

VHH抗体スクリーニング事業のご紹介



ProteinExpress

株式会社プロテイン・エクスプレス

〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番15号

千葉大学亥鼻イノベーションプラザ内

TEL : 043-202-5755 FAX : 043-202-5756



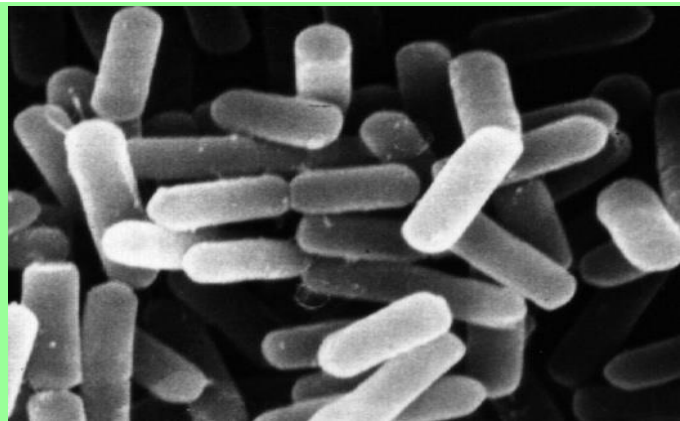
会社概要

設立	平成12年10月18日
代表取締役	大滝義博
資本金	50、000千円
本社	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-15 千葉大亥鼻イノベーションプラザ
人員	従業員6名（研究員5名） 役員・監査役4名
電話番号	043-202-5755
ホームページ	http://www.proteinexpress.co.jp



事業内容

事業	事業内容
タンパク質 事業	○ タンパク質発現クローンの構築や タンパク質受託発現サービス ○ 有用タンパク質の開発 (抗体精製用タンパク質 プロテインAの開発) ○ VHH抗体のスクリーニングサービス(NEW!)
創薬基盤 事業	○ タンパク質標識技術による研究支援・創薬支援事業 ・ 標識タンパク質合成法の開発と用途開発 ・ 標識タンパク質によるタンパク質機能解析 ○ 無細胞系タンパク質合成キットの商品化とラインナップ ○ 抗体の作製と販売



＜ブレビバチルス菌について＞

- ☆ 枯草菌近縁種
- ☆ 優れたタンパク質分泌発現能
- ☆ 培養時に目的タンパク質の分解が少ない
- ☆ 培養、精製の容易性
- ☆ 安全性の高い微生物
- ☆ 低いエンドトキシンレベル（グラム陽性菌）

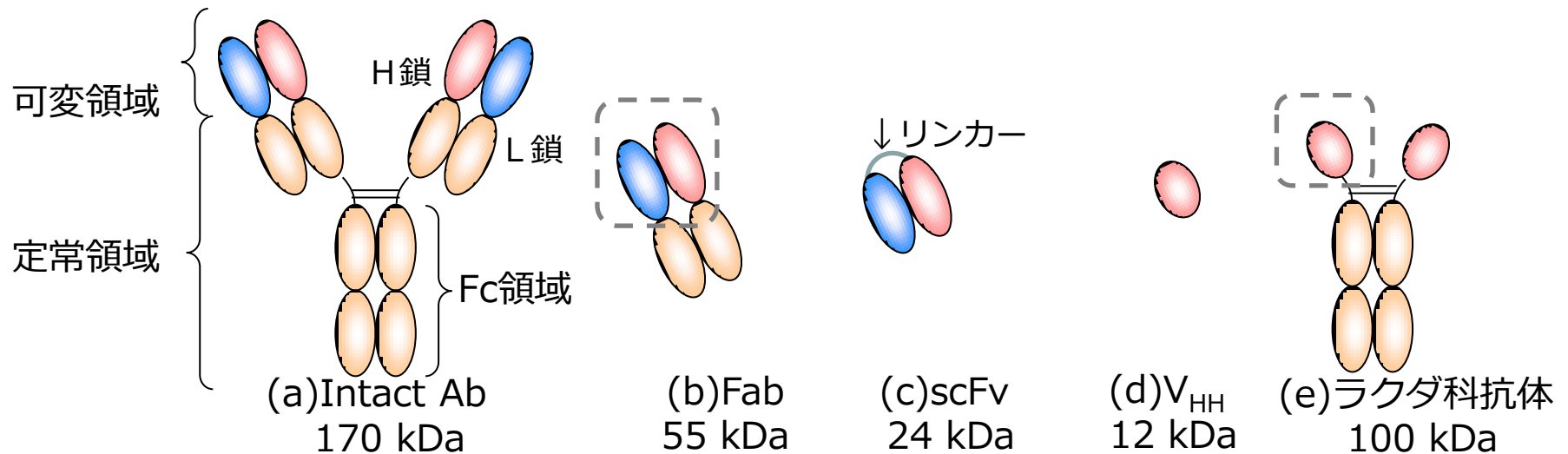
タンパク質	起源	発現量 (g/L)
＜酵素＞		
α - アミラーゼ	<i>B. licheniformis</i>	3.7
CGTase	<i>B. macerans</i>	1.5
キトサナーゼ	<i>B. circulans</i>	1.4
超耐熱性ヌクレアーゼ	<i>P. horikoshii</i>	0.7
PDI	ヒト	1.0
＜抗原＞		
表層抗原	<i>E. rhusiopathiae</i>	0.9
表層抗原	<i>T. pallidum</i>	0.8

タンパク質	起源	発現量 (g/L)
プロテイン A	<i>S. aureus</i>	2.0
＜サイトカイン＞		
EGF	ヒト	3.0
IL-2	ヒト	0.6
NGF	マウス	0.2
IFN-γ	ニワトリ	0.5
TNF-α	ウシ	0.4
GM-CSF	ウシ	0.2

VHH抗体とは

ラクダ科（ラクダ、ラマ、アルパカ等）には軽鎖を持たない抗体（重鎖抗体）が存在
 <特徴>

- ・ 可変領域（VHH抗体）は最小の抗体フォーマット
- ・ 微生物での生産が可能（**低コスト**）
- ・ pH、熱安定性が高い（**保存安定性に優れている**）
- ・ 多価化や二重特異性化といった**タンパク質工学的改変が容易**



VHH抗体の取得(従来技術)

アルパカへの免疫ライブラリーからのスクリーニング方法 (A社: 500~600万円)

1. 抗原の調製

> 10mg

(マウス; ~0.4mg)



2. 動物への免疫

アルパカ; >100万円+2万円/月

(マウス; 約100円+3千円/月)



3. 採血、mRNA調製

PCR⇒

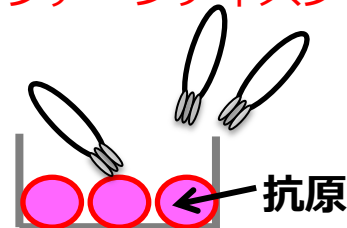


6. 配列解析、組換え体生産 (大腸菌)

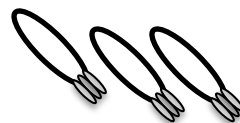


5. バイオパニング

ファージディスプレイ



4. ファージライブラリー作製



VHH抗体の取得(従来技術の課題)

- ・ **実験動物**

アルパカの場合、購入に100万円以上、飼育に2万円/月と高コスト
飼育場所の確保が困難

- ・ **抗原量**

1回の免疫に2mg～必要、5回免疫とバイオパニング用に10mg以上必要

- ・ **ファージディスプレイによるスクリーニング (バイオパニング)**

大腸菌での生産性の影響を受ける

ファージディスプレイで使用可能なライブラリーサイズは小さい

- ・ **大腸菌での生産**

VHHは分子内に少なくとも1つのジスルフィド結合を保持

⇒大腸菌での生産では封入体になりやすい

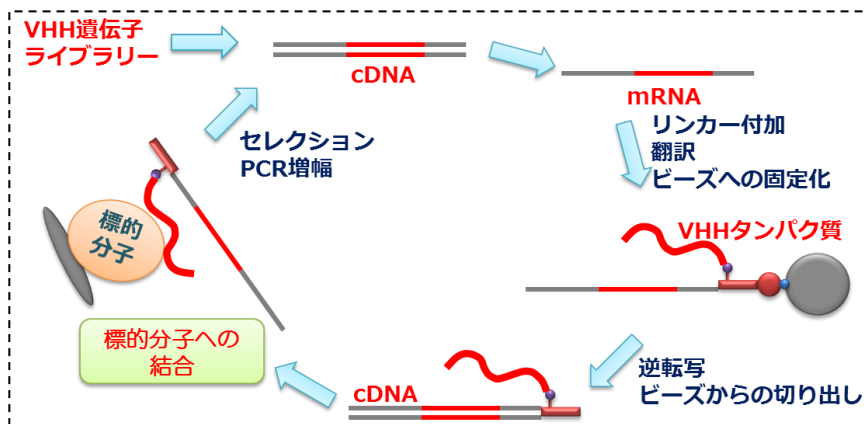
⇒VHH抗体のスクリーニング方法としては多くの課題が存在

VHH抗体の取得(当社技術)

1. 抗原の調製
必要量 ; 約100 μ g



2. **cDNAディスプレイ**
高いライブラリーサイズ ($\sim 10^{12}$)
安定なスクリーニング方法 (室温で可能)



VHH合成遺伝子ライブラリー(10^{12})を使用
完全化学合成

⇒生体が作りえない配列を含む

終止コドン排除

⇒高品質なライブラリー

3. 配列解析、
組換え体生産 (ブレビバチルス菌)



ブレビバチルス菌
菌体外へ分泌生産可能

⇒分子内SS結合が正しく生産可能

高い生産性

⇒低コスト

エンドトキシンを保有しない

⇒精製工程が簡略

VHH抗体の取得(従来技術との比較)

- ・ 実験動物

アルパカの場合、購入に100万円以上、飼育に2万円/月と高コスト
飼育場所の確保が困難

⇒**動物(免疫)は使用しない**

- ・ 抗原量

1回の免疫に2mg必要、5回免疫とバイオパニング用に10mg以上必要

⇒**100 μ g程度の抗原量で十分**

- ・ ファージディスプレイによるスクリーニング(バイオパニング)

大腸菌での生産性の影響を受ける

ファージディスプレイで使用可能なライブラリーサイズは小さい

⇒**VHH遺伝子ライブラリー、cDNAディスプレイ技術を用いることにより効率的なスクリーニング**

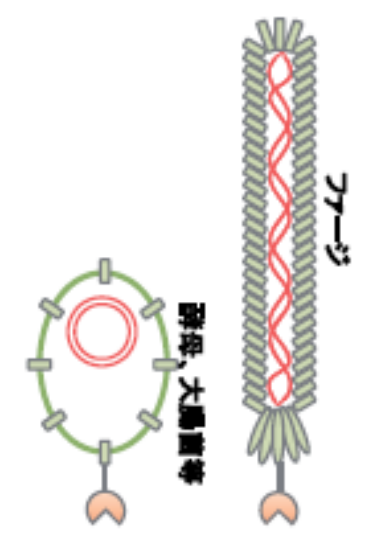
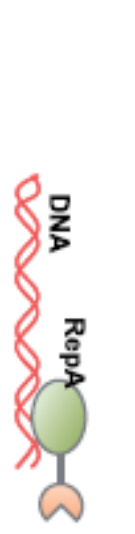
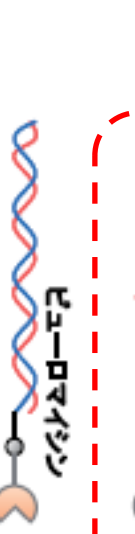
- ・ 大腸菌での生産

VHHは分子内に少なくとも1つのジスルフィド結合を保持

⇒大腸菌での生産では封入体になりやすい

⇒**ブレヴィバチルス菌により低コスト製造**

遺伝子型 / 表現型対応付け技術比較 1

模式図	細胞要求性		細胞非要求性						
	細胞表面ディスプレイ ファージディスプレイ		マイクロビーズディスプレイ STABLE法	SNAPディスプレイ	CISディスプレイ	リボソームディスプレイ	mRNAディスプレイ	cDNAディスプレイ	
									
遺伝子型	プラスミド	ssDNA	DNA	DNA	DNA	DNA	mRNA	mRNA	cDNA
ライブラリサイズ	10^{10}	10^{10}	10^7	10^{10}	10^{10}	10^{13}	10^{13}	10^{13}	10^{13}
連結の様式	細胞	ウイルス粒子	複合体	複合体	共有結合	複合体	複合体	共有結合	共有結合

生物物理53 (5) , 250-253 (2013)

遺伝子型 / 表現型対応付け技術比較2

	ファージディスプレイ	リボソームディスプレイ	mRNAディスプレイ	cDNAディスプレイ
タンパク質発現系	大腸菌	無細胞翻訳系 (非天然アミノ酸導入可能)	無細胞翻訳系 (非天然アミノ酸導入可能)	無細胞翻訳系 (非天然アミノ酸導入可能)
ライブラリー サイズ (最大値)	10 ¹⁰ /mL	10 ¹³ /mL	10 ¹³ /mL	10 ¹³ /mL
安定性	安定	不安定 (リボソームからの解離)	不安定 (mRNAの分解)	安定 (cDNA)
遺伝子型/表現型 対応付け	ファージ	リボソーム (非共有結合)	ピューロマイシン (共有結合)	ピューロマイシン (共有結合)
実施企業	複数	ジーンフロンティア	ペプチドリーム	当社 (提携先 ; ジェナシス)

cDNAディスプレイの特長

- ・ 膨大なライブラリサイズで使用可能
- ・ 高い安定性 (共有結合での連結、mRNAの分解やリボソームの解離の懸念が無い)

VHHの構造について

VHH配列の一例

ラクダmRNAライブラリーからスクリーニングした
歯周病原性細菌由来タンパクに対する抗体

B

Anal Biochem August 415(2): 158–167 (2011)



大腸菌菌体内生産では分子内ジスルフィド結合が誤っている場合がある（封入体）

⇒産総研にてCysを除いた配列として特許化

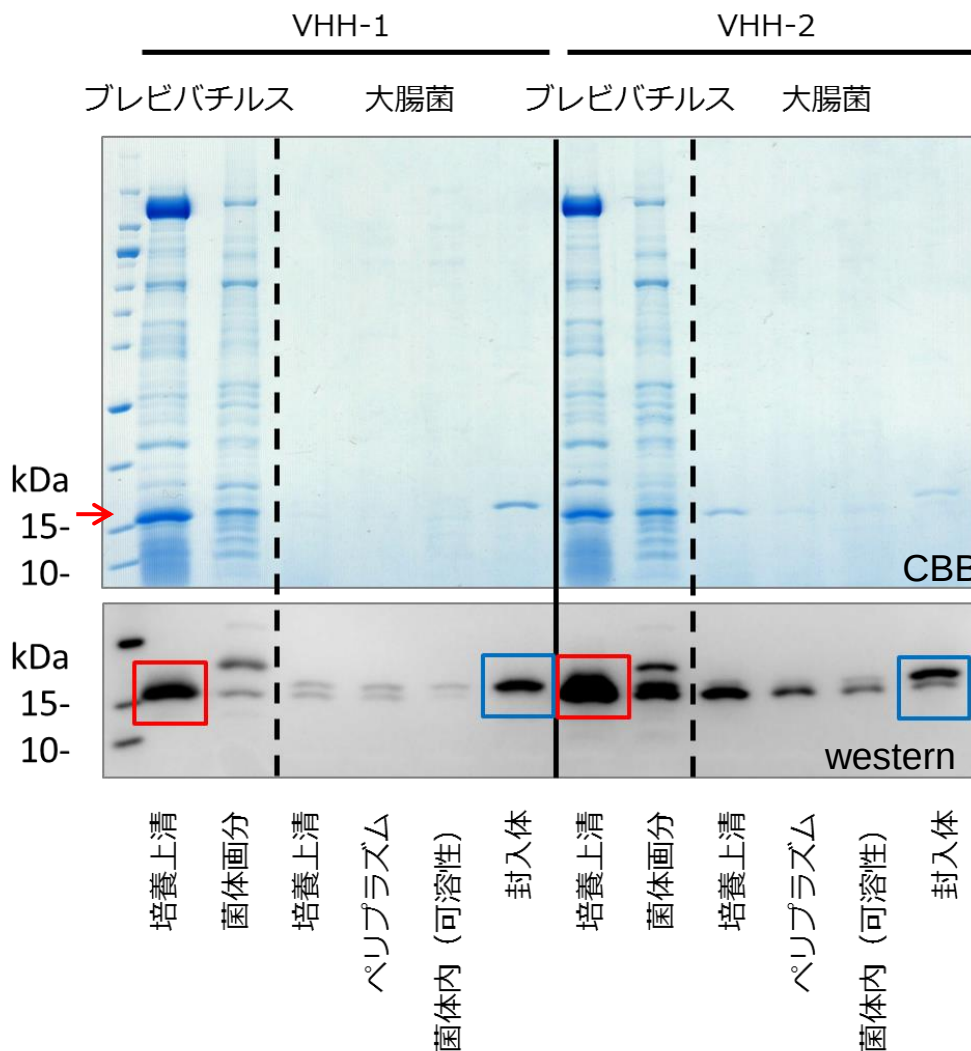
スクリーニングにて得られた配列に変異導入が必要

⇒活性が消失するケースも



分泌生産による正しい構造での生産が望ましい

VHHの生産例(宿主の比較)



2種類のVHHについて、
ブレビバチルスおよび大腸菌で発現量を比較
(いずれも分泌生産)

大腸菌での生産

<10mg/Lが培養上清、ペリプラズムで発現
しかし、ほとんど封入体として発現
⇒これを回避するためにCysの変異 (産総研特許)

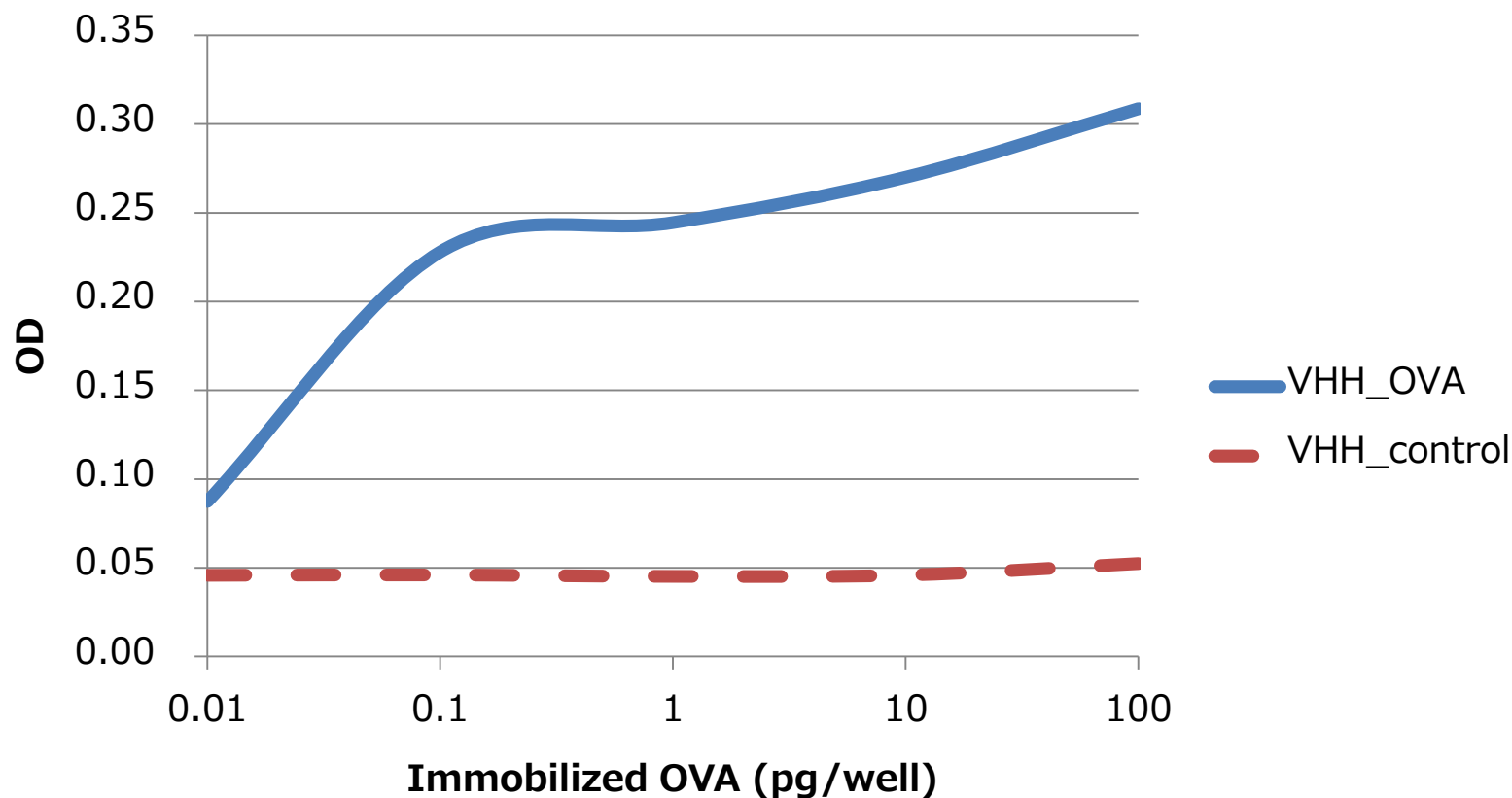


ブレビバチルスでの生産

~500mg/Lが培地中に発現 (フラスコ培養)
菌体外分泌のため精製が容易
低エンドトキシン

VHHのブレビバチルスによる生産
⇒高生産性、低コスト化が可能に

生産したVHHの活性評価



ブレビバチルスによる分泌生産によっても活性を保持したVHHの生産が可能である

抗体医薬品VHとの配列比較(例)

			CDR1	CDR2		
remicade	1	-EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS	VFASGFIFSNHWMNWVQSEK	GLEWVAEIRSKSINSA	59	
rituxan	1	-QVQLQOPGAELVKPFGASVKM	SCASGYTFTSYNMHWVKQTPG	KLEWIGAIYPGN--GD	57	
avastin	1	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGYTFTNYGMNWVQAPG	KLEWVGWINTYT--GE	57	
herceptin	1	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFNIKDTYIHVVRQAPG	KLEWVARIYPTN--GY	57	
humira	1	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFDYAMHWVVRQAPG	KLEWVSAITWNS--GH	57	
opdivo	1	-QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFDYAMHWVVRQAPG	KLEWVAVIWDYD--SK	57	
フタコブラクダ	AGV76534_Camelus	1	-EVQLVESGGGSVQAGGSLRLS	CRASRYTYSRMCMGWFRQTPG	KEREGVAAL--DSA--GN	56
ヒトコブラクダ	BAD00248_Camelus	1	-QVQLVQSGGGSVQAGGSLRLS	CAASGYTIDSYCMGWFRQAPG	KEREGVAVINNP--GT	57
ラマ	CAD13187_Lama	1	-QVQLVESGGGSVQAGGSLRLS	CAASGYAYSSNCMGWFRQAPG	KEREGVAGIYSGG--GS	57
アルパカ	ACZ80603_Vicugna	1	MDVQLVESGGGLVQAGGSLRLS	CAASGIIFISINAMGWYRQAPG	KERELVAAL--SSN--GN	57
remicade	60	THYAESVKGRTISRD	DKSAVYQLQMTDLRTEDTG	VYYCSR--NYYGS---TY---DYW	110	
rituxan	58	TSYNQKFKGKAITLADK	SSSTAYMQLSLTSEDS	AVYYCAR-STYYGG-DWYF---NVW	111	
avastin	58	PTYAADFKRRFTFSLD	TSKSTAYLQMNSLRAED	AVYYCAKYPHYGGSSHWYF---DVW	113	
herceptin	58	TRYADSVKGRFTISAD	TSKNTAYLQMNSLRAED	AVYYCSR--WG-GDGFYAM---DYW	110	
humira	58	IDYADSVKGRFTISRD	NAKNSLYLQMNSLRAED	AVYYCAK--VSYLSTASSL---DYW	111	
opdivo	58	RYYADSVKGRFTISRD	NSKNTFLQMNSLRAED	AVYYCA-----TNDDYW	103	
AGV76534_Camelus	57	TNYVDSVKGRTISQ	NAKNTLYLQMNSLKPED	TAIYYCAAVASVVAHRCSP-SPDYNW	115	
BAD00248_Camelus	58	TYYADSVKGRFTISQ	NTKNTVYLQMNSLKPED	TAIYYCA-ADPR--F-CGLNRRGFNYW	113	
CAD13187_Lama	58	TYYADSVKGRFTISQ	NAKNTVYLQMNSLKPED	TAMYYCA-VHWKAYYNCGM-WIAYNNW	115	
ACZ80603_Vicugna	58	TLYADSVKGRFTISRD	NAKNTLYLQMNSLKPED	TAMYYCTAPDDEYD-----YW	106	
remicade	111	GQGTLLTV			118	
rituxan	112	GAGTITTV			119	
avastin	114	GQGTLLTV			121	
herceptin	111	GQGTLLTV			118	
humira	112	GQGTLLTV			119	
opdivo	104	GQGTLLTV			111	
AGV76534_Camelus	116	GQGTQVTV			123	
BAD00248_Camelus	114	GQGTQVTV			121	
CAD13187_Lama	116	GQGTQVTV			123	
ACZ80603_Vicugna	107	GQGTQVTV			114	

ヒトVHとの相同性も高く、
(FRで80%程度)
ヒト化も容易

(Ablynx社等で医薬品開発)

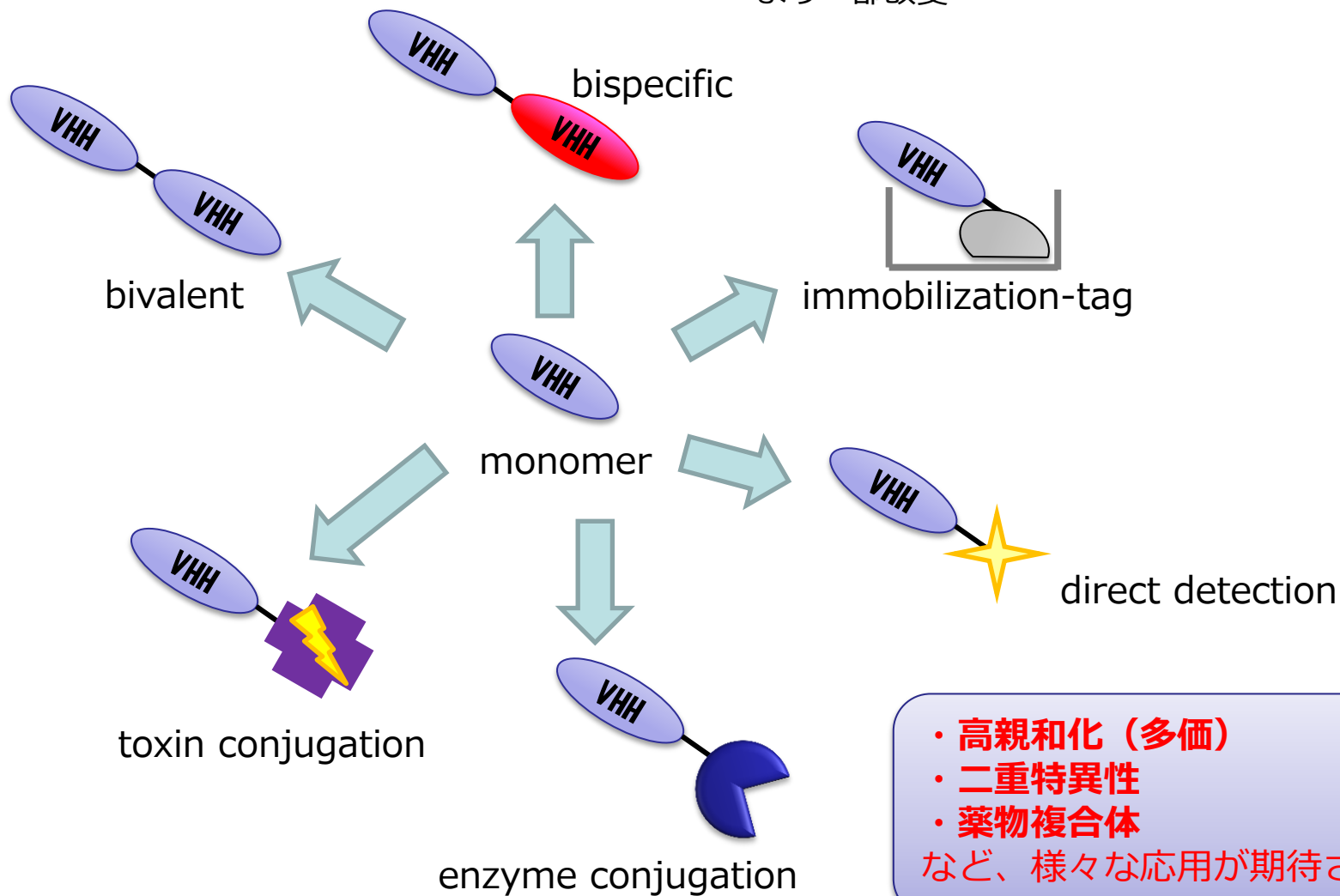
ヒトVHとの相同性も高く、
(FRで80%程度)
ヒト化も容易

(Ablynx社等で医薬品開発)



タンパク質工学的応用

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1000334>
より一部改変



・高親和化（多価）
・二重特異性
・薬物複合体
など、様々な応用が期待される

VHH抗体スクリーニングサービス

ユーザーより抗原の提供

(当社組換えタンパク質発現サービスの利用も可)

↓ cDNAディスプレイによるスクリーニング

候補遺伝子配列の取得

↓ ブレビバチルスでの生産

候補VHHタンパク質の取得

↓ ELISAによる評価

納品 (3 クローン、各0.5mg ; 基本価格、追加も対応可能)

<オプション>

- ・ VHH抗体のアミノ酸配列開示
- ・ クローン数、納品量の変更
- ・ 高親和化
- ・ 製造プロセスの向上化

<http://www.proteinexpress.co.jp/>

HOME

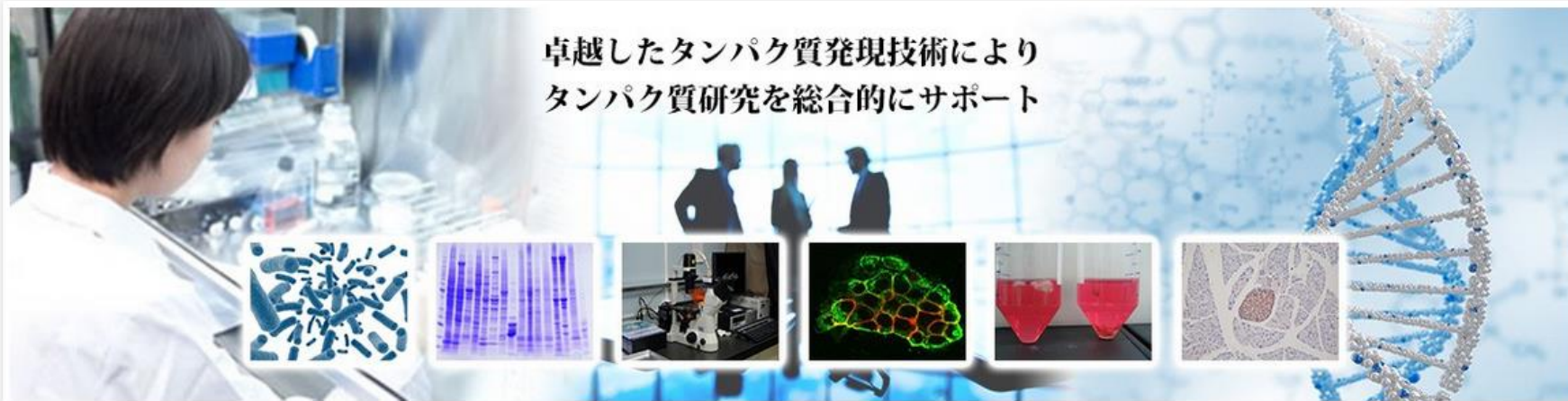
Product

Service

Link

Company

卓越したタンパク質発現技術により
タンパク質研究を総合的にサポート



VHHスクリーニング事業に関するお問い合わせなどは、
service@proteinexpress.co.jp
までご連絡ください。