



Title	Development of rabbit VH with high affinity and improved stabilities
Author(s)	篠崎, 直也
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/70669">https://doi.org/10.18910/70669</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 篠 崎 直 也 )	
論文題名	Development of rabbit VH with high affinity and improved stabilities (強い結合活性と物理的安定性が改善されたrVHの開発)
<p>論文内容の要旨</p> <p>The single domain antibody (sdAb) consisting of a single variable region is one of the very promising next-generation antibodies, however, there could be rooms for improvement on its generating sources. The antibodies with natural single variable regions produced by camels and cartilaginous fishes are considered to be suitable for sdAb production, while most researchers would be difficult to utilize such uncommon animals for sdAb obtainment. sdAbs have also been generated from general IgG-type antibodies of human and mouse. Such sdAbs would be highly convenient, however have been shown to be difficult to have strong binding activities (e.g. <math>K_D</math> values of single-digit nM). In addition, sdAbs prepared from general IgG-type antibodies have a concern of reduced conformational and colloidal stabilities. To solve such a problem on sdAb generation, the author focused on rabbit which is commonly used for immunization like mouse and known to produce general IgG-type antibodies with very strong binding affinities (e.g. <math>K_D</math> value in the pM order).</p> <p>In chapter 2, based on the hypothesis that a single variable region of IgG-type antibody having very strong binding affinity can possess strong binding affinity, antigen-specific variable region of heavy chain of rabbit antibody (rVH) were obtained followed by investigation of physico-chemical properties. In obtainment, interruption of efficient obtainment of antigen-specific rVHs due to their decreased conformational stabilities was avoided by producing phage at low temperature. Some of the obtained rVHs showed a strong binding affinity (<math>K_D</math> values less than nM order) that may be comparable to camel variable regions (VHHs).</p> <p>In chapter 3, after structural validation of additional disulfide (S-S) bond introduction to rVHs using a modeled structure, rVH mutants with Cys mutations were prepared. Introduced Cys formed S-S bond with dramatic improvement of the thermal stabilities without significant change of the antigen binding affinity. Thermal stability improvement by the additional S-S bond in the rVH was much larger than the previously reported thermal stabilization of VHH (increase of unfolding temperature; 24.0 °C for rVHs and 9.0 °C for VHHs). Thermodynamic analysis suggested that large thermal stabilization of rVHs was attributed to the entropic contribution greatly exceeding the enthalpic loss.</p> <p>In chapter 4, the amino acid residues at the VL-interaction interface of rVH were thus replaced with amino acid residues conserved in VHH, a camel-derived sdAb, and their impacts on the physical stabilities were examined. Some substitutions were found to contribute for enhancing structural stability or lowering hydrophobicity of the molecular surface. By combining these substitutions, rVH mutants were improved their both structural stability and hydrophilicity of molecular surface. One of the rVH mutants with enhanced hydrophilicity showed improved colloidal stability and disappearance of non-specific binding. Moreover, for this mutant, the purification yield in the <i>E. coli</i> expression system finally increased to 40 times that of the wild type.</p> <p>Through this thesis, rVHs with high affinities and improved stabilities were developed. By utilizing rVHs, further brisk of sdAb research and development, and eventually creation of innovative pharmaceuticals contributing to the healthy and prosperous lives of people around the world could be expected.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 篠 崎 直 也 )		
論文審査担当者	( 職 )	氏 名
	主 査	教授 内山 進
	副 査	教授 紀ノ岡 正博
	副 査	教授 大政 健史
	副 査	教授 村中 俊哉
	副 査	教授 渡邊 肇
	副 査	教授 大政 健史
	副 査	教授 仁平 卓也
	副 査	教授 藤山 和仁
	副 査	教授 永井 健治

## 論文審査の結果の要旨

抗体医薬は抗原特異性が高く副作用が少ない優れた分子標的薬として盛んに研究開発が行われている。分子量約150,000Daの比較的大きな従来型のIgG抗体に対し、断片化によりダウンサイズしたFabやscFvは微生物生産や新規な投与経路を利用可能にするなど、応用可能性を更に広げている。単一の変域からなるシングルドメイン抗体(sdAb)は分子量がIgGの約1/10と更に小さく、より大きなサイズダウンの効果が期待される。sdAbは様々な応用が期待される有望な分子であるが、現在、主にラクダなどの天然で単一の変域を持つ抗体を産生する特殊な免疫動物から作製されており、汎用性の面で向上の余地がある。一方、幅広く利用されているヒトやマウスの抗体からもsdAbを作製する試みがなされているが、(1)これまでに作製されたsdAbはいずれも市販の抗体医薬のように解離定数がnMのような強い結合活性を持たない、(2)パートナー変域の欠如によりコロイド安定性や構造安定性などの物理化学的特性が低下する、という課題があった。

申請者は、これらの課題を解決するため、マウスと同じく汎用的な免疫動物であるが、遥かに抗体産生能の高いウサギに着目し、抗原特異的なウサギ重鎖可変領域(rVH)の効率的な取得と物理化学性質の評価、さらに物理化学的特性の向上を試みた。第1章としてGeneral Introductionおよび第5章としてGeneral Conclusionが記述された全5章から構成されている。

第2章において、まず、申請者は、がん特異的抗原HER2およびHER3で免疫したウサギから、rVH遺伝子を取得した。取得したrVHをファージ表面に提示したライブラリーを作製し、各抗原に対するパニング操作を行った。しかしながら、ライブラリー作製過程において、通常の37℃での培養条件で大腸菌に産生させたファージにはrVHが全く提示されなかった。申請者は、提示が確認できなかった原因はパートナー可変領域(VL)の欠如によるrVHの安定性低下にあると推察し、培養温度を16℃に下げたところ、rVHはファージ表面に効率的に提示された。このライブラリーを各抗原に対するパニング操作に供した結果、ファージ全体に対する抗原特異的rVHを提示したファージの存在比が増大し、各抗原に対して特異的に結合するrVHを複数取得した。取得したrVHの幾つかはsdAbであるにもかかわらず、ラクダ由来のシングルドメイン抗体(VHH)の抗原結合活性に匹敵するnM以下の $K_D$ 値を示した。

取得したrVHには、構造安定性の指標となる変性温度が40℃前後のものもあった。抗体医薬への応用を考えた場合、低い構造安定性は生産プロセスなどにおける凝集形成、ひいては免疫原性免疫原性を引き起こす要因となりうる。

そこで、第3章において、申請者はジスルフィド(SS)結合の追加導入による安定性の向上を試みた。モデル構造を用いてSS結合導入の妥当性を確認した後、Cys変異を導入したrVH変異体を作製した。導入されたCysは狙い通りのSS結合を形成し、熱安定性を飛躍的に向上させた。なお、意外なことに、このSS結合の熱安定性向上に対する効果は、過去に報告されたVHHの場合よりも遥かに大きく、変性温度の上昇は平均でrVHが24.0℃、VHHが9.0℃であった。熱力学的解析により、SS結合導入によるrVHの大きな熱安定性の向上はエンタルピー損失を大きく上回るエントロピーの寄与によることが示唆された。

rVHはヒトやマウス由来sdAbと同様に、VL欠如に伴う物理化学的特性上の課題を持つ。このうち構造安定性の低下には、SS結合導入という一つの解決策を示したが、導入時の大腸菌発現系での生産性があまり高いことから、応用可能性向上のために他の選択肢も用意しておく方が望ましい。さらに、当初からの課題としてあったように、疎水性のVL相互作用界面が露出したことによる、非特異的な相互作用やコロイド安定性の低下が懸念される。

そこで、第4章において申請者は、rVHの本IgGではVLと界面を形成していたrVHのVH表面に位置するアミノ酸残基をVHHで保存されているアミノ酸残基へと置換し、物理化学的特性の改善を試みた。V37F置換により疎水性パッキングが強化されて熱安定性が大きく向上し、G44E/L45RやF91Y置換により本界面の疎水性が大きく低減した。これらの部位を同時に置換した4箇所変異体では、熱安定性向上と疎水性低減の効果が相乗的に働いており、非常に安定で抗原に強く結合可能なrVHの創製に成功した。さらに、大腸菌発現系での生産性が大幅に向上していたことから分子の安定性向上は生産性の向上へとつながる可能性も示唆された。

このように、申請者は、汎用性の高い免疫動物であるウサギからsdAbとしての利用に適した高い抗原結合活性を持つrVHが、低温でのファージ生産を利用すれば得られることを示した。更に申請者は、rVHの構造安定性をSS結合導入やVHH保存アミノ酸への置換により高度に向上できることを示した。また、申請者は、もう一方の疎水的な分子表面の露出を別の部位のVHH保存アミノ酸への置換により解消することで、非特異的な結合の低減やコロイド安定性の向上を実現した。さらに、申請者が行ったVHH保存アミノ酸への置換により両課題が克服されると共に、改変rVHは利便性の高い大腸菌発現系での生産性が大幅に増大していたのは特筆すべきことである。申請者がこの研究を通じて示したsdAbを創製するための手法は有望な分子であるsdAbを用いた開発研究を更に加速させることが期待される。

本論文は有望なバイオ医薬品候補であるsdAb分子について、十分な結合力と高い構造安定を持つrVHの取得を世界で初めて実現しており、高く評価される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。