

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative Biological Medicine

研究開発課題名： (日本語) アンメット疾患領域を開拓するスマートなケモバイオ抗体  
(英語) Smart chemobio antibodies design for unmet disease

研究開発担当者 (日本語) 東北大学 大学院工学研究科 教授 梅津 光央  
所属 役職 氏名： (英語) Mitsuo Umetsu, Professor, Graduate School of Engineering, Tohoku University

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

研究開発分担者 (日本語) 東北大学 大学院薬学研究科 教授 大島 吉輝  
所属 役職 氏名： (英語) Yoshiteru Oshima, Professor, Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University

研究開発分担者 (日本語) 東北大学 大学院医学研究科 准教授 段 孝  
所属 役職 氏名： (英語) Takashi Dan, Associate professor, Graduate School of Medicine, Tohoku University

研究開発分担者 (日本語) 東海大学 医学部 教授 松阪 泰二  
所属 役職 氏名： (英語) Taiji Matsusaka, Professor, School of Medicine, Tokai University

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

低分子医薬は、細胞内外の幅広い標的分子を対象として多様な作用機序が狙える一方で、特異性が低く複数の作用点を持つ。バイオ医薬の一つである抗体は、特異性は高いものの、細胞外での利用に限定され、作用も標的抗原との結合による中和活性と抗体依存性や補体依存性の細胞障害作用に限られる。本業務では、低分子・バイオ医薬が単独では効果を示さないアンメットな疾患の標的分子をターゲットにできる医薬品フォーマットを提案することを目的として、腎臓病をモデルに用いて、低分子医薬と抗体医薬の利点構造のみを融合させ、それぞれの特徴である

豊富な標的分子と多様な作用機序、標的特異性と良好な薬物動態を合わせ持つケモバイオ抗体を創り出す。

上記目標へ向けて当該年度は、抗ポドプラニン抗体から作製した腎上皮特異的低分子抗体へ蛋白質に結合可能なリンカーを付与した PAI-1 阻害薬を結合させて PAI-1 阻害薬修飾低分子抗体(ケモバイオ抗体)の作製を行った。その結果、ケモバイオ抗体へのアミノ酸改変・PAI-1 阻害薬のリンカー改変・反応条件などを検討することにより、抗体のポドプラニン断片への結合機能を不活性化させずに PAI-1 へ結合活性を有するケモバイオ抗体を作製することができた。さらに、抗体と PAI-1 阻害薬の両者に共通する可溶化条件を改善していくことによって、PAI-1 活性を阻害できるケモバイオ抗体へ最適化していくことができた。

ケモバイオ抗体をヒトへ利用するためには、ヒトへ利用できる抗体であるだけでなく動物実験にも用いることができる必要がある。そこで、当該年度では、ヒトと他の動物の両ポドプラニンに対して交差性を持つ抗ポドプラニン抗体を開発し、その抗体の断片から腎上皮に集積する低分子抗体を作製することを行った。そこで、前年度までに取得しているヒト型化されたヒトポドプラニンに特異的な抗体を骨格として変異導入を繰り返し行ったところ、ヒト由来のポドプラニンを提示した CHO 細胞への結合活性を損なうことなく目的動物由来のポドプラニンを提示している CHO 細胞にも親和性を同等程度にまで向上させた抗体を作製することに成功した。また、この交差性を持たせた変異導入は、大腸菌における抗体の生産量も向上させる結果にもつながった。

次に、この交差性抗体を用いて、ヒト腎臓組織断片および目的動物腎臓組織断片を免疫染色したところ、両組織中の糸球体を染色できることが分かった。そこで、開発された交差性抗体の可変領域から diabody 型の低分子抗体を作製し、目的動物へ投与して免疫染色などで腎臓表皮への集積度を評価した。その結果、低分子抗体は、他の臓器へは集積しておらず、腎臓中の糸球体へ優位に集積することが観測された。

以上から、当該年度においては、低分子抗体の標的結合性および PAI-1 阻害薬の PAI-1 活性阻害を失活させずに両者を結合させたケモバイオ抗体を作製した。そして、ヒトへの実用化に関しては、ヒトと他の動物の両ポドプラニンに対して交差性を持つ抗ポドプラニン抗体を開発することができた。

Low-molecular medicines can be designed for targeting various molecules present in and out of cells and they have various interaction with target molecules to express various function; however, the affinity and specificity of low-molecular medicines is so low to lead to off-target reaction and side effect, and the low weight causes fast clearance. Whereas, antibodies have high affinity for target molecules and its specificity leads to high accumulation on a specific tissue; but the antibodies are not functional in cell and they only have the functions of neutralization and cell cytotoxicity such as ADCC and CDC. In this project, we propose a novel medical molecular format which has effective activity for kidney disease by conjugating low molecular organic medicine with antibody fragments. The medical molecules (we call 'chemobio antibodies') have both the benefit characters of low-molecular medicine and antibody: they can target as various molecules as low molecular organic medicine, the function of low molecular organic medicine can be expressed, and further, they have as high specificity for target molecule and good clearance as

antibody.

For generating chemobio antibodies, low-molecular medicine of PAI-1 inhibitor with a polyethyleneglycol linker was chemically bound to smart antibody designed from anti-podoplanin antibody. The smart antibodies with PAI-1 inhibitor conjugated antibodies. Optimization of solubilizing agent led to construction of the chemobio antibodies with comparable function of inhibiting PAI-1 activity to free PAI-1 inhibitor.

The antibodies with affinity for human and other species podoplanin were generated by means of mutation techniques, because the chemobio antibodies applied to human should be studied in animal study. Here, we repeatedly mutated the antibodies with affinity for human podoplanin; consequently, the antibodies had the affinity for other species podoplanin without loss of affinity for human podoplanin. The smart antibodies constructed from the variable region of fragments of the cross reactive antibodies can bind onto both podoplanins on human and other species tissues, and further, the smart antibodies were accumulated in glomerulus in vivo.

In this year, we generated the chemobio antibodies with comparable function to free PAI-1 inhibitor, and cross reactive antibodies with affinity for human and other species podoplanin.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

特になし

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 低分子抗体 - 薬物複合体の開発へ向けた化学接合に及ぼすリジン残基周辺環境の影響, ポスター, 服部修平, 服部峰充, 中澤光, 梅津光央, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016/6/8, 国内
2. 変異導入設計に焦点をあてた抗体の分子進化, 口頭, 服部峰充, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016/6/9, 国内
3. What factors influence chemical conjugation reactions on small antibody, poster, Shuhei Hattori, Takamitsu Hattori, Hikaru Nakazawa, Teppei Niide, Atsushi Matsunaga, Seon Hwa Lee, Tomoyuki Oe, Mitsuo Umetsu, EXPO Krakow, 2016/7/4, 国外(Krakow, Poland)
4. 低分子抗体 - 薬物複合体の開発: リジン残基側鎖の化学反応へ界面活性剤が及ぼす影響, ポスター, 服部修平, 服部峰充, 中澤光, 二井手哲平, 松永淳, 李宣和, 大江知行, 梅津光央, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 2016/9/30, 国内
5. 低分子化抗体 - 薬物複合体の開発: 低分子化抗体の化学修飾特性解析, ポスター, 服部修平, 服部峰充, 中澤光, 二井手哲平, 熊谷維子, 松永淳, 李宣和, 大江知行, 梅津光央, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ, タワーホール船堀, 2016/11/16, 国内
6. 難発現抗体断片を大腸菌発現させるデータベース利用, ポスター, 服部修平, 齋琢磨, 服部峰充, 中澤光, 二井手哲平, 亀田倫史, 熊谷維子, 金子美華, 加藤幸成, 梅津光央, 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2016/11/30, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
特になし

(4) 特許出願  
特になし