

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：次世代バイオ医薬品を目指した低分子二重特異性抗体の基盤技術開発
3. 研究開発代表者：国立大学法人東京農工大学大学院工学研究院 准教授 浅野竜太郎
4. 研究開発の成果

研究代表者らが開発してきた低分子二重特異性抗体医薬シーズである Ex3(図 1)は、担がんマウスモデルに於ける薬効、および製剤化に十分な安定性を有しているが、既存の調製技術では、実製造プロセスを見据えることができていない。即ち、新たに調製に係る革新的な基盤技術を確立することができれば、この Ex3 のみならず同様の低分子抗体医薬の実用化を加速させることが期待できる。本プロジェクトでは、より実用化に適した分子設計、遺伝子配列の改変を応用した微生物発現の最適化、プロテイン L を利用した高効率精製の観点から、共同研究機関と連携して低分子二重特異性抗体の調製に係る基盤技術開発を目指しており、宿主微生物としては、汎用されている大腸菌と酵母に加え、組換えタンパク質の分泌生産に優れ、エンドトキシンを持たないことから、低コストでの製造プロセス構築が期待できるブレビバチルス菌を用いた検討を並行して進めている。

平成 27 年度は、配向性が異なる低分子二重特異性抗体の調製と機能評価、およびアルカリ感受性の高いプロテイン L の開発を進めた。研究代表者らは近年、Ex3 を構成するドメインの連結順を入れ換えた配向性改変体を作製することで、発現量やがん細胞傷害活性が増減することを見出したが、一方で、Ex3 は非共有性の相互作用により会合した二量体タンパク質であるため、製造プロセス過程や保存中に、分子が解離してしまう恐れがある。すべての構成するドメインを連結させた構造である single-chain diabody (scDb)型や tandem scFv (taFv)型は、解離の懸念はないが、それぞれ 8 通りの配向性が考えられ、これらの配向性の違いが及ぼす発現量や機能への影響を検証した例はない(図 2)。そこで、本年度は、これまでの検討により、親和性の低下が予測されている 4 種類の scDb 型 Ex3 を除く合計 12 種類の配向性が異なる分子種をすべて調製し、機能評価を行うことで配向性の違いがもたらす機能への影響を詳細に記述することを目指した。

12 種類の配向性が異なる taFv 型および scDb 型 Ex3 の配列をそれぞれ設計し、対応するコドン宿主に合わせて最適化後、遺伝子配列の委託合成を行った。続いて、大腸菌、酵母、およびブレビバチルス菌で発現させるためのベクターの作製を、共同研究機関と分担して進めた。結果、大腸菌と酵母用発現ベクターは 12 種類すべて完成し、またブレビバチルス菌用発現ベクターは、10 種類完成した。ベクターの作製と平行して、発現確認も進めた結果、大腸菌と酵母に於いてはいずれも発現がみられたことから設計した遺伝子には問題がないこと、および配向性が異なる分子すべてが調製可能であることが示された。ブレビバチルス菌に於いては、6 種類の配向性に関して発現確認が終了している。精製タンパク質を用いた機能評価に先駆けて、4 種類の Ex3 の大腸菌培養上清を用い、簡易的ながん細胞傷害性試験を行ったところ、配向性の違いによる効果の差異が認められたため、今後はすべての配向性に関して簡易的な評価を行った後、有望な分子種に関しては、詳細な評価へと進める予定である。さらに、前述の親和性の低下が予測されている 4 種類の scDb 型 Ex3 に関しても、発現量の向上や予想と反する高い

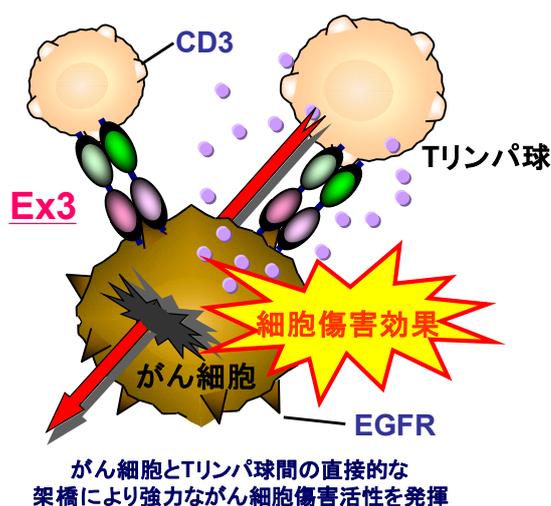


図1 低分子二重特異性抗体Ex3の模式図

機能を示す可能性が否定できないため、これらに関する発現ベクターの作製を追加で進め、結果大腸菌および酵母用に関しては図 2 に示す 16 種類の配向性に対する発現ベクターすべての作製を終了した。今後、未完成の発現ベクターの構築を進めると共に、生産性と精製タンパク質を用いた機能評価により、有用な宿主と配向性の組み合わせを抽出する予定である。

一方、プロテイン L に関して、アルカリ、熱処理による切断部位の同定を実施し、安定性の低いアミノ酸配列の同定を試みた。並行して、リジン残基に対する変異、立体構造上の安定性が向上されると推測される残基の変異を導入した複数のコンストラクトを作製し、その中で最も安定性が高い変異体を選抜した。さらに、担体への固定化方法を変更することで、より安定性が高くなることを見出した。今後、同変異体の生産能向上、製造プロセスの最適化を行うとともに、Ex3 の精製工程への適用を図る計画である。

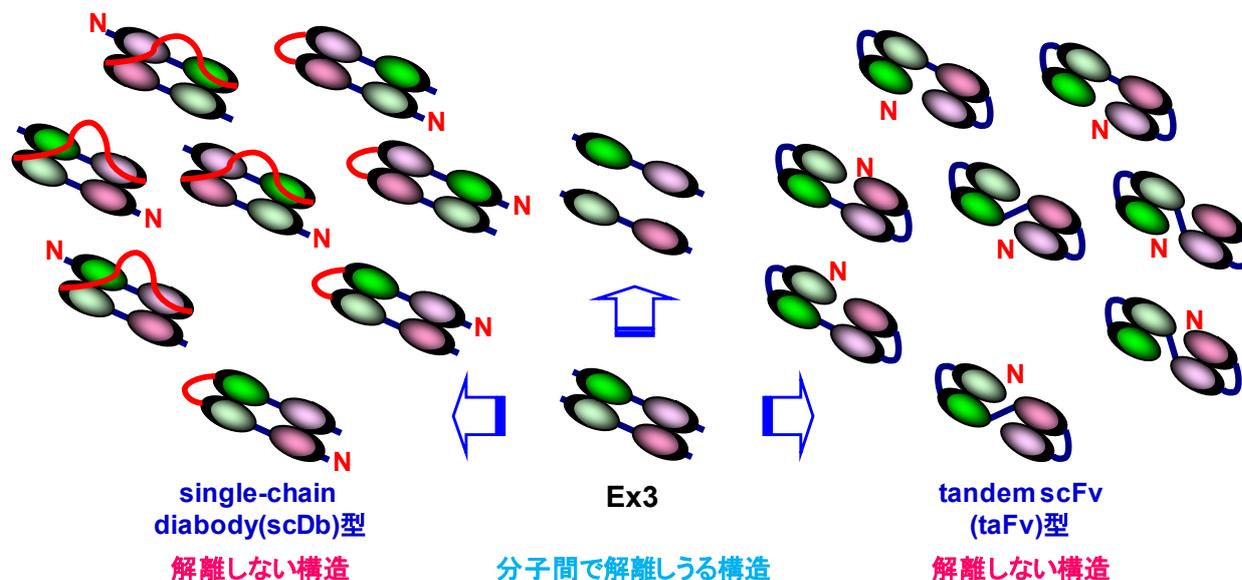


図2 配向性の異なるEx3の模式図