礎検討と、生成物の分析法の確立を行ったものである。著者は LplA を効率的にタンパク質コンジュゲートの製造へと応用できる基礎検討を完了できた一方で、堅牢で信頼性の高いプロセスを確立するためには、まだ克服する必要がある多くの障害が存在する。たとえば、この研究では、重要なプロセスパラメータの決定が完全に達成されなかった⁸⁵⁾。もう 1 つの重要な側面は、ADC などの抗体コンジュゲートにおいては、低分子薬物の多様化が盛んな点である。免疫刺激剤⁸⁶⁾、テルペノイド⁸⁷⁾、アントラサイクリン⁸⁸⁾などの合成分子は、将来の ADC の payload として機能する可能性がある。新しい payload の幅広い範囲を受け入れることができる酵素は、ADC の研究においてますます重要になる。また、第 1 章で述べたとおり、LplA の酵素自体もタグ無しシステムにおいては、基質選択性が完全ではなく、酵素の変異などの更なる検討が必要である。さらに、タンパク質コンジュゲートの *in vivo* 評価、薬物動態試験、安全性試験も今後計画していく必要がある。さらに、既に LAP-タグシステムの LplA 反応で一部採用されているように、反応効率を高めるため、バイオ医薬品の製造において主流になりつつある、フローマイク

ロリアクタを用いた連続生産への応用も視野に入れる必要がある⁸⁹⁾。

このように本論文は、バイオコンジュゲーション分野の研究者に対して、Lp1Aを用いるタンパク質修飾に関する基礎的な情報を提供することを目的として、3章にわたる研究を実施した。近年ますます広がりを見せるバイオ医薬品分野に、多くの異分野の研究者が参画することを期待したい。

5. 謝辞

本論文をまとめるにあたり，御懇切なる御指導を賜りました東京薬科大学分析化学教室 袴田 秀樹 教授に心から感謝致します。

本論文をまとめるにあたり，御指導を頂きました東京薬科大学生体分析化学教室 柳田 顕郎 教授，薬物動態制御学教室 井上 勝央 教授，分子生物物理学教室 三島 正規 教授に深く感謝致します。

本研究への適切な御助言，御協力を賜りました東京薬科大学分析化学教室 小谷 明 准教授に深く感謝致します。

本研究に関し，有益な御助言と御協力をいただいた共同研究者である味の素株式会社，松田豊 博士（現 Exelixis 社 Director of antibody-drug conjugate chemistry），三原康博 博士（現 バッカスバイオ社，主席研究員），高橋一敏 博士，伊藤健一郎 博士，青木翼 博士，藤井友博 博士，嵐田直子 主任研究員，井上公太 研究員，渡部友博 研究員に心より深く感謝いたします。

本研究に関し，有益な御助言と御討論を賜りました，味の素株式会社 奥住竜哉 博士，新保和高 博士，鈴木基孝 博士，敷田奈都紀 研究員，高杉梨花 研究員ならびに Ajinomoto Genetika Research Institute 社の Smirnov SV 博士，Tokmakova IL 博士に深く感謝いたします。

また，研究生生活を多大な支援と激励をもって，支えてくれた妻・絵美，息子・凌生と泰生に心より感謝いたします。

6. 研究結果の掲載誌

1. S. Yamazaki, K. Inoue, Y. Mihara, Y. Matsuda, *ChemistrySelect.*, **8**, e202204706 (2022).
2. S. Yamazaki, K. Ito, T. Aoki, N. Arashida, T. Watanabe, T. Fujii, Y. Matsuda, *Biochemistry*, **63**, 5, 644-650 (2024).
3. S. Yamazaki, K. Takahashi, Y. Matsuda, *Anal. Sci.*, (2024).
DOI: 10.1007/s44211-024-00534-6

7. 引用文献

- 1) Debon A., Siirola E., Snajdrova R. *JACS Au*, **3**, 1267-1283 (2023).
- 2) Knittel CH., Devaraj NK. *Acc Chem Res*, **55**, 3099-3109 (2022).
- 3) Smeenk M., Agramunt J., Bongers KM. *Curr Opin Chem Biol*, **60**, 79-88 (2021).
- 4) Reichert JM., Valge-Archer VE. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 349-356 (2007).
- 5) Nakada T., Masuda T., Naito H., Yoshida M., Ashida S., Morita K., Miyazaki H., Kasuya Y., Ogitani Y., Yamaguchi J., Abe Y., Honda T. *Bioorg Med Chem Lett*, **26**, 1542-1545 (2016).
- 6) Ogitani Y., Aida T., Hagihara K., Yamaguchi J., Ishii C., Harada N., Soma M., Okamoto H., Oitate M., Arakawa S., Hirai T., Atsumi R., Nakada T., Hayakawa I., Abe Y., Agatsuma T. *Clin Cancer Res*, **22**, 5097-5108 (2016).
- 7) Junutula JR., Raab H., Clark S., Bhakta S., Leipold DD., Weir S., Chen Y., Simpson M., Tsai SP., Dennis MS., Lu Y., Meng YG., Ng C., Yang J., Lee CC., Duenas E., Gorrell J., Katta V., Kim A., McDorman K., Flagella K., Venook R., Ross S., Spencer SD., Lee Wong W., Lowman HB., Vandlen R., Sliwkowski MX., Scheller RH., Polakis P., Mallet W. *Nat Biotechnol*, **26**, 925-932 (2008).
- 8) Matsuda Y., Mendelsohn BA. *Expert Opin Biol Ther*, **21**, 963-975 (2021).
- 9) Matsuda Y., Clancy C., Tawfiq Z., Robles V., Mendelsohn BA. *ACS Omega*, **4**, 20564-20570 (2019).
- 10) Nayak S., Richter SM. *Organic Process Research & Development*, **27**, 2091-2099 (2023).
- 11) Sun Y., Lyu B., Yang C., He B., Zhang H., Wang X., Zhang Q., Dai W. *Bioact Mater*, **22**, 47-59 (2023).
- 12) Fujii T., Matsuda Y., Seki T., Shikida N., Iwai Y., Ooba Y., Takahashi K., Isokawa M., Kawaguchi S., Hatada N., Watanabe T., Takasugi R., Nakayama A., Shimbo K., Mendelsohn BA., Okuzumi T., Yamada K. *Bioconjug Chem*, **34**, 728-738 (2023).
- 13) Matsuda Y., Leung M., Okuzumi T., Mendelsohn B. *Antibodies (Basel)*, **9**, (2020).
- 14) Yamazaki S., Y. M. *Chemistry Select*, **7**, e202203753 (2022).
- 15) Grigoletto A. MK, Pasut G. *Polymer-Protein Conjugates*, 271-295 (2020).
- 16) Dickgiesser S., Rieker M., Mueller-Pompalla D., Schroter C., Tonillo J.,

- Warszawski S., Raab-Westphal S., Kuhn S., Knehans T., Konning D., Dotterweich J., Betz UAK., Anderl J., Hecht S., Rasche N. *Bioconjug Chem*, **31**, 1070-1076 (2020).
- 17) Morgan HE., Turnbull WB., Webb ME. *Chem Soc Rev*, **51**, 4121-4145 (2022).
- 18) Morris TW., Reed KE., Cronan JE. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 16091-16100 (1994).
- 19) Zhao X., Miller JR., Jiang Y., Marletta MA., Cronan JE. *Chem Biol*, **10**, 1293-1302 (2003).
- 20) Puthenveetil S., Liu DS., White KA., Thompson S., Ting AY. *J Am Chem Soc*, **131**, 16430-16438 (2009).
- 21) Yamazaki SMY. *Chemistry Select*, **8**, e202302947 (2023).
- 22) Fujiwara K., Toma S., Okamura-Ikeda K., Motokawa Y., Nakagawa A., Taniguchi H. *J Biol Chem*, **280**, 33645-33651 (2005).
- 23) Uttamapinant C., White KA., Baruah H., Thompson S., Fernandez-Suarez M., Puthenveetil S., Ting AY. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 10914-10919 (2010).
- 24) Thornlow DN., Cox EC., Walker JA., Sorkin M., Plesset JB., DeLisa MP., Alabi CA. *Bioconjug Chem*, **30**, 1702-1710 (2019).
- 25) Baalman M., Neises L., Bitsch S., Schneider H., Deweid L., Werther P., Ilkenhans N., Wolfring M., Ziegler MJ., Wilhelm J., Kolmar H., Wombacher R. *Angew Chem Int Ed Engl*, **59**, 12885-12893 (2020).
- 26) Tawfiq Z., Caiazza NC., Kambourakis S., Matsuda Y., Griffin B., Lippmeier JC., Mendelsohn BA. *ACS Omega*, **5**, 7193-7200 (2020).
- 27) Matsuda Y., Mendelsohn BA. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **69**, 976-983 (2021).
- 28) Yamazaki S., Shikida N., Takahashi K., Matsuda Y., Inoue K., Shimbo K., Mihara Y. *Bioorg Med Chem Lett*, **51**, 128360 (2021).
- 29) Yamazaki S., Inoue K., Mihara Y., Y. M. *Chemistry Select*, **8**, e202204706 (2023).
- 30) Yamazaki S., Ito K., Aoki T., Arashida N., Watanabe T., Fujii T., Matsuda Y. *Biochemistry*, **63**, 644-650 (2024).
- 31) Yamazaki S., Takahashi K., Matsuda Y. *Anal Sci*, (2024).
- 32) Yamazaki S., Matsuda Y. *ChemistrySelect*, **7**, (2022).
- 33) Hadjabelhafid-Parisien A., Bitsch S., Macarron Palacios A., Deweid L., Kolmar H., Pelletier JN. *RSC Adv*, **12**, 33510-33515 (2022).
- 34) Spycher PR., Amann CA., Wehrmuller JE., Hurwitz DR., Kreis O., Messmer D., Ritler A., Kuchler A., Blanc A., Behe M., Walde P., Schibli R. *Chembiochem*, **18**, 1923-1927 (2017).

- 35) Seki T., Yamada K., Ooba Y., Fujii T., Narita T., Nakayama A., Kitahara Y., Mendelsohn BA., Matsuda Y., Okuzumi T. *Front Biosci (Landmark Ed)*, **27**, 234 (2022).
- 36) Baalman M., Best M., Wombacher R. *Methods Mol Biol*, **1728**, 365-387 (2018).
- 37) Plaks JG., Kaar JL. *Methods Mol Biol*, **2012**, 279-297 (2019).
- 38) Rashidian M., Dozier JK., Distefano MD. *Bioconjug Chem*, **24**, 1277-1294 (2013).
- 39) Fujii T., Ito K., Takahashi K., Aoki T., Takasugi R., Seki T., Iwai Y., Watanabe T., Hiramata R., Tsumura R., Fuchigami H., Yasunaga M., Matsuda Y. *ACS Med Chem Lett*, **14**, 1767-1773 (2023).
- 40) Matsuda Y., Seki T., Yamada K., Ooba Y., Takahashi K., Fujii T., Kawaguchi S., Narita T., Nakayama A., Kitahara Y., Mendelsohn BA., Okuzumi T. *Mol Pharm*, **18**, 4058-4066 (2021).
- 41) Cronan JE., Zhao X., Jiang Y. *Adv Microb Physiol*, **50**, 103-146 (2005).
- 42) Fairbanks AJ. *Chem Soc Rev*, **46**, 5128-5146 (2017).
- 43) Shikida N., Yamazaki S., Takahashi K., Matsuda Y., Shimbo K. *Anal Bioanal Chem*, **415**, 6461-6469 (2023).
- 44) Qian L., Lin X., Gao X., Khan RU., Liao JY., Du S., Ge J., Zeng S., Yao SQ. *Chem Rev*, **123**, 7782-7853 (2023).
- 45) Conilh L., Sadilkova L., Viricel W., Dumontet C. *J Hematol Oncol*, **16**, 3 (2023).
- 46) Fujii T., Matsuda Y. *Expert Opin Biol Ther*, **23**, 1053-1065 (2023).
- 47) Chen L., Wang L., Shion H., Yu C., Yu YQ., Zhu L., Li M., Chen W., Gao K. *MAbs*, **8**, 1210-1223 (2016).
- 48) Mohamed HE., Mohamed AA., Al-Ghobashy MA., Fathalla FA., Abbas SS. *J Pharm Biomed Anal*, **150**, 268-277 (2018).
- 49) Fujii T., Reiling C., Quinn C., Kliman M., Mendelsohn BA., Matsuda Y. *Explor Target Antitumor Ther*, **2**, 576-585 (2021).
- 50) Matsuda Y., Kliman M., Mendelsohn BA. *J Am Soc Mass Spectrom*, **31**, 1706-1712 (2020).
- 51) Doronina SO., Toki BE., Torgov MY., Mendelsohn BA., Cervený CG., Chace DF., DeBlanc RL., Gearing RP., Bovee TD., Siegall CB., Francisco JA., Wahl AF., Meyer DL., Senter PD. *Nat Biotechnol*, **21**, 778-784 (2003).
- 52) Matsuda Y., Yamada K., Okuzumi T., Mendelsohn BA. *Organic Process Research & Development*, **23**, 2647-2654 (2019).
- 53) Fuchigami H., Manabe S., Yasunaga M., Matsumura Y. *Sci Rep*, **8**, 14211

- (2018).
- 54) Matsuda Y., Robles V., Malinao MC., Song J., Mendelsohn BA. *Anal Chem*, **91**, 12724-12732 (2019).
 - 55) Matsuda Y., Kliman M., Mendelsohn BA. *J Am Soc Mass Spectrom*, (2020).
 - 56) Tawfiq Z., Matsuda Y., Alfonso MJ., Clancy C., Robles V., Leung M., Mendelsohn BA. *Anal Sci*, **36**, 871-875 (2020).
 - 57) Xu Y., Jiang G., Tran C., Li X., Heibeck TH., Masikat MR., Cai Q., Steiner AR., Sato AK., Hallam TJ., Yin G. *Organic Process Research & Development*, **20**, 1034-1043 (2016).
 - 58) Chen TH., Yang Y., Zhang Z., Fu C., Zhang Q., Williams JD., Wirth MJ. *Anal Chem*, **91**, 2805-2812 (2019).
 - 59) Matsuda Y., Leung M., Tawfiq Z., Fujii T., Mendelsohn BA. *Anal Sci*, **37**, 1171-1176 (2021).
 - 60) Debets MF., van Berkel SS., Dommerholt J., Dirks AT., Rutjes FP., van Delft FL. *Acc Chem Res*, **44**, 805-815 (2011).
 - 61) Sadekar S., Figueroa I., Tabrizi M. *AAPS J*, **17**, 828-836 (2015).
 - 62) Stone GW., Grines CL., Cox DA., Garcia E., Tchong JE., Griffin JJ., Guagliumi G., Stuckey T., Turco M., Carroll JD., Rutherford BD., Lansky AJ., Controlled A., Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications I. *N Engl J Med*, **346**, 957-966 (2002).
 - 63) Bondarenko I., Gladkov OA., Elsaesser R., Buchner A., Bias P. *BMC Cancer*, **13**, 386 (2013).
 - 64) van Berkel SS., van Delft FL. *Drug Discov Today Technol*, **30**, 3-10 (2018).
 - 65) Matsuda Y., Chakrabarti A., Takahashi K., Yamada K., Nakata K., Okuzumi T., Mendelsohn BA. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **1177**, 122753 (2021).
 - 66) Matsuda Y., Tawfiq Z., Leung M., Mendelsohn BA. *ChemistrySelect*, **5**, 8435-8439 (2020).
 - 67) Nadkarni DV., Jiang Q., Friese O., Bazhina N., Meng H., Guo J., Kutlik R., Borgmeyer J. *Organic Process Research & Development*, **22**, 286-295 (2018).
 - 68) Yamazaki S., Matsuda Y. *ChemistrySelect*, **8**, (2023).
 - 69) Plaks JG., Falatach R., Kastantin M., Berberich JA., Kaar JL. *Bioconjug Chem*, **26**, 1104-1112 (2015).
 - 70) Pei X., Luo Z., Qiao L., Xiao Q., Zhang P., Wang A., Sheldon RA. *Chem Soc Rev*, **51**, 7281-7304 (2022).
 - 71) Nakahara Y., Mendelsohn BA., Matsuda Y. *Organic Process Research & Development*, **26**, 2766-2770 (2022).

- 72) Wu H., Cao D., Liu T., Zhao J., Hu X., Li N. *PLoS One*, **10**, e0146032 (2015).
- 73) Lescar J., Souchon H., Alzari PM. *Protein Sci*, **3**, 788-798 (1994).
- 74) Da Silva M., Beauclercq S., Harichaux G., Labas V., Guyot N., Gautron J., Nys Y., Rehault-Godbert S. *Biol Reprod*, **93**, 71 (2015).
- 75) Giansanti F., Leboffe L., Angelucci F., Antonini G. *Nutrients*, **7**, 9105-9115 (2015).
- 76) Fologea D., Ledden B., McNabb DS., Li J. *Appl Phys Lett*, **91**, 539011-539013 (2007).
- 77) Belinskaia DA., Voronina PA., Batalova AA., Goncharov NV. *Encyclopedia*, **1**, 65-75 (2020).
- 78) Mercadante D., Melton LD., Norris GE., Loo TS., Williams MA., Dobson RC., Jameson GB. *Biophys J*, **103**, 303-312 (2012).
- 79) Noinaj N., Easley NC., Oke M., Mizuno N., Gumbart J., Boura E., Steere AN., Zak O., Aisen P., Tajkhorshid E., Evans RW., Gorringer AR., Mason AB., Steven AC., Buchanan SK. *Nature*, **483**, 53-58 (2012).
- 80) Nakahara Y., Kawaguchi T., Matsuda Y., Endo Y., Date M., Takahashi K., Kato K., Okasora T., Ejima D., Nagaki A. *Langmuir*, **40**, 8483-8492 (2024).
- 81) Shikida N., Yamazaki S., Takahashi K., Matsuda Y., Shimbo K. *Anal Bioanal Chem*, (2023).
- 82) 福原直志. 奈良先端大学大学院 情報科学研究科 情報生命科学専攻 修士論文, (2004).
- 83) Watanabe T., Fujii T., Stofleth J., Takasugi R., Takahashi K., Matsuda Y. *Org. Process Res. Dev.*, **27**, 1136–1143 (2023).
- 84) Duvall JR., Thomas JD., Bukhalid RA., Catcott KC., Bentley KW., Collins SD., Eitas T., Jones BD., Kelleher EW., Lancaster K., Protopopova M., Ray SS., Ter-Ovanesyan E., Xu L., Yang L., Zurita J., Damelin M., Toader D., Lowinger TB. *J Med Chem*, **66**, 10715-10733 (2023).
- 85) Watanabe T., Fujii T., Stofleth JT., Takasugi R., Takahashi K., Matsuda Y. *Organic Process Research & Development*, (2023).
- 86) Duvall JR., Thomas JD., Bukhalid RA., Catcott KC., Bentley KW., Collins SD., Eitas T., Jones BD., Kelleher EW., Lancaster K., Protopopova M., Ray SS., Ter-Ovanesyan E., Xu L., Yang L., Zurita J., Damelin M., Toader D., Lowinger TB. *J Med Chem*, (2023).
- 87) Matsuda Y., Endo Y., Saikawa Y., Nakata M. *J Org Chem*, **76**, 6258-6263 (2011).
- 88) Cheng-Sanchez I., Moya-Utrera F., Porrás-Alcalá C., López-Romero JM., Sarabia F. *Mar Drugs*, **20**, (2022).

- 89) Endo Y., Nakahara Y., Shiroma R., Takimoto K., Matsuda Y. *Organic Process Research & Development*, (2024).