

抗体酵素を用いた神経変性疾患治療薬開発を目指して

鈴鹿医療科学大学

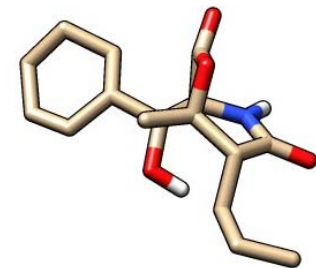
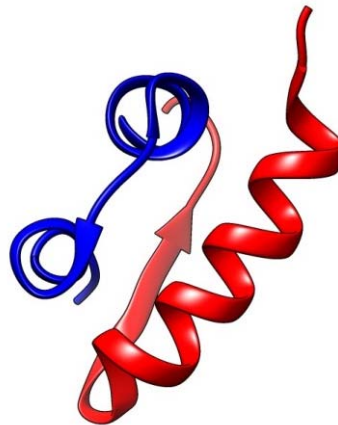
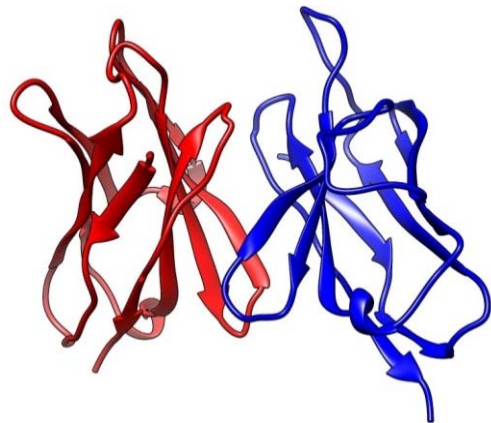
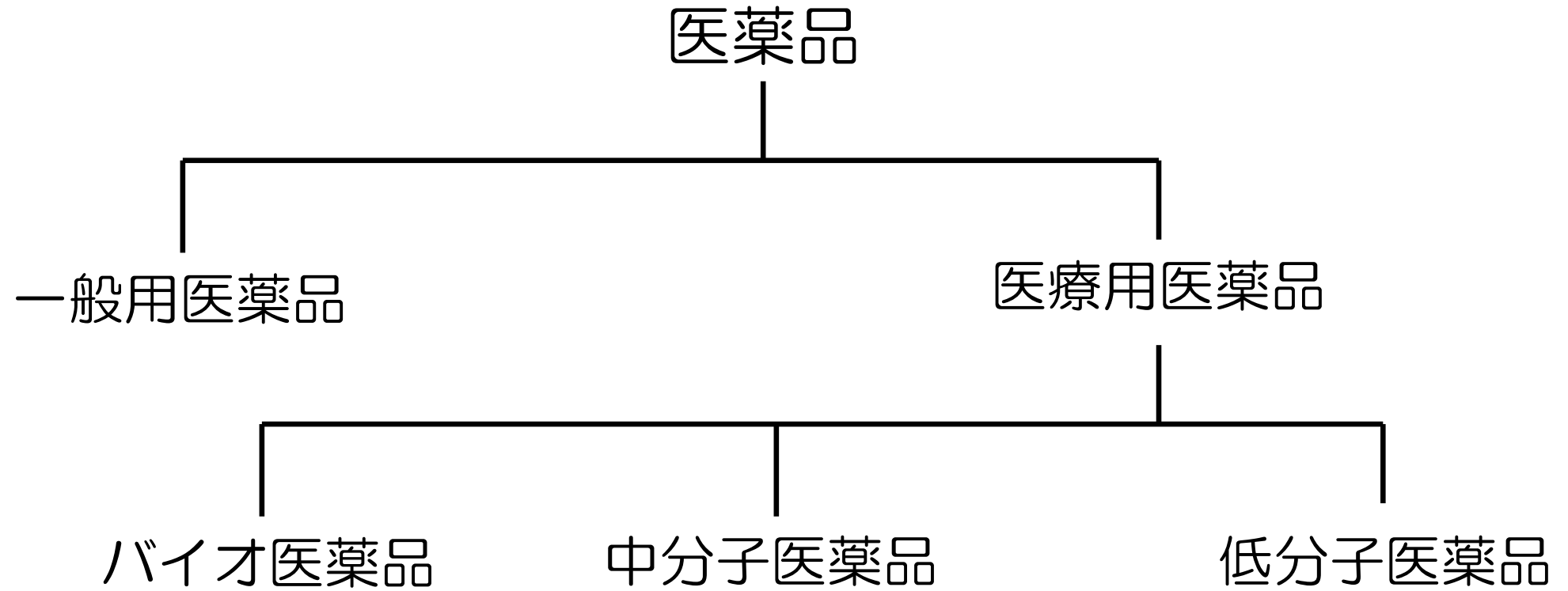
薬学部 薬学科 薬品化学研究室

田口 博明



- 抗体医薬と抗体酵素
- 病原性タンパク質を加水分解する抗体酵素の開発
- 抗体酵素作製法の開発

医薬品の分類



抗体医薬の歴史

- 1890 血清療法ージフテリア、破傷風ー抗体を治療に使った始まり
(Behring and 北里)
- 1975 ハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の作成
(Koehler and Milstein)
- 1982 白血病への抗体療法の最初の成功例（抗イディオタイプ抗体）
- 1986 キメラ抗体技術（Genentech社/Cabilly）
- 1986 マウスモノクローナル抗体（抗CD3抗体:OKT3）がFDAにより認可
(J&J社)
- 1988 ヒト化モノクローナル抗体（MRC/G.Wintre）
- 1990 ファージディスプレイ法（mcaffertyら）
- 1997 ヒト化モノクローナル抗体（抗CD25抗体）がFDAにより認可
(Roche)
- 1997 モノクローナル抗体（抗CD20抗体）によるがん治療が認可
- 1998 抗TNF抗体による関節リウマチとクローン病の治療が認可

- 高い効果と少ない副作用
- 抗原に対する高い特異性と親和性
- 生体内安定性が高い
- 毒性が低い
- 開発過程でドロップアウトが少ない
- 多様な薬剤ターゲットに対応できる標的分子（抗原）の多様性作用メカニズムの多様性
- 工業生産が可能遺伝子工学的な手法による改変、改良が可能組み換え体の製造技術の確立生産や精製法の共通性が高い

抗体医薬のデメリット

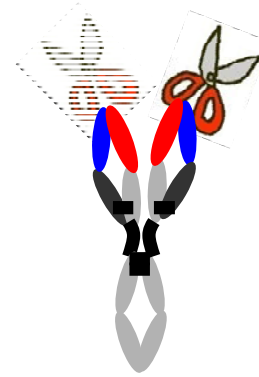
- 高額な薬剤費
 - 抗体医薬は従来のタンパク医薬に比べ投与量かはるかに多い
 - 細胞培養で製造するとコストが高い
 - 特許が複雑
- 品質管理が難しい
 - 抗体は糖鎖による修飾など、構造が複雑なので、製造上の品質を均一にすることが難しい
 - 保管などが低分子化合物と比べ難しい
- 剤形が主に注射剤
- 分子量が大きいため、経口は不可
- 抗体への免疫応答がおこる
(マウス等異種の抗体の場合)

抗体酵素とは

抗体



抗体酵素



酵素



基質特異性

+++

++

+

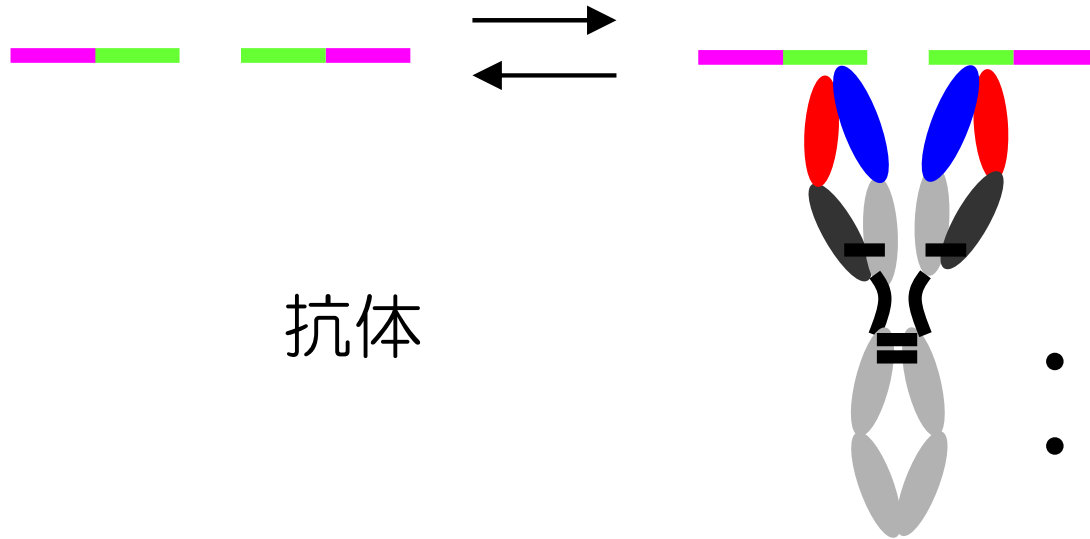
効率
(turnover)

—
(化学量論的)

++

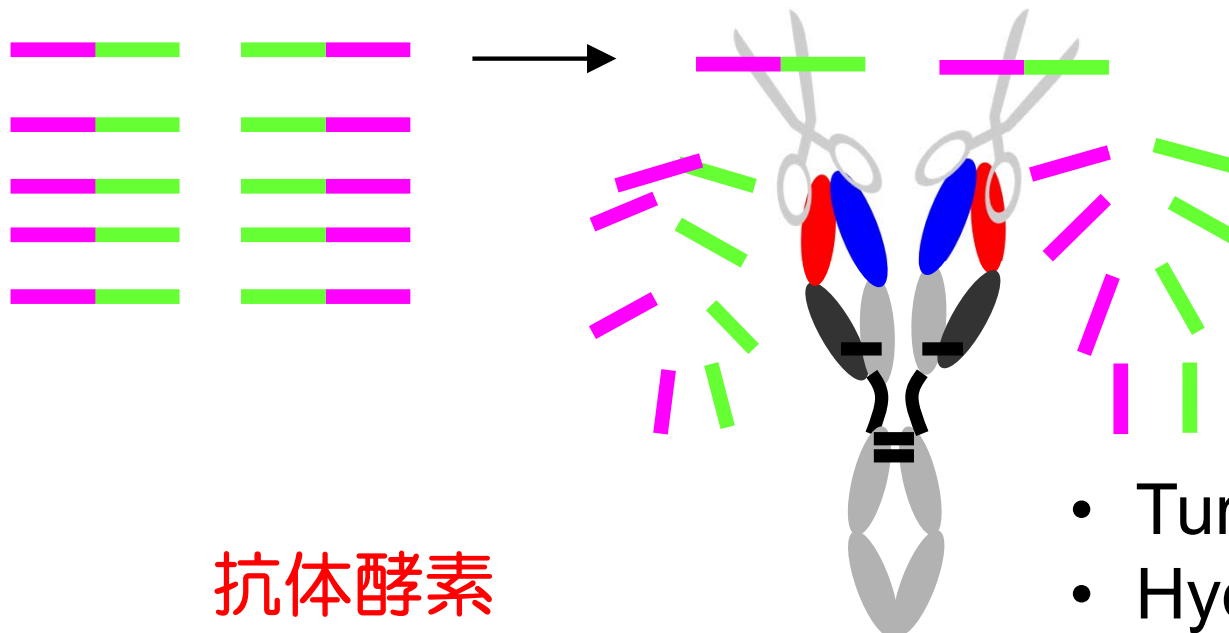
+++

抗体と抗体酵素



抗体

- Reversible
- Stoichiometric inactivation



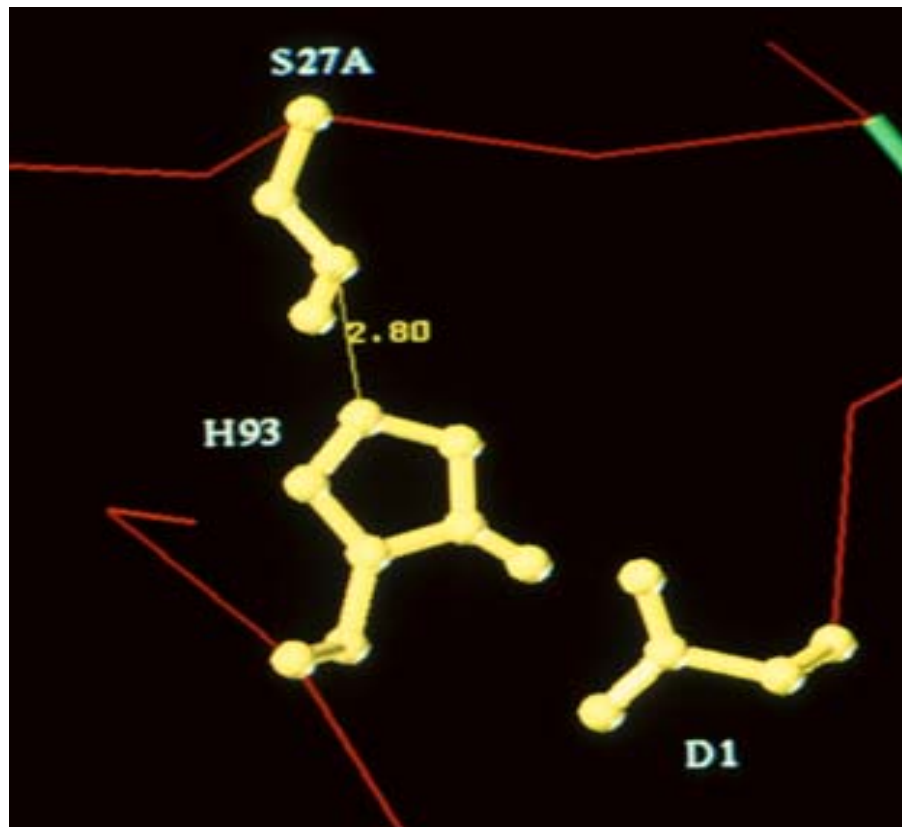
抗体酵素

- Turn over
- Hydrolysis
- Permanent inactivation

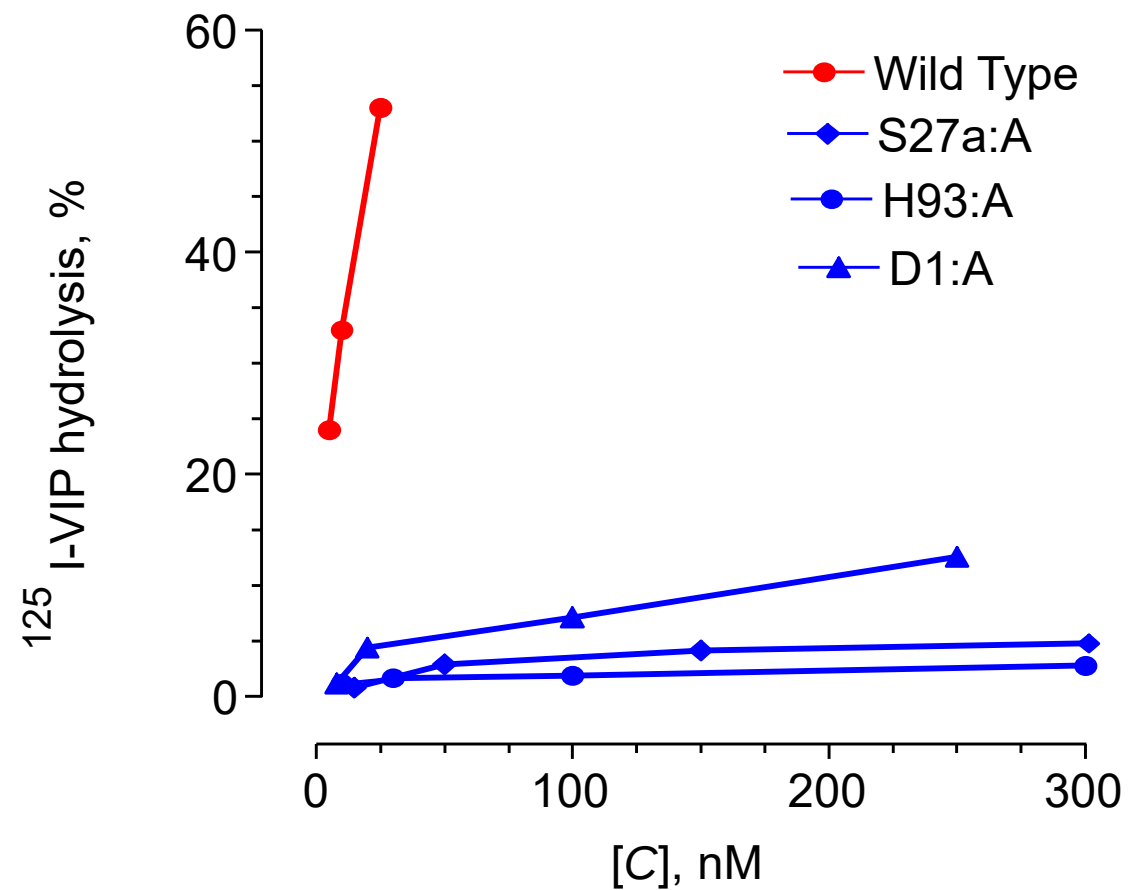
抗体軽鎖のセリン酵素メカニズム

VIP: H-S-D-A-V-F-T-D-N-Y-T-R-L-R-K-Q-M-A-V-K-K-Y-L-N-S-I-L-N-NH₂

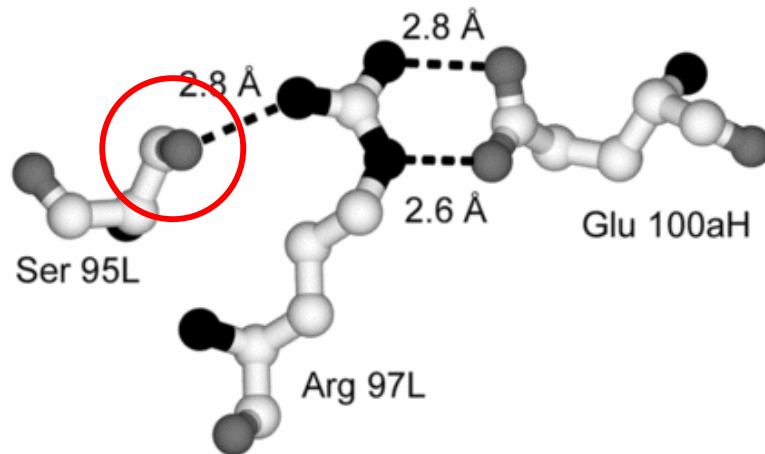
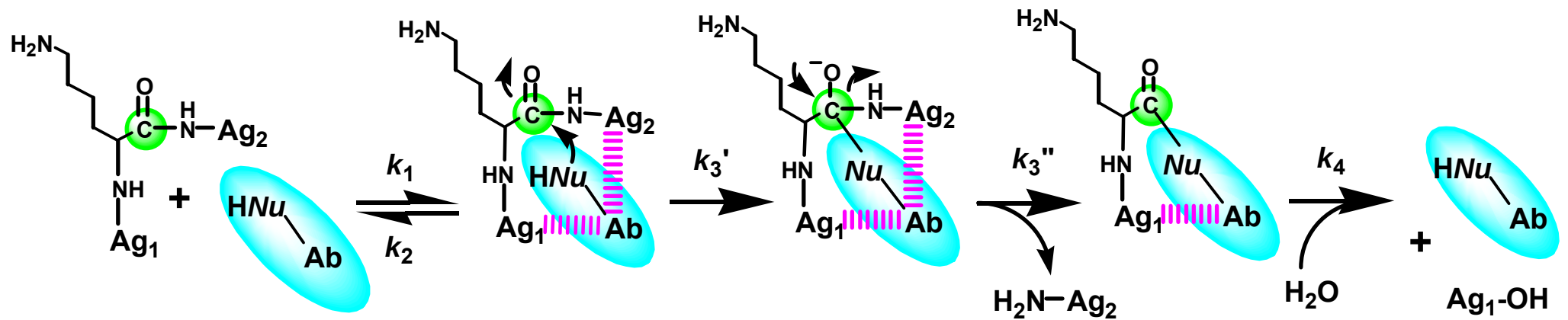
↑ ↑



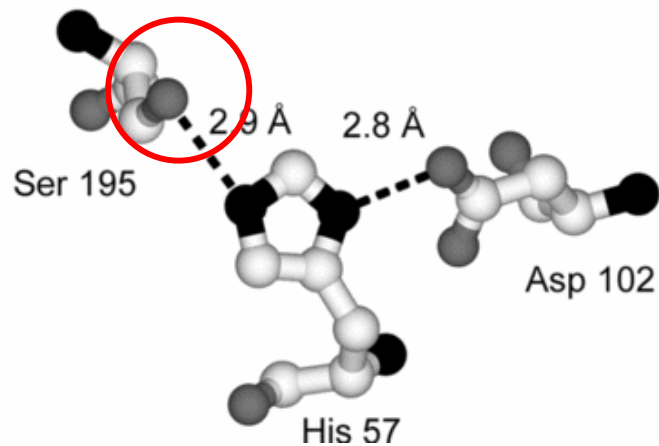
Trypsin-like triad



抗体軽鎖のセリン酵素メカニズム



抗体酵素の推定活性中心



トリプシンの活性中心

- 抗体医薬と抗体酵素
- 病原性タンパク質を加水分解する抗体酵素のスクリーニング
 - アミロイド β
 - ヘマグルチニン
 - PD1
 - SARS-CoV-2 スパイクタンパク質
 - タウタンパク質
 - α シヌクレイン
- 抗体酵素作製法の開発

14328

Biochemistry **2003**, 42, 14328–14334

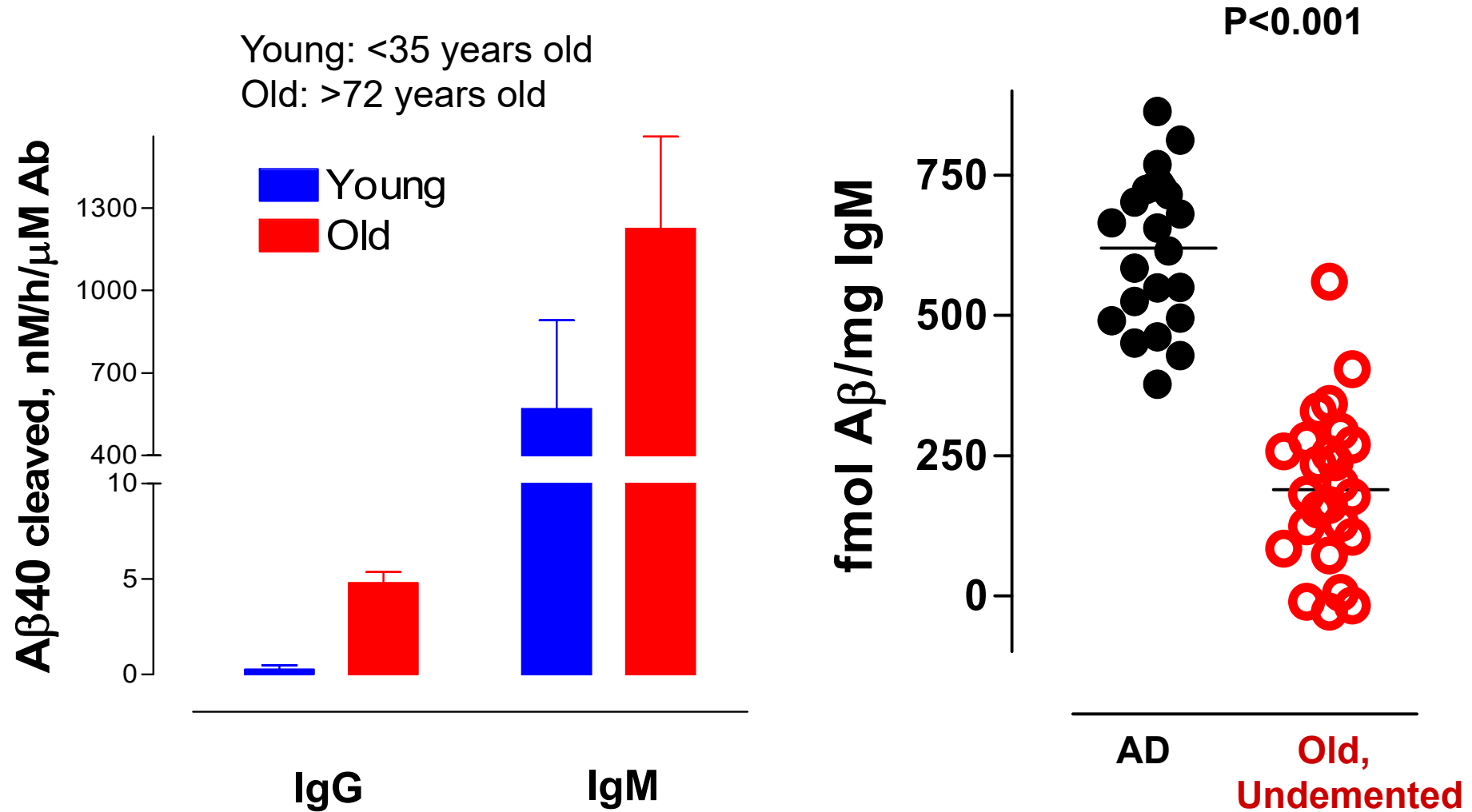
Degradation of β -Amyloid by Proteolytic Antibody Light Chains[†]

Srinath Kasturi Rangan,[‡] Ruitian Liu,[‡] Daniel Brune,[§] Stephanie Planque,[#] Sudhir Paul,[#] and Michael R. Sierks^{*,‡}

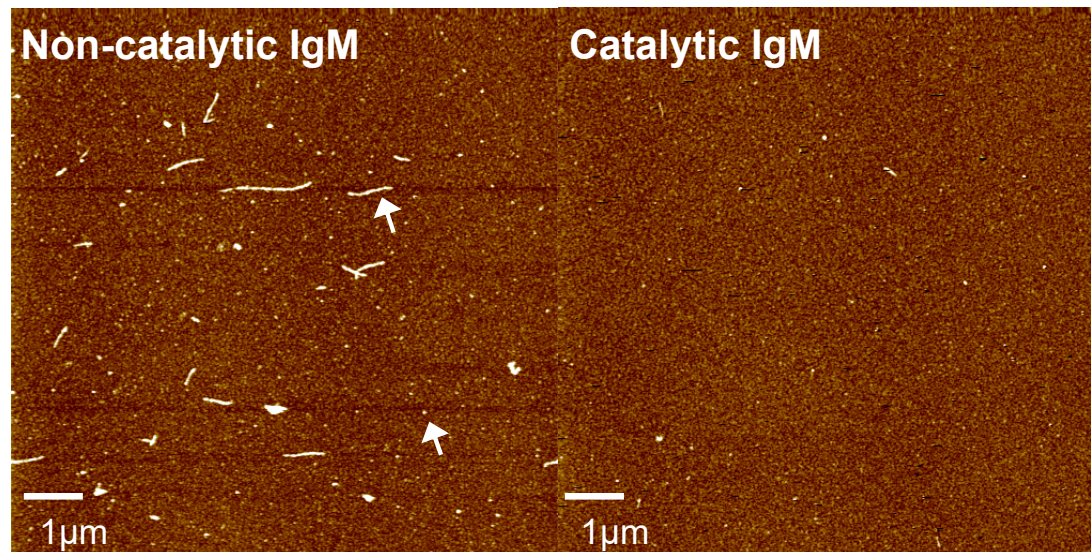
Department of Chemical and Materials Engineering and Department of Chemistry and Biochemistry, Arizona State University, Tempe, Arizona 85287, and Chemical Immunology Research Center, Department of Pathology, University of Texas-Houston Medical School, Houston, Texas

Received June 17, 2003; Revised Manuscript Received October 2, 2003

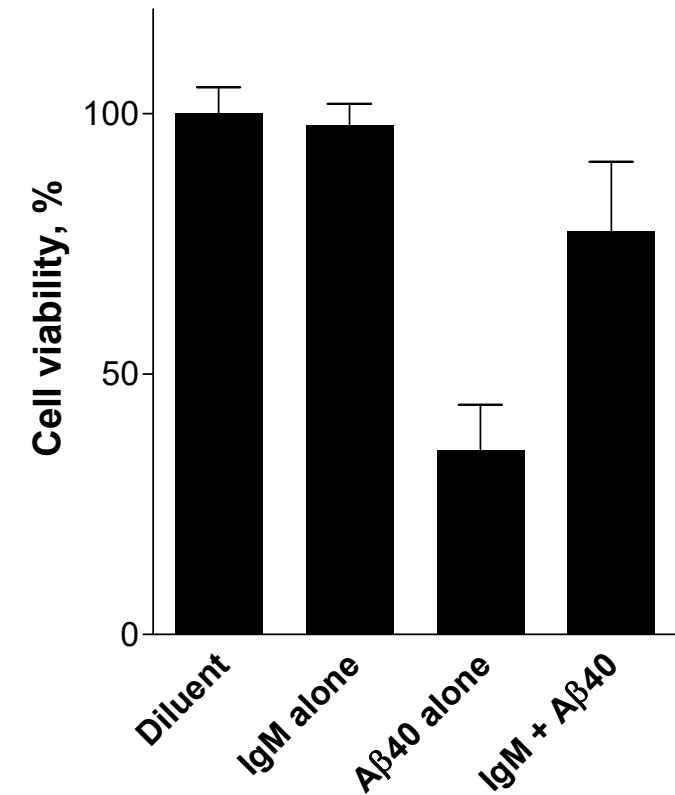
ヒト抗体によるアミロイド β の加水分解



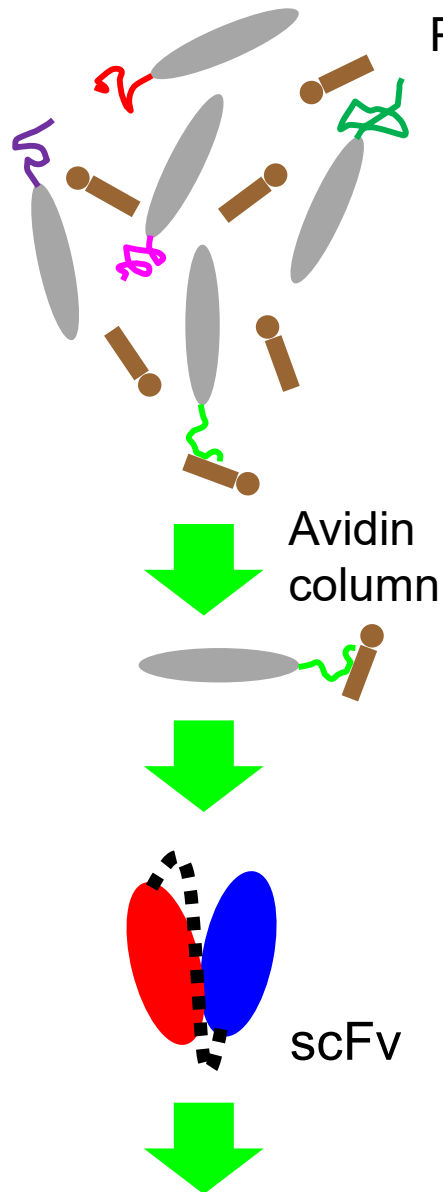
抗体酵素によるアミロイド β 凝集抑制効果と神経細胞保護効果



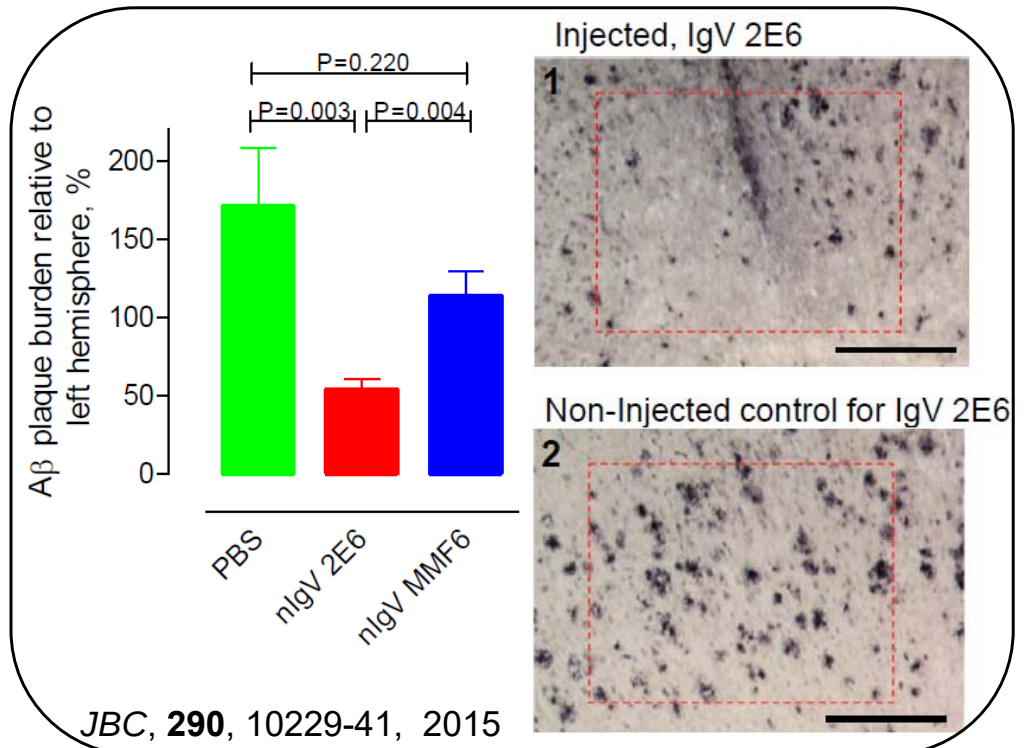
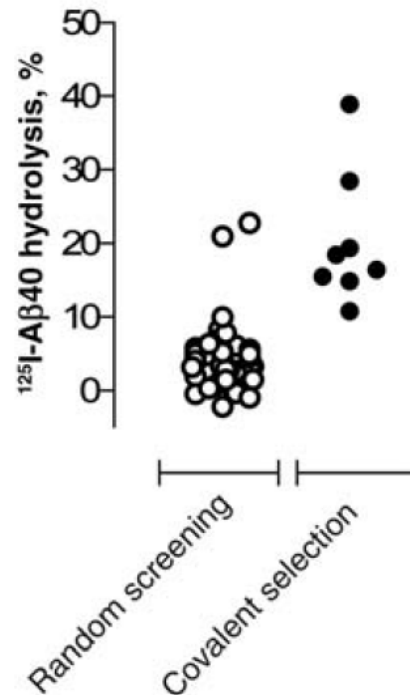
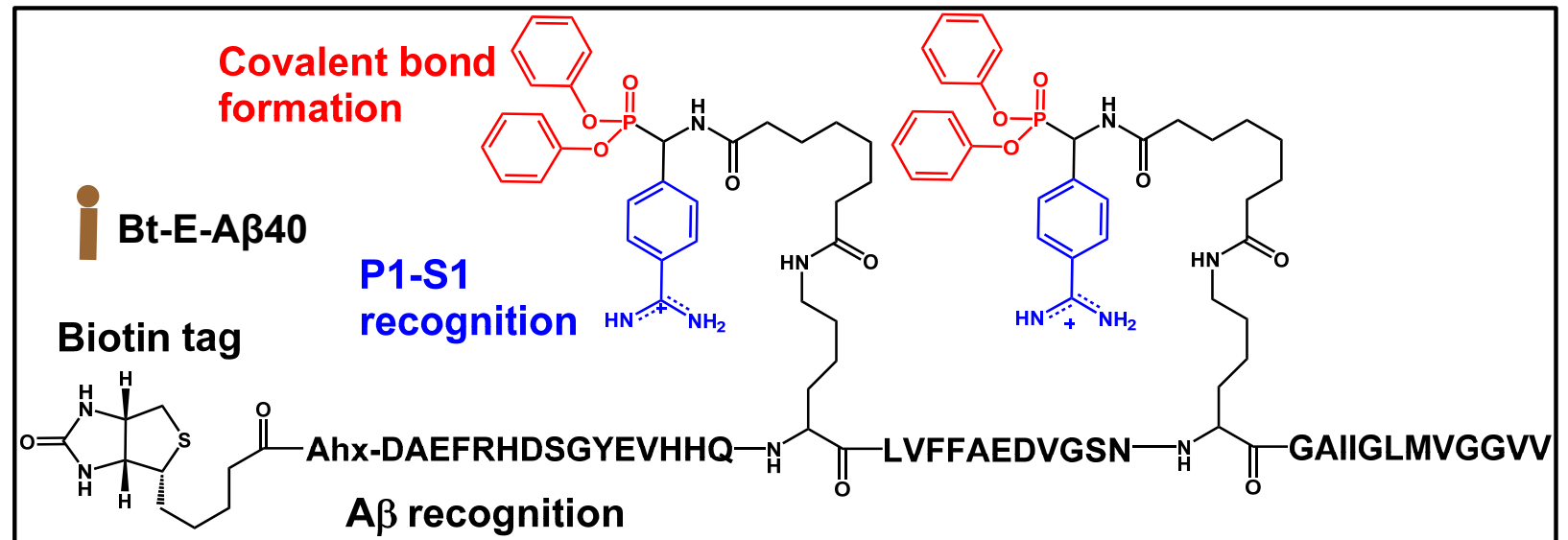
Antibody	Number/100 μm^2		
	oligomers	protofibrils	short fibrils
Catalytic IgM	$22.7 \pm 3.5^*$	$7.8 \pm 2.52^{**}$	2.7 ± 0.58
Non-catalytic IgM	81.3 ± 17	31.3 ± 5.51	16 ± 8.54



ファージライブラリーからアミロイドβ加水分解抗体の単離



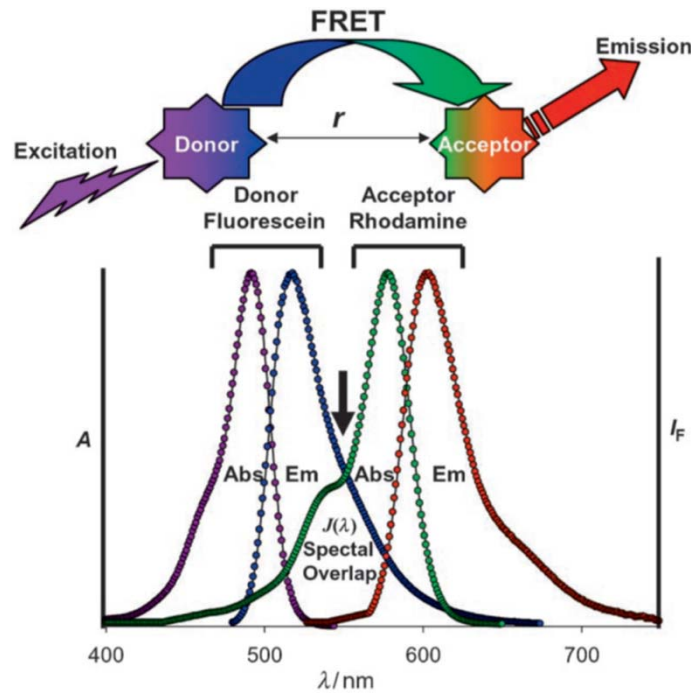
Phage panning in solution



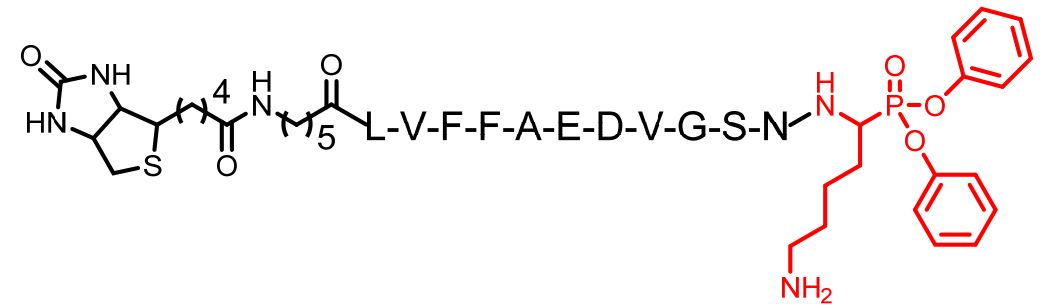
- どのように研究室を立ち上げるか？
- 本学に設置されている機器で何ができるか？
- 自分自身は何ができるか？
- どのように研究費を獲得するか？

etc....

抗体酵素のスクリーニング法

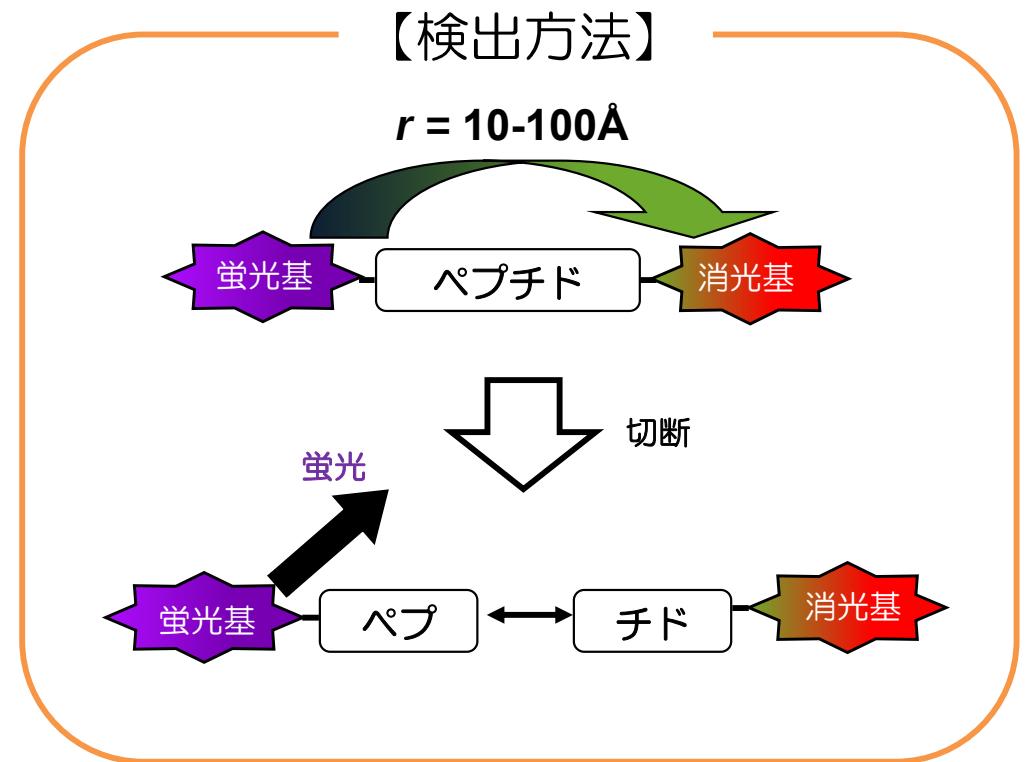
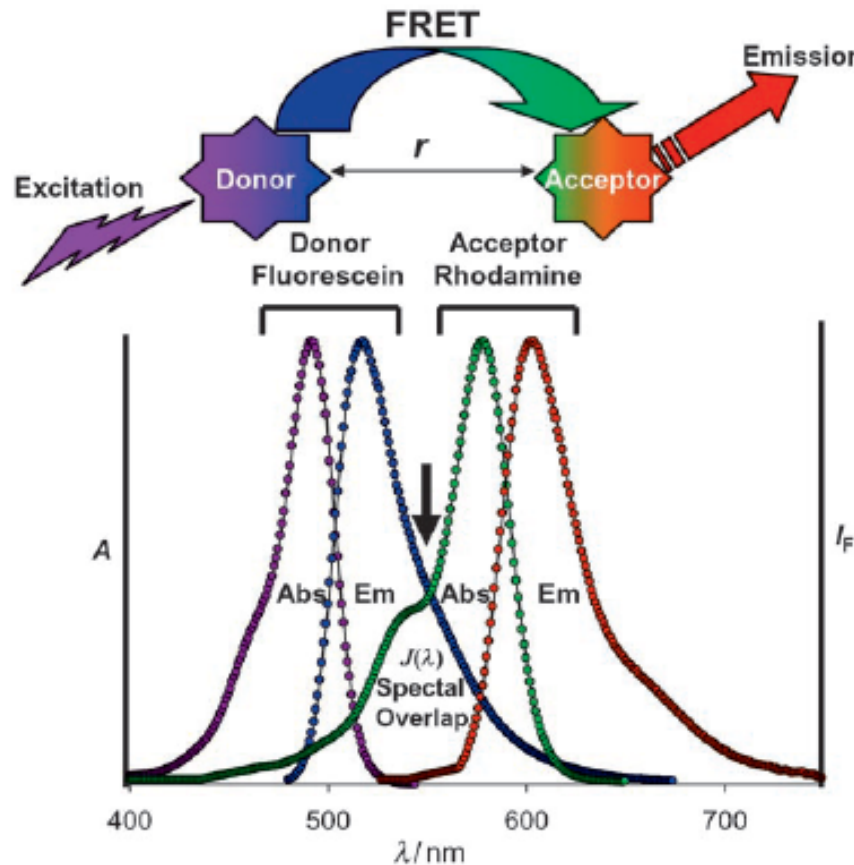


抗体酵素作製法

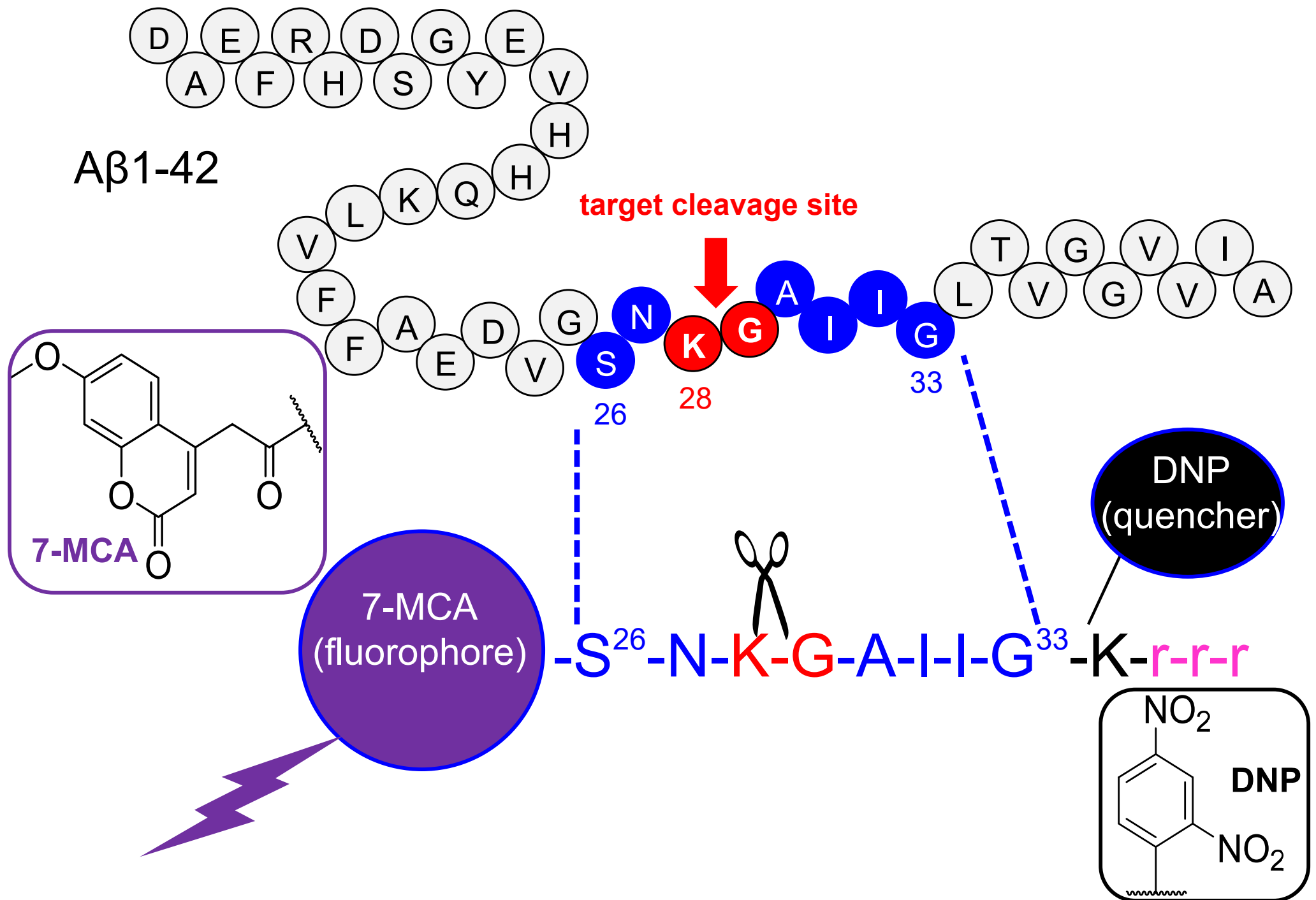


フェルスター共鳴エネルギー移動

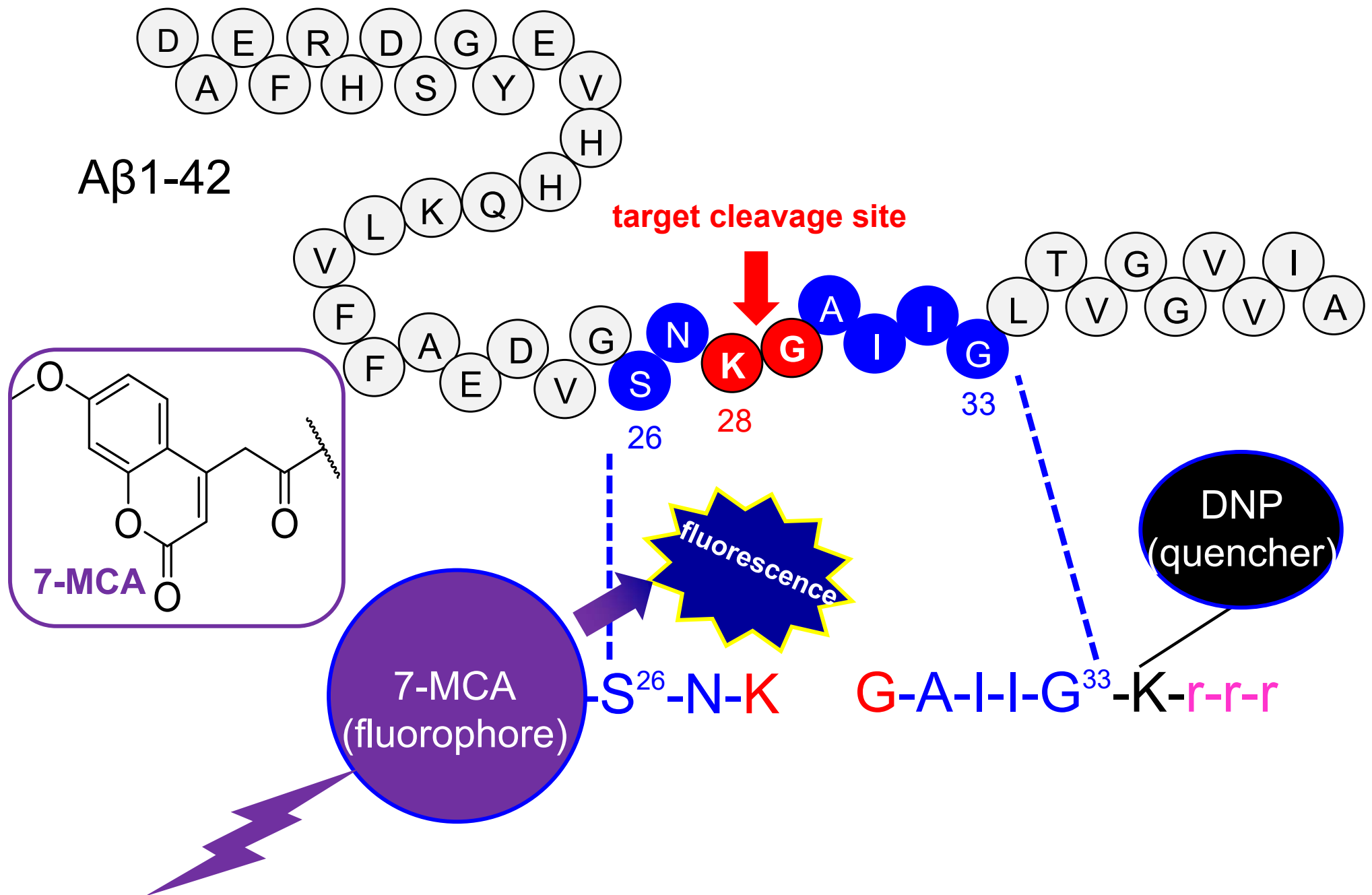
ドナーおよびアクセプターとなる2種類の蛍光物質が一定の距離に位置する時にドナーが発した発光エネルギーをアクセプターが吸収する非発光的エネルギー移動過程



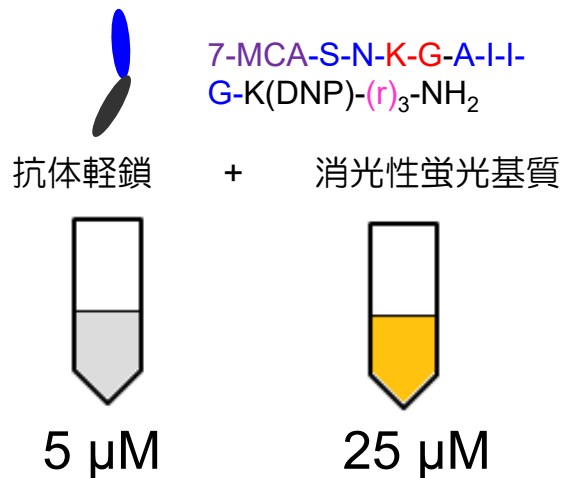
消光性蛍光基質の分子設計



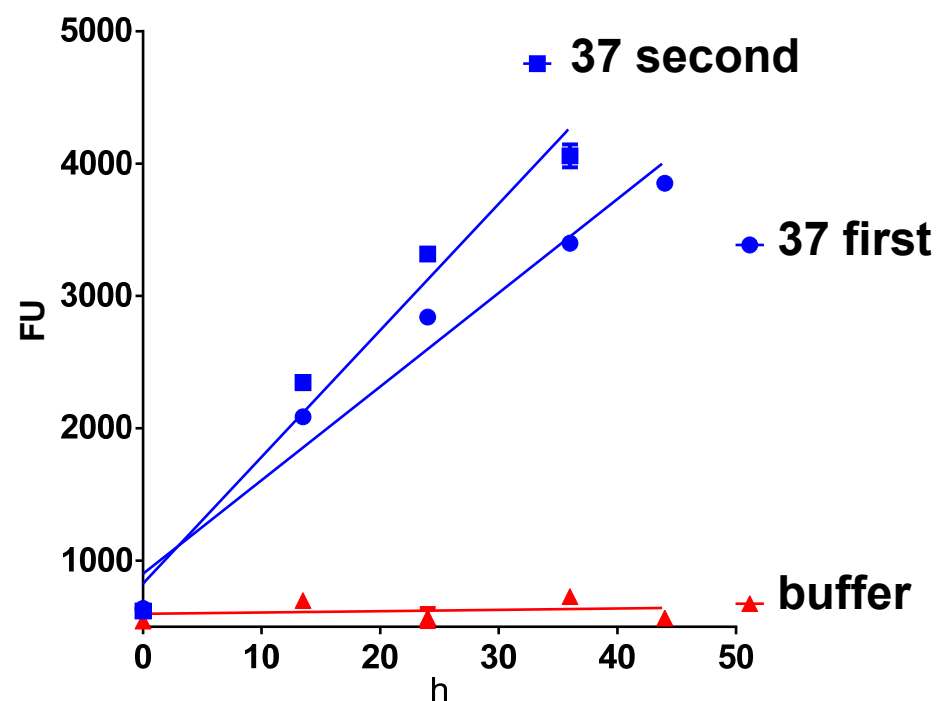
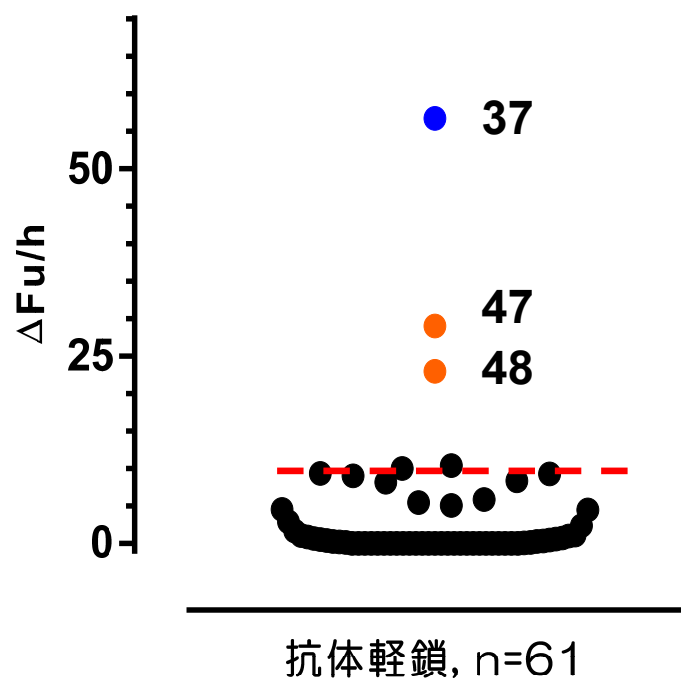
消光性蛍光基質の分子設計



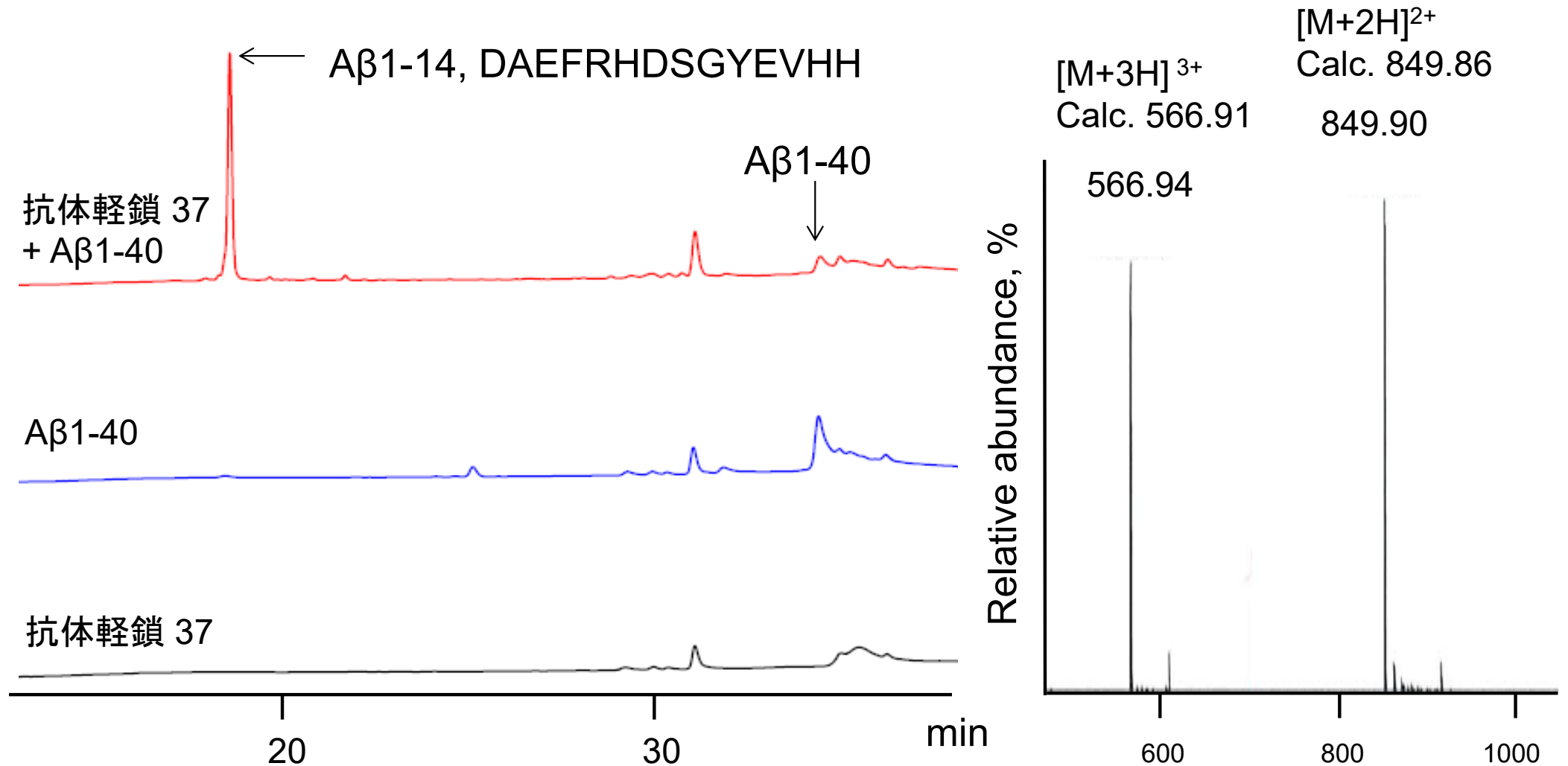
消光性蛍光基質を用いた抗体のスクリーニング



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○



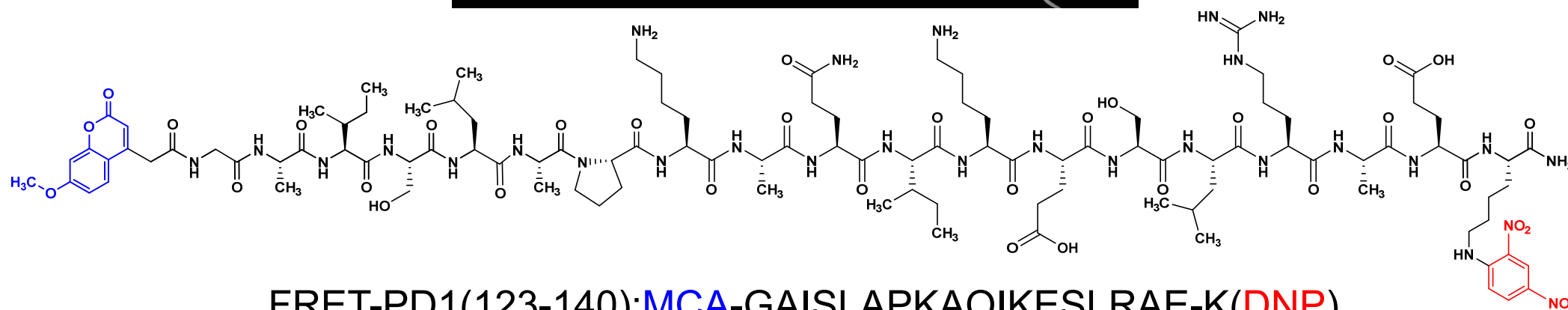
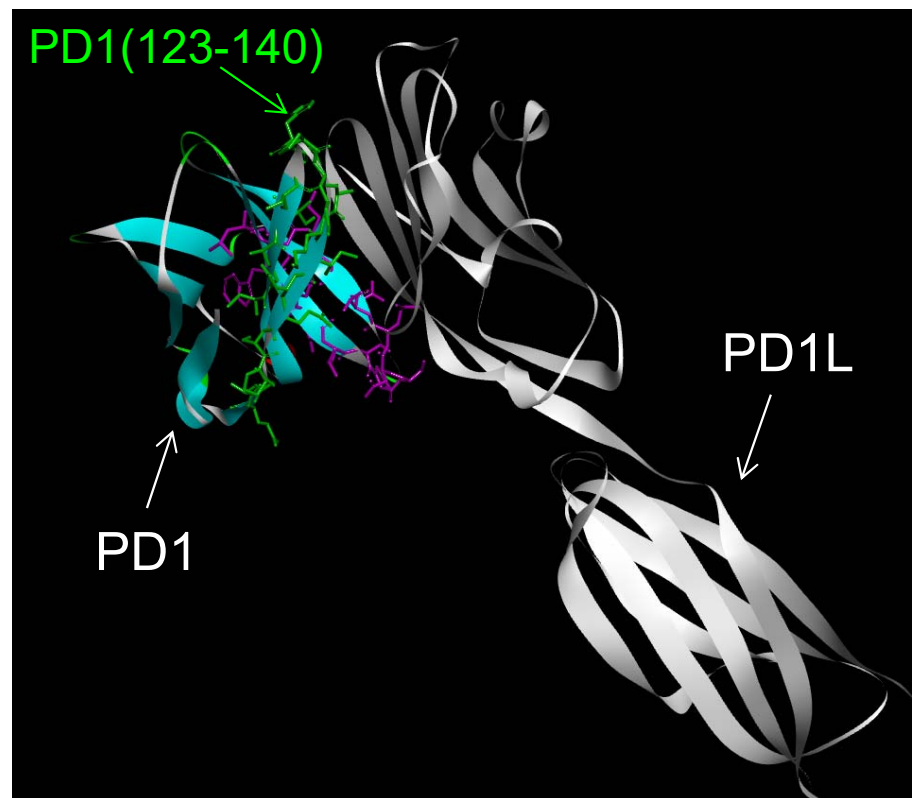
抗体軽鎖 37によるAβ1-40 の加水分解



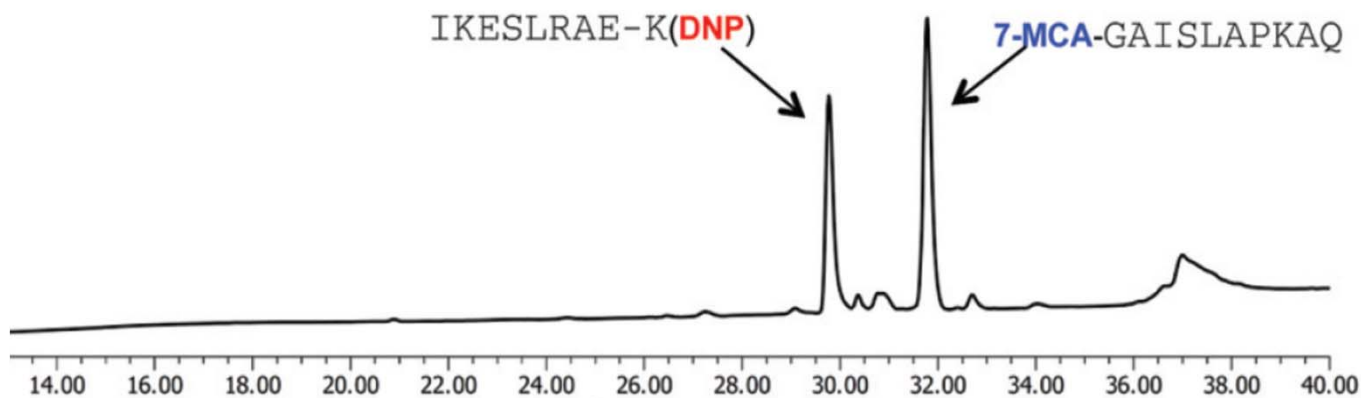
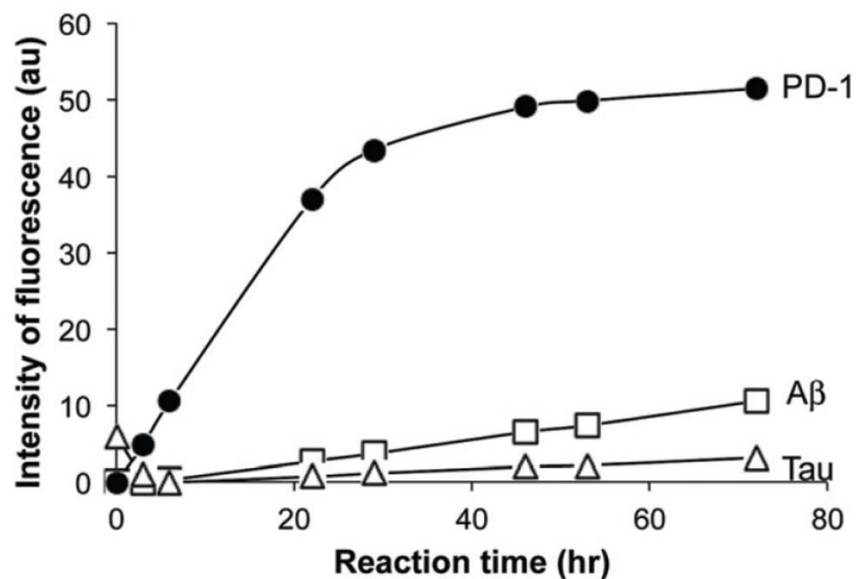
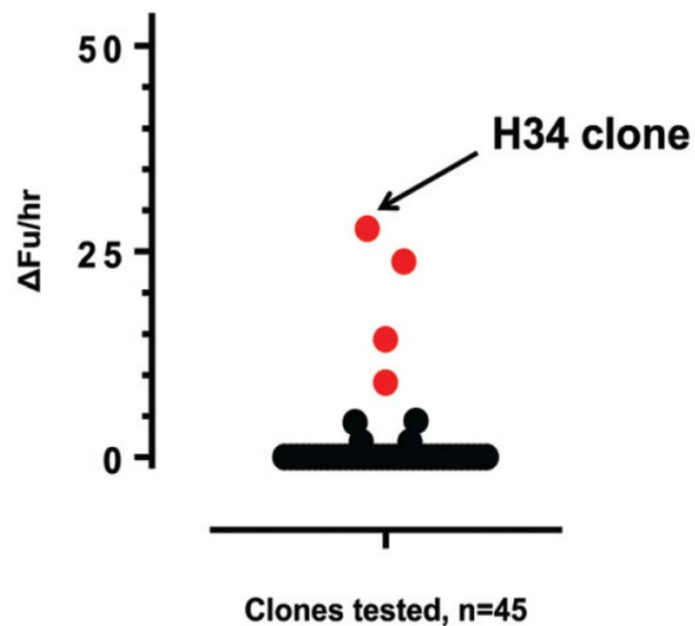
Aβ1-40 (100 uM); clone 37 (10 uM); for 96 h at 37°C. column: Cosmosil type: 5C₁₈-AR-2 (4.6×250), MilliQ water in 0.05% TFA : Acetonitrile in 0.05% TFA from 90 : 10 to 60 : 40 in 60 min (1.0 ml/min)



消光性蛍光基質の分子設計

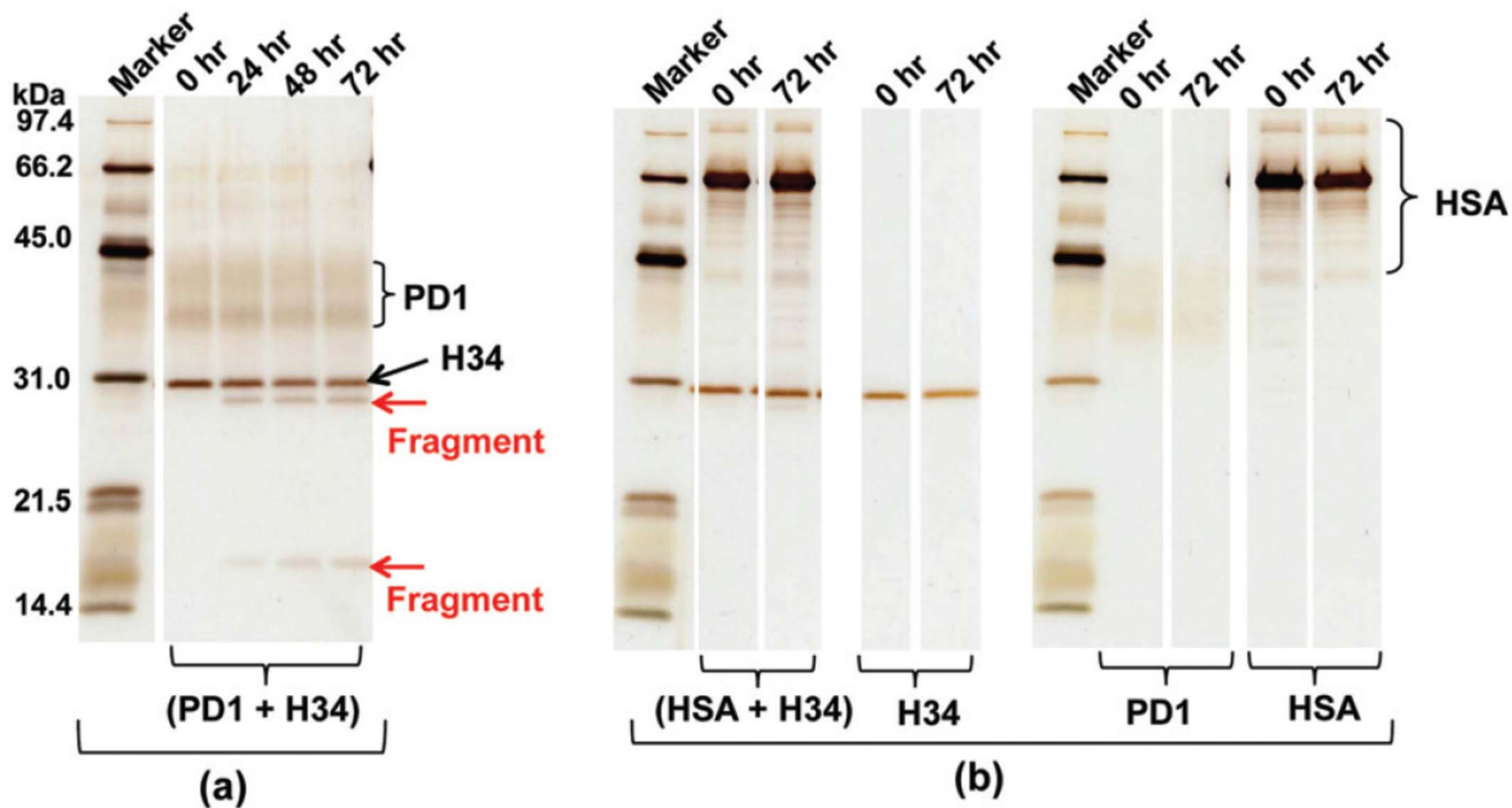


消光性蛍光基質を用いた抗体のスクリーニング



FRET-PD1(123-140):MCA-GAISLAPKAQ-IKESLRAE-K(DNP)

H34によるPD1の加水分解反応



目次

- 抗体医薬と抗体酵素
- 病原性タンパク質を加水分解する抗体酵素のスクリーニング
- 抗体酵素作製法の開発
 - リン酸ジエステルを含む抗原による免疫
 - リン酸ジエステルを含むプローブによるライブラリーの探索
 - 抗体の点変異による抗体の抗体酵素化

SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE

CHEMISTRY

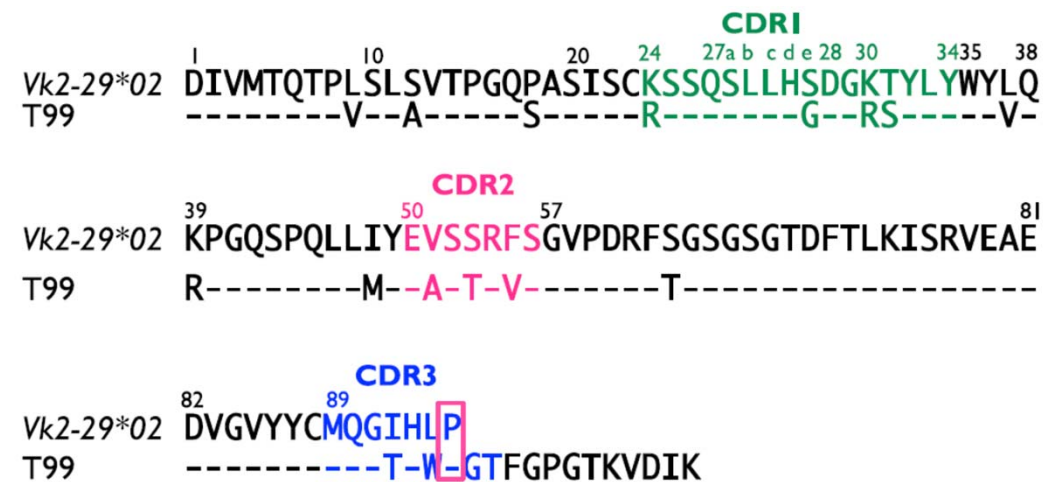
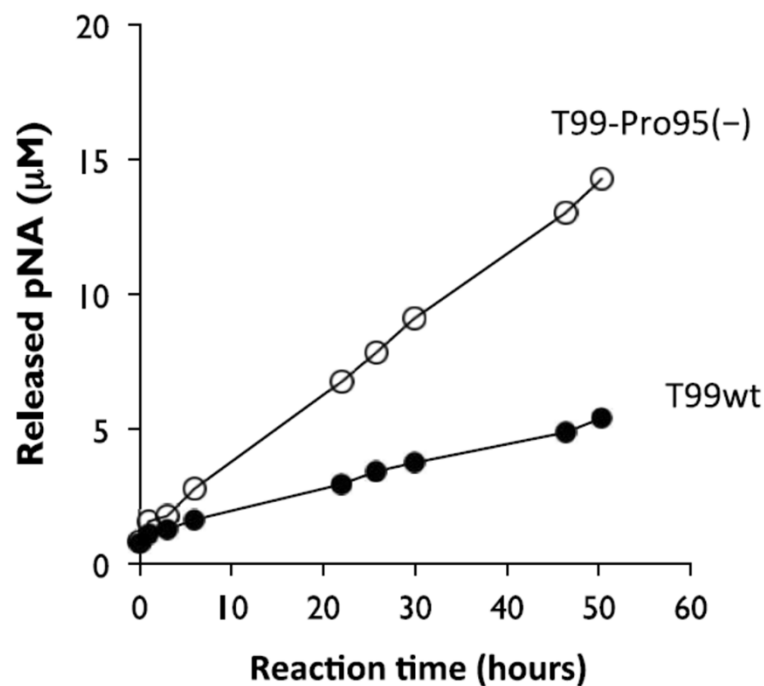
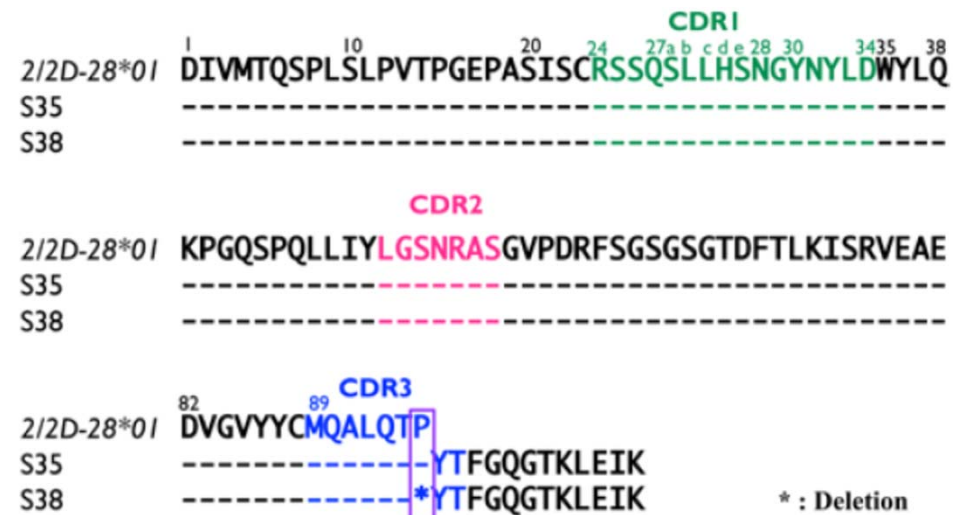
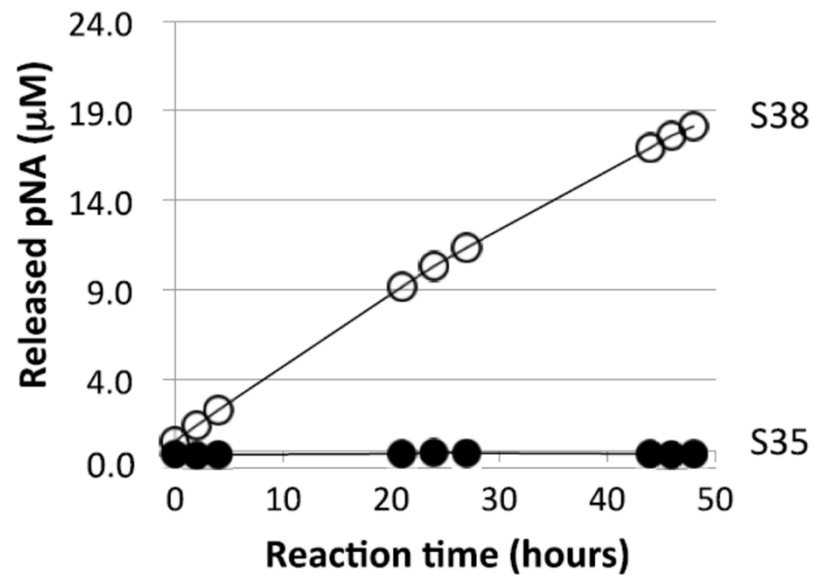
A new algorithm to convert a normal antibody into the corresponding catalytic antibody

Emi Hifumi^{1*}, Hiroaki Taguchi², Haruna Tsuda^{1,3}, Tetsuro Minagawa^{1,3},
Tamami Nonaka¹, Taizo Uda^{1,4}

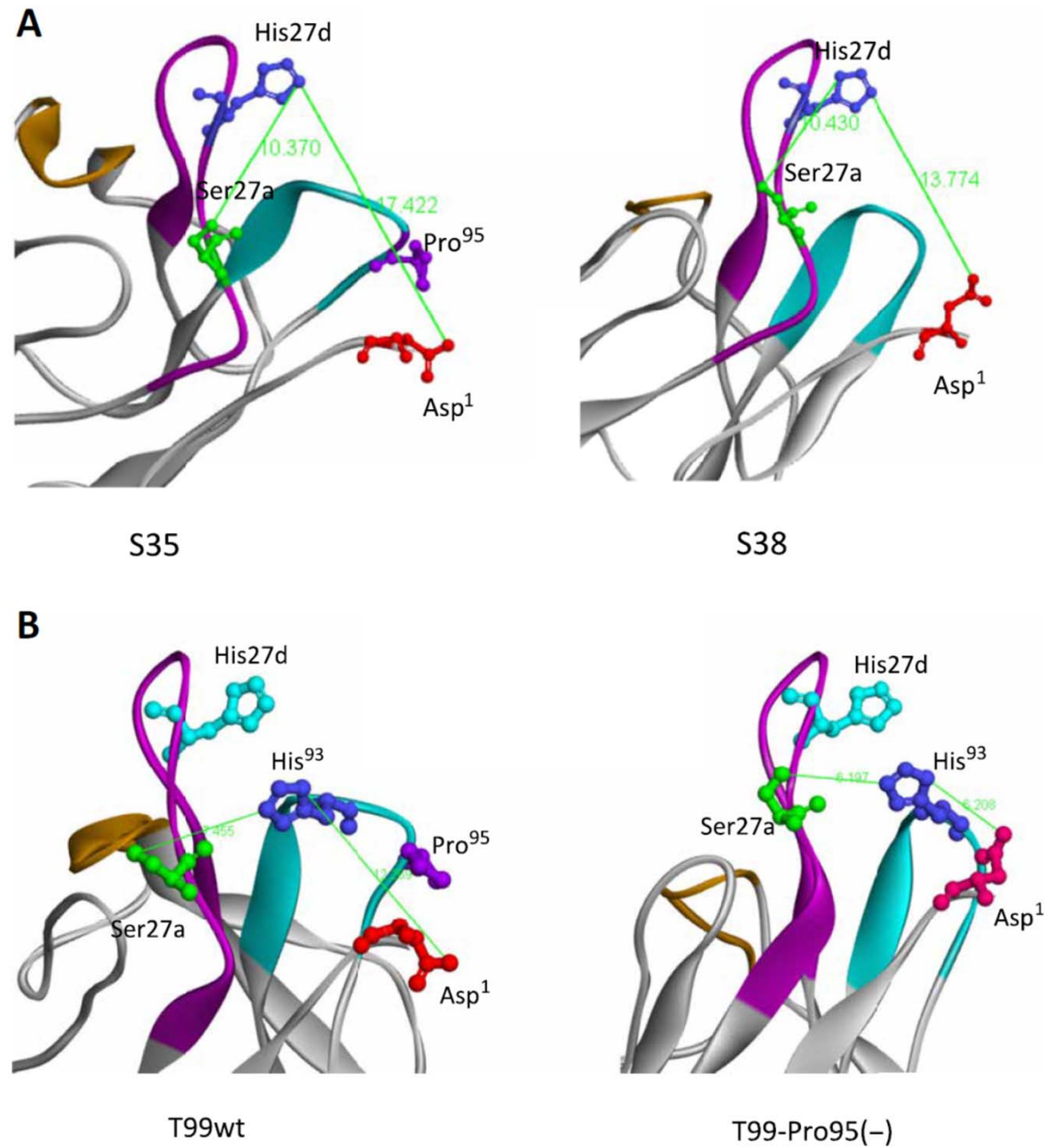
Over thousands of monoclonal antibodies (mAbs) have been produced so far, and it would be valuable if these mAbs could be directly converted into catalytic antibodies. We have designed a system to realize the above concept by deleting Pro⁹⁵, a highly conserved residue in CDR-3 of the antibody light chain. The deletion of Pro⁹⁵ is a key contributor to catalytic function of the light chain. The S35 and S38 light chains have identical amino acid sequences except for Pro⁹⁵. The former, with Pro⁹⁵ did not show any catalytic activity, whereas the latter, without Pro⁹⁵, exhibited peptidase activity. To verify the generality of this finding, we tested another light chain, T99wt, which had Pro⁹⁵ and showed little catalytic activity. In contrast, a Pro⁹⁵-deleted mutant enzymatically degraded the peptide substrate and amyloid-beta molecule. These two cases demonstrate the potential for a new method of creating catalytic antibodies from the corresponding mAbs.

Copyright © 2020
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim to
original U.S. Government
Works. Distributed
under a Creative
Commons Attribution
NonCommercial
License 4.0 (CC BY-NC).

軽鎖抗体の加水分解反応とアミノ酸配列

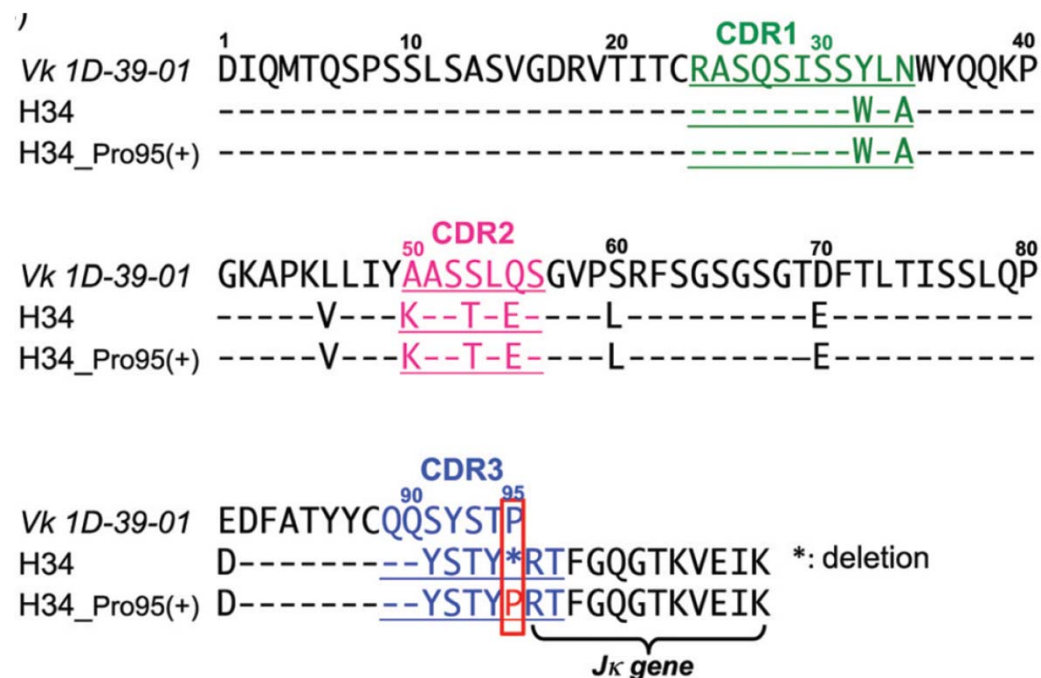
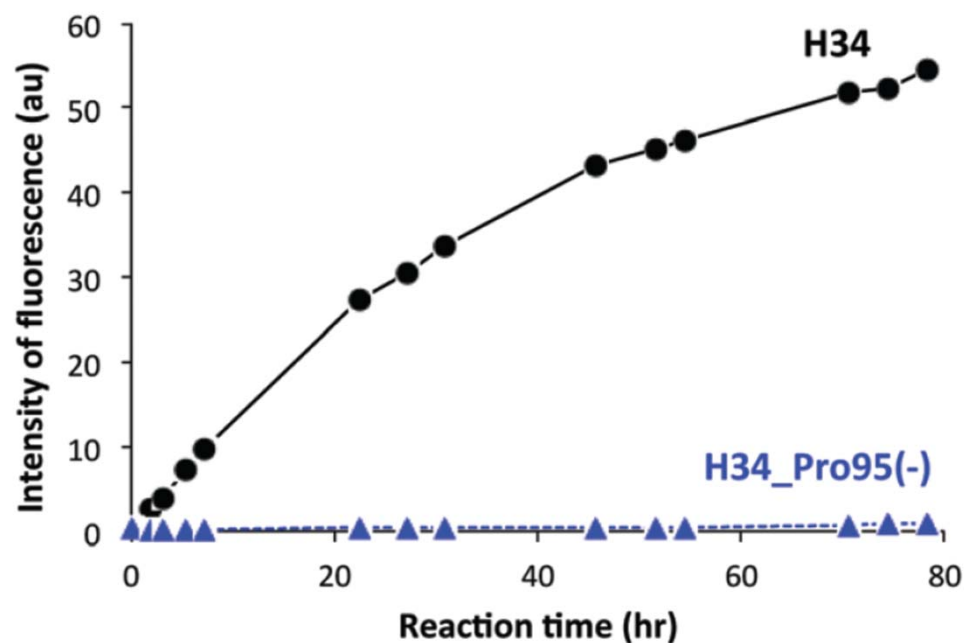


軽鎖抗体の分子モデリング



H34とH34ΔPro95の加水分解反応とアミノ酸配列

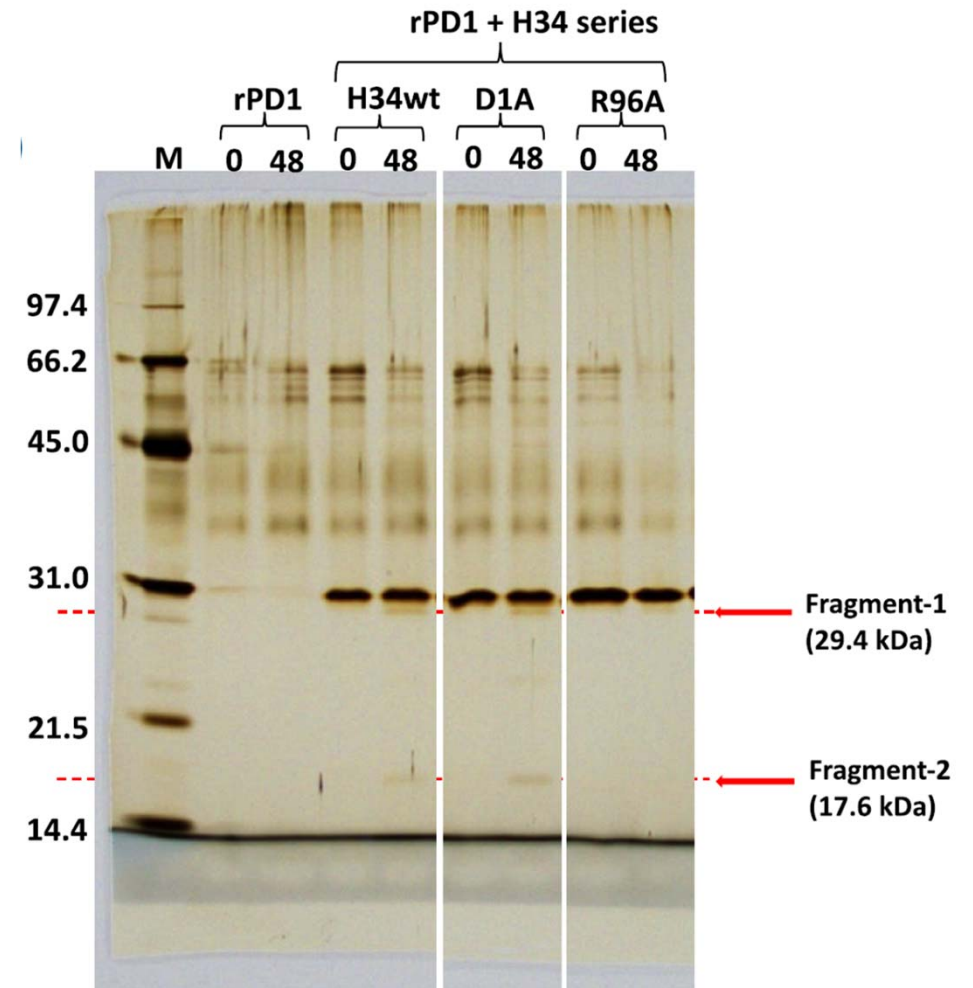
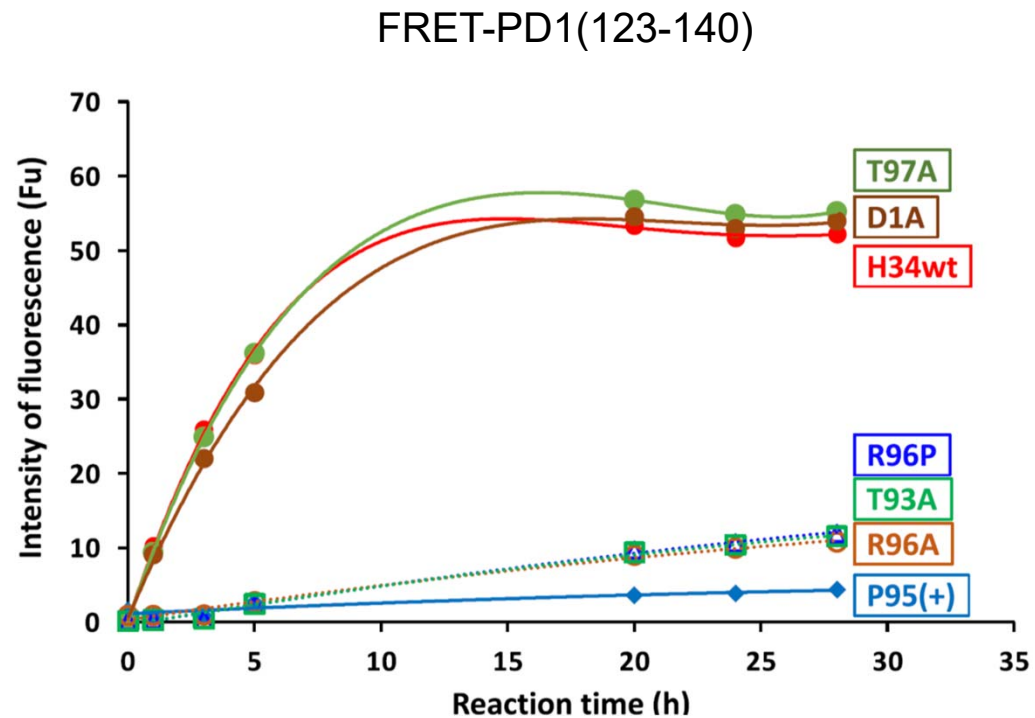
FRET-PD1(123-140)



H34と変異体のアミノ酸配列

	1	10	20	30	40	50	60
H34wt	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKVLIIYKASTLESGVPL						
P95(+)	-----						
R96P	-----						
R96A	-----						
T93A	-----						
T97A	-----						
D1A	-----						
	61	70	80	90	100	110	
H34wt	RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSTY* R TFGQGTKVEIK						
P95(+)	-----P-----						
R96P	-----*P-----						
R96A	-----*A-----						
T93A	-----A-*-----						
T97A	-----*-A-----						
D1A	-----*------						

H34と変異体の加水分解活性



H34と変異体の機能的相互関係

