

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08922

研究課題名(和文)抗体フラグメントFabの高度な安定化と医薬への応用

研究課題名(英文)Thermostabilization of Fab and its application to medicine

研究代表者

大栗 誉敏(Ohkuri, Takatoshi)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：70346807

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)：近年抗体医薬品が盛んに開発され、多くの難治性疾患に高い効果を発揮している。本研究では、抗体医薬品アダリムアブのFab分子のリコンビナントタンパク質を作製し、アミノ酸変異導入によって機能性を高めた改変Fabの作製を行った。安定性を向上させる目的で新規の分子間SS結合導入変異をデザインした結果、12個の変異体作製に成功した。特に安定性の上昇が顕著なH:V177C-L:Q160C変異体についてはC末端のCysを用いた新しいPEG化Fabを創製し、ラット体内での半減期の上昇も確認できた。またN型糖鎖配列導入変異による糖鎖付加Fabの創製に成功し、糖鎖付加によるFabの凝集抑制効果が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬品の欠点の1つは生産コストが高いという点である。本研究において抗体医薬品アダリムアブのFabについて機能性を高めた改変Fabを酵母を用いて作製することに成功した。酵母によって安価に生産できるFabが抗体医薬品として応用できれば薬価を抑えることが期待できる。また高機能化によりIgG分子より優れた効果を生み出す可能性ももたらした。本研究は、Fabの抗体医薬品への応用につながる重要な知見をもたらした。

研究成果の概要(英文)：In recent years, antibody drugs have been actively developed and are highly effective against many diseases. In this study, we produced a recombinant protein of Fab molecule of human monoclonal antibody drug adalimumab and produced a modified Fab whose functionality was improved by introducing an amino acid mutation. As a result of designing a novel intermolecular SS bond introduction mutation for the purpose of improving stability, 12 mutants were successfully constructed. We have successfully demonstrated that a Fab mutant with a novel interchain SS bond (H:V177C-L:Q160C) and one free cysteine at the C-terminal end can be PEGylated without changes in functionality. N-glycosylation site was introduced at H-chain constant region of adalimumab Fab through site-directed mutagenesis. We demonstrated that glycosylated Fab can prevent protein aggregation.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：抗体工学 Fab 抗体医薬 糖鎖エンジニアリング ジスルフィド結合 安定化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、抗体医薬品が盛んに開発され、世界医薬品売上高ランキングの上位を占めている。抗体 IgG はヒト型の糖鎖付加が必須の為、哺乳類の CHO 細胞で生産されているが、発現系構築は難易度が高く、期間も生産コストもかかるという欠点がある。これらを補う分子として、抗体フラグメント (Fab) が挙げられる。Fab は酵母や大腸菌など微生物での生産が IgG よりも原理的に可能で、容易で安定な発現系を構築でき、低コストでの大量生産も見込まれる。また、Fab は IgG と同等の結合力を維持しつつ分子量が小さいため、組織浸透性が高いという利点もある。IgG と比べた Fab の欠点は、血中半減期が短いことである。それを補えるポリエチレングリコール (PEG) による修飾は体内貯留時間を上げることができ、さまざまなバイオ医薬品にも利用されている。2013 年には、国内においても世界初の PEG 化抗 TNF  $\alpha$  Fab' 製剤 (シムジア) が販売され、Fab そのものが新たな抗体医薬品として適応され始めている。しかしながら Fab の安定化や凝集抑制といったタンパク質工学的な高機能化に関する報告は非常に少ない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトモノクローナル抗体医薬品アダリムマブの抗原結合部位を含んだ Fab をターゲットとし、アミノ酸変異導入によって高度に安定化した Fab 変異体あるいは物性や機能性を高めた Fab 変異体を作製する。発現系は酵母 *Pichia Pastoris* を用いて大量調製を行う。作製した Fab について、安定性や凝集性などの物性を評価し、さらに動物実験によって Fab の体内動態や抗原性を解析し、Fab 製剤としての有用性を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規分子間 SS 結合導入による Fab の安定化

Fab の安定化を目的とし H 鎖と L 鎖の分子間に SS 結合を導入することを試みた。X 線結晶構造を元に、分子構造シミュレーションソフト MOE (MOLSYS 社) のジスルフィドスキャンプログラムを用いて定常領域での変異部位を推定した。Fab には C 末端部位に分子間 SS 結合が唯一存在するが、新規の SS 結合形成の有無を容易に解析できるように C 末端の Cys を Ala に置換した変異体 (WT  $\Delta$  SS) をベースとして新規 SS 結合導入変異体を作製し、酵母を用いた発現系によりタンパク質を調製した。精製した Fab は SDS-PAGE による SS 結合解析と ELISA による結合活性、DSC による熱安定性の評価を行った。

#### (2) 新規分子間 SS 変異体を用いた C 末端 Cys への部位特異的 PEG 化 Fab の創製

Fab の血中半減期を上げるためにポリエチレングリコール (PEG) 修飾が利用されているが部位特異的な修飾が問題となっている。Fab の唯一存在する C 末端の SS 結合を利用するために、新規の分子間 SS 結合変異体を元に Fab-H 鎖の C 末端のみ Cys を保持したアミノ酸変異を施し、分子間 SS 結合を有した Fab の C 末端 Cys への部位特異的な PEG 修飾体の調製を試みた。酵母より変異体を調製し PEG 修飾を行った。作製した PEG 化改変 Fab をラットに尾静脈投与し、時間毎の血中の残存量から体内動態パラメーターを求め野生型と比較した。

#### (3) 糖鎖付加による Fab の高機能化

Fab の定常部位へ糖鎖付加配列を導入し、糖鎖付加によって Fab の凝集性を抑制することを目的とした。表面での露出度が高い部位に位置する H 鎖の 178 番目のロイシンをアスパラギンに置換し Asn-X-Thr/Ser の N 型糖鎖付加配列を導入した変異体 (H:L178N) を酵母より作製した。PAS 染色及び糖鎖切断酵素により糖鎖付加の解析を行った。また散乱光によって凝集性評価を行った。さらに糖鎖付加 Fab をラットを用いて体内動態を解析し、さらにマウスへ投与して糖鎖付加による抗原性への影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規分子間 SS 結合導入による Fab の安定化

シミュレーションソフトの結果、Table1 に示す 12 種の変異体が候補に挙がり、いずれも酵母による発現精製することができた。分子間 SS 結合を解析した結果、いずれも検出できたが No1, 2, 4, 8, 9, 10, 11 の変異体は分子間 SS 結合が形成されていない分子種も含まれていることがわかった。完全に分子間 SS 結合形成された No3, 5, 6, 7, 12 変異体について DSC により安定性を評価した結果、WT  $\Delta$  SS と比較して安定性の上昇が見られた。またいずれの変異体も抗原との結合活性に大きな影響はなく、2 次構造も保持していることを確認した。以上のように、新規の分子間 SS 結合の導入による Fab の安定化に成功した。

Table.1 SS結合導入変異体のSS結合形成及び熱安定性

変異体	変異部位	酵母発現	SS結合	DSC	比較
No1	H:172C-L:174C	○	$\Delta$	-	-
No2	H:187C-L:176C	○	$\Delta$	-	-
No3	H:130C-L:124C	○	○	73.4	3.5°C $\uparrow$
No4	H:174C-L:176C	○	$\Delta$	-	-
No5	H:177C-L:160C	○	○	74.5	4.6°C $\uparrow$
No6	H:174C-L:162C	○	○	71.7	1.8°C $\uparrow$
No7	H:130C-L:121C	○	○	73	3.1°C $\uparrow$
No8	H:145C-L:116C	○	$\Delta$	-	-
No9	H:132C-L:118C	○	$\Delta$	-	-
No10	H:138C-L:116C	○	$\Delta$	-	-
No11	H:137C-L:117C	○	$\Delta$	-	-
No12	H:175C-L:162C	○	○	72	2.1°C $\uparrow$

## (2) 新規分子間SS変異体を用いたC末端Cysへの部位特異的PEG化Fabの創製

FabのC末端には唯一の分子間SS結合が存在し、このシステイン残基へのPEG修飾が有効であると考えられたが、FabのC末端SS結合を欠損させた変異体(WT $\Delta$ SS)の熱安定性は野生型と比較して約5°C低下した。これはPEG修飾部位としてC末端のシステイン残基を利用するとFabの安定性を下げることとなり、安定化の対策が必要であることを示唆するものであった。そこでNo5変異体(H:L170C, L:160C)をベースとしたFab(Fig. 1)にPEG修飾を施した結果、安定性を損なわずに部位特異的にPEG化された改変Fabを調製することに成功した。このPEG化改変Fabは未修飾の野生型に比べ、ラットでの血中半減期が大幅に長くなることも確認できた(Fig. 1)。以上のように、安定性を維持したまま部位特異的にPEG修飾可能なFabを作製し動物実験によるPEGの有効性を証明した。

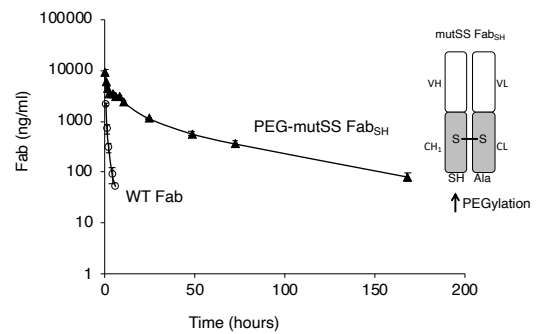


Fig.1 PEG化改変Fabと野生型の血中濃度測定

## (3) 糖鎖付加によるFabの高機能化

酵母より発現・精製したH:L178N変異体について、PAS染色及び糖鎖切断酵素による解析の結果、比較的短い糖鎖が付加していることが分かった。そこで野生型が凝集を起こす条件にて、散乱光による凝集性評価を行ったところ、野生型が濃度依存的に凝集されるのに対し糖鎖付加したH:L178N変異体は、凝集性が抑制されることが示された(Fig. 2)。以上のように、凝集性が抑制できる糖鎖付加Fabの作製に成功した。

さらに糖鎖付加したH:L178N変異体のラット体内における血中滞留時間を野生型と比較した結果、野生型よりも血中から早く消失することが明らかになった(Fig. 3)。この結果は酵母特有の糖鎖配列(ハイマンノース型)が肝臓あるいはマクロファージ上のマンノース認識受容体を介して取り込まれたことが原因と推測され、酵母による糖鎖付加体の調製によって、体内から早く消失させるFabが創製出来ることが分かった。また糖鎖修飾による抗原性についても調べた結果、マウスでの血中の抗体価は野生型に比べ糖鎖付加体への抗体価は低く、糖鎖付加によって抗原性が抑えられることが証明できた(Fig. 4)。

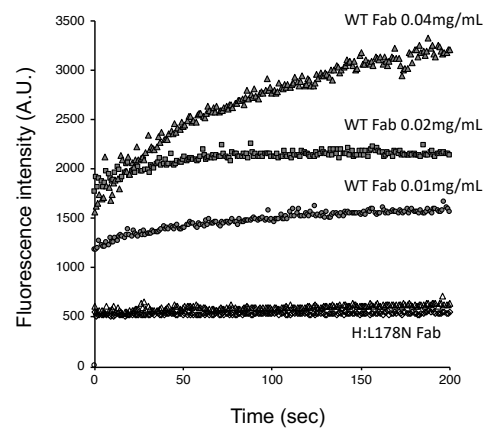


Fig.2 糖鎖付加Fabと野生型の凝集性評価

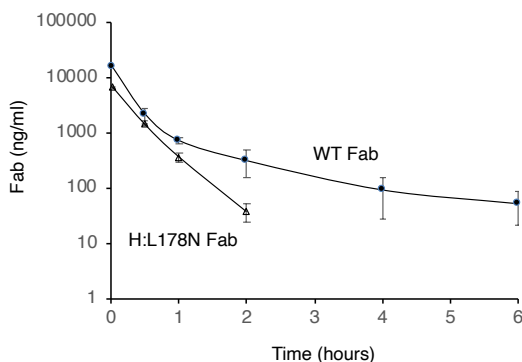


Fig.3 糖鎖付加Fabと野生型の血中濃度測定

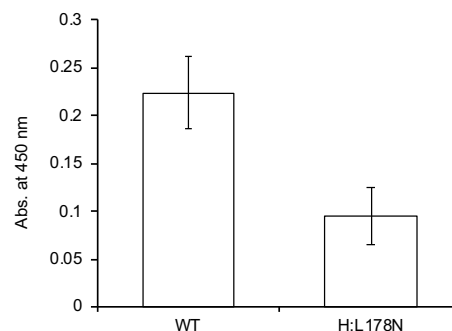


Fig.4 糖鎖付加Fabと野生型の抗体価測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura H, Oda-Ueda N, Ueda T, Ohkuri T.	4. 巻 503
2. 論文標題 Introduction of a glycosylation site in the constant region decreases the aggregation of adalimumab Fab.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 752-756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.06.071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura H, Oda-Ueda N, Ueda T, Ohkuri T.	4. 巻 495
2. 論文標題 A novel engineered interchain disulfide bond in the constant region enhances the thermostability of adalimumab Fab.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.10.140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura H, Anraku M, Oda-Ueda N, Ueda T, Ohkuri T.	4. 巻 43
2. 論文標題 C-Terminal Cysteine PEGylation of Adalimumab Fab With an Engineered Interchain SS Bond	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 418-423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大栗誉敏、中村仁美、植田正、上田直子
2. 発表標題 酵母Pichia pastorisを用いたアダリムマブFabの調製
3. 学会等名 第33回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中村仁美、大栗誉敏、植田正、上田直子
2. 発表標題 抗体医薬アダリムマブFab のC末端ジスルフィド結合 が構造安定性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村仁美、大栗誉敏、植田正、上田直子
2. 発表標題 アダリムマブFabの新規分子間SS結合導入による熱安定化
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会 (仙台)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 アダリムマブFabにおける分子間SS結合の熱安定性への影響と新規SS結合の導入
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会 (熊本)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 アダリムマブFabの定常領域での新規SS結合の導入と安定化
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 糖鎖付加によるアダリムマブFabの凝集性の抑制
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村仁美、木吉真人、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 抗体医薬品アダリムマブFabの糖鎖付加変異体の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川萌香、財津佑衣、中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 ヒト抗体Fabの定常領域へのアミノ酸変異による新規分子間SS結合の導入
3. 学会等名 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 分子間SS結合を有したFabのC末端特異的PEG修飾体の調製
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村仁美、木吉真人、安楽誠、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 ヒト型Fab定常領域への糖鎖配列の導入と糖鎖が及ぼす影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安楽 誠  (Anraku Makoto)  (60398245)	崇城大学・薬学部・教授    (37401)	
研究分担者	中村 仁美  (Nakamura Hitomi)  (60510691)	崇城大学・薬学部・助教    (37401)	