

平成30年 5月17日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17939

研究課題名(和文) シングルドメイン抗体に及ぼす異分子コンジュゲートの影響の検証

研究課題名(英文) The effect of payload conjugates on VHH antibody

研究代表者

赤澤 陽子 (Akazawa, Yoko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：50549897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗体-薬物複合体(Antibody Drug Conjugate:ADC)の開発における問題点は、抗体分子への薬物コンジュゲートの不均一性による薬効・安全性への影響である。この問題点は通常抗体の構造の複雑さに起因するものであり、低分子抗体であるラクダ科動物由来シングルドメイン抗体(VHH抗体)をADCに利用することで、高い均一性と安全性を兼ね備えた次世代ADCが期待される。本研究では付加される物質(ペイロード)の種類(低分子化合物、核酸)、サイズによるVHH抗体の機能および物性への影響やペイロード側の機能について評価を行った。これらの知見はVHH抗体-薬物複合体開発の技術基盤の確立に資する。

研究成果の概要(英文)：Developing the technique to conjugate antibody with various payload reagents, such as anticancer drug, isotopes and dye, is an important topic for evolution of antibody drug, diagnostic reagent and molecular imaging. The technical difficulty for the homogeneous conjugation to conventional IgG and IgG-derived fragments is caused by inevitable features of antibody structure. Single-domain VHH antibody, variable domain of camelid heavy chain antibody, usually has only one disulfide bond and thus is useful to obtain a homogeneous population with a fixed conjugation at a specific location. Here we report the feasibility of payload (Low molecular weight compounds, nucleic acids) conjugation with VHH antibody. The conjugate was then labeled, and its stability and functionality were characterized.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：シングルドメイン抗体 異分子コンジュゲート 抗体-薬物複合体

1. 研究開始当初の背景

創薬研究において、「バイオ医薬品」への期待は高い。なかでも抗体医薬品開発は国際的に激しい開発競争が繰り広げられ、その技術レベルと市場は急速な成長を遂げている。とりわけ、近年注目されている抗体-薬物複合体(Antibody Drug Conjugate: ADC)は、強い細胞毒性の薬剤と抗体を融合させることで、薬物を疾患部位特異的に送達し、選択的な薬効と副作用の減弱をコンセプトとした医薬品である。世界では 40 剤が、日本においても 20 剤以上について臨床試験が行われている。一方で、ADC の問題点として、抗体 1 分子あたりのペイロード数の不均一性がある。ADC の不均一性による生体での薬物動態や効力への影響が懸念されており、ADC の不均一性改良は医薬品の効果を最大限に発揮するための重要な課題である。既存 ADC は抗体分子に 1 個から 8 個のペイロード付加体が混在(平均して 3.2-3.8 個程度)しており、通常抗体 1 分子あたり 4 つの機能性分子付加が安定かつ機能性を兼ね備えていると報告されている。このような背景から ADC 開発においては、蛋白質工学技術によってペイロード付加を精密に制御する必要性があり、容易な抗体分子の改良および小型化は有用な技術となる。

2. 研究の目的

ADC の開発における問題点は、抗体分子への薬物コンジュゲートの不均一性による薬効・安全性への影響である。この問題点は通常抗体 (IgG) の構造の複雑さに起因するものであり、低分子抗体であるラクダ科動物由来シングルドメイン抗体 (VHH 抗体) を ADC に利用することで、高い均一性と安全性を兼ね備えた次世代 ADC が期待される。

3. 研究の方法

(1) 様々なペイロード付加体の作製

抗 EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)-VHH 抗体の C 末端にシステインを挿入した VHH 抗体を作製し、マレイミド化した各ペイロードを反応させる。未反応のペイロードおよび VHH 抗体は複数種のカラム精製を用いて取り除き、高精製度の VHH 抗体-分子複合体を取得する。対象とするペイロードは低分子化合物、核酸である。低分子化合物はマレイミド化した Biotin、Alexa、FITC 付加体を作製する。

(2) ピアコアによる抗原結合能の評価

作製した VHH 抗体-分子複合体の抗原に対する結合活性を SPR 測定装置 (ピアコア) により測定する。センサーチップ基板に抗原蛋白質を固定化し、各複合体の VHH 抗体の抗原結合能を測定する。付加物の種類・サイズによる抗原結合への影響を精査する。

(3) PCR による長さ二本鎖 DNA 付加技術の開発

VHH 抗体に一本鎖 DNA を付加し、PCR 反応を利用して VHH 抗体へ目的のサイズの二本鎖

DNA 付加を検討する。また、1 本鎖 DNA とよび二本鎖 DNA 付加による VHH 抗体の抗原結合能への影響について評価する。

4. 研究成果

(1) 抗 EGFR-VHH 抗体の作製

公知の抗 EGFR-VHH 抗体 (7D12, 9G8, Ega1) を人工遺伝子合成により作製し、さらに C 末にシステインを挿入した。大腸菌により蛋白質を発現させ、精製を行った。作製した抗 EGFR-VHH 抗体は分子内にシステインを 2 つ有しており、ジスルフィド結合を形成している。C 末にシステインを挿入するとジスルフィド結合のシャッフリングが起こり、間違っ組み合わせて結合した VHH 抗体は凝集・不活化され、Wild-Type と比較して活性 VHH 抗体の回収率が著しく低下した。そこで、分子内のジスルフィド結合を欠失させた Cys 欠失体の作製を検討した。既報に従い、7D12-VHH 抗体の Cys22 と Cys92 を Ala/Ala(A/A)もしくは Ala/Val (A/V)に変異させた VHH 抗体を作製した<引用>。還元条件下での蛋白質精製が可能になり、VHH 抗体の回収率は改善した。一方、抗原結合能への影響を SPR 解析により評価した結果、wild-type は K_D (解離定数)が 14nM に対し、A/A 体は 29nM、A/V 体は 10, 1 μ M となり、Cys を Ala へ変異させることで、効率的な VHH 抗体の作製と結合活性の保持を認めた(表 1)。9G8 および Ega1 に対しても同様の検討を行い、A/A 体の活性維持を認めた。

表 1 7D12-VHH 抗体 Cys 変異による親和性影響

	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
7D12 (wt)	3.2×10^6	4.4×10^{-2}	1.4×10^{-8}
7D12(A/V)	6.7×10^2	6.8×10^{-3}	1.0×10^{-5}
7D12(A/A)	3.3×10^5	9.5×10^{-3}	2.9×10^{-8}

(2) ペイロード付加体の作製

作製した VHH(A/A)-Cys 抗体へマレイミド-Biotin、マレイミド-PEG-Biotin、マレイミド-PEG-FITC、マレイミド-Alexa、マレイミド-核酸 (1 本鎖 DNA、RNA) を反応させ、各複合体を作製した。還元剤を取り除いた VHH 抗体をすみやかにペイロードと(1:2 モル比、100mM Tris-HCL pH 7.0 溶液中、室温、1 時間) 反応させた。マレイミド-Biotin は疎水性が高く、VHH 抗体と水溶液中で反応させると VHH 抗体の凝集を引き起こし、付加体の作製が不可能であった。マレイミド-PEG-Biotin、マレイミド-PEG-FITC、マレイミド-Alexa、核酸付加体 (1 本鎖 DNA、RNA) は効率的な付加反応が認められ、1 分子の VHH 抗体へ 1 分子のペイロード付加体を得ることができた。

(3) ペイロード付加による VHH 抗体の機能へ

の影響

ペイロード付加による親和性への影響は VHH 抗体により異なり、7D12-VHH 抗体は 9G8 および Ega1 に比べてペイロード付加による顕著な親和性の低下が認められた(図 2、3)。さらに、本検討のペイロード付加では分子サイズと親和性影響の相関は認められなかった。

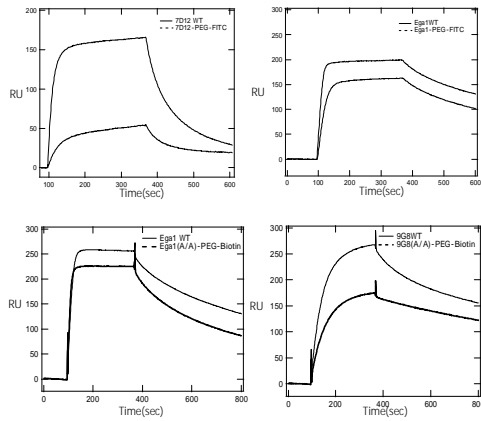


図 2 低分子化合物付加による VHH 抗体の抗原結合能への影響

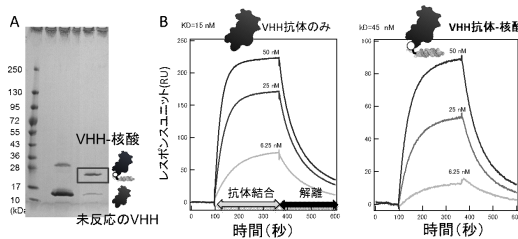


図 3 7D12-核酸複合体(一本鎖 DNA)の作製と核酸付加による 7D12 の抗原結合能の低下

(3)抗体付加によるペイロードの機能への影響

ペイロード側の機能について、Alexa や FITC は VHH 抗体付加後も蛍光を発する機能を保持していた。しかし、Biotin は VHH 抗体付加によりストレプトアビジンとの結合能欠失が認められた。

一本鎖 DNA 付加体では PCR による目的のサイズの二本鎖 DNA の増幅を認めた。また、siRNA 付加体の培養細胞へ添加は、VHH 抗体と EGFR の結合を介した細胞内取り込みによって標的遺伝子の抑制効果を認めた(図 4)。

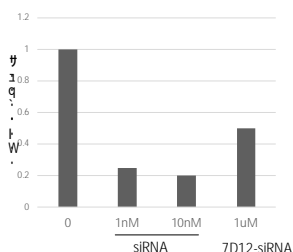


図 4 7D12-siRNA 添加による標的遺伝子抑制効果

(4)新規 EGFR-VHH 抗体の作製

ペイロード付加による VHH 抗体の抗原結合能への影響はクローンにより異なった為、さらなる抗 EGFR-VHH 抗体の取得を試みた。抗原の EGFR 蛋白質は C 末に HisTag を挿入した人工遺伝子を作製し、pcDNA3 ベクターへ挿入した。HEK293T 細胞に遺伝子導入し EGFR 蛋白質を発現させ、HisTag カラムおよびゲルろ過により精製し、抗原蛋白質とした。アルパカへの抗原免疫および VHH 抗体のスクリーニング作業はアーク・リソース株式会社へ外注により実施した。約 2mg の抗原を 2 週間おきに 5 回免疫し、随時採血と血漿力価の判定を行った。免疫前と比べ、2 回目、3 回目および 4 回目の採血サンプルにおいて抗原に対する力価の有意な上昇を確認した(図 5)。

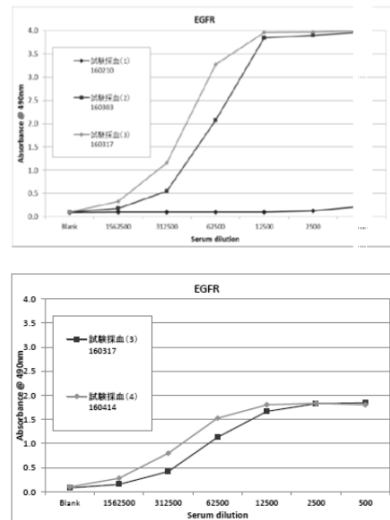


図 5 EGFR 蛋白質免疫後の血漿力価上昇

EGFR に対して力価上昇を確認した末梢血リンパ球から VHH 抗体のファージライブラリの作製とバイオパニングにより抗原に特異的に結合する VHH 抗体の単離を検討した。8 クローンの陽性クローンを得た(図 6)。さらに、配列解析の結果 3 つの VHH 抗体を得た。

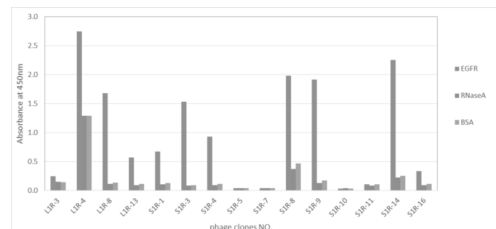


図 6 クローニングしたクローンの特異性評価

(5)総括

本課題では特定の抗原を認識できる「VHH 抗体」を利用し、様々な分子を付加させた場

合の影響を解明することを目的とした。付加物の種類、サイズ、数、リンカーの長さ、付加する位置といったADC設計の際に必要な基礎情報を得ることで、今後のADC開発における基盤となると考える。

特に本課題では、付加物の種類、サイズの検討を実施し、VHH抗体の目的の部分に1分子ペイロード付加が可能となった。さらに、複合体についてVHH抗体の機能およびペイロードの機能について評価を行った。今後、VHH抗体-ペイロード複合体によるVHH抗体およびペイロードの構造への影響について詳細な解析が必要である。

<引用文献>

Hagihara Y1, Mine S, Uegaki K., Stabilization of an immunoglobulin fold domain by an engineered disulfide bond at the buried hydrophobic region. *J Biol Chem.* 2007 282(50):36489-36495

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計5件)

赤澤陽子、「ラクダ科動物由来シングルドメインVHH抗体の安定性を利用した抗体素材および医薬への応用」、第16回日本蛋白質科学会年会 2016.6.9

赤澤陽子、「ラクダ科動物由来シングルドメインVHH抗体の蛋白質科学と医療分野への応用」第1回セミナー 次世代抗体の創出プラットフォームとその展開、2016.7.13

赤澤陽子、「ラクダ科動物由来VHH抗体の開発」生物化学的測定研究会 第21回学術シンポジウムプログラム、2016.11.11

赤澤陽子、「ラクダ科動物由来VHH抗体の耐熱性の改良」大阪大学蛋白質研究所セミナー、2017.9.11

赤澤陽子、「ラクダ科動物由来VHH抗体の基盤的な研究開発」第3回蛋白質工学研究会ワークショップ『小分子抗体関連技術』、2017.6.19

[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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤澤 陽子 (Akazawa Yoko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：50549897

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

(4)研究協力者

萩原 義久 (Hagihara Yoshihis)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
研究者番号：50357761
中島 芳浩 (Nakajima Yoshihiro)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
研究者番号：10291080