

学位論文の要旨

氏名

Md. Abdur Rafique

学位論文題目

Fab抗体精製システム構築のための高速配列解析とアルパカVHHファージライブラリを使った単ドメイン抗体の機能的デザインに関する研究

モノクローナル抗体による抗体医薬の分野において、Fab抗体の重要性は、完全抗体と比較した際のいくつかの優位性の観点から、日毎に高まりつつある。しかし、Fab抗体の利用は、Fab抗体の精製方法が確立していないために、限定されているのが実情である。本研究では、免疫したアルパカから構築したVHHファージライブラリを用いて、バイオパンニングと次世代シーケンサーを用いた高速配列解析を組み合わせながら、Fabに特異的な高親和性かつアフィニティリガンドとしての耐久性を有する抗体を効率的にデザインする方法を確立した。この方法により、最終的に得られたVHH抗体は、Fab精製のためのアフィニティリガンドとして、十分に機能することが示された。

第1章は、通常の抗体と重鎖抗体由来の可変ドメイン (VHH) に関する一般的な紹介とともに、それらの研究や治療薬への応用について述べるとともに、目的とするVHH抗体を単離する際に、通常のスクリーニング効率よりも優れた、次世代シーケンサー解析の利点を議論した。

第2章では、Fab抗体を免疫したアルパカから、VHHファージライブラリを構築し、バイオパンニングと通常のスクリーニングによっていくつかのFab特異的なVHHのクローンの単離を行ったが、機能的に十分なVHHを単離することができなかった。

第3章では、目的の機能を有するVHHクローンを単離するために、次世代シーケンサーを用いた高速配列解析の手法が導入された。結果として、多量のNGSの解析データから複数の高親和性VHH抗体を得ることに成功したが、多くはアルカリ耐性や解離特性に問題があり、実際には精製用の親和性リガンドとしては使用できないクローンであった。

第4章では、第3章で得られたVHHのうち、低親和性であるものの耐久性の高いクローンを見出し、その親和性の改良を目的に、エラープロンPCRを使ったランダムライブラリを構築した。結果として、このクローンの中から、親和性の向上に寄与するアミノ酸変異を見出し、それを組み合わせることで、元のVHHクローンに比べ、10倍以上の親和性を有するVHHのデザインに成功した。

第5章では、最終的にデザインしたVHHを固定化したアフィニティカラムを作製し、そのFab精製におけるパフォーマンスの評価を行った。最終的なVHH結合カラムは、2種類のFab抗体を吸着かつ溶離することを可能にし、カラム再生において使用されるアルカリpHに対する高い耐久性を示した。このことは、デザインしたVHHが、Fab精製に適したアフィニティガンドとして高い有用性を持つことを示している。

第6章は、本研究の結果をまとめるとともに、我々のVHHを使ったFab抗体の精製方法の有用性について、他の方法との比較を交えながら産業的な観点から議論し、本論文を総括した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Studies on design of single domain antibodies by Alpaca VHH phage library and high throughput sequencing to construct Fab antibody purification system

Name: Md. Abdur Rafique

In the field of monoclonal antibody therapeutics, the popularity of Fab antibody is increasing day by day due to several advantages compared with full-length immunoglobulin. However, the use of Fab antibody drugs is not still major due to that Fab purification system is not well established yet. In this study, we approached to design high affinity VHH specific to Fab, using VHH phage display library of immunized Alpaca through biopanning followed by high throughput sequencing analysis on next generation sequencer (NGS). Finally designed VHH was found to function well as an affinity ligand for the purification system for Fab, showing the characters of the high affinity and alkaline resistance.

Chapter 1, described the general introduction about the conventional antibody and the variable domain of heavy chain antibody (VHH), and also their application in research and therapeutics. Furthermore, the advantages in use of next generation sequencing to search desirable VHH antibody beyond the efficiency of the conventional screening were described.

Chapter 2, described the construction of VHH phage library from Fab-immunized Alpaca and the isolation of Fab-specific VHH through biopanning followed by the conventional screening.

In Chapter 3, the high-throughput sequencing technology on NGS was employed to find the desirable VHHs. Several useful candidates identified from the analysis of NGS data showed the suitable binding specificity but low affinity.

In Chapter 4, the affinity maturation of VHH obtained in Chapter 3 was done using random library constructed by error-prone PCR to enhance the binding affinity of VHH clone. Finally, we succeeded in the design of VHH with ten folds higher binding affinity towards Fab, as compared with the parent VHH.

Chapter 5, we prepared VHH-conjugated affinity column and evaluated its usefulness in Fab purification. Finally designed VHH-conjugated column made it possible to binds two kinds of Fab completely and to eluate them, and also showed the high resistance against alkaline pH used in regeneration of the column, indicating the VHH affinity ligands suitable for the purification of Fab was successfully designed.

In Chapter 6, the results of this study were summarized and the usefulness of our purification system was discussed from a viewpoint of industrial applications, comparing with other methods.