

3P-1093 ドメイン組換えによる低分子二重特異性抗体の高機能化○浅野 竜太郎, 熊谷 崇, 瀧 慎太郎, 熊谷 泉
(東北大院・工・バイオ工)

我々は、新規がん治療薬としての応用を目指して、抗体の抗原結合部位だけで構成されるディアボディ型二重特異性抗体の研究に取り組んできた。がん関連抗原であるヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)とリンパ球表面抗原CD3を標的としたEx3と名付けたディアボディは、その中で最も顕著な効果を示したが、一方で近年、低分子二重特異性抗体の形態やドメインの配向性が与える機能への影響が報告されている。そこで、本研究ではドメインの組換えによるEx3の高機能化を目指した。

Ex3は4つの抗原結合ドメインから構成されるが、連結順を考慮すると4種の配向性が考えられる。これらの発現ベクターをそれぞれ構築し、大腸菌発現系により調製したところ、いずれもゲルろ過で均一なピークが確認された。がん細胞を用いた傷害試験の結果、配向性を改変した分子すべてに、従来のEx3を凌駕する効果がみられ、極めて高い比活性を示す分子も存在した。一方、ドメインの配向性と連結しているリンカー長を改変することで、tandem scFv型のEx3を作製したところ、同様に著しい活性の向上がみられた。結合活性試験では、機能との相関はみられなかったが、2抗原間の架橋能試験では、相関がみられたことから、配向性等の変換は、リンパ球とがん細胞間の架橋において、より有利な構造をもたらしたと考えられる。今後さらに、これらの機能の向上に寄与した因子を追求していく予定である。

Functionalization of small bispecific antibodies by recombination of domain order○Ryutaro ASANO, Takashi KUMAGAI, Shintaro TAKI,
Izumi KUMAGAI
(Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)**Key words** antibody, protein engineering, bispecific antibody**3P-1095 体外免疫法をベースとした高速抗体取得方法 RAntIS の開発**○山本 有希子, 西村 侑子, 小林 哲, 吉見 達成,
稲垣 貴之
(株式会社アドバンス)

抗体医薬品は特異性が高く副作用の少ない治療薬として注目されており、従来の低分子医薬品よりも効果的な治療が期待される。だがこれまでの方法では、抗体の作製において膨大なコストと長い作製期間が必要となることが問題であった。この問題を解決するため、我々は各種抗原に対する抗体を低コスト・短期間で作製できるRAntIS (Rapid Antibody Isolation System)法を開発した。動物に抗原を注射して抗体を得る従来の方法と異なり、RAntIS法はin vitroでマウスの脾臓細胞を免疫し、一本鎖抗体(scFv)を取得する方法である。これによりわずか数nmolの抗原量および約10日間という短期間でマウスscFv取得を実現した。この手法で用いている体外免疫法は、生体外での胚中心の形成と、AIDの発現を誘導する手法であることを明らかにした。また、RAntIS法で取得したscFvには体細胞変異が誘導されていることも確認された。さらに、免疫に用いる細胞を別種のものに置き換えることにも成功したので、報告する。

また、RAntIS法を用いて、ヒト由来S100A10に対する抗体、マウス由来S100A10に対する抗体を共に取得することに成功したのであわせて報告する。

Development of Rapid Antibody Isolation System based on *in vitro* immunization○Yukiko Yamamoto, Yuuko Nishimura, Satoshi Kobayashi,
Tatsunari Yoshimi, Takashi Inagaki
(ADVANCE Co., Ltd.)**Key words** Rapid antibody isolation system, single chain variable fragment**3P-1094 高速抗体取得方法 RAntIS により産生したマウス scFv のヒト化技術開発**西村 侑子, 山本 有希子, 吉見 達成, ○稲垣 貴之
(株式会社アドバンス)

抗体医薬品は特異性が高く副作用の少ない治療薬として注目されており、従来の低分子医薬品よりも効果的な治療が期待される。だがこれまでの方法では、抗体の作製において膨大なコストと長い作製期間が必要となることが問題であった。この問題を解決するため、我々は各種抗原に対する抗体を低コスト・短期間で作製できるRAntIS (Rapid Antibody Isolation System)法を開発した。動物に抗原を注射して抗体を得る従来の方法と異なり、RAntIS法はin vitroでマウスの脾臓細胞を免疫し、一本鎖抗体(scFv)を取得する方法である。これによりわずか数nmolの抗原量および約10日間という短期間でマウスscFv取得を実現した。しかしマウス由来の抗体は、そのままではヒトの体内で異物と認識され、抗原性を示す可能性がある。そのため抗原に対する特異性や親和性を維持したまま、マウス由来のアミノ酸配列をヒトのアミノ酸配列に置換して抗原性を低くする必要がある。RAntIS法で取得した抗体のヒト化技術開発により、抗原性の低い抗体医薬品を安価に短期間で製造できるようになることが期待される。そこで我々は、RAntIS法により取得したマウスscFv抗体のヒト化を行った。RAntIS法によりニワトリ卵白リゾチーム(HEL)に対するマウスscFvを取得し、このマウスscFvをもとに二量体やヒト化抗体を作製した。さらにそれぞれの抗体の親和性を、BIACORE やELISAを用いて比較したので報告する。

Development of humanized scFv based on RAntISYuko Nishimura, Yukiko Yamamoto, Tatsunari Yoshimi, ○Takashi Inagaki
(ADVANCE Co., Ltd.)**Key words** Rapid antibody isolation system, single chain variable fragment, humanized scFv**3P-1096 変異能力を有するニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いたマウスモノクローナル抗体の親和性成熟**○金山 直樹, 小島 聡史, 藤井 忍, 北村 幸一, 井上 知恵,
岡山 展久, 松田 修一, 鴨下 佳代子, 藤堂 景史,
池田 美香, 曲 正樹, 大森 齊
(岡山大院・自然・生物機能)

モノクローナル抗体を改変して親和性成熟させる技術は、有用な抗体を作製する上で重要である。我々は、抗体遺伝子への変異能力を自在にスイッチできるように改変したニワトリB細胞株DT40-SWを用いたin vitro抗体作製システムを構築してきた。今回、DT40-SWの抗体可変部遺伝子を任意の抗体由来の可変部遺伝子に置き換え、変異導入によって親和性成熟させる方法を構築した。ハブテン4-hydroxy-3-nitrophenylacel (NP)に対するマウスモノクローナル抗体17.2.25をモデルとして、このマウス抗体の可変部遺伝子のVH、VL遺伝子をPCRで増幅し、それぞれをDT40のVHおよびVL遺伝子と置換するためのベクターに挿入した。各置換ベクターを順次、DT40-SWに導入した細胞を作製したところ、マウス由来抗体可変部とニワトリ抗体定常部とのキメラ抗体を細胞表面抗体および分泌抗体として発現した。この抗体は、NP化抗原に対して反応性を示したことから、導入した抗体可変部が本来の特異性を保持していることが示唆された。さらに、抗NP抗体産生細胞株の変異機能をONにして培養を続けたところ、重鎖および軽鎖ともに組み込んだ可変部遺伝子に変異が導入され、この変異ライブラリーからNPに対する親和性の向上したクローンを単離することに成功した。

Affinity maturation of a mouse monoclonal antibody in the hypermutating chicken B cell line DT40-SW○Naoki KANAYAMA, Satoshi KOJIMA, Shinobu FUJII,
Koichi KITAMURA, Kazue INOUE, Nobuhisa OKAYAMA,
Shuichi MATSUDA, Kayoko KAMOSHITA, Kagefumi TODO,
Mika IKEDA, Masaki MAGARI, Hitoshi OHMORI
(Dept. of Biosci. Biotech., Okayama Univ.)**Key words** antibody, affinity maturation, DT40 cells, somatic hypermutation