

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

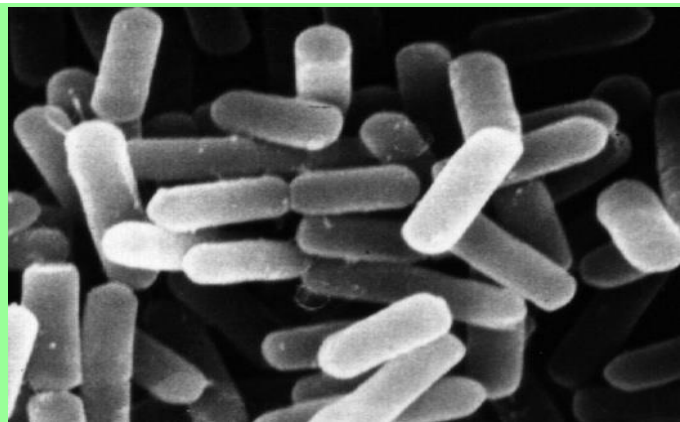
設立	平成12年10月18日
代表取締役	大滝義博
資本金	50、000千円
本社	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-15 千葉大亥鼻イノベーションプラザ
人員	従業員7名（研究員5名） 役員・監査役4名
電話番号	043-202-5755
ホームページ	http://www.proteinexpress.co.jp



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 (抗体精製用アフィニティリガンドタンパク質の開発) ○ VHH抗体のスクリーニングサービス (NEW!)
創薬基盤 事業	○ 非天然アミノ酸導入技術による研究支援、創薬支援事業 ○ 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 (理化学研究所の成果を事業化) ○ 抗体の作製と販売 (かずさDNA研究所と連携)

ブレビバチルス発現系によるタンパク質生産



＜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）

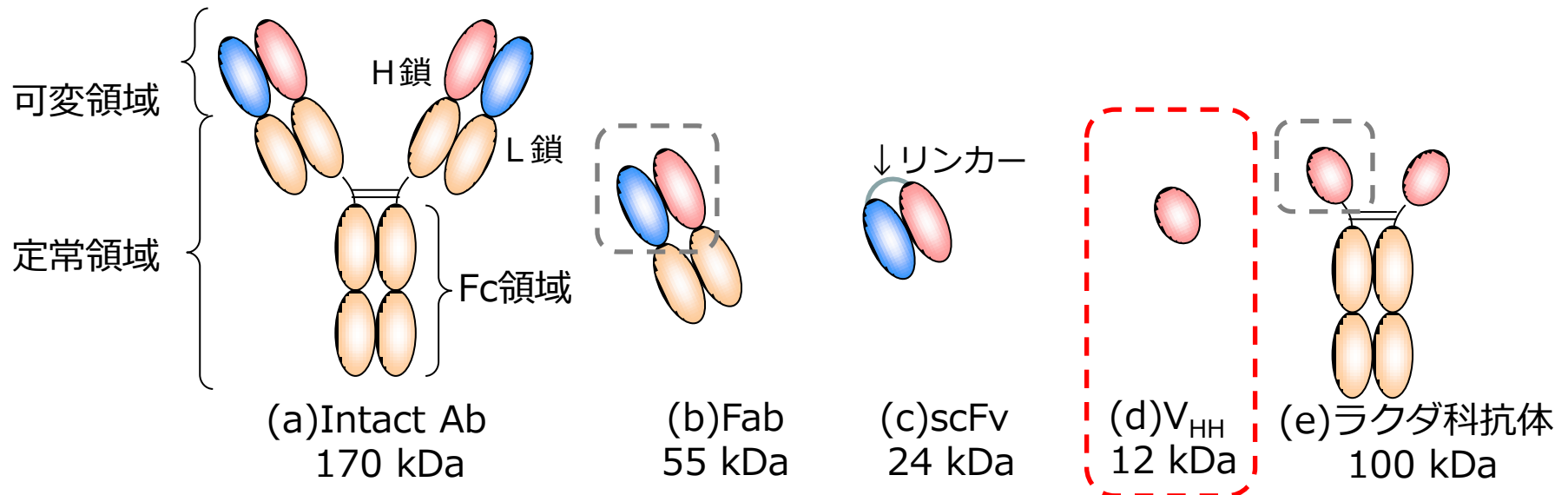
タンパク質	起源	発現量 (g/L)
＜酵素＞		
α - アミラーゼ	<i>B. licheniformis</i>	3.7
CGTase	<i>B. macerans</i>	1.5
キトサナーゼ	<i>B. circulans</i>	1.4
超耐熱性ヌクレアーゼ	<i>P. horikoshii</i>	0.7
PDI	ヒト	1.0
＜抗原＞		
表層抗原	<i>E. rhusiopathiae</i>	0.9
表層抗原	<i>T. pallidum</i>	0.8

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**
- ・ BBB通過による脳への到達報告もあり



VHH抗体の取得(従来技術)

アルパカ免疫ライブラリーからのスクリーニングの場合 (A社: 500~600万円)

1. 抗原の調製

> 10mg

(マウスモノクローの場合; ~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⇒

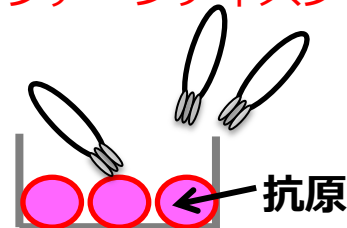


6. 配列解析、組換え体生産 (大腸菌)

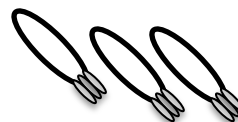


5. バイオパニング

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)

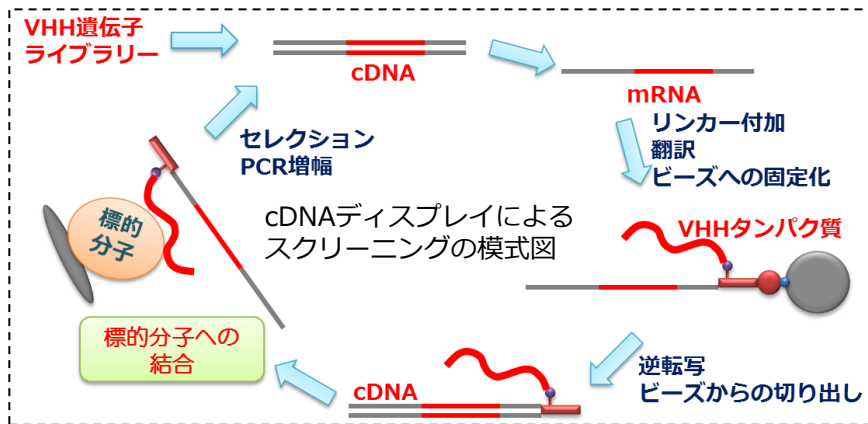
1. 抗原の調製

必要量 ; 約100 μ g (タンパク質だけでなく、細胞等も可能)



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)



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結合が正しく発現可能

高い生産性

⇒低コスト

エンドキシンを保有しない

⇒精製工程が容易

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

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、低分子抗原も可能**

- ・ 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合成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**

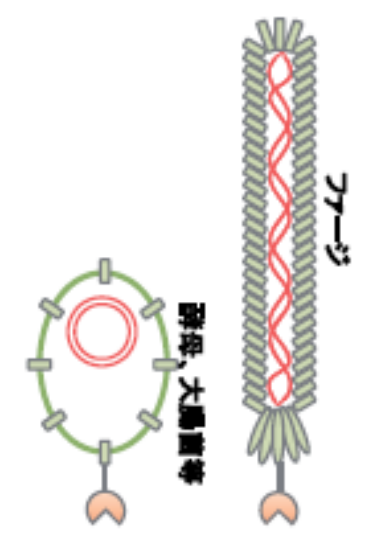
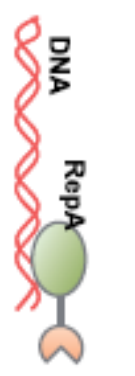
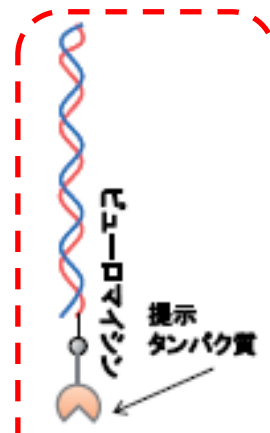
- ・ 大腸菌での生産

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)

遺伝子型と表現型(タンパク質)を対応付ける方法(ディスプレイ技術)は多様

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、 リンカーの解離)	安定 (cDNA、 リンカーと共有結合)
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)	アミノアシルアデノシン (or ピューロマイシン) (共有結合)	ピューロマイシン (共有結合)
実施企業例	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)

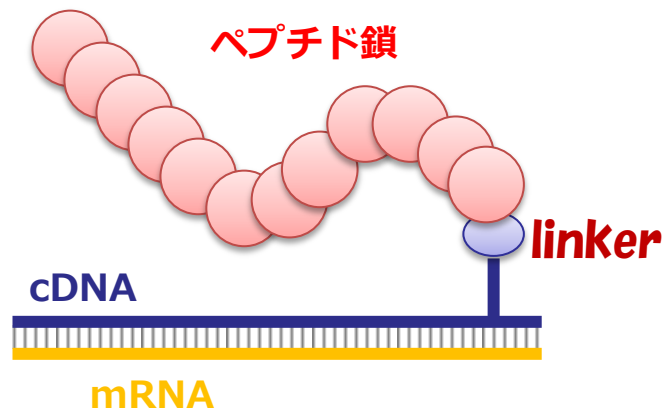
cDNAディスプレイの特長

- ・ 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)



mRNAディスプレイ技術との比較

cDNAディスプレイ

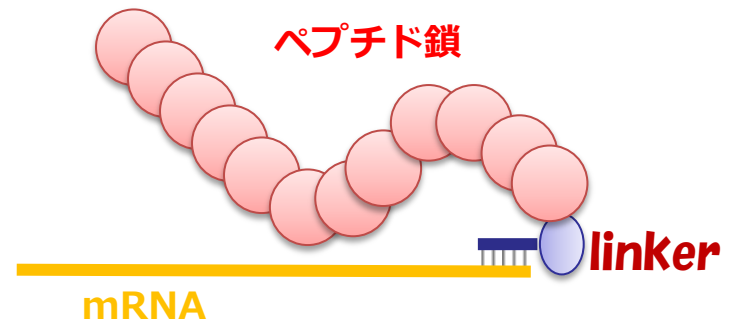


cDNA-ペプチド鎖間を
ピューロマイシンリンカーで連結
⇒**強固な結合**

リンカーとcDNA ; **共有結合**

mRNAが分解されても配列情報は残る
逆転写工程が必要

mRNAディスプレイ



mRNA-ペプチド鎖間を
アミノアシルアデノシンリンカーで連結
⇒**加水分解のリスクあり**

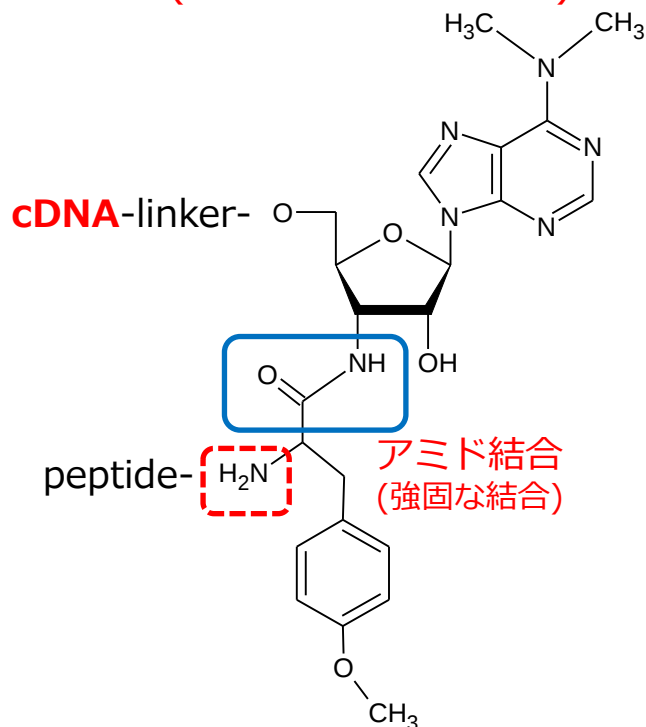
リンカーとmRNA ; **アニーリングによる結合**
(解離のリスク)

mRNAが分解されると配列情報が消失される
作業は簡略化されている



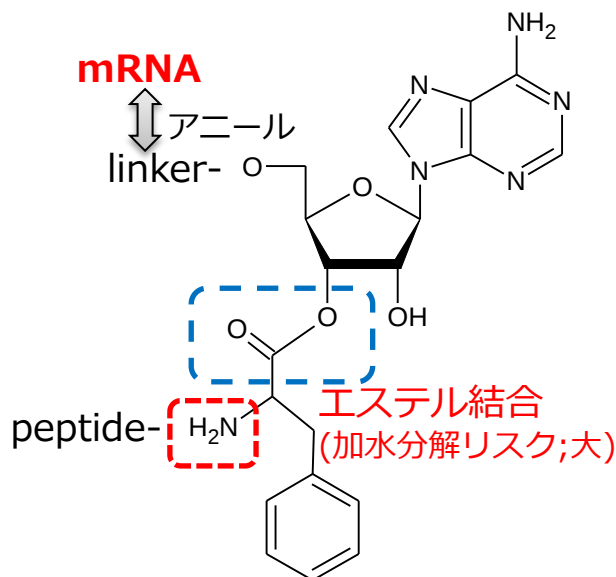
対応付けリンカーの比較

本技術 (cDNAディスプレイ)



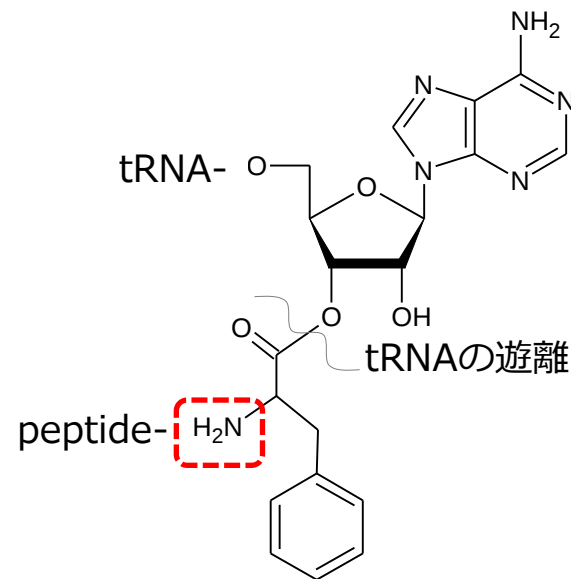
ピューロマイシンリンカー
特許第4318721号
産総研、ジェナシス株式会社

他社技術 (mRNAディスプレイ)



アミノアシルアデノシンリンカー
(Phe-linker)
特許第5174971号
ペプチドリーム株式会社

(参考)



アミノアシルtRNA
(Phe-tRNA)

□ ペプチドC末端との連結部位

遺伝子型/表現型対応付けの強固さ

cDNAディスプレイ > mRNAディスプレイ

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誤ってジスルフィド結合が形成される場合がある（封入体形成）

⇒産総研にて大腸菌生産用として、Cysに変異を導入し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

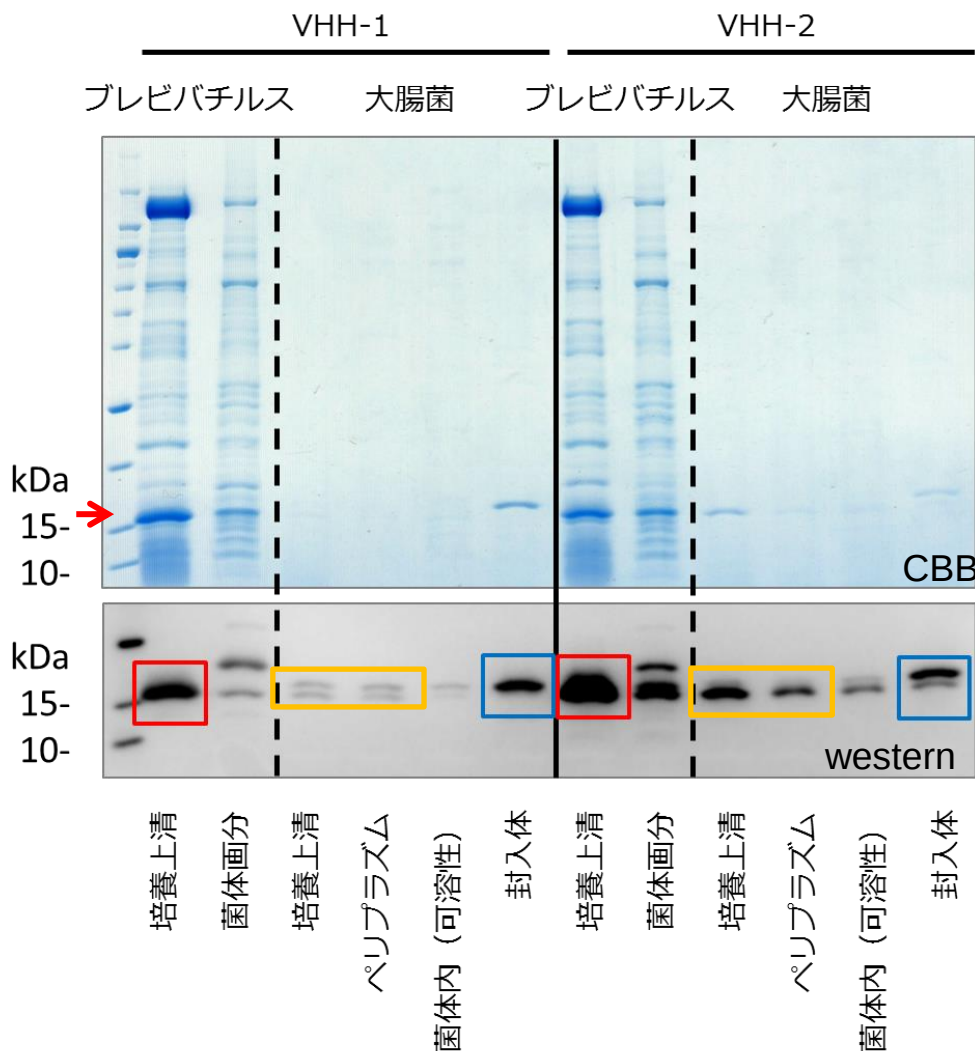
⇒活性が消失するケースも



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、大半は封入体形成
⇒回避するためにCysの変異 (産総研特許)

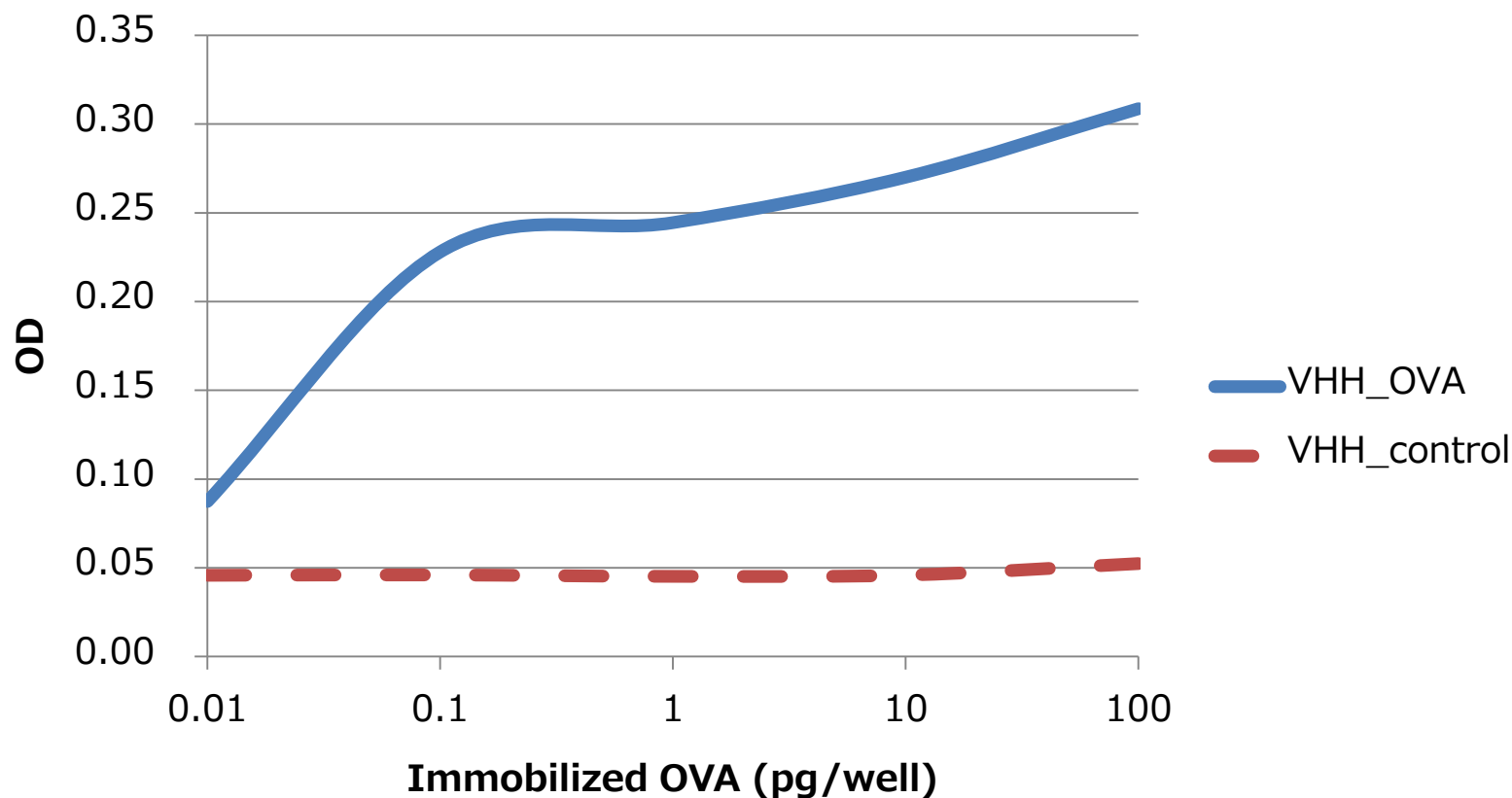


ブレビバチルスでの生産

~500mg/Lが培地中に発現 (フラスコ培養)
菌体外分泌生産のため精製が容易

ブレビバチルスによるVHHの生産
⇒高生産性、低コスト化を可能に

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活性を保持したVHHの生産が可能

抗体医薬品VHとの配列比較(例)

			CDR1	CDR2		
remicade	1	-EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS	VFASGFIFSNHWMNVRQSEPKGLEWVAEIRSKSINSA	59	> キメラ抗体	
rituxan	1	-QVQLQOPGAEELVKPFGASVKM	SCASGYTFTSYNMHWVKQTPGKLEWIGAIYPGN--GD	57		
avastin	1	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGYTFTNYGMNWRQAPGKLEWVGWINTYT--GE	57	> ヒト化抗体	
herceptin	1	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFNIKDTYIHWRQAPGKLEWVARIYPTN--GY	57		
humira	1	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFDYAMHWVRQAPGKLEWVSAITWNS--GH	57	> ヒト抗体	
opdivo	1	-QVQLVESGGGVVQPGGSLRLD	CKASGITFTSNGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDG--SK	57		
フタコブラクダ	AGV76534_Camelus	1	-EVQLVESGGGSVQAGGSLRLS	CRASRYTYSRMCMGWFRQTPGKEREGVAAL--DSA--GN	56	
ヒトコブラクダ	BAD00248_Camelus	1	-QVQLVQSGGGSVQAGGSLRLS	CAASGYTIDSYCMGWFRQAPGKEREGVAVINNPG--GT	57	
ラマ	CAD13187_Lama	1	-QVQLVESGGGSVQAGGSLRLS	CAASGYAYSSNCMGWFRQAPGKEREGVAGIYSGG--GS	57	
アルパカ	ACZ80603_Vicugna	1	MDVQLVESGGGLVQAGGSLRLS	CAASGIIFISINAMGWYRQAPGKERELVAAL--SSN--GN	57	
			*	CDR3		
remicade	60	THYAESVKGGRFTISRD	DKSAVYQLQMTDLRTEDTG	VYYCSR--NYYGS---TY---DYW	110	
rituxan	58	TSYNQKFKGKAITLADK	SSSTAYMQLSLTSEDS	AVYYCAR-STYYGG-DWYF---NVW	111	
avastin	58	PTYAADFKRRFTFSLD	TSKSTAYLQMNSLRAED	TAVYYCAKYPHYYGSSHWFY---DVW	113	
herceptin	58	TRYADSVKGRFTISAD	TSKNTAYLQMNSLRAED	TAVYYCSR--WG-GDGFYAM---DYW	110	
humira	58	IDYADSVKGRFTISRD	NAKNSLYLQMNSLRAED	TAVYYCAK--VSYLSTASSL---DYW	111	
opdivo	58	RYYADSVKGRFTISRD	NSKNTLFLQMNSLRAED	TAVYYCA-----TNDDYW	103	
AGV76534_Camelus	57	TNYVDSVKGRFTISQ	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	GQGTTLTV				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

*; 保存されているCys残基

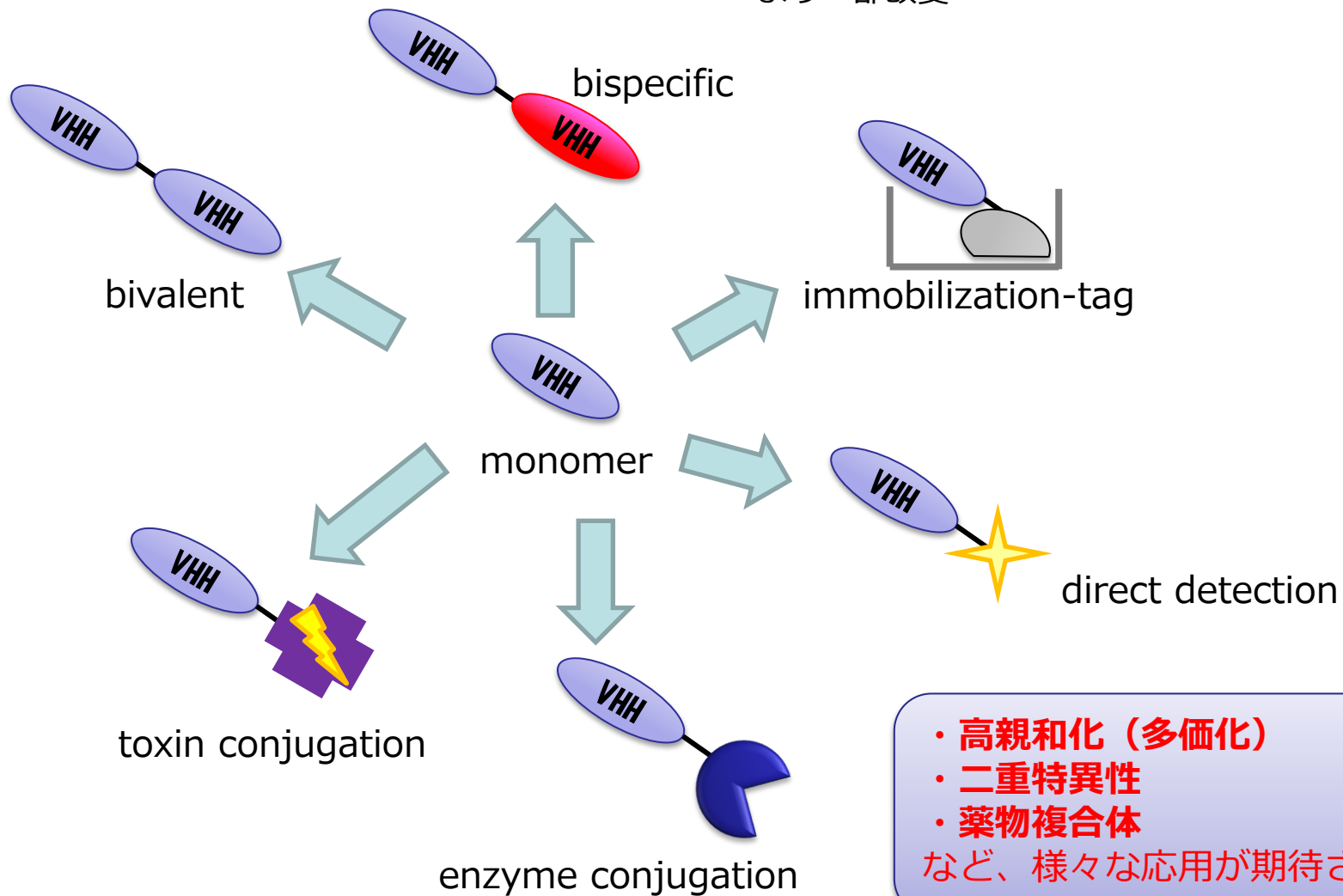
ヒトVHとの相同性も高く、
(FRで80%程度)
ヒト化も容易

(Ablynx社等で医薬品開発、Phase III)



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（多価化）
・二重特異性
・薬物複合体
など、様々な応用が期待される

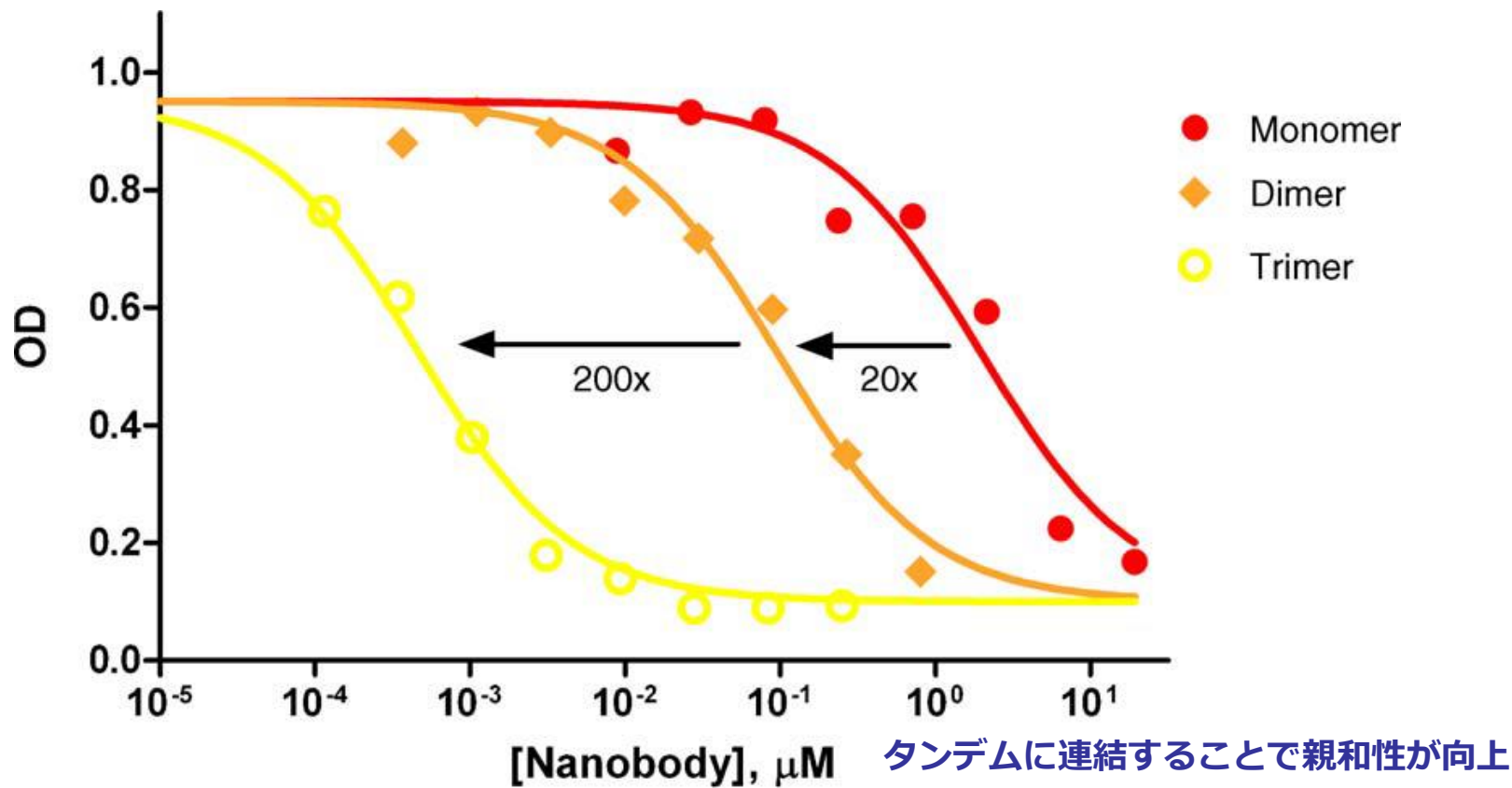


Figure 3. Effect of formatting on the neutralizing capacity of an antiviral Nanobody. Serial dilutions of Nanobody monomer, dimer and trimer were analyzed in a virus neutralization assay. IC₅₀ values calculated from these dose–response curves are 2 mM, 100 nM and 0.5 nM for respectively monomer, dimer and trimer, corresponding to a maximum potency improvement of 4000x.

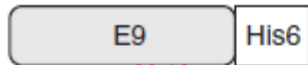
参考2 FASEB J. 26, 3969-3979 (2012).

TABLE 1. Biological characteristics of the different VHH-derived constructs

Construct	MW	pI	K_D	GFP expression	BBB crossing	<i>In vivo</i> GFAP intracellular binding
mVHH E9	14	9.4	5.6×10^{-9} M	—	+	+
mVHH E9-SS free	14	ND	12×10^{-9} M	—	ND	ND
mVHH E9-E9	28	9.3	5.4×10^{-9} M	—	+	ND
mVHH E9-23	15	7.7	4.8×10^{-9} M	—	—	—
mVHH E9-EGFP	44	6.2	7.7×10^{-9} M	+	—	—
mVHH E9-GS-EGFP	45	9.3	5.2×10^{-9} M	+	+	+

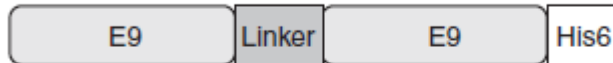
See Fig. 1 for schematic illustration. E9, anti-GFAP mVHH E9; ND, not determined.

mVHH E9 or mVHH E9-SS free



VHH抗体

mVHH E9-E9



mVHH E9-23



mVHH E9-EGFP



mVHH E9-GS-EGFP



Figure 1. Schematic illustration of the mVHH constructs. See Table 1 for biological characteristics. E9, anti-GFAP mVHH E9; linker, AAASLSTELFGSELIPIS peptide; GS, GGGGSGGGGS peptide; Tat, GRKKRRQRRPQ peptide; His6: hexahistidine tag; Myc, cMyc-derived epitope tag.

- ・ 抗原 ; Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)
- ・ 大腸菌発現系 (分泌 or 菌体内)
- ・ SS-freeは2ヶ所のCysをSerに
⇒親和性には影響ないがBBB通過認められず
- ・ VHH抗体がBBBを通過できる可能性
タグによるpIの変化でBBB通過能が変わる

VHH抗体スクリーニングサービス

基本サービス ; 400万円～、3～4ヶ月

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 (基本 ; 100万円/クローン)
- ・ クローン数、納品量の変更
- ・ 高親和化 (二次スクリーニング、多価化)
- ・ 製造プロセスの向上
- ・ 多検体、年間契約など柔軟に対応

VHH抗体取得実績

対象抗原

- ・タンパク質
(可溶性タンパク質、受容体の細胞外ドメイン)
- ・低分子化合物
(単糖、抗生物質)

親和性

nM～10nMオーダー

用途

ELISA等検出用
次世代抗体医薬品（二重特異性抗体）の開発（検討中）

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

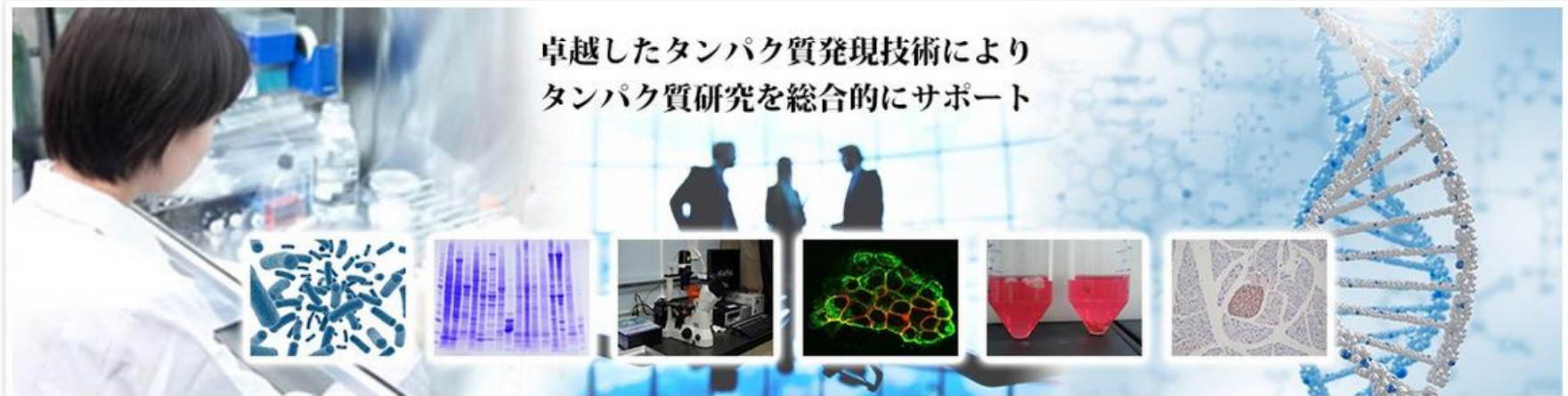
HOME

Product

Service

Link

Company



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。