

ADC Builder: 抗体薬物複合体の効率的な分子モデリング技術の開発

抗体薬物複合体（ADC: Antibody-Drug Conjugate）は、リンカーを介して抗体に細胞毒性薬剤（ペイロード）を結合させたバイオ医薬品であり、がん細胞を高い選択性で攻撃できる治療薬として注目されています。

ADC の薬効には、ペイロードやリンカーの種類、薬物抗体比（DAR: Drug-Antibody Ratio）、修飾位置などのさまざまな要素が密接に関連しています。一方で、これらの要素は血中での構造安定性や凝集といった問題とも関わっているため、ADC の薬効・安全性・製造性を高い水準で満たすためには、合理的な分子設計手法の開発が不可欠です。本稿では、MOE のカスタムプログラム ADC Builder と、それを用いてさまざまなパラメーターを考慮して ADC を構築するためのワークフローを紹介します。

■ ADC について

ADC は、抗体の高い標的特異性と薬剤の高い殺細胞活性を合わせ持つバイオ医薬品です。ADC は、特定のがん細胞表面の抗原を選択的に認識・結合し、細胞内に取り込まれた後、pH や酵素等によりリンカーが切断されることでペイロードが細胞内に放出され、標的細胞に対して細胞死を誘導します。

多くの場合、ペイロードは、抗体分子中のリジンあるいはシステインと結合させます。一般に抗体 1 分子には結合可能なリジンおよびシステインがそれぞれ 90 残基および 8 残基存在しますが、より均一的な ADC を得るためには組み合わせの数の少ないシステインが選ばれます。

Brentuximab vedotin (BV, 図 1)¹⁾ は、再発または難治性の CD30 陽性ホジキンリンパ腫や未分化大細胞リンパ腫の治療薬として使用されている ADC です。BV のペイロードである MMAE は他のペイロードと同様に疎水性を示します。DAR が高いほど、より多くのペイロードが抗体に結合しており、DAR の高さやペイロードの修飾位置により ADC の物理化学的性質が変化し凝集や構造安定性などの問題が懸念されます。

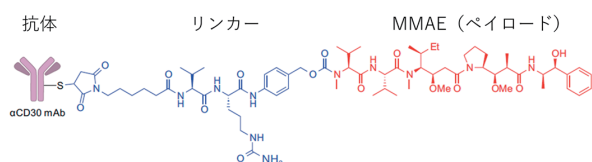


図 1. Brentuximab vedotin (BV)¹⁾

■ MOE を用いた ADC 構築のワークフロー

合理的な ADC の設計を行うためには、DAR やペイロードの修飾位置の他に、結合させるアミノ酸、ペイロード、リンカーの種類も検討する必要があります。これらの条件を変えながら、さまざまな ADC をモデリングするために次のようなワークフローを作成しました（図 2）。

1. ペイロードが結合した修飾アミノ酸（NNAA, Non-natural amino acid）を準備します。

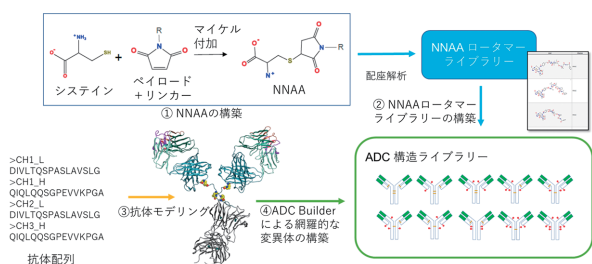


図 2. ADC 構築のためのワークフロー

2. 側鎖の配座解析により NNAA ローターライブラリーを作成します。
 3. 抗体構造を準備します。
 4. ADC Builder を使用して指定したアミノ酸における網羅的な変異体の構築を行います。
- それぞれのステップは独立しており、一部のステップのみを実施することもできます。

■ NNAA と NNAA ローターライブラリーの構築

NNAA は、MOE の Builder 機能により構築できます。あるいは、MOE の Combinatorial Library 機能を利用し、複数の NNAA を自動構築することもできます。この場合、反応物としてアミノ酸とリンカーが結合したペイロードを指定し、化学反応ルールを指定することで、網羅的な組み合わせでの NNAA を構築できます。例えば、ペイロードとして MMAE^{2,3)} と MMAF²⁾ をそれぞれ結合させたマレイミド基を有するリンカーを準備し、システインとマイケル付加反応させることで、2 種類の NNAA を得ることができます（図 3）。なお、化学反応ルールは MOE に標準搭載されているものの他に、RXN ファイルで新規ルールを作成して利用することもできます。

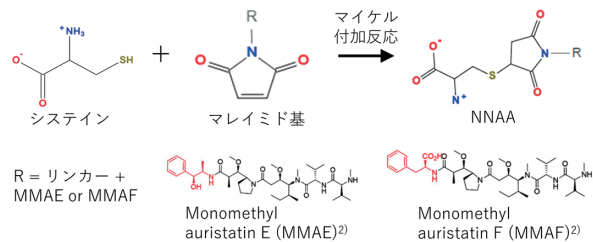


図 3. マイケル付加反応による NNAA の自動構築

構築した NNAA に対する側鎖の配座解析により、NNAA ローターライブラリーを得ます。この NNAA ローターライブラリーを MOE に登録することで、MOE の Protein Design 機能や ADC Builder で変異体構築に使用することができます。

■ 抗体モデリング

ADC を構築するための抗体構造は、PDB から取得する以外に、MOE の抗体専用モデラーを使用してアミノ酸配列から構築することもできます。抗体モデリングは、二重特異性抗体やグリカンを考慮したモデリングも可能です。

■ ADC Builder による網羅的な変異体の構築

ADC Builder は、MOE 上で選択されたアミノ酸を、ペイロードが結合している NNAA に、網羅的な組み合わせで変異させるためのカスタムプログラムです。ADC Builder

は MOE の開発言語 SVL を用いて、弊社で開発されました。ADC Builder による ADC 構築のフローを図 4 に示します。

- 異なる分子鎖間でジスルフィド結合を形成している 8 個のシステインを選択します (赤丸)。
- 選択したシステインからビットベクトルを生成します。ビットベクトルは、それぞれ 8 個のシステインの位置を意味し、変異が行われる位置に 1 を格納します。DAR 0~8 の全ての ADC を構築する場合、256 通りのベクトルが生成されます。
- ビットベクトルに基づいて 1 で選択したアミノ酸残基を NNAA に変異させます。ジスルフィド結合は自動的に開裂され、他の原子と接触しないように順次 NNAA に変異させます。
- DAR とペイロードの修飾位置の異なる網羅的な ADC 構造ライブラリーを出力します。

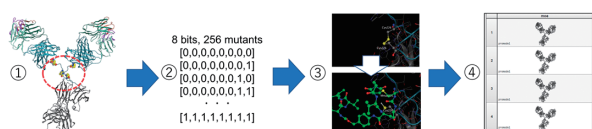


図 4. ADC Builder を用いた ADC 構造ライブラリーの生成

■ 解析事例

本ワークフローを用いて、DAR とペイロードの結合位置の異なる複数の BV (図 2) を構築し、2 種類の解析を実施しました。ADC Builder は、DAR が 0~8 までの 256 種類の網羅的な BV を構築することも、また、DAR が偶数の典型的な BV のみを構築することもできます。典型的な BV とは、フリーのシステインが生じないようにペイロードを埋め込んだ 16 種類の BV を意味します。ここでは、後者の BV 構造ライブラリーを構築しました。

■ DAR と分子表面パッチとの関係

分子表面パッチとは、疎水性あるいは静電ポテンシャルが強く面積の広い分子表面部位を指します。特に疎水性パッチの表面積は、タンパク質の凝集傾向等の実験値と関連することが知られています。DAR が 0, 2, 4, 6, 8 である代表的な BV の疎水性パッチ、正電荷パッチ、負電荷パッチを描画しました (図 5)。DAR が高くなるにつれて緑の疎水性パッチ表面が増加することがわかります。

これら 16 種類の BV の DAR によるパッチ表面積の変化をプロットしました (図 6)。DAR が高くなるにつれて疎水性パッチの表面積も増加することがわかりました。一方、イオン性パッチの表面積は DAR の変化とは関連しませんでした。BV における DAR の増加は、HIC の溶出の時間の増加を引き起こすことが実験でも明らかになっています³⁾。

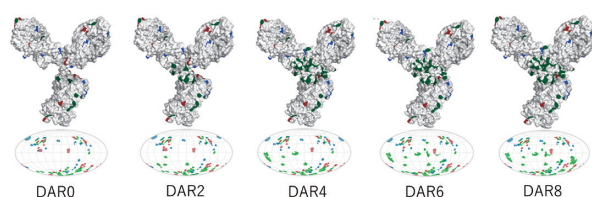


図 5. 分子表面パッチ描画。上図は分子表面パッチの 3D 図、下図は分子表面パッチの 2D 図。疎水性パッチ (緑)、正電荷パッチ (青)、負電荷パッチ (赤)。

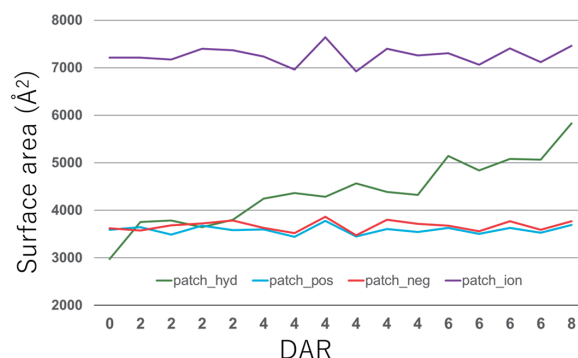


図 6. 16 種類の BV の DAR と各分子表面パッチの表面積のプロット。
patch_hyd: 疎水性パッチ、patch_pos: 正電荷パッチ、patch_neg: 負電荷パッチ、patch_ion: 正電荷+負電荷パッチ。

■ MD シミュレーションによるペイロードの柔軟性の評価

DAR が 8 である BV に対して MD シミュレーションを実施し、各ペイロードの柔軟性を Root Mean Square Fluctuation (RMSF) により評価しました。MOE 2024.0601 を用いて pH 7.4 の条件下で水素原子を付加しました。周期境界条件を設定し、水とカウンターイオンを配置後、100 ナノ秒のシミュレーションを実施しました。MD エンジンとして NAMD3 を用い、力場は MOE の Amber:EHT を用いました。各ペイロードの RMSF を算出したところ、4.15~7.65 Å の分布を示しました (図 7)。RMSF の大きいペイロードは、空間的自由度が高く、抗体との相互作用が弱い場合、凝集や非特異的な相互作用の原因となる可能性があります。

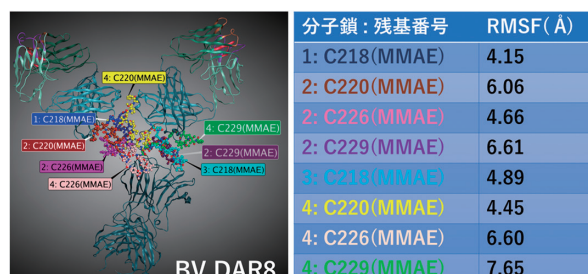


図 7. DAR8 の BV と各ペイロードの RMSF の結果。左図の原子の色は右表の文字色と対応。左図では、水とカウンターイオンは非表示。

■ まとめ

ADC Builder を活用した本ワークフローを用いることで、さまざまな条件を組み合わせた ADC を構築できます。さらに MOE の解析機能と組み合わせることで、実験前に、多くの候補構造の中から物理化学的特性の良好な ADC 構造を見出すことができる可能性があります。ADC Builder は MOE の保守契約を締結中のユーザーに無償提供しています。ご希望の方は弊社までご請求ください。

- Tsuchikama, K.; An, Z. *Protein Cell* **2018**, 9 (1), 33–46.
- Biopharma PEG. Antibody–Drug Conjugate Payloads: MMAE & MMAF, 2022. Biopharma PEG Web site. <https://www.biochempeg.com/article/312.html> (accessed May 15, 2025).
- Rodriguez-Aller, M.; et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393–403.