

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) Structure-based protein design を駆使した抗体代替物の創成と高難度組換え蛋白質生産の支援

(プログラム名) (英語) Recombinant production of high-value target proteins and their binders via structure-based protein design

実施期間: 平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 高木 淳一
(英語) Junichi Takagi

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人大阪大学・蛋白質研究所・教授
(英語) Osaka University, Institute for Protein Research, Professor

II 補助事業の概要

(1) 支援

本事業の支援分では、下記の二つの主要な支援項目それぞれについて、整備した体制と研究開発環境のもとに進めた。

1. 高難度創薬ターゲット蛋白質の構造解析品質での迅速生産

【目標】本グループの特色である、(i) 動物細胞を用いた高品質発現系の採用、(ii) 糖鎖修飾変異株をつかった糖鎖均一化エンジニアリング、そして (iii) 独自のアフィニティータグシステムを駆使した一段階高速精製、を最大限に活かし、支援の本項目では、創薬研究および基礎生物学研究に供する「高難度蛋白質」の発現精製、その性状解析 (相互作用解析を含む)、さらにはその構造機能解析について、「正確性と迅速性」を重視した支援を行った。

【実績】2017年度には、6件の支援案件を担当し、創薬研究に供する「高難度蛋白質」の発現精製、その性状解析、さらにはその構造機能解析について、正確性と迅速性を重視した支援を行った。具体的には、(i) がんの転移と増殖に関わる HGF について、その安定発現細胞株の樹立と大量生産、Fv-clasp 化抗体との複合体の結晶構造の 2.8Å 分解能での解明、低分子阻害化合物との共結晶化、(ii) 新規糖転移酵素の組み換え大量生産とその基質アナログ複合体の結晶構造決定、(iii) マラリア原虫の免疫攪乱抗原の可変領域の組

換え蛋白質生産、(iv) 先天性無歯症の分子標的抗体医薬開発のための高品質抗原蛋白質調製、などを達成した。2018 年度には、10 件の支援案件を担当した。具体的には、(i) がんの転移と増殖に関わる HGF について、その不活性型前駆体断片の世界初の結晶構造の決定と活性化メカニズムの解明、(ii) 新規糖転移酵素の組み換え大量生産とその基質アナログ複合体の結晶構造決定、(iii) 先天性無歯症の分子標的抗体医薬開発のための高品質抗原蛋白質調製と中和抗体の樹立、などを達成し、2 件を成功裏に、1 件は目的不達成のまま終了した (7 件継続)。2019 年度には、9 件の支援案件を担当した。具体的には、(i) がんの転移と増殖に関わる HGF について、その不活性型前駆体でも受容体 Met に高親和性で結合してしまう謎の解明、(ii) 先天性無歯症の分子標的医薬候補である中和抗体のエピトープ同定、(iii) 血液凝固第 XII 因子の O 型糖鎖の役割の解明、(iv) ケモカイン受容体の下流制御因子複合体の調製、などを達成した。3 件の課題については生産自体は成功したもの、依頼者側で目的不達成のまま終了した (6 件継続)。2020 年度には、11 件の支援案件を担当した。具体的には、(i) 新型コロナウイルス(nCoV)感染治療薬候補のスクリーニングのためにスパイク蛋白質の RBD(receptor-binding domain)-Fc を供与、(ii) スパイク受容体 ACE2 の高親和性変異体の生産と性状解析、およびそれを用いた治療薬候補の同定、(iii) 重症筋無力症の治療薬候補となる MuSK アゴニストの発見、などを達成した。2 件の課題については生産自体は成功したもの、依頼者側で目的不達成のまま終了した (9 件継続)。2021 年度には、9 件の支援案件を担当した。具体的には、(i) 医薬候補 (高親和性変異型 ACE2-Fc 蛋白質 3N39v4) の最終デザイン確定とその大量精製、そしてその血中濃度を測定するアッセイ系の構築、(ii) 高親和性 ACE2 変異体単独 (スパイク RBD と結合する前) の構造決定、(iii) がん細胞特異的な抗体の認識抗原の同定と、その認識にがん細胞特有の糖鎖が関わることの証明、(iv) ケモカイン受容体のシグナル伝達に関わるタンパク質複合体 X の精製と、阻害剤の結合様式の解明、などを達成した。

2. 創薬ターゲット蛋白質に対する構造認識抗体/バインダー蛋白質の取得とその組換え発現

【目標】 この支援項目では、①外部研究者が持ち込むターゲット特異的なモノクローナル抗体の Fv-clasp 化と構造解析、②PA タグ挿入法を用いた難結晶性蛋白質の結晶化、③Rapibody 法 (LassoGraft 法) を応用した新規バインダー取得支援、をおこなった。

【実績】 2017 年度には、8 件の支援を引き受け、(i) HGF 抗体の Fv-clasp 化と結晶構造解析、(ii) タンパク質の糖化修飾構造を認識するモノクローナル抗体の Fv-clasp 変換と結晶化、(iii) 単一ドメイン抗体の Fv-clasp 化による結晶化、(iv) インフルエンザウイルス中和活性をもつ環状ペプチドの Rapibody 化、などを実施した。2018 年度には、5 件の支援を引き受け、(i) HGF 抗体の Fv-clasp 化と結晶構造解析、(ii) 抗うつ薬に対する抗体の Fv-clasp 変換と結晶化、(iii) 抗体酵素の Fv-clasp 化による結晶化、(iv) Fv-clasp 型ファージライブラリーの構築、などを実施した。2019 年度には、6 件の支援を引き受け、(i) 抗体酵素の Fv-clasp 化による結晶化、(ii) 転写因子複合体の構造解析を目指した PA タグ挿入と NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製、などを実施した。2 件を成功裏に終了させた。2020 年度には、10 件の支援を引き受け、(i) 抗 PD-L1 抗体医薬テセントリクの Fv-clasp と PD-L1 複合体の結晶構造取得、(ii) NMR による Fv-clasp 動的構造情報の取得、などを実施した。5 件を成功裏に終了させ、依頼者との共著論文も発表した。2021 年度には、4 件の継続案件を支援し、(i) 糖鎖認識抗体の Fv-clasp 化と、その糖鎖抗原との共結晶構造の決定、(ii) LassoGraft 法を応用した Met 活性化アゴニスト Mirabody の in vivo 活性の確認と結合エピトープの同定、などを実施した。PA タグ挿入と Fv-clasp 結合による高難度ターゲットの結晶化に挑んだ 2 件の支援では、複合体化は出来たものの良好な結晶は得られず、同じ試料をクライオ電顕による構造解析に供することとして終了した。これらの支援を通して合計 11 件の共著論文を発表した

(2) 高度化

【目標】高度化研究では、次世代の支援技術基盤となり得るテクノロジー、とくに抗体および抗体類似分子の蛋白質工学的改変に関わる新技術の創成を目指した。事業期間を通じて、「既存の抗体の弱点を克服する Fv-clasp とそのバリエーションの改良」、「組み換え生産系としての Fc 融合システムの“再開発”」、抗体に代わるバインダーフォーマット“Rapibody=LassoGraft”方法論の確立」、そして「アデノ随伴ウイルスキャプシドへの標的移行性ペプチド提示法の開発」の4つの実施項目を推進した。

【実績】

「Fv-clasp とそのバリエーションの改良」においては、新たに多種類のモノクローナル抗体について Fv-clasp 化と結晶構造決定した。また、Fv-clasp 化した2つの抗インテグリンモノクローナル抗体を利用し、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリントリガンドであるラミニンを加えた4者複合体(合計で9サブユニットを含む)の構造決定をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により達成し、Nature Commun 誌に報告した。このほか、2つの抗 HER2 抗体と HER2 との複合体結晶構造解析を行い、2種類の抗体についてそれぞれ 1.7\AA および 1.75\AA 分解能での構造決定に成功した。

「古典的な Fc 融合システムの“再開発”」においては、抗体のヒンジ部を切断する IdeS プロテアーゼの大量発現精製、および酵素学的解析を行い、さらに IdeS と Fc の共結晶構造決定を低分解能で達成した。IdeS プロテアーゼ切断を利用した新規 Fc 融合ベクター系の確立については、これを応用したヒト Wnt3-Frizzled 受容体の複合体状態での構造決定を達成し、論文発表した。さらにベクターデザインの改良を続け、IdeS 切断後にヒンジ領域が残らない「short hinge Fc(shFc)」デザインを完成した。

「Rapibody」方法論の確立では、8つのターゲット蛋白質に対する合計31種類の環状ペプチド配列を Rapibody フォーマットに適用し、成功率約50%で変換可能であることを示した。このほかにも、「eTev タグ」と「PA タグ」とを組み合わせた PAW タグシステムを創出し、論文発表するとともに支援案件に応用した。また、PA タグ挿入法を電子顕微鏡イメージングに応用し、サブユニットやドメインの可視化を常温ネガティブ染色試料およびクライオサンプルの両方で達成した。さらに、Rapibody 以外のバインダー提示フォーマットの探索をすすめて、Mirabody、Addbody の開発に成功した。ここで Rapibody 法を LassoGraft Technology® (LG 法) と改称し、この技術の水平展開のため、様々な標的に対する Mirabody、Addbody を作製し、その機能評価を行った。とくに Addbody については4重特異性抗体や異種細胞を連結する抗体の開発に成功した。続いて、様々な受容体に結合してその多量体化を誘導することによって活性化する「アゴニスト性バインダー」を複数の受容体に対して取得した。

「AAV キャプシドへの標的移行性ペプチド提示法の開発(産学連携高度化課題)」では AAV キャプシドの改変可能な表在ループの同定とターゲティングペプチドの提示に成功した。まずは AcGFP と luciferase を格納したプレキシシン B1 標的型 AAV2 をもちいて POC 実験を終了した。つづいて、3種類の受容体に対するバインダーペプチドを組み込んだ AAV において、標的発現細胞特異的な遺伝子導入効率の増大(野生型に比べて3-10倍)を達成した。また本項目の分担者である菅教授と共同で、多様な細胞に対する特異的標的化のための新たなペプチド配列の取得を進め、20種類以上の新規ペプチド同定に至った。最終年度には、AAV 粒子を高品質で精製する手法を開発し、in vivo 実験品質のウイルスをコンスタントに作製出来る環境を構築したほか、精製 AAV をマウス尾静脈から投与し、生物発光イメージング(BLI)によって遺伝子発現を評価する系を確立した。

This proposal aimed to provide SHI-EN (research support) to outside researchers through the use of cutting-edge protein expression and purification skills combined with structural biology/protein engineering background. We took advantage of our proprietary technologies including the special glycoengineered expression host cell lines and custom-made affinity purification systems, as well as strong expression pipeline established during the previous "PDIS" program. We also adopted our newly-developed technologies including Fv-clasp and Rapibody into the SHI-EN scheme. Particular emphasis was put on the effort to aid crystallization of drug-target proteins, through the use of "crystallization chaperones". Upon request, we converted numerous candidate monoclonal antibodies from the IgG to the hyper-crystallizable Fv-clasp format, maximizing the chance of crystallization of the antibody-antigen complex. We also helped researchers to isolate novel binder molecules against their target using the semi-synthetic antibody-like protein scaffold "Rapibody" (which was renamed as "LassoGraft technology" during the period of this program). We put the rest of the efforts into the "KOHDO-KA" (technology development) scheme, where we aimed to achieve the followings; (1) design improvement of Fv-clasp and other clasping technologies, (2) development of Fc-fusion system suitable for the structure-oriented protein production, and (3) establishment of the "Rapibody" technology. For (1), we collected large set of structural information on different Fv-clasp proteins and engineer highly stable Fv-clasp variants. We also systematically optimized the sequence of the SARAH domain, the core heterodimerization domain within the Fv-clasp scaffold, and came up with a modified version of Fv-clasp utilizing a heterodimeric SARAH domain. In (2), the sequence of the IgG-derived upper-hinge region of the traditional Fc-fusion expression vector was re-engineered to include specific recognition site for the IdeS protease, so that the clean Fc-tag removal can be realized. This resulted in a novel protein fusion/expression system we call "short-hinge Fc (shFc)", and we succeeded in applying it to a few cases of structural determination of receptor ectodomains. The last and the most ambitious technology development was the realization of Rapibody/LassoGraft technology (3). This technology incorporated the advantage of the macrocyclic peptide binder format (i.e., RaPID peptides) into a well-folded recombinant proteins such as InG Fc. We obtained more than 15 Mirabodies (Fc-only protein grafted with internal sequence derived from target-binding cyclic peptides) that can bind the target molecules on the cell surface with high specificity and affinity. Some of the anti-receptor Mirabodies were found to be capable of activating the target receptors in cells, which opened a way to systematically develop receptor agonists, a new modality of biotherapeutics that had not been easy to make with the existing technology. Overall, this project employed the best expertise on the structure-guided protein engineering and succeeded in developing novel antibody substitute, which can potentially change the current trend of antibody-centered biologic drug development scheme.