

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05721

研究課題名（和文）高機能抗体薬物複合体創成を目指した多量体型抗体フラグメントの分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of multimeric antibody fragments towards the construction of highly functional antibody-drug conjugates

研究代表者

田所 高志（Tadokoro, Takashi）

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・講師

研究者番号：10762396

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、従来の抗体医薬品に代わる新規分子設計を行い、その分子基盤と物理化学的特性を明らかにすることを目指した。そこで、抗体の可変領域（Fv）をペプチドリinkerで繋いだ一本鎖Fv抗体断片（scFv）に着目し、抗原結合能を低下させる変異を導入したscFvを、多量体化ペプチド配列と融合させることにより多価の結合部位を有する多量体型抗体フラグメントを作製した。相互作用解析の結果、解離定数が二桁程度悪化した多重変異体を多量体化すると、多価効果により見かけの結合解離定数が二桁程度改善することを見出した。また、この多価効果はscFvと多量体化ペプチドをつなぐリンカー配列の影響を受けることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全長抗体では、その強すぎる抗原結合能のため、不十分な細胞内取り込みや薬効あるいはOn-targetの副作用がしばしば問題となっている。アカデミアを中心に抗体の高機能化を目指した低分子抗体の研究が進められてきており、最近になり低分子抗体を基盤とした抗体医薬品が上市されるなど、ようやく実装されつつある。本研究の、scFv一価当たりの親和性を低下させ、結合価数により高親和性を達成する設計は独自である。抗原結合部位によらずリンカー配列により結合能が影響を受けるという知見は、今後の合理的設計に新しい視点を与える。従来とは異なる本研究の分子設計は、新たな選択肢を提供できるという意味でも非常に意義深い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to investigate the molecular basis and physicochemical properties of antibody fragment by designing novel molecular format to replace conventional antibody drugs. Therefore, focusing on a single-chain Fv antibody fragment (scFv) in which the variable region (Fv) of an antibody is connected with a flexible peptide linker, multimeric antibody fragments with multivalent binding sites were generated as follows; the scFv which utilizes a mutation that reduces antigen-binding ability is fused with a multimerized peptide sequence. The interaction analysis showed that the apparent binding dissociation constant was improved by about two orders of magnitude by multimerization of the mutant with multiple mutations whose dissociation constant was deteriorated by about two orders of magnitude. We also found that this multivalent effect is affected by the linker sequence connecting the scFv and the multimerized peptide.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：抗体 蛋白質工学 抗がん剤 相互作用解析 合理的分子設計

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、抗がん剤の開発に向けた抗体医薬品の研究が積極的に進められている。抗がん性抗体医薬品はがん特異的に発現している抗原を標的とするために効果的な治療につながっているが、不十分な薬効や重い副作用等未だに多くの課題がある。一方、低分子薬は高い殺細胞活性を有するが、治療濃度域が狭く、それを超える濃度を用いた場合強い副作用を示す例がほとんどである。これまでに抗体医薬品と低分子薬の併用による一定の治療効果が上がった成果はあるが、決定的な問題解決には至っていない。抗体医薬品における課題と今後の展開は、大別して (2) 標的分子・対象疾患の拡大、(2) 次世代抗体への転換、(3) 製剤、剤形、製造方法の改良などが考えられる。本研究では主に (2) の関連研究について着目した。現在次世代バイオ医薬品として最も期待されている抗体医薬の一つは、抗体に薬物を連結させた抗体-薬物複合体 (Antibody drug conjugate, ADC) である (Beck A. et al. Nat Rev Drug Discov. 2017)。ADCは、高い標的選択性をもつ抗体を薬物の運搬役とし、抗体に連結した薬物が薬効を担うように設計されている。しかし、現在主流の全長抗体を基本骨格としたADCでは、不均一な薬物抗体比 (Drug antibody ratio, DAR)、副作用、高薬価等の問題が残されている。また、全長抗体はがん抗原に対する結合が強すぎるため、細胞内に取り込まれにくい性質を持つ。このため、全長抗体は投与量のごく少量しかがん組織に蓄積しないことが明らかになっている。加えて、抗原に対する結合が強すぎるために起こる On-target の副作用がしばしば問題となっている (Münz M et al. Cancer Cell Int. 2010)。この問題を解決するために、全長抗体に代わる設計に基づいた抗体が望まれる。

抗体の高機能化や多機能化を実現するための基盤として、全長抗体を断片化した低分子化抗体の研究が比較的早くから進められてきている。低分子化抗体の中でも一本鎖 Fv 抗体断片 (single chain fragment variable, scFv) に関する研究は盛んに進められてきている。scFv は、抗原結合部位を含む可変領域 (Fv) を柔軟なペプチドリンカーで繋いだ一本鎖ポリペプチドで構成され、全長抗体より低分子量のため、組織浸透性と血中滞留性が改善することが知られている。これまでの研究から、低分子化抗体 (Fab や scFv) では、断片化することにより抗原結合親和性が全長抗体に比べて著しく低下する場合はあれば、ほとんど差がない場合もあり、抗体の性質を決定する要因の完全な理解には至っていない (Tiller KE & Tessier PM. Annu Rev Biomed Eng. 2015)。これは、抗体毎での親和性や構造安定性といった物理化学的特性の差異に起因していると考えられるが、この差異を考慮した合理的な分子設計を実現する上では、抗体の物理化学的特性の相関を理解することが不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究では、特に scFv を用いて高機能化や将来的なADCへの応用を目指した分子設計を行い、分子間相互作用解析や安定性解析を定量的に実施することで、低分子抗体およびそれを基盤とする分子の物理化学的特性を明らかにすることを目的とする。そのため、既存の抗がん性バイオ医薬品よりも高い標的選択性と高親和性を有する高機能抗体分子を設計・作製し、物理化学的な解析を進めることで、scFv を基盤とした高機能化抗体の構造構築に対する新たな知見を得ることを目指した。具体的には、タンパク質工学的アプローチにより、親和性低下変異を導入した抗体断片 Fv を、多量体化が知られているペプチド配列と融合させることにより多価の結合部位を有する新規構造の抗体フラグメント体について解析することとした。一般の抗体医薬品では、人為的な親和性成熟やヒト化後の進化工学的手法によって高親和性の獲得が試みられるが、Fv の親和性を低減させ、結合価数により高親和性を目指す点がユニークなところである。本研究により低分子化抗体を活用した分子の物理化学的特性が明らかになれば、将来的には、より合理的な抗体医薬品の設計指針を与えることができるだけでなく、既存抗体に代わる新規バイオ融合医薬品開発のための基盤となる新たな選択肢の一つとして、多量体型抗体フラグメントを提案できると期待する。

### 3. 研究の方法

新規抗がん性のバイオ融合医薬品を開発を目標に、抗 HER2 抗体 (トラスツズマブ) をモデルとして新規の多量体型抗体フラグメントを作製し、結合親和性や安定性といった物理化学的特性を解析する。具体的には、scFv を基本骨格とし、立体構造情報に基づき抗原結合親和性を低下させる変異を導入する。次いで多量体化が知られているペプチド配列を融合させることで任意の多量体化分子を作製し、物理化学的解析を実施する。本研究では、scFv に導入する変異や多量体化ペプチドと Fv を繋ぐリンカーの配列や長さについても検討することとする。更に、将来的なADCへの応用を目的とし、scFv を用いたADCを試作検討することとする。具体的には以下の項目について取り組む。

#### (1) 高機能化抗体フラグメントの作製

多量体化能を持つペプチドと親和性を抑制した scFv 変異体を連結した多量体型抗体フラグメントを作製する。また、その発現系・調製方法の検討および最適化を行う。

## (2) 多量体型抗体フラグメントの物理化学的特性解析

多量体型抗体フラグメントの結合親和性、安定性、高次構造といった物理化学的性質を解析する。また、細胞を用いたフローサイトメトリーによる結合実験を

## (3) 高機能化抗体フラグメントを用いた抗体薬物コンジュゲートの試作

将来的な ADC への応用を念頭に、scFv に抗がん活性を示す薬剤を搭載した抗体薬物複合体を試作・検討する。

## 4. 研究成果

(1) 乳がん治療抗体であるトラスツズマブをモデルとし、また、既存の抗原との複合体構造情報に基づき、相補性決定領域に 5 つの部位への単変異を導入することで一価あたりの抗原結合能を低下させた scFv 変異体を、大腸菌発現系を用いて封入体より巻き戻しをすることで作製した。また、結合親和性低下効果が大きかった単変異を組み合わせた多重変異体も同様の方法で作製した。更に  $\alpha$  ヘリックスを介した二量体、三量体、および五量体形成が知られているペプチド配列をトラスツズマブ scFv の C 末端に連結した多量体型抗体フラグメントを同様に作製した。大腸菌発現系による組換えタンパク質調製では、scFv 単量体から二量体、三量体と量体数が増加するごとに巻き戻り効率および収率が低下する傾向が認められたため、トラスツズマブ scFv 三量体について、カイコ発現系および哺乳細胞発現系による調製を試み、哺乳細胞発現系において収量の改善が認められた。このことから他の抗体の多量体作製についても哺乳細胞発現系が適用可能であることが見込まれる。更に、多量体化抗体の作製を進めた分子設計の汎用性を高めるため、On-target 副作用の報告例がある抗 EGFR 抗体（セツキシマブやパニツムマブ）に着目し、立体構造情報に基づきセツキシマブおよびパニツムマブそれぞれについて結合能が低下すると予想される変異を導入したコンストラクトを作製した。相互作用実験の結果、抗原に対する結合能が最大で一桁程度低下しており、その要因が解離速度定数に起因することが分かったことからこれら抗 EGFR 抗体についても今後の三量体化フラグメント作製への基盤が整えられた。

(2) (1) で作製した、トラスツズマブの各多量体型抗体フラグメントについて、サイズ排除クロマトグラフィー・多角度光散乱測定および Blue-Native PAGE を実施し、トラスツズマブ scFv の二量体、三量体および五量体が意図したとおりに形成されていることが分かった。

抗原結合能を低下させる変異を導入した scFv を用いて、表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を実施したところ、5 種類のうち 3 種類の単変異体で抗原結合解離定数が一桁程度低下していること、多重変異体で最大で二桁程度低下していることが分かった。速度論的解析の結果、この解離定数の低下は主に解離速度定数に起因することが明らかとなった。また、多量体化した変異体についても同様に相互作用解析を実施し、多量体化分子を一価とみなした見かけの結合解離定数を算出したところ、単量体に比べて、解離定数が二桁程度改善していることを見出した。速度論的解析の結果、この解離定数の改善は、解離速度定数の改善によることが分かり、結合価数の増加によるアビディティ効果によるものであることが示唆された。

scFv と多量体化ペプチドをつなぐリンカー配列について、トラスツズマブ scFv の三量体を用いて検討した。天然のタンパク質でみられる柔軟なループ領域に着目し、複数の候補配列を導入したコンストラクトを構築し、これらを組換えタンパク質として調製した。抗原の固定化量や結合時間を変えて表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を行ったところ、固定化量を増加させるにつれて見られる解離定数の低下や、結合時間の増加に伴う解離定数の低下というアビディティ効果が、リンカーのアミノ酸配列によって異なることを見出した。

以上、相互作用解析および高次構造の解析により、今回設計した多量体型抗体フラグメントが想定どおりの高次構造を形成し、多価化することでアビディティ効果による結合能の改善ができることを示した。また多価効果は scFv と多量体化ペプチドをつなぐリンカー配列の影響を受けることを見出した。

(3) ADC への応用に向けてトラスツズマブの scFv に対する薬物コンジュゲート体の試作を行った。薬剤の結合に活用する複数のタグ配列を検討し、適切な配列を見出した。また、抗原発現細胞に対する毒性試験を試みたところ、コンジュゲートに用いた化合物単体とそん色ない程度の細胞毒性を示す初期データを得ることができた。

また、今回設計した多量体化抗体フラグメントの ADC への活用を念頭に、トラスツズマブの抗原である HER2 の発現量が異なる複数の乳がん由来細胞に対してフローサイトメトリーを用いた結合実験を実施した。変異を導入した多量体型抗体フラグメントが、検討した全ての HER2 発現細胞に結合し、抗原発現量が比較的少ないとされる細胞とも結合できることが分かった。

以上今回設計した多量体型抗体フラグメントの ADC への応用の可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Tadokoro, Kota Nakamura, Asami Tomita, Harumi Tsuboi, Reo Ohmura, Katsumi Maneaka
2. 発表標題 Construction and characterization of the engineered trimeric single-chain Fv antibody fragment.
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田所高志、大村玲央、富田麻美、坪井晴美、中村光太、前仲勝実
2. 発表標題 独自の設計による高機能化抗体の調製と相互作用解析
3. 学会等名 第34回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------