

## 医薬価値に優れた機能性変異蛋白質の網羅的作製とその DDS への応用

吉岡靖雄<sup>1)</sup>

## Creation of Functional Muteins Using Phage Libraries for Pharmacoproteomic-based Drug Discovery and Development of DDS

Yasuo YOSHIOKA

Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,  
1-6 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

(Received April 14, 2004)

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) has been expected to be a promising new antitumor agent, but toxic side effects by the systemic administration of TNF- $\alpha$  limit its clinical application. In this study, we attempted to improve the therapeutic potency of TNF- $\alpha$  by using our protein-drug innovation systems. Among phage libraries displaying various mutant TNF- $\alpha$ s, we isolated some lysine-deficient super mutant TNF- $\alpha$ s, typified by mTNF- $\alpha$ -K90R, with higher TNF-receptor affinities and stronger bioactivity *in vitro*, in spite of the importance of lysine residues for trimer formation and receptor binding. mTNF- $\alpha$ -K90R showed more than 10 times stronger *in vivo* antitumor effects and 1.3 times less toxicity than wild-type TNF- $\alpha$  (wTNF- $\alpha$ ). Site-specifically mono-PEGylated mTNF- $\alpha$ -K90R (sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R) at *N*-terminus showed higher *in vitro* bioactivity than unmodified wTNF- $\alpha$ , whereas randomly mono-PEGylated wTNF- $\alpha$  at a lysine residue (ran-PEG-wTNF- $\alpha$ ) had less than 6% of the bioactivity of wTNF- $\alpha$ . The antitumor therapeutic window of sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R was extended by about 5 times, 60 times and 18 times compared with those of mTNF- $\alpha$ -K90R, wTNF- $\alpha$  and ran-PEG-wTNF- $\alpha$ , respectively. sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R may, thus, be a potential systemic anti-tumor therapeutic agent. These data suggested that our fusion protein-drug innovation system composed of a creation system of functional mutant proteins based on phage display technique and a site-specific PEGylation system may open up a new avenue to the optimal protein therapy.

**Key words**—phage display; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; PEGylation; bioconjugation; mutein

## はじめに

新世紀を迎え、ヒトゲノムシーケンス解析が完了し、ポストゲノム戦略としてのプロテオーム創薬への期待が急速に高まっている。この疾病治療に有効な蛋白質を探索・創製しようとするプロテオーム創薬は、昨今の疾患プロテオミクスや構造ゲノミクスの著しい進歩と、これら知見を統括したファーマコ・インフォマティクスが駆動力となり、今後加速度的に進展するものと考えられている。しかし周知のように、生理活性蛋白質は体内安定性に乏しいため、臨床応用の際には大量頻回投与を余儀なくされ、多くの場合、重篤な副作用を招いてしまってい

る。また一般にサイトカインなどは、複数種のレセプターを介して多様な *in vivo* 作用を示すため、目的とする治療作用のみならず副作用をも同時に発現してしまう。そのため、副作用が比較的軽度な顆粒球コロニー刺激因子やエリスロポエチンといったごく一部の例外を除き、ほとんどの生理活性蛋白質の臨床応用はいまだ著しく制限されている。<sup>2,3)</sup> したがってプロテオーム創薬を推進するためには、上述した問題点を克服し得る創薬テクノロジーの確立が不可欠であり、この創薬テクノロジーは蛋白療法の最適化を目指した Drug Delivery System (DDS) にとって最重要項目と位置付けられる (Fig. 1)。

従来から世界的に行われてきた、医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の創製は、Kunkel 法と言った点突然変異法を利用し、種々蛋白質の構造変異体 (アミノ酸置換体) をトライ・アンド・エラーで作製することにより試みられてきたものである。われ

大阪大学薬学研究科薬剤学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

e-mail: y-yoshioka@nihs.go.jp

本総説は、平成 15 年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

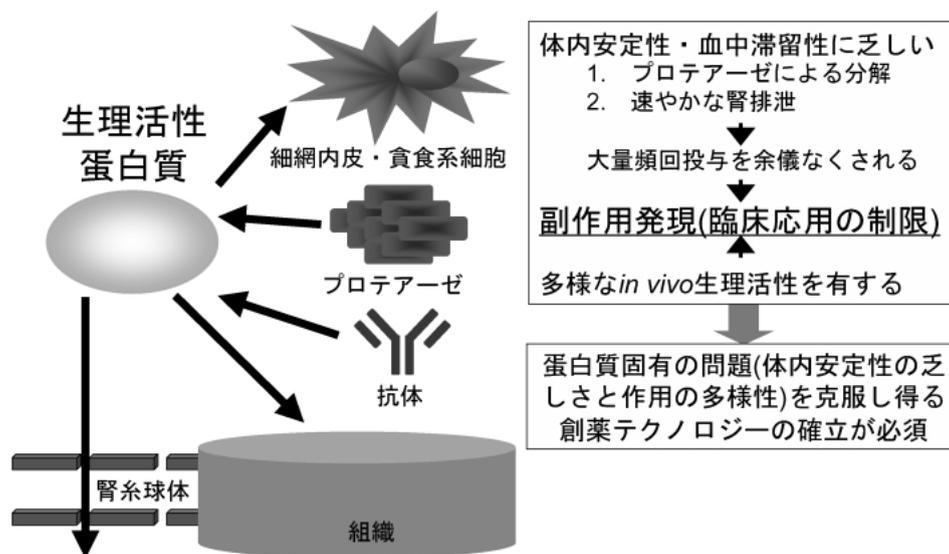


Fig. 1. Problems of Bioactive Proteins

われも、サイトカインやイムノトキシンの体内安定性を改善するため、点突然変異法により蛋白質表面の塩基性アミノ酸を中性、酸性アミノ酸と言った他のアミノ酸へ置換し、蛋白質の表面電荷を低下させることで (Lowering pI 法)、蛋白質の細網内皮系への取り込み回避や腎排泄濾過の抑制を達成し得ること、その結果これら蛋白質の目的治療作用を効率よく向上し得ることを明らかとしてきた。<sup>4)</sup> しかしながら、点突然変異法は膨大な時間、労力を費やすばかりか、作製可能な構造変異体の多様性 (種類) にも限界があるなど、期待通りの機能性人工蛋白質はほとんど得られていない。そのため、効率よく目的の機能性人工蛋白質を設計・創製できる基盤テクノロジーの確立が必須となっている。

一方で水溶性高分子で蛋白質を修飾するバイオコンジュゲーションは、蛋白質の生体内安定性を高め得る最適の DDS と世界的に認識されており、中でもポリエチレングリコール (PEG) を用いたバイオコンジュゲーション (PEGylation) は数多くの蛋白質へ適用されようとしている。<sup>5-7)</sup> このうち、インターフェロン- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) を PEGylation (PEG化) した PEGASYS, PEG-Intron は、C 型肝炎に対する特効薬として臨床に供されている。<sup>6,7)</sup> 本観点からわれわれの研究室ではこれまで蛋白質療法の最適化に叶う DDS の確立を目指し、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) や血小板産生促進因子としてのインターロイキン-6 (IL-6) などをモデル生理活性蛋白質と

して用い、このバイオコンジュゲーションの最適化を図ってきた。<sup>8-15)</sup> その結果、1) 蛋白質の作用メカニズムを考慮し、最適の修飾高分子を選択したうえで、2) 比活性—修飾率 (水溶性高分子導入率)—分子サイズなどの相関を詳細に検討し、最適条件を見出すことにより、*in vitro* における比活性低下は避け得ないものの *in vivo* においては、①蛋白質の生体内安定性や血中滞留性を飛躍的に向上させ得ること、②その生体内挙動 (組織移行性) を制御し得ること、③多様な *in vivo* 作用の中から、目的とする治療作用と副作用の原因と成る作用とを選択分離し、目的作用のみを数百倍にも高め得ることを明らかとしてきた (Fig. 2)。この③の生理活性蛋白質への作用の選択性付与は、体内安定性の向上に伴う投与量の削減や副作用発現組織への移行性低下によることを見出しており、例えば PEG 化 TNF- $\alpha$  や PEG 化 IL-6 の場合、副作用を増幅することなく目的とする抗腫瘍効果や血小板産生促進効果が飛躍的に選択増強されることを認めている。

しかし依然として、バイオコンジュゲーションの成功例は極めて少ない。この最大の原因は、活性発現部位への水溶性高分子導入による致命的な比活性低下と、バイオコンジュゲート化蛋白質の分子的・機能的不均一性にある。これまで汎用されてきたバイオコンジュゲーション法は、リジン  $\epsilon$  アミノ基及び N 末端  $\alpha$  アミノ基をターゲットとし、この位置に水溶性高分子を結合させようとしたものである。

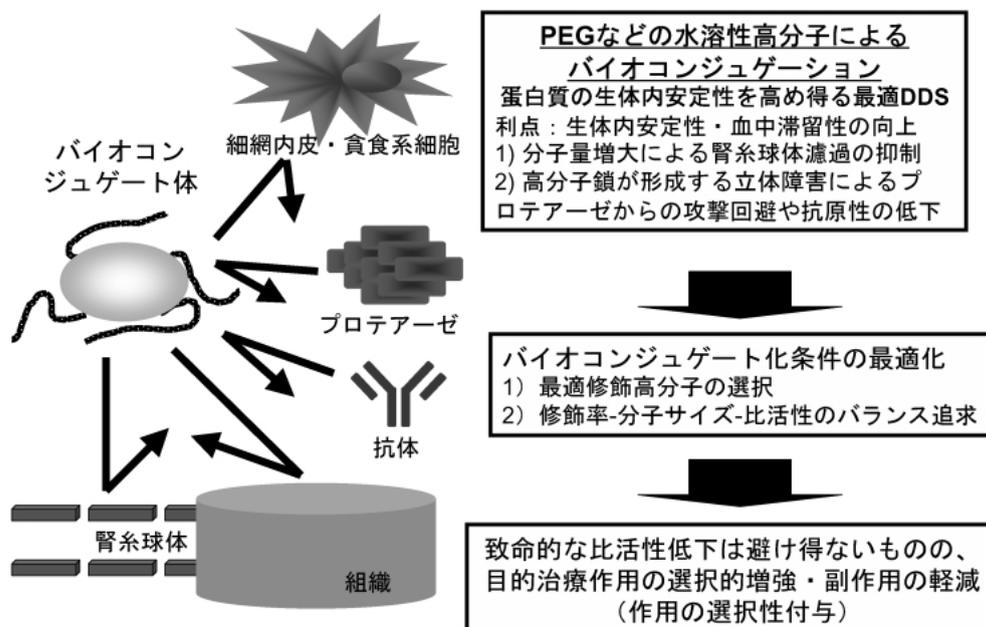


Fig. 2. Characteristics of Bioconjugated Bioactive Proteins

この方法は、反応条件が緩和なうえ、高収率でバイオコンジュゲート体を得られる。しかし、修飾高分子のアミノ基への結合はランダムでしかない。ほとんどの蛋白質においてリジン残基は活性発現に必須の役割を担っている。そのため、これらリジン残基への高分子導入により、必然的に著しい比活性低下を招いてしまう。またランダムに修飾高分子が導入されるため、得られたバイオコンジュゲート体は、蛋白質の様々な部位に種々異なった個数の修飾高分子が結合した、分子的に不均一な混合物となる。その結果、バイオコンジュゲート体は比活性や体内挙動、安定性などの機能面でも不均一な集団になってしまう。事実、市販されている PEG 化 IFN- $\alpha$  (PEGASYS) ですら、その活性は未修飾体の 10% 以下にまで低下しており、不均一な分子集団であることが知られている。<sup>16,17)</sup> そのため、21 世紀型創薬としてプロテオーム創薬を推進するためには、部位特異的に効率よく高分子導入でき、高い比活性を有するバイオコンジュゲート体を創製できるテクノロジーの確立が待望されている。この点われわれは最近、ファージ表面提示法を駆使することにより、活性を完全に保持したまま、蛋白質中のすべてのリジン残基を他のアミノ酸へ一挙に置換したリジン欠損体である機能性人工蛋白質を迅速創製できる基盤テクノロジーを先駆けて構築した。<sup>15)</sup> またこの活性を

完全に保持したリジン欠損体の N 末端アミノ基への部位特異的 PEGylation が、上述したバイオコンジュゲーションの問題点を一挙に解決できるテクノロジーとなり得ることを提唱した。

本論文では、蛋白療法の最適化に叶う「プロテオーム創薬のための DDS 基盤テクノロジー」の確立を最終目的に、夢の抗癌剤として期待されている TNF- $\alpha$  をモデルとして用い、上述の両テクノロジーのシステム・アップ（最適化）を図った。すなわち wild-type TNF- $\alpha$  (wTNF- $\alpha$ ) よりも比活性が増強し、かつリジン残基が完全に他のアミノ酸に置換された医薬価値に優れた Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  の迅速創製とその有用性評価を行うことを第一の目的とした。ついで、得られた Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  に対する部位特異的 PEGylation の詳細な条件検討を通じて、その最適化を図り、癌に対する治療域が飛躍的に拡大した機能化 TNF- $\alpha$  の作製を試みた (Fig. 3)。

### 1. 比活性が増強された Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$ の創製とその評価

従来から蛋白療法の最適化に向け、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた機能性人工蛋白質の創製が、Kunkel 法などの点突然変異法により精力的に試みられてきた。しかし点突然変異法では、トライ・アンド・エラーで生理活性蛋白質の構成ア

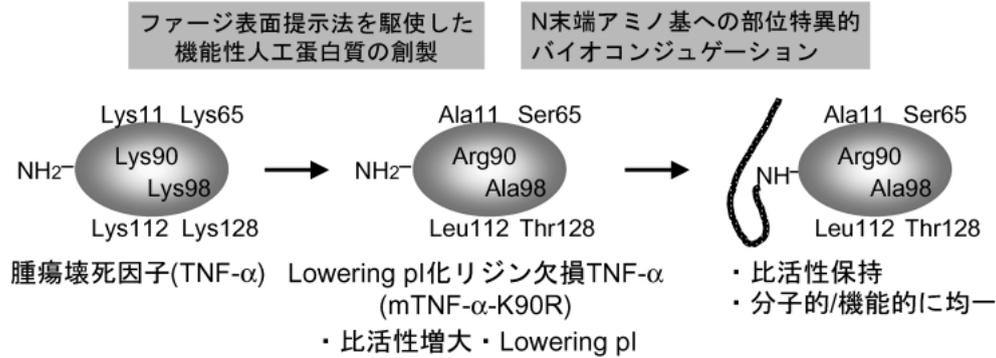
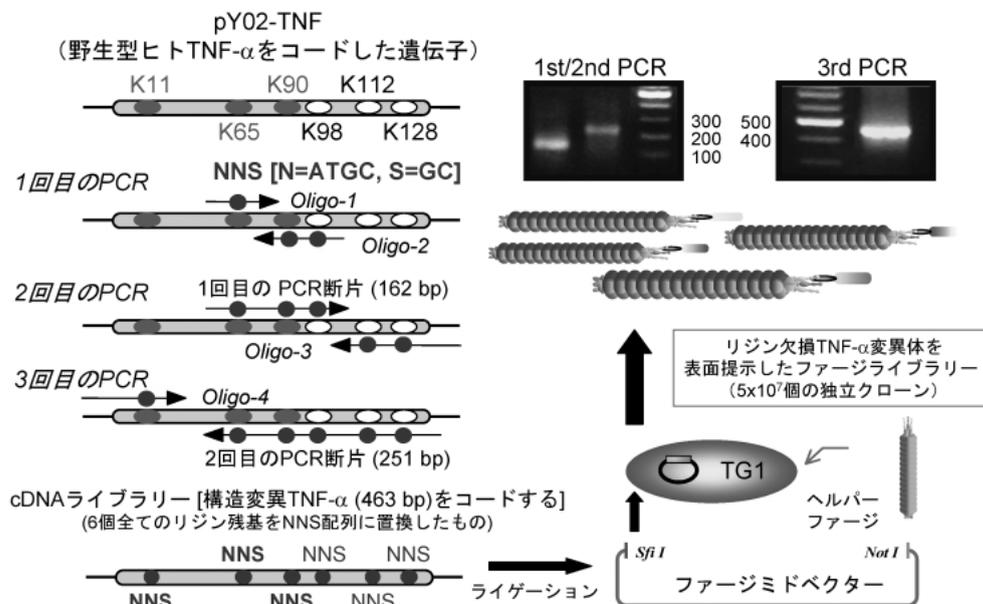


Fig. 3. Fusion System between Creation of Optimized Mutants and Site-Specific Bioconjugation

ミノ酸を1つずつ別の特定アミノ酸に改変することにより、個々の構造変異体（アミノ酸置換体）を作製せねばならない。そのため従来法では時間ばかりが消費され、期待通りの成果は得られておらず、より迅速かつ効率的に目的作用を有する機能性人工蛋白質を創製し得るテクノロジーの開発が望まれている。われわれはこれまでに、ファージ表面提示法を独自に展開することにより1億種類にも及ぶ多様性を有した生理活性蛋白質の構造変異体ライブラリを構築し、その中から目的機能を有する機能性人工蛋白質を網羅的に探索・同定できるテクノロジーの開発を先駆けて進めてきた。<sup>15)</sup>本章では、比活性が増強された Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  の創製を1つのモデルケースと位置付け、“医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の迅速創製システム”のさらなるシステム・アップを図り、そのうえで Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  の新規抗癌剤としての有用性を追求した。

TNF- $\alpha$  は、17 kDa の単量体当たり6個のリジン残基を有しており、ホモ三量体形成することで初めて活性型となる（三量体として18個のリジン残基を有する）。<sup>18)</sup>この TNF- $\alpha$  の抗腫瘍メカニズムは、1) 直接的な腫瘍細胞傷害、2) 血中の抗腫瘍エフェクター免疫細胞の活性化、3) 腫瘍血管の特異的傷害により引き起こされることが知られている。<sup>19-21)</sup> TNF- $\alpha$  投与によって腫瘍血管特異的に血管透過性が亢進されることをわれわれは既に認めているので、TNF- $\alpha$  の血中滞留性を向上させれば、これらすべての作用を効率よく増強可能となる。また、その副作用は肝臓、脾臓、小腸などの正常組織への移行により引き起こされてしまうため、TNF- $\alpha$  の血中滞留性を高めることができれば副作用発現組織への移

行を効果的に低減し、副作用軽減に直結することにもなる。したがって、もし wTNF- $\alpha$  よりも高い比活性を有し、かつ全リジン残基が他のアミノ酸に置換された Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  が作製できれば、Lowering pI 効果に起因する血中滞留性向上効果も相まって、TNF- $\alpha$  の抗腫瘍作用を選択的に増強できるものと期待される。そこで、Fig. 4 に示す方法で、ヒト wTNF- $\alpha$  の全リジン残基を20種類のアミノ酸へ網羅的に一挙置換した構造変異 TNF- $\alpha$  をファージ g3p 先端に提示したライブラリを作製した。このファージライブラリを用い、最適化されたパイオ・パンニングにより、最終的に2種類の Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  を得ることができた (Fig. 5)。以後、この2種類の Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  を mTNF- $\alpha$ -K90R, mTNF- $\alpha$ -K90P と記す。これら両 Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  の pI 値は wTNF- $\alpha$  と比較し大幅に減少しており、さらに蛋白質表面電荷を GRASP 法により確認したところ、その表面電荷は明らかに負電荷を帯びていることが示唆された。そこで次に、遺伝子工学的手法で大量培養し、常法に従って精製蛋白質を得た。これら両 Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  を SDS-PAGE 解析したところ、wTNF- $\alpha$  と同様にいずれも17 kDa の単一のバンドとして観察された。さらにゲル濾過 HPLC により解析した結果、いずれの Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  も wTNF- $\alpha$  と同一の溶出ピークを示した。以上の事実は、これら両 Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  では、これまでの点突然変異解析からホモ三量体形成に重要と言われてきた Lys11 が他のアミノ酸に置換されているにも関わらず、ホモ三量体形成していることを強く示唆している。<sup>18)</sup>次に、比活性を算出

Fig. 4. Preparation of the Phage Library Displaying mTNF- $\alpha$ s

	Residue positions						pI
	11	65	90	98	112	128	
wTNF- $\alpha$	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	7.44
mTNF- $\alpha$ -K90R	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Thr	4.96
mTNF- $\alpha$ -K90P	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	4.76

Fig. 5. Amino Acids of Lysine-Deficient mTNF- $\alpha$ s

するため、マウス TNFRI を介した *in vitro* における生物活性を、マウス LM 細胞に対する細胞傷害性試験により評価した。その結果、mTNF- $\alpha$ -K90P は wTNF- $\alpha$  と同等の比活性を有することが明らかとなった。一方、mTNF- $\alpha$ -K90R は、実に wTNF- $\alpha$  の 5.6 倍もの強い比活性を有していた (Fig. 6 (A))。次に、これら両 Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  のヒト TNFRI に対する生物活性をヒト Hep2 細胞に対する細胞傷害性試験を用いて評価した。その結果、mTNF- $\alpha$ -K90P は wTNF- $\alpha$  と同等の比活性を、mTNF- $\alpha$ -K90R は wTNF- $\alpha$  の約 10 倍という優れた生物活性を有することが判明した (Fig. 6(B))。なお、この mTNF- $\alpha$ -K90R は現存する人工 TNF- $\alpha$  中で最強の比活性を有するものである。さらに、ヒト TNFRI, TNFRII に対する結合力を BIAcore により評価したところ、前述した *in vitro* の比活性と相関しており、例えば mTNF- $\alpha$ -K90R は wTNF- $\alpha$  よりも強い結合力を示した。以上の事

	A)		B)	
		EC <sub>50</sub> (ng/ml)		EC <sub>50</sub> (ng/ml)
wTNF- $\alpha$		0.17	wTNF- $\alpha$	1.28
mTNF- $\alpha$ -K90R		0.03	mTNF- $\alpha$ -K90R	0.12
mTNF- $\alpha$ -K90P		0.14	mTNF- $\alpha$ -K90P	1.40

Fig. 6. *In vitro* Bioactivity of Lysine-Deficient mTNF- $\alpha$ s

(A) The specific activity of lysine-deficient mTNF- $\alpha$ s was measured by cytotoxic assay using LM cells in the presence of actinomycin D. (B) The specific activity of lysine-deficient mTNF- $\alpha$ s was measured by cytotoxic assay using Hep2 cells in the presence of cycloheximide. EC<sub>50</sub> is the concentration of mTNF- $\alpha$ s capable of killing 50% of cells.

実は、これまでの点突然変異解析からレセプター結合に重要と言われてきた Lys65, 90 が他のアミノ酸に置換された両 Lowering pI 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  が、wTNF- $\alpha$  以上のレセプター結合能を有していることを示した興味深い知見である。<sup>22-25)</sup> 次に、wTNF- $\alpha$  とヒト TNFRI の結合モデルを構築し、mTNF- $\alpha$ -K90R の TNFRI への結合力増加機構について考察した。wTNF- $\alpha$  では Lys90 は Glu135 と水素結合し、レセプター結合領域と考えられるアミノ酸 84 番目から 89 番目のループ構造を安定化していると考えられる。mTNF- $\alpha$ -K90R では、Lys90 がアルギニンに置換されることでリジンと同様に Glu135 と水素結合し、ループ構造の安定化に寄与しているものと考えられた。さらに、wTNF- $\alpha$  の Lys65 は、TNFRI の Lys78 と電氣的、立体的に反

発しているものと推測される。mTNF- $\alpha$ -K90R ではセリンに置換されることで、電気的、立体的反発が減少し、結合力が上昇したものと考えられた。

mTNF- $\alpha$ -K90R の *in vivo* における抗腫瘍効果は、Meth-A 担癌マウスに単回尾静脈内投与し、その24時間後の腫瘍出血壊死作用を指標に評価した。wTNF- $\alpha$  投与群では、3  $\mu$ g 投与でさえ十分な腫瘍出血壊死作用を発現できないうえ、実験に供したマウスの10%に突然死が見られるなど、強烈な副作用が認められた。一方、mTNF- $\alpha$ -K90R 投与群では0.3  $\mu$ g 投与においてwTNF- $\alpha$  3  $\mu$ g 投与群と同等以上の出血壊死作用が認められ、3  $\mu$ g 投与により多くの完全治癒例も認められた。さらに、副作用の指標としてのLD<sub>50</sub> 値を求めた結果、wTNF- $\alpha$  では390  $\mu$ g/kg であったのに対し、mTNF- $\alpha$ -K90R では510  $\mu$ g/kg であり、その毒性は顕著に低下していた。したがって、mTNF- $\alpha$ -K90R は、wTNF- $\alpha$  と比較してマウス TNFRI を介した *in vitro* における生物活性が約6倍であるにも関わらず、*in vivo* における出血壊死作用が10倍に、LD<sub>50</sub> 値は1.3倍となり、その治療域はwTNF- $\alpha$  の13倍にも向上していることが判明した。次にmTNF- $\alpha$ -K90R の治療域拡大機構を解明するため、静脈内投与後の血中動態を検討した。その結果、wTNF- $\alpha$  と比較して顕著な血中滞留性の向上が認められ、mTNF- $\alpha$ -K90R の血中半減期、AUCはともに約2倍に増大していた。この血中滞留性の向上は、カチオン性のリジン残基を他のアミノ酸へ置換したことによる Lowering pl 効果に起因したものであり、目的治療作用増大、副作用軽減に寄与したものと考えられた。

以上の結果より、最適化されたファージ表面提示法を駆使した“医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の迅速創製システム”を用いることで、比活性が著しく上昇した Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  が効率よく創製できること、その *in vivo* での優れた有用性が判明した。このように医薬価値に優れた Lowering pl 化リジン欠損蛋白質の報告は、TNF- $\alpha$  を含めいずれの生理活性蛋白質でも全く例を見ないものであり、本システムが他を圧倒した優位性を有することを強く示している。現在、筆者は様々な生理活性蛋白質にこの機能性人工蛋白質の迅速創製システムを展開するとともに、その立体構造解析を進めており、近未来的に新たな創薬シーズの理論的設

計への道を拓くものと期待している。

## 2. N末端アミノ基への部位特異的 PEGylation とその評価

前述したように、高分子バイオコンジュゲーションは蛋白質に高い品質保証を付与できる最適の DDS と世界的に認識されているものの、依然としてその成功例は極めて少ない。この最大の原因は、活性発現部位への高分子導入による致命的な比活性低下とバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性にある。これは、現在汎用されているバイオコンジュゲーション法が、蛋白質のリジン  $\epsilon$  アミノ基や N末端  $\alpha$  アミノ基へ、ランダムに高分子導入するものであることに起因している。これらの欠点を改良するため、従来より遺伝子工学的にシステイン残基を導入した変異蛋白質を作製し、遊離のチオール基をターゲットとした部位特異的バイオコンジュゲーション法が考案されてきた。<sup>12)</sup> しかし一般に、フォールディングに重要な役割を担うチオール基の人為的導入は、蛋白質の立体構造変化や蛋白質間凝集を招いてしまい、予期せぬ活性低下を招いてしまう場合が多いことが判明している。そのうえ活性を保持したシステイン残基導入変異蛋白質が作製でき、部位特異的バイオコンジュゲーションが可能となった場合においてさえも、チオール基への高分子導入効率の低さから、十分な収率でバイオコンジュゲート体が得られないという致命的問題を抱えている。したがって、ポストゲノム新時代の創薬テクノロジーとしてバイオコンジュゲーションをシステム・アップしていくためには、アミノ基をターゲットとしたバイオコンジュゲーションと同様の良好な高分子導入効率を保ったまま、修飾部位を局限し得るテクノロジーの確立が必須となっている。そこで前章において創製したヒト TNFRI を介した *in vitro* 生物活性がwTNF- $\alpha$  の10倍にも増強された Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ -K90R) に対する N末端アミノ基への部位特異的バイオコンジュゲーションを試みることにより、比活性低下と分子的不均一性の問題を一挙に解決し得る優れたバイオコンジュゲート化蛋白質を収率良く創製できる新たなテクノロジー構築を図った。そのうえで、TNF- $\alpha$  の *in vivo* 抗腫瘍効果、副作用及び、抗腫瘍治療域の拡大を指標とし、Lowering pl 効果と最適化されたバイオコンジュゲーション効果との相乗作

用を以下に検証した。

wTNF- $\alpha$  及び mTNF- $\alpha$ -K90R のバイオコンジュゲーションは、最も汎用されている直鎖状で分子量 5000 の活性化 PEG (methoxy-PEG-succinimidyl propionate) を用い、アミノ基を標的とした PEGylation を行った。各 PEGylation 産物を SDS-PAGE 解析したところ、wTNF- $\alpha$  のリジン  $\epsilon$  アミノ基・N 末端  $\alpha$  アミノ基に対してランダムに PEGylation した場合には、高分子側にシフトした複数のバンドが確認され、ヘテロな分子集団となってしまうことが判明した。一方 mTNF- $\alpha$ -K90R の PEGylation では、TNF- $\alpha$  モノマーに対して PEG が 1 分子だけ導入された 1 本のバンドしか観察されなかった。以上の事実は、N 末端のアミノ基のみへ選択的に PEG 導入されていることを強く示唆するものである。次に N 末端アミノ基を標的とした部位特異的 PEGylation の有用性を評価するために、TNF- $\alpha$  三量体当たり 1 分子の PEG だけが結合したモノ PEG 化 TNF- $\alpha$  をゲル濾過 HPLC 等によって分取精製した。以後、mTNF- $\alpha$ -K90R の部位特異的モノ PEG 化体を sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R、wTNF- $\alpha$  のランダム・モノ PEG 化体を ran-PEG-wTNF- $\alpha$  と記す。これら両モノ PEG 化 TNF- $\alpha$  のマウス TNFRI を介した生物活性（比活性）を LM 細胞に対する細胞傷害性を指標に検討した結果、ran-PEG-wTNF- $\alpha$  ではわずか 1 分子の PEG をランダム導入するだけで、未修飾 wTNF- $\alpha$  の約 6% にまで比活性が低下していた。一方、sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R では未修飾 mTNF- $\alpha$ -K90R の約 60% もの強い比活性を有していること、さらに未修飾 wTNF- $\alpha$  よりも 3 倍以上強い比活性を保持していることが判明した (Fig. 7)。このように、PEG 化蛋白質が PEG 化していない未修飾蛋白質よりも強い *in vitro* 比活性を保持した例はこれまで他に類を見ない初めての知見であり、N 末端アミノ基への部位特異的バイオコンジュゲーションの際立った有用性が明らかとなった。

次に、sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R の静脈内投与後の血中濃度推移を評価した。その結果、Lowering pl 効果と PEGylation 効果による相乗作用により、その血中半減期は未修飾 mTNF- $\alpha$ -K90R の約 2 倍、wTNF- $\alpha$  の約 4 倍にも向上しており、著しく血中滞留性が向上していることが明らかとなった。sp-

	EC <sub>50</sub> (ng/ml) (残存活性)
wTNF- $\alpha$	0.17
mTNF- $\alpha$ -K90R	0.03
ran-PEG-wTNF- $\alpha$	2.85 (6.0%)
sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R	0.05 (60.0%)

Fig. 7. *In vitro* Bioactivity of Mono-PEGylated Forms of TNF- $\alpha$ s

The specific activity of mono-PEGylated forms of TNF- $\alpha$  was measured by cytotoxic assay using LM cells in the presence of actinomycin D. EC<sub>50</sub> is the concentration of various PEGylated TNF- $\alpha$ s capable of killing 50% of cells.

PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R の *in vivo* における抗腫瘍効果は、Meth-A 担癌マウスに対し単回尾静脈内投与し、その 24 時間後の腫瘍出血壊死を指標に評価した。未修飾 wTNF- $\alpha$  投与群では、3  $\mu$ g の投与でさえ十分な出血壊死を誘導できなかった。また wTNF- $\alpha$  に対してランダムにモノ PEGylation した ran-PEG-wTNF- $\alpha$  では、wTNF- $\alpha$  と比較してごくわずかな抗腫瘍効果の増大を認めただけであった。一方、sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R 投与群では 1  $\mu$ g 投与において、mTNF- $\alpha$ -K90R 3  $\mu$ g 投与群より強い抗腫瘍効果が認められ、その抗腫瘍効果は未修飾 mTNF- $\alpha$ -K90R の 3 倍以上にも増強していた。前述したように mTNF- $\alpha$ -K90R は、wTNF- $\alpha$  よりも 10 倍強い *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮することから、sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R は未修飾 wTNF- $\alpha$  と比較して 30 倍も強い抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。また、副作用の指標としての LD<sub>50</sub> 値を検討した結果、wTNF- $\alpha$  では 390  $\mu$ g/kg、mTNF- $\alpha$ -K90R では 510  $\mu$ g/kg、ran-PEG-wTNF- $\alpha$  では 1290  $\mu$ g/kg、sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R では 780  $\mu$ g/kg であったことから、sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R の治療域は wTNF- $\alpha$  の 60 倍、mTNF- $\alpha$ -K90R の 5 倍、ran-PEG-wTNF- $\alpha$  の 18 倍に拡大していることが示唆された。

以上の結果より、最適化されたファーゼ表面提示法を駆使した“医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の迅速創製システム”を用いることにより、wTNF- $\alpha$  よりも優れた生物活性を有する Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ -K90R) などが初めて創製可能と成ること、この mTNF- $\alpha$ -K90R の

N末端アミノ基を標的とした部位特異的バイオコンジュゲーションを適用することで、従来までのランダムなバイオコンジュゲーションにおける様々な欠点を一挙に解決できることが判明した。また Lowering pl とバイオコンジュゲーションとの融合効果によって、サイトカインの多様な *in vivo* 作用の中から目的とする治療作用を選択的に発現させ得ることが明らかとなるとともに、sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R の新規抗癌剤、腫瘍血管透過性の選択的亢進剤としての有用性が示された。

#### おわりに

本研究にて、独自のファージ表面提示法を駆使することで蛋白性創薬シーズの構造変異体を Combinatorial Biosynthesis し、その機能情報をハイスループットに集積し得る方法論を先駆けて確立した。この蛋白性医薬品の創製テクノロジーは、膨大な構造変異体ライブラリの中から分子機能的に進化した機能性人工蛋白質を選択する点で、ネオ・ダーウィニズム的分子進化戦略と言うべき、他に類を見ないポストゲノム・アプローチと言えらる。さらに、筆者は現在、レセプター指向性変異体、アンタゴニスト作用を有する機能性人工蛋白質の創製にも成功しており、本方法論が蛋白質固有の問題（生体内安定性の乏しさや *in vivo* 作用の多様性など）を改善するのみならず、蛋白質へ新たな医薬価値をも付与できる新規創薬テクノロジーとして有用であることを認めている（未発表データ）。これら、自然界には存在しない医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の創製は、医療は勿論のこと、蛋白質のフォールディング解析、シグナル伝達などの詳細なメカニズム解明に多大に貢献し得るものと期待される。さらに、機能性人工蛋白質の構造活性相関の解明は、新たな創薬シーズの開発、より医薬的価値に優れた機能性変異体の創製へと展開が予想される。

一方で、期待されながらも十分な成果を得ることができなかったバイオコンジュゲーションの問題点を一挙に解決し得る部位特異的バイオコンジュゲーションと融合することで、治療域の飛躍的に向上した機能性分子の創製、最適化に成功した。当研究室ではこれまで、特異的組織移行能など DDS 機能を有する機能性ポリマーの開発にも成功しており、これを部位特異的バイオコンジュゲーションシステムに適用することで、より有効性、安全性に優れた機

能性分子の設計が可能となるものと考えられる。近年の分子細胞生物学やバイオテクノロジー技術の進歩により、今後益々各種疾病が分子レベルで解明されていくとともに、生理活性蛋白質を有効な医薬品として応用しようとする試みが加速度的に増加していくであろうことが予想される。そのため、本研究で考案した部位特異的バイオコンジュゲーションが、21世紀の蛋白療法を支える基盤技術に成り得ることを期待している。

**謝辞** 本研究は大阪大学大学院薬学研究科薬劑学分野にて行ったものであり、本研究の遂行に際し、ご指導ご鞭撻頂いた真弓忠範教授（現・神戸学院大学大学院薬学研究科）、堤康央助手（現・国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 医薬基盤研究施設）をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科薬劑学分野の皆様にご感謝申し上げます。また本研究は、文部科学省科学研究費補助金若手研究(A)、ヒューマンサイエンス振興財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業若手奨励研究、武田科学奨励財団薬学系奨励研究、千里ライフサイエンス振興財団奨励研究、厚生労働科学研究費補助金疾患関連たんぱく質解析研究事業などにより実施されたものであり、この場をお借りして御礼を申し上げます。

#### REFERENCES AND NOTES

- 1) Present address: Division of Foods, National Institute of Health Sciences 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.
- 2) Kimura K., Taguchi T., Urushizaki I., Ohno R., Abe O., Furue H., Hattori T., Ichihashi H., Inoguchi K., Majima H., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **20**, 223-229 (1987).
- 3) Rosenberg S. A., Lotze M. T., Muul L. M., Chang A. E., Avis F. P., Leitman S., Linehan W. M., Robertson C. N., Lee R. E., Rubin J. T., *N. Engl. J. Med.*, **316**, 889-897 (1987).
- 4) Onda M., Nagata S., Tsutsumi Y., Vincent J. J., Wang Q. C., Kreitman R. J., Lee B. K., Pastan I., *Cancer Res.*, **61**, 5070-5077 (2001).
- 5) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Mayumi T., *Curr. Drug Targets*, **3**, 123-130 (2002).
- 6) Youngster S., Wang Y. S., Grace M., Bausch J., Bordens R., Wyss D. F., *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 2139-2157 (2002).

- 7) Foster G. R., *Expert Opin. Pharmacother.*, **4**, 685–691 (2003).
- 8) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kanamori T., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **71**, 963–968 (1995).
- 9) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kamada H., Kihira T., Nakagawa S., Kaneda Y., Kanamori T., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **74**, 1090–1095 (1996).
- 10) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kamada H., Kihira T., Kaneda Y., Ohsugi Y., Mayumi T., *Thromb. Haemost.*, **77**, 168–173 (1997).
- 11) Kaneda Y., Yamamoto Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T., *Cancer Res.*, **58**, 290–295 (1998).
- 12) Tsutsumi Y., Onda M., Nagata S., Lee B., Kreitman R. J., Pastan I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8548–8553 (2000).
- 13) Kamada H., Tsutsumi Y., Yamamoto Y., Kihira T., Kaneda Y., Mu Y., Kodaira H., Tsunoda S., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Res.*, **60**, 6416–6420 (2000).
- 14) Kamada H., Tsutsumi Y., Sato-Kamada K., Yamamoto Y., Yoshioka Y., Okamoto T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 399–404 (2003).
- 15) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 546–552 (2003).
- 16) Monkarsh S. P., Ma Y., Aglione A., Bailon P., Ciolek D., DeBarbieri B., Graves M. C., Hollfelder K., Michel H., Palleroni A., Porter J. E., Russoman E., Roy S., Pan Y. C., *Anal. Biochem.*, **247**, 434–440 (1997).
- 17) Bailon P., Palleroni A., Schaffer C. A., Spence C. L., Fung W. J., Porter J. E., Ehrlich G. K., Pan W., Xu Z. X., Modi M. W., Farid A., Berthold W., Graves M., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 195–202 (2001).
- 18) Eck M. J., Sprang S. R., *J. Biol. Chem.*, **264**, 17595–17605 (1989).
- 19) Uggiero V., Latham K., Baglioni C., *J. Immunol.*, **138**, 2711–2717 (1987).
- 20) Asami T., Imai M., Tanaka Y., Hosaka Y., Kato K., Nakamura N., Horisawa Y., Ashida Y., Kanamori T., Nobuhara M., *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 1161–1164 (1989).
- 21) Watanabe N., Niitsu Y., Umeno H., Kuriyama H., Neda H., Yamauchi N., Maeda M., Urushizaki I., *Cancer Res.*, **48**, 2179–2183 (1988).
- 22) Yamagishi J., Kawashima H., Matsuo N., Ohue M., Yamayoshi M., Fukui T., Kotani H., Furuta R., Nakano K., Yamada M., *Protein Eng.*, **3**, 713–719 (1990).
- 23) Van Ostade X., Tavernier J., Prange T., Fiers W., *EMBO J.*, **10**, 827–836 (1991).
- 24) Loetscher H., Stueber D., Banner D., Mackay F., Lesslauer W., *J. Biol. Chem.*, **268**, 26350–26357 (1993).
- 25) Van Ostade X., Tavernier J., Fiers W., *Protein Eng.*, **7**, 5–22 (1994).