

## 学位論文の要旨

氏名

山田 慧

学位論文題目

親和性ペプチドを利用した抗体の位置選択的な官能基化法

本論文では、高機能型の抗体医薬品を開発することを目標に、親和性ペプチドを利用した抗体部位特異的修飾方法であるCCAP (Chemical Conjugation by Affinity Peptide) 法を改良し、親和性ペプチドが抗体上に残存しない手法であるAJICAP™法を開発した。本論文は、5章からなり、以下各章の内容についてまとめた。

第1章は、研究背景として抗体医薬品の機能や抗体への分子修飾技術、医薬品として実際に応用されている分子修飾抗体の概要と、抗体薬物複合体 (ADC: antibody drug conjugate) の世界での開発状況について記載した。

第2章は、CCAP法の問題点を克服するための手法を立案した。そのコンセプトに基づいて研究を進め、ヒトIgG<sub>1</sub>抗体であるtrastuzumabをモデルとして利用して、ジスルフィド結合を有するリンカーを利用することで修飾に使用したペプチドを抗体上に残さずに、薬剤を連結するためのチオール基を選択的に導入することことに成功した。同時にペプチドマッピングを行い、抗体上Lys246/248に位置選択的に修飾が進行していることを証明した。また、CCAP法では実現できなかったLys248以外のサイトでの修飾について検討を行った。具体的には、Lys288/290およびLys317をProtein A由来のペプチドZ34Cを利用して位置選択的に修飾することに成功した。同様にペプチドマッピングを行い、反応が位置選択的に進行することを示した。

第3章は、第2章で開発した手法の汎用性を確認するため、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>並びにIgG<sub>4</sub>のヒト抗体について検討を行った。その結果、trastuzumabと同様に反応が進行することを示し、ペプチドマッピングにより位置選択性の確認できた。さらに、反応条件や反応効率について考察を行うため、中性条件でのコンジュゲーション実験や加水分解したペプチドのtrastuzumabに対する親和性測定を行った。

第4章では、本研究で開発した手法によりADCを作製し、調製したADCの表面プラズモン共鳴解析による抗原結合性評価および担癌マウスを使った*in vivo*による活性評価を行い、抗体薬物複合体として優位に機能していることを示した。

第5章は、今回開発した修飾方法についてのまとめ、医薬や工業分野への応用における新しい抗体修飾法としての可能性について議論した。

## Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Affinity peptide mediated site-specific functionalization of native antibodies

Name: Kei Yamada

This thesis mainly comprises the improvement of site-specific modification technology of antibody named CCAP (Chemical conjugation by affinity peptide) method to develop peptide traceless labeling to antibodies. This thesis is composed of five chapters and the contents for each chapter were summarized as following.

Chapter 1 described the research background, including the functions of antibody drugs, molecular modification technology of antibodies, developing status of antibody-drug conjugates (ADC: antibody drug conjugate) in the world.

Chapter 2 explained the methodology detail of CCAP and proposed the scheme to solve the problems in CCAP. The research was performed according to the planned concept and was succeeded in the incorporation of reactive thiol into antibodies with site-specific manner using the linker reagent harboring disulfide bridge. Furthermore, the peptide mapping analysis was conducted to determine the modification site. Additionally, the site-specific modifications were tested on sites other than Lys248 used in CCAP, using Z34C peptide derived from Protein A. This approach was succeeded in specific modification of Lys288/290 and Lys317. Also, these modification sites were determined by peptide mapping analysis

In Chapter 3 checked the versatility of these affinity labeling system using human IgG<sub>1,2 and 4</sub>. In each case, the reaction proceeded in site-specific manner which was checked by peptide mapping. Additionally, the reaction was conducted in neutral pH and measured binding affinity of hydrolyzed peptide reagent to trastuzumab for investigating the reaction mechanism.

In Chapter 4, ADC was synthesized by this new optimized technology for the biological evaluation. The activities of the prepared ADC were examined for antigen binding assay on Surface Plasmon resonance and *in vivo* assay using tumor-carrying mice, elucidating its advantageous functions.

Chapter 5 summarized the utilities of the optimized CCAP method and discussed about the possibilities in use of new method for medical and industrial applications.