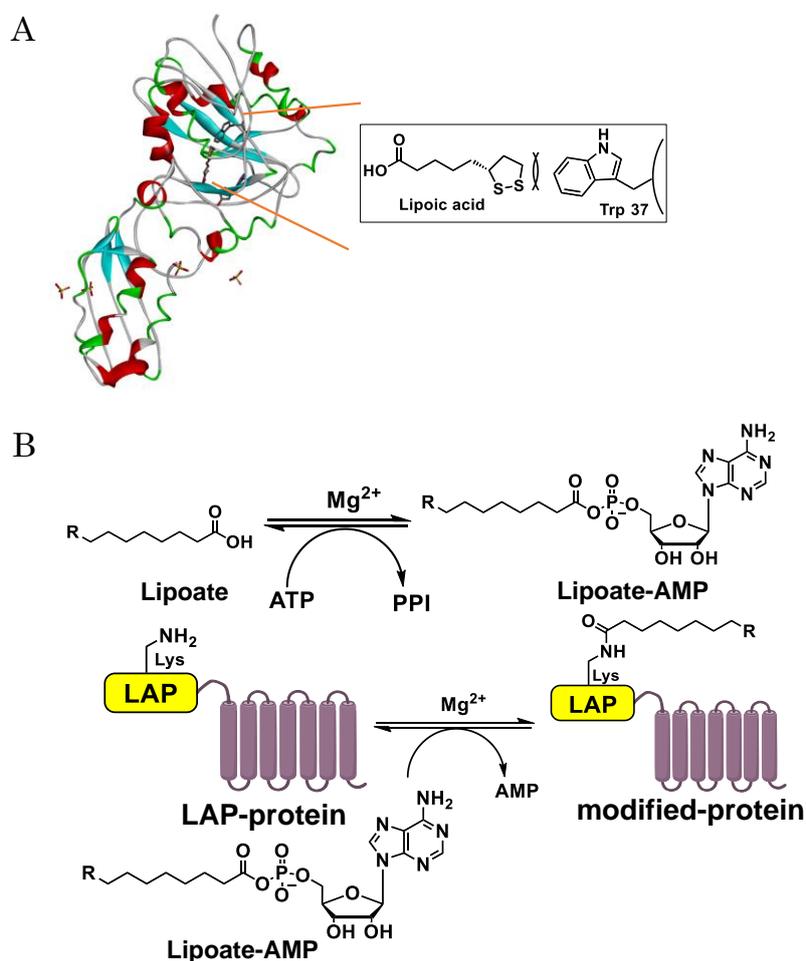


氏名（本籍）	やまざき しゅんすけ 山崎 俊介（神奈川県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 390 号
学位授与の日付	令和 6 年 7 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	リポ酸リガーゼ A を用いる抗体薬物複合体の作製法の開発と種々のタンパク質修飾への応用
論文審査委員	（主査）教授 袴田 秀樹 教授 柳田 顕郎 教授 井上 勝央 教授 三島 正規

## 論文内容の要旨

バイオコンジュゲーションは過去 20 年にわたり、タンパク質や細胞を選択的に修飾または標識する技術として、バイオ医薬品開発における重要な手法となってきた。従来から用いられてきた手法の一つは化学結合法であり、バイオコンジュゲートの製法として最も一般的である。実際に、抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate、以降 ADC）のうち米国食品医薬品局（FDA）が承認した ADC は全てこの手法を用いている（2024 年 3 月現在）。これら ADC の製造では抗体中のジスルフィド結合を還元し、遊離したチオールとの複合体化などが用いられる。しかし、抗体の安定性の低下や副生成物の形成を避けるために慎重な反応制御が必要となる。その他の手法として、タンパク質へ非天然アミノ酸残基などのタグを導入し、クリックケミストリーなどの生体直交化学で機能性分子を付加するものが報告されている。非天然アミノ酸残基以外のタグの導入としては、酵素反応の認識モチーフ（タグ）を目的タンパク質に導入し、そのタグへの酵素反応によりバイオコンジュゲートを生成する酵素結合法も着目されている。例えば、Transglutaminase や Sortase を用いる手法などが特に注目されているが、タグの導入は煩雑であり、タンパク質の機能を損なうリスクを伴う。タグ無しでの結合が可能になれば、このリスクを減少させ、より簡便な修飾が可能になる。しかし、これまでにタグ無しでの酵素反応を行った例は少ない。そこで本研究では、基質特異性が広い酵素として知られるリポ酸リガーゼ A（Lipoate ligase A、以降 LplA、Fig. 1A）のバイオコンジュゲーション分野への応用可能性に着目した。LplA は、13 残基からなる LplA 認識ペプチド（LAP 配列：GFEIDKVWYDLDA）のリジン残基（配列中下線）へリポ酸などの脂肪酸（オクタン酸）を共有結合させる反応を触媒する（Fig. 1B）。この反応は ATP 依存的に進行し、生体反応と同様の温和

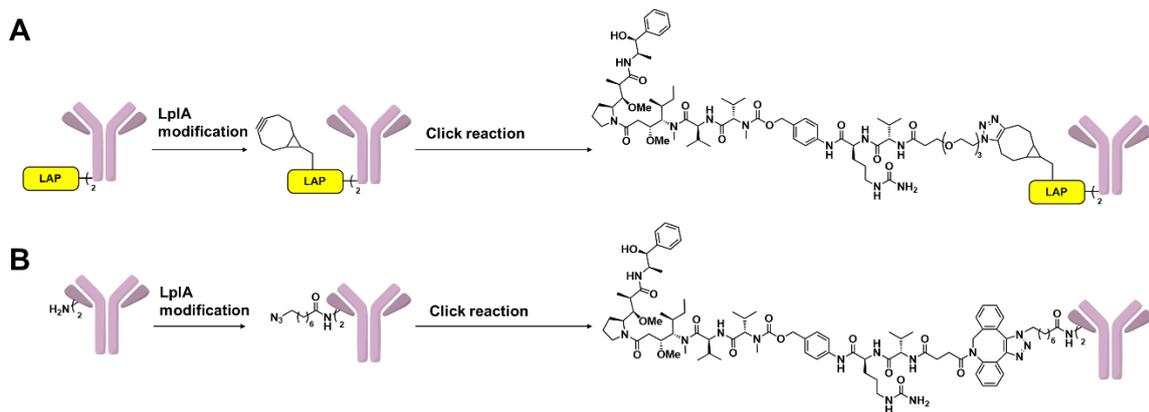
な条件で進行する。LAP 配列を抗体などのバイオ医薬品に導入し、機能性分子を付加する検討も報告されており、ADC の製法への応用可能性も高いと考えられる。LAP 配列についてはある程度の許容性が認められており、アミノ酸置換があっても LplA の反応は進行する。そこで、LAP 配列の無い、タグ無し抗体への LplA による修飾が可能ではないかと仮説を立て、検討を開始した。前提として、ADC を始めとするバイオ医薬品の評価において、分析法が課題となる場合が多い。本研究では、まず、アジド基を有するオクタン酸を基質とし、蛍光標識した環状アルキンとのクリック反応により抗体-蛍光分子コンジュゲートを調製し、蛍光分析による修飾リジン残基の定量法を開発した。本法による評価の結果、タグ無し抗体のリジン残基へのオクタン酸の修飾反応が進行することを確認した。さらに、pH や ATP 濃度などの条件を検討し、オクタン酸の修飾量が最大となる反応条件を決定できた。



**Fig. 1.** Structure and two-step reaction of LplA.

A) Crystal structure of LplA-Mg-AMP complex (PDB: 3A7R). B) Two-step reaction of LplA. Step1 (top): Synthesis reaction of lipoic acid-AMP. Step2 (bottom): Modification reaction to LAP fusion protein.

続いて、蛍光分子の代替として低分子医薬品（ペイロード）とのバイオコンジュゲート（実際の ADC）を調製した（**Fig. 2**）。それに伴い、Drug Antibody Ratio (DAR) を算出するために、蛍光を用いない定量法を新たに開発する必要があった。各種検討の結果、質量分析（LC-Q-TOF MS）および分離分析（HPLC-PDA）の組み合わせにより、DAR の算出が可能であることを見出した。さらに、ADC の特性評価として細胞毒性試験による生物活性評価、血漿中の安定性の確認、Biacore を用いる Fc 受容体（FcRn）との相互作用の解析を行い、ADC としての基礎特性を評価できた。



**Fig. 2.** Comparison of LplA reactions for ADC synthesis.

A) ADC synthesis by LplA through LAP-tag (previous method). B) ADC synthesis by LplA without a tag (this study). Trastuzumab was used as an antibody and monomethyl auristatin E (MMAE) was used as a payload.

ここまでは抗体をタンパク質のモデル基質として、LplA による酵素的修飾反応を検討した。一方で、市場の拡大が望めるバイオ医薬品の中では、抗体以外のタンパク質コンジュゲートが多く登場している。例えば、バイオ医薬品の lipegfilgrastim はタンパク質であるヒト G-CSF に酵素を用いる修飾反応でポリエチレングリコール（PEG）を導入している。このように酵素は抗体修飾以外にも応用の可能性を有しているが、基質特異性が高いことが課題であった。そのため、多くの基質に汎用的に使えるコンジュゲーション法が求められていた。そこでタンパク質修飾法として、LplA を用いる酵素結合法に着目した。LplA は比較的低い基質特異性を示しているため、冒頭で述べたように基質タンパク質へタグを導入することが酵素結合法において一般的な中、LplA であればタグ無しでタンパク質への修飾を実現する可能性がある。この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を修飾した（**Table 1**）。タンパク質の修飾率を求めるため、SDS-ポリアクリドアミドゲル電気泳動法に加えて HPLC の活用を検討した。その結果、ポリフェニルレジンカラムを用いる HPLC-PDA の汎用性が高いことを見出し、蛍光分子の修飾率を決定できた。さらに、溶媒露出表面積(solvent-accessible surface area、以下 SASA)分析により、LplA による修飾

は、修飾されるリジン残基への LplA のアクセシビリティに依存する可能性を見出した。

**Table 1.** Number of modified fluorescent molecules by LplA and lysine residues showing high SASA values in substrate proteins.

	Substrate protein	Number of fluorescent molecule modifications per protein molecule	Number of lysine residue with high SASA value (>160)
1	Ovalbumin	0.77	3
2	Ovotransferrin	0.50	7
3	Bovine serum albumin	0.93	16
4	Human serum albumin	3.0	6
5	Egg-Lysozyme	0.0030	0
6	Human-Lysozyme	0.0020	0
7	Beta-lactoglobulin	0.092	6
8	Transferrin	0.27	7

The number of fluorescent molecule modifications was calculated based on the amount of labeling with the fluorescent molecule Cy3.

本研究では、酵素結合法によるタグ無しでのバイオコンジュゲートの作製について検討し、LplA の酵素結合法の基礎検討と生成物の分析法の開発を行った。抗体をモデル分子として ADC を調製し、その基礎特性を評価することができた。さらに、抗体以外の種々のタンパク質へも LplA は活用可能であることを示した。堅牢で信頼性の高いプロセスを確立するためには、LplA の基質選択性の不完全さなど、克服すべき課題がまだ存在するものの、近年ますます広がりを見せるバイオ医薬品分野の分析評価に関する新たな知見を与えたと考えられる。

#### 【研究結果の掲載誌】

- 1) [S. Yamazaki](#), K. Inoue, Y. Mihara, Y. Matsuda, *ChemistrySelect*, 8 (9) e202204706 (2023).
- 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*, in press (2024). DOI: 10.1007/s44211-024-00534-6

## 【論文審査の結果の要旨】

近年の創薬モダリティの多様化に伴い、生体高分子に他の分子を共有結合させて機能などを付与、或いは改変するアプローチ（バイオコンジュゲーション、化学修飾）が注目されている。本法の代表的な適用例として抗体薬物複合体があり、適切なリンカーを介して抗体に薬物（ペイロード）を結合させた幾つかのバイオ医薬品が承認、臨床応用されている。リンカーの結合には、抗体のジスルフィド結合を部分的に還元したチオールや、リジンの $\epsilon$ -アミノ基が用いられる。しかし、反応制御と生成物の分析の難度が高く、ペイロードの導入部位や導入数の不均一性などが問題となっている。本研究は、位置選択的なタンパク質修飾法の開発を目的とし、リンカーの導入に酵素（リポ酸リガーゼA）を利用し、抗体薬物複合体の作製とその特性評価、更に、抗体以外の種々のタンパク質の修飾へと応用した内容で、3章から構成されている。

第1章では、リポ酸リガーゼAの広い基質特異性に着目し、酵素の認識配列（タグ）を導入していないタグ無しの抗体へのリンカーの結合を発想した。リコンビナントのリポ酸リガーゼAを得た後、抗HER2ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブを基質とし、 $Mg^{2+}$ とATPの存在下でリンカーの8-アジドオクタン酸と反応させた。反応後の溶液にジベンゾシクロオクチン（DBCO）-Cy3を加え、アジド基とクリック反応させた。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ゲルの蛍光イメージングを行い、トラスツズマブ-Cy3が合成できたことを示した。以上から、リポ酸リガーゼAはタグ無しの抗体を基質として認識し、リンカーの8-アジドオクタン酸を結合できることを明らかにした。

第2章では、第1章で用いたトラスツズマブに加え、マウスーヒトキメラ型抗CD20モノクローナル抗体のリツキシマブに対し、リポ酸リガーゼAを用いて8-アジドオクタン酸を結合させた。これらにDBCO-VA-PAB-MMAE（モノメチルアウリスタチンE）をクリック反応させ、抗体薬物複合体（トラスツズマブ-MMAEとリツキシマブ-MMAE）を合成した。液体クロマトグラフィー-四重極飛行時間型質量分析（LC-QTOFMS）とUV検出高速液体クロマトグラフィー（HPLC-UV）による薬物抗体比（DAR）の解析法を開発し、主にHPLC-UVの結果からトラスツズマブ-MMAEとリツキシマブ-MMAEともに、DAR=2を主体とすることを明らかにした。更に、HER2陽性細胞に対する毒性試験を行い、トラスツズマブ-MMAEは細胞選択的な毒性を示すこと、血漿中安定性試験ではヒト血漿中で4日間安定であること、表面プラズモン共鳴によるヒト胎児性Fc受容体との親和性は、非修飾のトラスツズマブとトラスツズマブ-MMAEで同等であることを示し、合成した抗体薬物複合体の種々の特性を評価することができた。

第3章では、リポ酸リガーゼAを用いるタグ無しのタンパク質修飾の適用拡大を目的とし、ヒトリゾチーム、卵白リゾチーム、オボアルブミン、オボトランスフェリン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、トランスフェリンを基質として選択した。これらに、リポ酸リガーゼAで8-アジドオクタン酸を結合させ、DBCO-Cy3とクリック反応してCy3修飾タンパク質を合成した。多波長検出HPLCによってCy3修飾率を求めたところ、ヒト血清アルブミン1分子に約3分子のCy3、ウシ血清アルブミン1分子には約1分子のCy3が導入されていることを示した。各タンパク質の溶媒露出表面積（SASA）を求めると、露出度の高いリジン残基とその周辺アミノ酸残基のSASA値と電荷などが、リポ酸リガーゼAを用いるタグ無しのタンパク質修飾に関連し

ている可能性を示した。以上から、本研究で開発したタンパク質修飾法は抗体以外へのタンパク質へも適用可能であることを実証した。

本論文では、リポ酸リガーゼ A の基質特異性の広さを巧みに活用し、タグの導入をせずに、位置選択的にリンカーを抗体に共有結合（アミド結合）できることを発見した。更に、トラスツズマブとリツキシマブを用いて、抗体薬物複合体の作製に応用できることを示した。加えて、他のタンパク質の特定のリジン残基の修飾も可能であることを示し、バイオコンジュゲーション分野への展開も期待できる。以上から、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものであると判断する。