

# 抗体部位特異的RI標識技術

日本メジフィジックス株式会社

創薬研究所 中田 徳仁

事業開発部 正山 祥生\*

## はじめに

抗体医薬品の開発では候補となる抗体を選定するために、抗体を放射性核種で標識することで抗体の薬物動態や薬力学的作用を評価する手法が汎用されている。その際<sup>123</sup>Iなどの放射性核種を直接導入する場合と、キレーターを抗体に導入し、後から<sup>89</sup>Zrや<sup>111</sup>Inなどの放射性金属核種で標識する場合がある。いずれにおいても、その導入法は抗体のアミノ酸残基などを介した化学的な導入であり、その導入部位や導入数を制御することが困難であるため、薬物動態や薬力学的作用への影響が懸念される。一方で、抗体医薬品の開発の方向性の一つとして抗体を薬剤送達システムに利用する場合がある。抗体薬物複合体（ADC：antibody drug conjugate）を医薬品として開発する場合、化学的に薬物を導入することは品質製造管理の観点から最適ではない。そのため、様々な部位特異的な導入方法が開発されているが、その導入方法が簡便であるとは言いがたいのが現状である。例えば、遺伝子工学的なアプローチにより部位特異的に導入できる抗体の作製や、薬剤の導入に際して酵素処理が必要な手法などがあり、これらの製造工程は煩雑である。そのため、抗体に対して容易に部位特異的に導入できる技術が注目されている。

## 抗体への部位特異的修飾技術

鹿児島大学の伊東 祐二教授は、IgG抗体のFc領域の特定部位に結合するペプチド（IgG結合ペプチド）を見出しており、IgG結合ペプチドを介して種々の化合物を抗体に修飾する新規技術（CCAP法：chemical conjugation by affinity peptide）の開発に成功している<sup>1)</sup>。日本メジフィジックス株式会社は鹿児島大学と共同で、CCAP法を用いた抗体のRI標識法を開発し、部位特異的にRI標識した抗体の製造に成功した。抗体へ

のRI導入はキレートを経して行うため、IgG結合ペプチドの末端にキレートを配位したものを抗体に修飾する（Fig. 1）。IgG結合ペプチドを介したキレーターの導入条件は簡便且つ迅速であり、IgG結合ペプチドは最終的に架橋剤により抗体中の特定のリジン残基と共有結合を形成するため、ペプチドを介したキレーターが容易に外れない仕組みである。なお、IgG結合ペプチドの結合部位は2か所あるため、反応後にはペプチドが1分子または2分子結合したものが含まれるが、イオン交換カラムにより抗体にペプチドが1分子結合した抗体のみを分離・精製することが可能である。

## CCAP法による抗体のRI標識

抗体へのキレート修飾に広く利用されているamine coupling法では、抗体中に存在するリジン残基にランダムにキレートが修飾されるため、抗体の抗原認識部位にもキレートが修飾される可能性がある。それに対してCCAP法では抗体のFc領域特異的にキレートを修飾するため、抗体の抗原認識能に影響がないと考えられる。そこで、標識法の違いによる抗体の結合活性及び特異性への影響を明らかにするために、鹿児島大学伊東教授と共同研究を実施した。

### 1. SPECTイメージングによる抗体の抗原結合活性の*in vivo*評価

HER2高発現細胞株（SK-OV-3）とHER2低発現細胞株（MDA-MB-231）を移植した担癌マウスを用いてSPECTイメージングを実施した。CCAP法又はamine coupling法で<sup>111</sup>In標識した抗体を担癌マウスに投与し、SPECTイメージングを実施した結果をFig. 2に示す。両標識抗体ともに投与後6時間から投与後3日までHER2高発現部位に集積しており、またHER2低発現部位には集積しなかった。本イメージング結果は、定性的に*in vivo*での抗体の特異性を評価しているものであるが、CCAP法又はamine coupling法で<sup>111</sup>In標識した

\* 現所属：研究・事業開発部

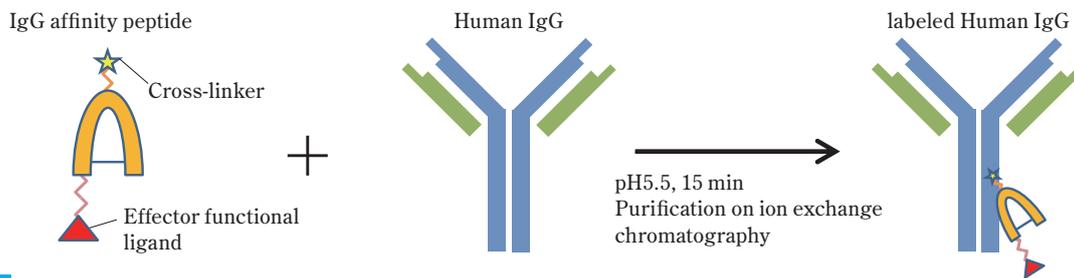
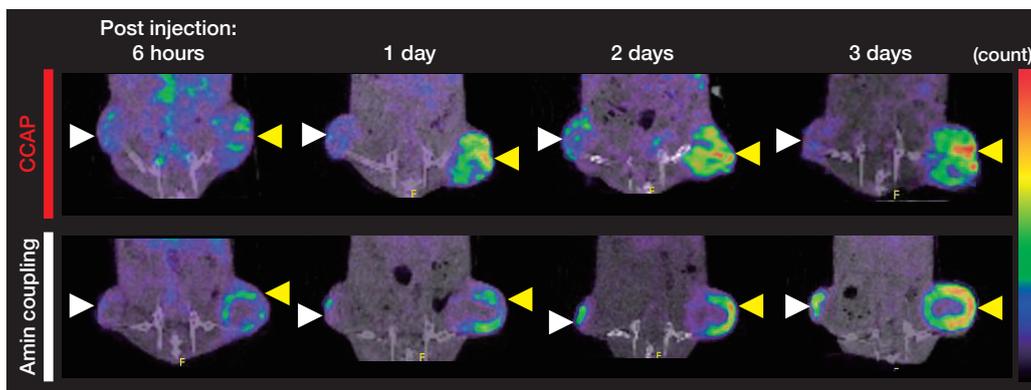


Fig. 1 Overview of CCAP method



All images display on coronal slice images and an optimal scale.  
 yellow arrowhead: HER2 overexpressing tumor  
 white arrowhead: HER2 low-expressing tumor

Fig. 2 SPECT images of different HER2 expression tumors

抗体はいずれも生体内で抗原を特異的に認識していることが示唆された。

## 2. Immunobinding assayによる各種抗体の抗原結合活性のin vitro評価

CCAP法又はamine coupling法で<sup>111</sup>Inを標識した抗体を使用し、各抗体の抗原結合活性を評価した。各標識法で<sup>111</sup>Inを標識した抗体を、HER2高発現細胞株又はHER2低発現細胞株にそれぞれ添加し、各細胞に対して結合した抗体量を放射能によって測定した。細胞に結合した抗体及び遊離した抗体の割合から結合率を算出し、標識法による抗体の結合活性を評価した。各標識法での結合率の結果をTable 1に示す。CCAP法又はamine coupling法で標識した抗体のHER2高発現細胞株への結合率は、それぞれ114.0±1.2%又は48.0±1.0%であり、amine coupling法は抗体の約50%が抗原への結合活性を失っているのに対して、CCAP法は抗原への結合活性にまったく影響を及ぼさなかつ

Table 1 Evaluation of the immunoreactivity

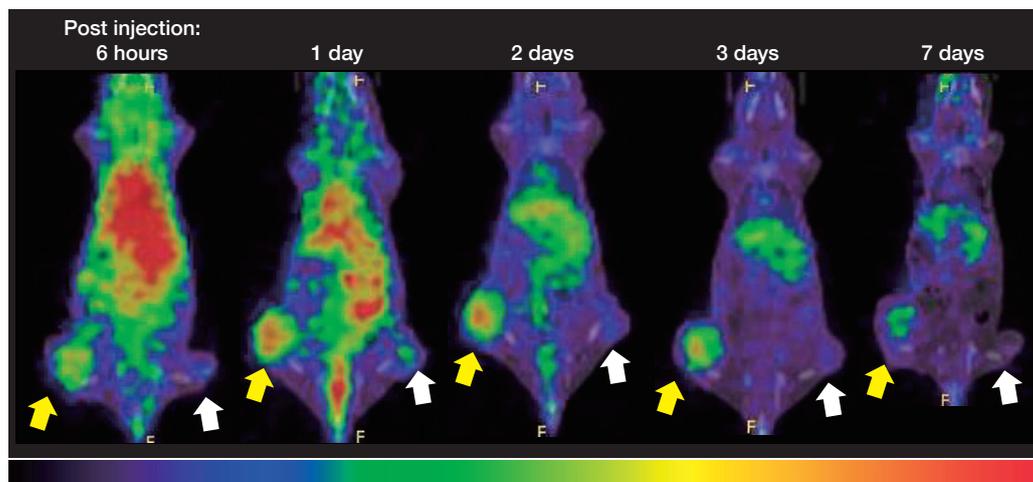
Labeling method	CCAP	Amine coupling
Radiochemical purity	100%	95.8%
Binding ratio (%)	HER2 overexpressing tumor cell	114.0±1.2*
	HER2 low-expressing tumor cell	2.1±0.2

Mean±SD, n = 3, \*p<0.01 (SK-OV-3 vs MDA-MB-231, Student t-test)

た。なお、HER2低発現細胞株に対してはCCAP法及びamine coupling法で標識したどちらの抗体もほぼ結合性を示さないことから、細胞に対する非特異的な結合の影響は見受けられない。

## 3. 標識核種及びキレートによる抗体の抗原特異性への影響

抗体標識には様々な放射性核種が利用されており、



All images display on coronal slice images and an optimal scale.  
 yellow arrowhead: HER2 overexpressing tumor  
 white arrowhead: HER2 low-expressing tumor

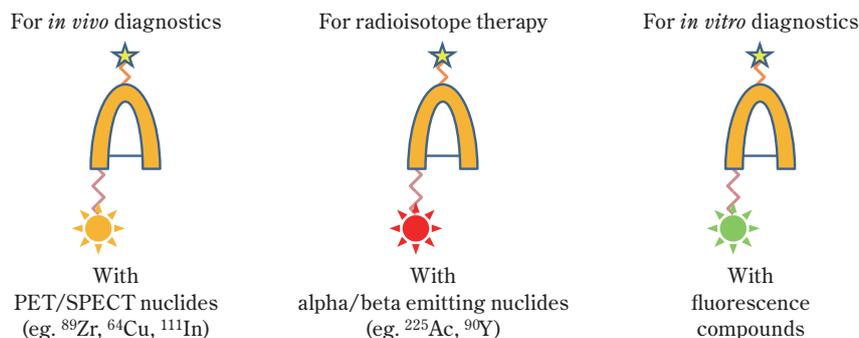
**Fig. 3** PET images of different HER2 expression tumors

標識する核種によって使用するキレートを変更する必要がある。SPECTイメージングにて使用した $^{111}\text{In}$ 標識抗体はキレートにDTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) を使用している。そこで、PET核種である $^{89}\text{Zr}$ 及びそのキレートとしてDFO (deferoxamine) を使用し、CCAP法にて抗体標識を行い、SPECTイメージングと同様の担癌マウスを用いたPETイメージングを実施した。PETイメージングの結果をFig. 3に示す。SPECTイメージングに用いた担癌マウスと同様の担癌マウスを使用して、PETイメージングを実施したところ、投与後6時間から投与後7日までHER2高発現部位に集積が確認でき、またHER2低発現部位には集積が検出されなかった。本結果から放射性核種及び

キレートによらず、*in vivo*での抗体の抗原特異性は保持されていることが示唆された。

#### 抗体標識プラットフォーム技術への応用

CCAP法はIgG結合ペプチドをIgG抗体のFc領域に部位特異的に定量的に結合する技術であり、IgG結合ペプチドの末端に様々な化合物を導入可能である。つまり、抗体の結合能を保持した高品質な修飾抗体の提供が可能な技術である。また、CCAP法の利点として同一の方法で様々な化合物(例: 蛍光物質、高分子 etc.)を導入できるため、条件検討が不要であることも挙げられる。今回紹介したイメージングに使用される放射性核種を標識した抗体以外にもIgG結合ペプチドに付



**Fig. 4** Platform technology by CCAP for antibody labeling

与する物質を変えることで様々な場面に応用できる (Fig. 4)。例えば、PET/SPECTイメージングにより病変部 (特に腫瘍領域) に存在する特定の生体分子の発現量を評価し、正常組織に対して過剰に発現していると判断できれば、治療に使用される放射線核種で抗体を標識し、治療薬として応用することも可能である。また、前述と同様に、術前に腫瘍組織内の生体分子の発現をイメージングで確認できれば、蛍光物質を導入した抗体を用いることで、蛍光ガイド下手術への応用が可能である。

#### おわりに

CCAP法は、抗原認識能を損ねることなく様々な分子を抗体に結合させることが可能となる。また、ペプチドと抗体を定量的に結合させ、均質な修飾抗体を製造することが可能であるため、高品質な修飾抗体医薬品を容易に製造する技術として期待できる。

当社は、CCAP法に関する特許について、放射性核種の標識の範囲で独占的に、蛍光物質の修飾の範囲で非独占的に実施権を獲得している。また、当社は、株式会社住化分析センターと共同で実施している非臨床

PET分子イメージング試験や当社独自で提供するPET治療薬の受託製造といった受託サービスを実施しており、これらの受託サービスで本技術を提供中である。当社は受託サービスを通じて、抗体医薬品を開発する製薬企業等にCCAP技術を提供することで、抗体医薬品の創薬に貢献する。

#### 謝辞

本研究は、鹿児島大学 大学院 理工学研究科 生命化学専攻 伊東 祐二教授と日本メジフィジックス株式会社との共同研究で成し得た成果であり、研究で使用したCCAP法を用いた抗体は、本共同研究先から入手しました。本研究に向けて多くのアドバイスを戴いた共同研究者の皆様に感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) N. Nakata, Y. Shoyama, A. Hayashi, A. Tsujii, S. Hashimoto and Y. Ito, “日本薬物動態学会第31回年会 PROGRAM & ABSTRACTS” (2016), p.227 (P-20).