

## 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	中分子アゴニスト創薬のロジカルデザイン ～OX40 アゴニスト開発を実施例として～
代表機関名	国立大学法人京都大学
研究開発代表者名	高折 晃史
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

本研究開発では、ラクダ科遺伝子由来の single domain antibody (VHH)を活用し、「アゴニストを数理的に取得する VHH 技術」の理論検証(POC)を目的としている。これにより、「標的エピトープを認識する VHH を数理的に取得する技術開発」を行い、「抗体医薬開発に飛躍的な技術革新とパラダイムシフト」をもたらすことを目指す。

##### 1) 抗 OX40-VHH ライブラリのクラスタリング数理解析・候補 VHH クラスターの抽出

アルパカを免疫し、ネイティブ OX40 単独、及びリガンド gp34 との OX40 複合体をパンニング用のベイトとして使用し、抗 OX40-VHH ライブラリを樹立した。次世代シーケンサによる遺伝子配列解析後、これら配列のサブトラクション法で分析し、リガンド結合候補クローンを約 800 抽出した。これらをシーケンス類似性によるクラスタ分類を行って、40 クラスタ程度に圧縮、40 クラスタ 50 クローン程度をペプチド合成し、下記細胞機能アッセイを実施した。サブトラクションアルゴリズムにしたがい、アゴニスト活性を有する 38 クローンを候補として選択した。

##### 2) ヒト T 細胞に対する合成 VHH ペプチドの生理活性の検証

合成された OX40 に対する VHH ペプチドをスクリーニングする際に用いる試験管内のアッセイ系として、細胞株を用いた NF- $\kappa$ B プロモーターのルシフェラーゼアッセイ、及び、初代培養細胞を用いた T 細胞増殖アッセイを樹立した。38 クローンの VHH 抗体を合成し、OX40 への結合、ルシフェラーゼアッセイ、T 細胞活性化アッセイを実施、活性の高いクローンを 6 クローン得た。

##### 3) VHH ペプチドによる OX40 の認識機構の検証

OX40-VHH が取得されるまでの間、GFP-VHH を用いて NMR 用試料の調製方法と測定方法を確立し、NMR データ統合解析プログラム及びそれを使った解析方法を整備した。GFP-VHH の各種他核多次元 NMR スペクトルを解析し、主鎖及び側鎖の帰属を行うとともに、立体構造解析を行った。取得した数種類の OX40-VHH の各種他核多次元 NMR スペクトルを測定した。目下、主鎖及び側鎖の帰属を行っている。

## 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】

ゲノム科学と計算科学を基盤とした高機能バイオ医薬品抗体デザイン開発技術の樹立に向け、ヒト腫瘍等に対する免疫グロブリンのレパトア解析、抗体高機能化に向けた計算科学の実施、改変抗体の作製まで、着実な成果が得られている。今後、抗体高機能化につながるアルゴリズムが開発され、医療上で有用な抗体作成に多大な貢献をもたらす研究として期待する。

現在ターゲットとしている抗体のさらなる高機能化を目指し、デザインした抗体の多角的機能性評価に重点を置き、創薬基盤推進研究として目的としている計算科学アルゴリズムの洗練化に結びつけること。そのために、特異的抗原物質に対する結合性の評価について専門家の協力も取り入れて進めること。さらに、本デザイン開発技術の将来展開に向け、必要かつ十分な知財出願をするとともに、抗体医薬が期待される臨床現場のニーズも踏まえ、ユニバーサルなデザイン開発技術につながる道筋を明らかにしておくこと。

以上