

研究報告書  
令和3年度：A課題

2023年 6月 6日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設	産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター
住所	茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5-2
研究者氏名	生長 幸之助



(研究課題)

前臨床試験を志向したトリプトファン修飾型抗体-薬物複合体の最適化

令和4年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 【研究目的】

独自開発したトリプトファン (Trp) 選択的修飾法によって製造される均質抗体-薬物複合体 (均質 ADC) の合成法/精製法/物性最適化を行う。これを通じて ADC の安定性を向上させ、前臨床試験 (動物実験) へと繋げて行くことを目的とする。

## 【研究成果】

申請当時、報告済であった Trp 修飾条件 [Oisaki & Kanai, JACS 2016, 138, 10798] においては、活性化剤として窒素酸化物 ( $\text{NO}_x$ )、反応溶媒として 0.1%-1%酢酸水溶液 (pH $\sim$ 3) の使用が必須となっていた。酸性媒体による抗体の変性や凝集などが危惧されるため、より温和な抗体 Trp 修飾法の開発の必要性に迫られた。2019 年に発表した電解 Trp 修飾反応 [Oisaki & Kanai, ChemRxiv, 2019] で使用される試薬コンビネーションから着想を得、反応条件の最適化をさらに進めたところ、N-オキシラジカル型試薬 (ABNO) の代わりに、扱いやすく NMR での純度評価が可能なヒドロキシルアミン型試薬 (ABNOH) を用い、活性化剤として嵩高いオキソアンモニウム試薬 ( $\text{TEMPO}^+\text{BF}_4^-$ ) を使用することで、中性緩衝液系で反応が実施可能な改良プロトコルを新たに見いだした。本プロトコルで抗体 Trp にアジド基を担持させ、引き続き歪み促進アルキン-アジド環化付加 (SPAAC) 反応を行うことで、抗体への Au25 クラスタ修飾を実現し、原著論文として報告した [Oisaki & Kanai, Bioconjugate Chem. 2023, 34, 781]。

このように見出された改良プロトコルを用いる条件、すなわちこれまでの ADC 合成で活用してきた試薬 (ABNOH-MCC-DM1) を、 $\text{TEMPO}^+$  活性化条件で抗体と反応させることで、ADC の合成を試みた。反应用抗体としては、市販品として入手可能な抗体医薬 2 種 (Trastuzumab および Cetuximab) を用いた。ABNOH-MCC-DM1 と  $\text{TEMPO}^+$  の量比 (2 : 1 $\sim$ 1 : 3)、反応濃度 (5 $\sim$ 10  $\mu\text{M}$ )、反応温度 (室温 $\sim$ 37 $^\circ\text{C}$ )、抗体に対する ABNOH-MCC-DM1 試薬の当量 (5 $\sim$ 30 当量)、反応溶媒として活用する緩衝液と pH (クエン酸バッファ・リン酸バッファ・PBS・Tris-HCl バッファ、pH5.0 $\sim$ 8.0) を検討すべき反応パラメータとして設定し、様々な組み合わせで検討したところ、下記のことが明らかとなった。

- ・ ABNOH-MCC-DM1 と  $\text{TEMPO}^+$  の量比は 1 : 1 が最適
- ・ 反応濃度は 10  $\mu\text{M}$ 、温度は室温、反応溶媒は 20mM クエン酸バッファ pH6.0 が最適
- ・ 抗体に対する ABNOH-MCC-DM1 試薬の当量を増やすと、応じて薬物-抗体結合比 (DAR) の値は増加する。試薬当量を変化させることで、DAR=1 $\sim$ 4 程度のサンプルを任意に作り分けることが可能。
- ・ DAR 値が大きくなるほど凝集しやすくなるため、適度な DAR 値を示す ADC の保管安定性試験を様々な保管溶媒と温度 (-20 $\sim$ 37 $^\circ\text{C}$ 、1 週間) で検討したところ、20mM クエン酸バッファ pH6.0 中で、4 $^\circ\text{C}$  にて保管することが最適であった。DAR 値はおおよそ 1 $\sim$ 2 程度が安定性に優れることが分かった。
- ・ 同一条件で比較すると、DAR 値は Trastuzumab > Cetuximab となる。
- ・ 精製に限外ろ過を用いると膜への吸着が起き、回収率が悪化する。ベンチトップ型サイズ排除カラムでの精製を行うことが好ましい。
- ・ 合成された ADC については、がん細胞選択的な毒性を発揮することが確認され、プロトコルの違いによる薬効の本質的差異は見られなかった。

## 【結論】

合成条件検討の結果、適切な DAR 値を有する ADC を、抗体種毎に作り分ける条件を見出すことに成功した。また保管安定性試験により、適切な DAR 値と保管条件を同定し、動物試験に供するためのスケールアップを行う化学基盤が整った。今後は血清処理による化学安定性試験と、担がんマウスへの投与を見据え、改良プロトコルによるスケールアップの検討を行う。