

令和元年5月9日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08200

研究課題名(和文) DNAアプタマーを分子認識素子とする次世代医薬の革新的臨床分析法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative clinical analytical methods for next-generation drugs using DNA aptamers as molecular recognition elements

研究代表者

轟木 堅一郎 (Todoroki, Kenichiro)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：70341451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNAアプタマーと呼ばれる特殊な立体構造を持つ核酸分子を分子認識素子として用い、種々の抗体医薬に対する簡便かつ正確な血中濃度分析法を開発した。具体的には、抗がん剤ベバシズマブやペルツズマブなど複数の抗体医薬に対して選択的に結合するDNAアプタマーを獲得し、それらを用い、多検体同時分析法であるELAA法、高精度なHPLC分析法であるアプタマーアフィニティー精製-高温逆相LC法を開発した。これらは従来の分析法に比べ簡便さや精度に優れたものであり、臨床分析法として有用であることが実証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗体の機能を利用した抗体医薬ががんや関節リウマチの治療など汎用されているが、抗体医薬の効き目を正しく評価し、適切な治療へとつなげるためには、血中の抗体医薬濃度を正確に測定する必要がある。しかし、血中には抗体医薬と構造の非常によく似た抗体が数多く存在するため、その分析は容易ではなかった。我々はDNAアプタマーと呼ばれる特殊な立体構造を持つ核酸分子を分子認識素子として用い、種々の抗体医薬に対する簡便かつ正確な血中濃度分析法を開発しました。我々の分析法は、新薬やバイオシミラー開発期間の効率化、迅速な薬物治療効果判定や薬物投与計画策定などへの貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed simple and accurate bioanalytical methods for various therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) using a nucleic acid molecule with a special three-dimensional structure called DNA aptamer as a molecular recognition element. Specifically, various DNA aptamers that selectively bind to therapeutic mAbs, such as the anticancer drug bevacizumab and pertuzumab, were obtained, and using them, the ELAA method, a multi-sample simultaneous analysis method, and the aptamer affinity purification - high temperature reversed-phase LC method, a high-precision HPLC analysis method, were developed. These methods are superior to conventional analytical methods in terms of simplicity and accuracy, and it has been verified that they are useful as clinical analytical methods.

研究分野：分析化学

キーワード：抗体医薬 DNAアプタマー バイオアナリシス

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 , CK - 19 ( 共通 )

#### 1 . 研究開始当初の背景

現在、ブロッグバスターの多くが抗体医薬となり、昨年の Infiximab の特許切れを契機としたバイオシミラー開発競争も熾烈になっている。そのため、各製薬企業では医薬品候補物質の前臨床段階における簡便かつ信頼性の高い PK/PD ( 薬物動態/薬力学 ) 解析法に対する要求が非常に高い。一方、臨床現場においても有効治療濃度の維持や投与計画の設定、適正使用などのための治療薬物モニタリング ( TDM ) の必要性が高まっている。

抗体医薬の TDM や PK/PD 解析では、ELISA 法を主とする Ligand Binding Assay ( LBA ) が汎用されている。LBA は高感度かつハイスループットな分析を可能とする反面、交叉反応の可能性や分析精度に問題が生じる場合も多い。バイオシミラー開発における先発品との生物学的同等性評価にも LBA が用いられるが、用いる抗体の質が分析結果を大きく左右する。一方、米国企業などではトリプシン消化-LC/MS/MS によるプロテオミクス的手法による定量法開発が盛んになっているが、高性能の LC/MS/MS が必要であり、分析前に煩雑かつ多段階の前処理操作も必須となる。そのため、従来の LBA 法やトリプシン消化-LC/MS/MS 法に置き換わる、あるいは測定結果を補完する特異性かつ信頼性の高い分析法が望まれてきた。

#### 2 . 研究の目的

本研究課題では、従来の Ligand Binding Assay やトリプシン消化-LC/MS/MS 法に置き換わる、あるいは分析結果を補完できる、抗体医薬および抗体-薬物複合体の簡便かつ高精度な臨床分析法の開発を目的とした。構築した分析法は、最終的にガン患者または関節リウマチ患者の血中薬物濃度分析に適用し、その有用性を実証することとした。本課題の完遂により、解析精度、利便性および可搬性に優れた抗体医薬の新たな臨床分析法が誕生し、新薬やバイオシミラー開発期間の効率化、迅速な薬物治療効果判定や薬物投与計画策定への貢献のみならず、薬剤師の臨床診断への参画をも加速させると期待された。

#### 3 . 研究の方法

具体的には、抗がん剤ペバシズマブやペルツズマブなど複数の抗体医薬に対して選択的に結合する DNA アプタマーを獲得し、それらを用いて多検体同時分析法である ELAA 法、高精度な HPLC 分析法であるアプタマーアフィニティー精製 - 高温逆相 LC 法を開発し、分析法バリデーションの構築、および臨床検体分析へと適用した。

#### 4 . 研究成果

初年度は、我々が見出した抗体医薬 bevacizumab に対する抗イディオタイプ DNA アプタマーを分子認識素子とし、磁気ビーズに固定化するアプタマーアフィニティー精製法を開発した。本精製法と、高温逆相 LC ( HT-RPLC ) - 自然蛍光検出法を組み合わせることで、血中 bevacizumab のバイオアナリシス法を構築した。磁気ビーズへのアプタマー固定化法について検討した結果、磁気ビーズにはストレプトアビジン修飾ビーズを用い、ビオチン修飾 DNA を結合させることとした。アプタマー結合磁気ビーズからのペバシズマブの溶出条件について検討した結果、最適溶出条件として 10 M 尿素と 3 M NaCl 含有溶液を用いたときに最大の回収率を与えた。FDA のバイオアナリシスの LC ガイドラインに則った分析バリデーションを取得した結果、ペバシズマブ添加血漿試料において、 $1 - 50 \mu\text{g/mL}$  の範囲で  $r^2 = 0.9993$  と良好な直線性を示し、 $\text{LOD} = 0.15 \mu\text{g/mL}$ 、 $\text{LOQ} = 0.51 \mu\text{g/mL}$  と十分な感度が得られた。また、日内変動は 2.3% - 5.5%、日間変動は 3.0% - 6.2% 以下といずれも優れた精度を示した。さらに本アフィニティー磁気ビーズは血漿中の IgG のみならず他の IgG 型抗体医薬も認識しなかったことから、本精製法がペバシズマブに対して非常に選択性が高いことが示された。

翌年度は抗体医薬 bevacizumab に対する我々が開発した抗イディオタイプ DNA アプタマーを利用した多検体同時分析法 Enzyme Linked Aptamer Assay ( ELAA ) 法を開発した。本法はアプタマーを固定化した 96 穴プレートに血漿試料を添加して反応させた後、protein A-HRP 複合体の結合に伴う HRP 活性を TMB の吸光度変化としてマイクロプレートリーダーで定量するものである。本法により、血漿中 bevacizumab を  $0.01 - 5 \mu\text{g/mL}$  の範囲で良好な定量性、精度で多検体同時迅速分析可能であった。今回開発した分析法は、血漿中抗体医薬を測定するには十分な感度と優れた定量性を有し、また安価かつ汎用性の高い分析法であることから、バイオシミラー開発や治療効果判定など様々な分野での利用が期待できる。

最終年度は、先に確立した抗体医薬をに対する 2 種類のバイオアナリシス法を他薬剤へと適用拡大すべく、まずは複数の抗体医薬に対して抗イディオタイプ DNA アプタマーの獲得を図った。その結果、HER2 陽性乳がん治療薬である Pertuzumab および CD20 陽性 B 細胞性リンパ腫増殖抑制薬である Rituximab を選択的に認識する抗イディオタイプ DNA アプタマーの獲得に成功した。これらの解離定数 (  $K_d$  ) は 452 nM、14 nM と高親和性であった。現在、他の薬剤に対してもそれぞれで複数のアプタマー候補配列が得られており、現在高親和性配列の導出および配列最適化のための評価を行っている。次に両アプタマーを我々が開発した多検体血中薬物濃度分析法である ELAA 法に適用した結果、Pertuzumab に関しては  $20 \mu\text{g/mL} - 2 \text{mg/mL}$ 、Rituximab に関しては  $500 \text{ng/mL} - 200 \mu\text{g/mL}$  の範囲で良好な直線性が示され、真度、精度ともに FDA の LBA ガイドラインを満たしていた。更にアプタマーアフィニティー精製と高分解能 LC-MS 分析法を組み合わせたバイオアナリシス法の構築を目指し、市販抗体医薬 12 種および抗体薬物複

合体 1 種類について化学還元を行い、生成した軽鎖および重鎖断片を高温逆相 LC により分離したときの溶出挙動に関する調査も行った。その結果、多くの抗体医薬において軽鎖断片を標的とした定量により優れたクロマト分離と定量性が示された。付加糖鎖や Lys バリエーションなどの不均一性が少ない軽鎖断片を分析対象とした抗体医薬のセミインタクトバイオアナリシス法の実施は、汎用されるトリプシン消化-LC-MS/MS 法に比べ精度や選択性に優れた結果を与えうると考えられ、今後臨床適用可能な分析法構築を目指していく。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

- 1) Kenichiro Todoroki, Tatsuki Nakano, Yasuhiro Eda, Kaname Ohyama, Hideki Hayashi, Daiki Tsuji, Jun Zhe Min, Koichi Inoue, Naoki Iwamoto, Atsushi Kawakami, Yukitaka Ueki, Kunihiko Itoh, Toshimasa Toyo'oka, Bioanalysis of bevacizumab and infliximab by high-temperature reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity magnetic purification, *Analytica Chimica Acta* 査読有, 916 巻, 2016 年, 112-119
- 2) Yamada Tomohiro, Mizuno Hajime, MIN Jun Zhe, Toyo'oka Toshimasa, Todoroki Kenichiro, High Sensitivity and Precision High-Temperature Reversed-Phase LC Analysis of Bevacizumab for Intact Bioanalysis of Therapeutic Monoclonal Antibodies, *Chromatography*, 査読有, 39 巻, 2018 年, 21-26
- 3) Yamada Tomohiro, Saito Taro, Shimizu Yutaka, Tsukakoshi Kaori, Hayashi Hideki, Mizuno Hajime, Tsuji Daiki, Yamamoto Keisuke, Itoh Kunihiko, Toyo 'oka Toshimasa, Ikebukuro Kazunori, Todoroki Kenichiro, Anti-Idiotypic DNA Aptamer Affinity Purification-High-Temperature Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Simple, Accurate, and Selective Bioanalysis of Bevacizumab, *Molecules*, 査読有, 24 巻, 2019 年, 857-857
- 4) Yamada Tomohiro, Saito Taro, Hill Yoshia, Shimizu Yutaka, Tsukakoshi Kaori, Mizuno Hajime, Hayashi Hideki, Ikebukuro Kazunori, Toyo'oka Toshimasa, Todoroki Kenichiro, High-Throughput Bioanalysis of Bevacizumab in Human Plasma Based on Enzyme-Linked Aptamer Assay Using Anti-Idiotypic DNA Aptamer, , 査読有, 91 巻, 2019 年, 3125-3130

〔学会発表〕(計 46 件)

- 1) 轟木堅一郎, アフィニティー精製と高温逆相 LC を組み合わせた抗体医薬の血中薬物濃度分析法の開発, 第 76 回分析化学討論会 (招待講演), 2016 年
- 2) 轟木堅一郎, LC を用いた抗体医薬の血中薬物濃度分析, 第 301 回液体クロマトグラフィー研究懇談会 (招待講演), 2016 年
- 3) 轟木堅一郎, 中野達基, 山田朋宏, 林 秀樹, 大山 要, 水野 初, 関 俊哲, 豊岡利正, アフィニティー精製-高温逆相 LC による抗体医薬の血中薬物濃度分析法開発, 第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (招待講演), 2016 年
- 4) Kenichiro Todoroki, Tatsuki Nakano, Hideki Hayashi, Hajime Mizuno, Jun Zhe Min, Toshimasa Toyo'oka, Sensitive bioanalysis of bevacizumab using pre-column and post-column fluorescence derivatization - liquid chromatography after immunoaffinity magnetic purification, XVII International Symposium on Luminescence
- 5) Spectrometry (招待講演), 2016 年
- 6) Kenichiro Todoroki, Tatsuki Nakano, Hideki Hayashi, Hajime Mizuno, Jun Zhe Min, Toshimasa Toyo(oka, Bioanalysis of therapeutic monoclonal antibodies based on affinity purification and high-temperature HPLC, 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (招待講演)(国際学会), 2017 年
- 7) 轟木堅一郎, 抗体医薬のバイオアナリシス法の開発, 日本薬学会第 138 年会 (招待講演), 2018 年
- 8) Kenichiro Todoroki, Bioanalysis of therapeutic monoclonal antibodies based on affinity purification and high-temperature liquid chromatography, 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Sciences, (招待講演)(国際学会), 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：アプタマー及び抗体検出方法  
発明者：池袋一典，齊藤太郎，轟木堅一郎，中野達基，豊岡利正  
権利者：池袋一典，齊藤太郎，轟木堅一郎，中野達基，豊岡利正  
種類：特許  
番号：特開 2018-027024  
取得年：2018 年  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：林 秀樹  
ローマ字氏名：Hayashi Hideki  
所属研究機関名：岐阜薬科大学  
部局名：薬学部  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：00419665

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は，研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため，研究の実施や研究成果の公表等については，国の要請等に基づくものではなく，その研究成果に関する見解や責任は，研究者個人に帰属されます。