

## 創薬基盤推進研究事業 研究開発課題

### 中間評価報告書

研究開発課題名	物理化学／計算科学を駆使したヒト化単ドメイン抗体取得系の高度化と汎用化
代表機関名	国立大学法人東京大学
研究開発代表者名	中木戸 誠
全研究開発期間	平成30年度 ～ 令和4年度（予定）

#### 1. 研究開発成果

本プロジェクトでは、生産コストの低さやハンドリングの容易さなどから近年注目を集めている単ドメイン抗体に着目し、物理化学的手法と計算科学的手法を駆使することにより、効率的にヒト化単ドメイン抗体を取得可能な合成ライブラリの構築および取得抗体の最適化手法を構築することを目的としている。具体的な研究開発項目として、以下の流れに沿って研究を進めている。

##### (1) アルパカ免疫による抗体取得と機能・物性解析

まずはライブラリ設計のための指針構築のため、合成ライブラリ作製に先立ち、複数の抗原に対してアルパカ免疫を行い、単離したリンパ球から抗体提示ファージライブラリを作製、パニングを行うことによって単ドメイン抗体を取得した。得られた抗体について、各種物理化学的手法によって物性・機能の解析を行い、それぞれの抗体について物性を精査した。その結果、いずれの抗原に対しても十分な親和性を有することが明らかとなり、ライブラリ構築の指針構築のためのモデル抗体として活用可能な単ドメイン抗体を複数取得することに成功した。さらに、計算科学的手法によって構造モデルを作製、分子動力学計算を行うことにより、単ドメイン抗体の分子内の動的な挙動について解析を行い、in vitro での解析結果と合わせて議論することにより、単ドメイン抗体の安定性に重要な部位について知見を得ることができた。

##### (2) 合成ヒト化単ドメイン抗体ライブラリの構築と抗体取得、機能・物性解析

これまでに配列とその立体構造が報告されている単ドメイン抗体の配列を参考に、CDR 領域に多様性をもたせたヒト化単ドメイン抗体提示ファージライブラリを構築した。作製した合成ライブラリを用いて抗原に対するパニングを行うことにより、抗原に対して特異的に結合する単ドメイン抗体を取得することに成功した。しかし、得られた抗体について大腸菌発現系を用いて組み換えタンパク質として発現・精製を試みたところ、凝集を形成し、単量体として組み換えタンパク質を調製することは困難であった。そこで、計算科学的手法によって得られた抗体の立体構造モデルを構築し、分子シミュレーションにより凝集性に寄与している可能性がある箇所をアミノ酸残基レベルで同定した。遺伝子工学により、凝集形成に寄与していると考えられるアミノ酸残基に変異を導入した改変型ヒト化単ドメイン抗体を作製し、同様に大腸菌発現系を用いて発現・精製を行ったところ、大幅に凝集性が改善され、単量体として組み換えタ

ンパク質を得ることに成功した。しかし、得られた抗体について表面プラズモン共鳴によって抗原に対する親和性を評価したところ、非常に親和性が低いことが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、骨格および CDR 設計の双方からライブラリデザインを再設計することとした。

### (3) 最適化ライブラリの設計

上記解析により、初期設計した合成ヒト化単ドメインライブラリから得られた抗体について、物性および抗原認識能の双方の観点から実用に足る十分な機能性を有していないことが明らかとなった。この原因を解明し、より優れたライブラリ設計のため、遺伝子工学によってヒト化単ドメイン抗体の骨格に免疫から取得した単ドメイン抗体の抗原認識領域を移植した合成ヒト化単ドメイン抗体を作製し、物理化学的手法によって詳細な物性解析を行っている。アミノ酸残基変異体を作製しながら精密解析を行うことにより、単ドメイン抗体の安定性に重要な部位が明らかとなりつつあり、今後これらの知見を活かし、再度合成ライブラリを設計・構築していく。

## 2. 総合評価

- ・総合的に期待通りの進捗と成果が得られている。

### 【評価コメント】

物理化学的手法と計算科学的手法を組み合わせることにより、ヒト化単ドメイン抗体デザイン技術の高度化・汎用化を目指し、アルパカ免疫による抗体取得、合成ヒト化単ドメイン抗体ライブラリ構築について、目標としていた標的タンパクについて合成ヒト化抗体を取得するなど着実に研究を進捗させている。将来、本研究開発課題が基盤となり、効率的な抗体医薬開発につながっていくことを期待する。

今後、本研究開発課題の達すべきクライテリアである取得した抗体の最適化に向け、機能・物性解析を加速する体制を整え、研究開発課題を進捗させること。特に、ライブラリ構築の最適化に向けて、機能性解析については、今後の研究開発期間を踏まえ、抗体の活性評価や抗原性評価が可能な研究機関に早急に協力を得て取り組むこと。

また、合成抗体デザイン化検討と機能・物性解析とを段階的に進めるだけでなく、それぞれの検討体制を有機的に連携させて研究を推進し、本研究開発課題の最終目標に向けて取り組むこと。

以上