

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) 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
(英語) Development of manufacturing technology on small bispecific antibody for next generation biologics
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京農工大学 大学院工学研究院生命機能化学部門
准教授 浅野 竜太郎
- 所属 役職 氏名： (英語) Ryutaro Asano, Associate Professor, Department of Biotechnology and Life Science, Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 酵母を用いた低分子二重特異性抗体生産技術とタンパク質高発現促進配列の開発
- 開発課題名： (英語) Development of technology on production of small bispecific antibody using protein high expression peptide tags and yeast expression system
- 研究開発分担者 (日本語) 出光興産株式会社 先進技術研究所 テーマリーダー 金田晃一
- 所属 役職 氏名： (英語) Koichi Kaneda, Team Leader, Advanced Technology Research Laboratories, Idemitsu Kosan Co., Ltd
- 分担研究 (日本語) ブレヴィバチルス菌を用いた低分子二重特異性抗体生産技術と高機能化プロテインLの開発
- 開発課題名： (英語) Development of technology on production of small bispecific antibody and high functionalized Protein L by Brevibacillus bacterium
- 研究開発分担者 (日本語) 株式会社プロテイン・エクスプレス 取締役 研究開発部長 渡辺俊介
- 所属 役職 氏名： (英語) Shunsuke Watanabe, Director, R&D Department, ProteinExpress Co., Ltd.

II. 成果の概要（総括研究報告）

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 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ヴィバチルス菌を用いた検討を並行して進めている。

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。

本年度は、まず昨年度に引き続き発現ベクターの作製を進め、計 48 種類の発現ベクターと 3 種の宿主を用いた発現検討を行った。大腸菌発現系に於いては、培養上清を直接用いた簡易的ながん細胞傷害活性評価が有効であることが、前年度の予備検討により明らかになっていたため、16 種類の発現ベクターを用いて培養を実施し、その上清を用いて評価した。結果、明確な濃度依存性が観察されると共に、期待通りに配向性の改変により細胞傷害活性が増減する様子が確認された。酵母、およびブレヴィバチルス菌に関しても同様に各々に特化した 16 種類の発現ベクターを用いた培養を行い、培養上清から金属キレートアフィニティクロマトグラフィーで粗精製後のサンプルを用いたがん細胞傷害活性評価を行った。結果、大腸菌を宿主に用いた場合と同様に濃度依存性と配向性の違いによる効果の違いが認められた。それぞれ、電気泳動のバンド強度からおおよその発現量を見積、前述の活性と併せて全 48 パターンの結果をパネル化した。粗精製サンプルではあるものの酵母発現系により得られたサンプルは比較的高純度であったため、活性に関してはこれらの結果を重視すると共に、それぞれの結果を踏まえて総合的に判断し、scDb 型、taFv 型共に 4 種ずつ有望な配向性を選抜し、さらなる評価へと進めた。scDb 型と taFv 型 Ex3 はいずれも構成するすべてのドメインが連結されているため不活性な単量体は生成されないが、多量体は形成し得る。そこで、これらのゲル濾過を行い、単量体画分のみを分取し、再度がん細胞傷害活性評価を行った。結果、いずれも概ね同等の活性を示すことが明らかになったが、より有望な配向性の Ex3 に関しては、生産性向上のためのリンカーの改変等に着手し、一部発現ベクターの作製を前倒しで行い、その発現検討も進めた。

また、より効率的な精製に用いるプロテイン L に関して、変異体候補配列について、スケールアップ生産の条件検討を実施するとともに、競合他社アルカリ耐性プロテイン L レジンとアルカリ感受性について比較を行い、より高い安定性であることを確認した。

We have confirmed the *in vivo* anti-tumor effects of Ex3, a small bispecific antibody with specificity for EGFR and CD3, and also confirmed its stability enough for formulation; however, we have not yet established an efficient manufacturing process for applying it as a reagent for therapeutic use. In other words, if we develop an innovative manufacturing technology, it will be expected to accelerate practical application of Ex3 and other small therapeutic antibodies. In this program, we will develop a manufacturing technology on small bispecific antibodies in the points of view of appropriate molecular design, optimization of microbial expression using gene sequence modification, and efficient purification using Protein L. As an expression host, in addition to *Escherichia coli* (*E. coli*) and yeast which have been generally used, we will use *Brevibacillus* which leads to low cost production because of no endotoxin production.

We have recently found that the cytotoxicity and productivity of Ex3 were improved by rearranging domain orders. On the other hand, Ex3 is non-covalent dimer which has concern about dissociation to monomer during a manufacturing process and/or preservation. Although construction of single-chain diabody (scDb) format or tandem scFv (taFv) format can solve this problem, they each have eight possible domain orders and there are no reports about the comprehensive investigation of effects of domain order on function and productivity.

Following last year, we constructed expression vectors, and evaluated cancer growth inhibition effects and expression levels using total 48 types of expression vectors and three kinds of the expression hosts. First, we investigated cancer growth inhibition effects using culture supernatants of *E. coli* harboring 16 expression vectors. As we expected, differences in growth inhibition effects were observed by exchanging domain orders. In the case of using yeast and *Brevibacillus* expression system, we used purified samples through metal chelate affinity chromatography for the evaluation, and obtained similar results with those from *E. coli* expression system. After evaluation of expression levels from band intensities of electrophoresis, we summarized their values and scores of growth inhibition effects in table. Based on these results, we selected four promising variants each for scDb and taFv formats and used them for further investigation. Since the formats of scDb and taFv have possibility to produce dimers or more higher ordered multimers, fractionated monomers via gel filtration were used for the evaluation of the growth inhibition effects. Each selected scDb and taFv showed to have almost comparative growth inhibition effects, thus we proceeded the construction of expression vectors for Ex3 variants with modified linker to increase their expression yields.

Additionally, we examined large scale production of Protein L mutants used for efficient purification of Ex3, and also confirmed their resistances under alkaline conditions by comparing with commercial Protein L.

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 4 件、国際誌 1 件)

1. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 人工改変を駆使した高機能性次世代がん治療抗体の開発. 月刊ファインケミカル, 46(2), 13-18 (2017)
2. **Ryutaro Asano**, Noriaki Koyama, Yasuyo Hagiwara, Yosuke Masakari, Ryota Orimo, Kyoko Arai, Hiromi Ogata, Shozo Furumoto, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, Anti-EGFR scFv tetramer (tetrabody) with a stable monodisperse structure, strong anticancer effect, and a long *in vivo* half-life. ***FEBS Open Bio***, 6(6), 594-602 (2016)
3. 浅野竜太郎, 人工抗体の機能的構造形態に関する研究. 生化学, 88(4), 380-385 (2016)
4. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, がん治療を目指した二重特異性抗体の開発. 細胞, 48(4), 8-12 (2016)
5. 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 次世代がん治療薬を目指した低分子二重特異性抗体の開発と高機能化. 酵素工学ニュース, 75, 11-14 (2016)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 黒木侑莉, 浅野竜太郎, 本間佐知子, 赤羽美穂子, 渡辺俊介, 黛 新造, 冷牟田修一, 熊谷 泉, 早出広司, 低分子二重特異性がん治療抗体のドメイン連結順の網羅的改変と機能評価, 口頭, 日本化学会, 2017/3/18, 国内
2. 浅野竜太郎, 次世代低分子がん治療抗体の開発, 招待講演, 日本薬物動態学会 第31回年会, 2016/10/15, 国内
3. 浅野竜太郎, 次世代がん治療薬を目指した二重特異性抗体の構造最適化, 招待講演, 若手研究者フォーラム2016 次世代バイオ医薬・再生医療を支える基盤技術開発, 2016/7/26, 国内
4. 浅野竜太郎, がん細胞とリンパ球の架橋を目指した二重特異性抗体の高機能化, 招待講演, 第32回日本DDS学会学術集会, 2016/6/30, 国内
5. 浅野竜太郎, 次世代二重特異性がん治療抗体の開発, 招待講演, バイオフィーマージャパン2016, 2016/4/22, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし