



国立大学法人

東京農工大学

Tokyo University of Agriculture and Technology

# 一本鎖抗体の産業価値を高める、その特異的な検出・修飾・精製を可能とする技術

大学院工学研究院

生命機能科学部門

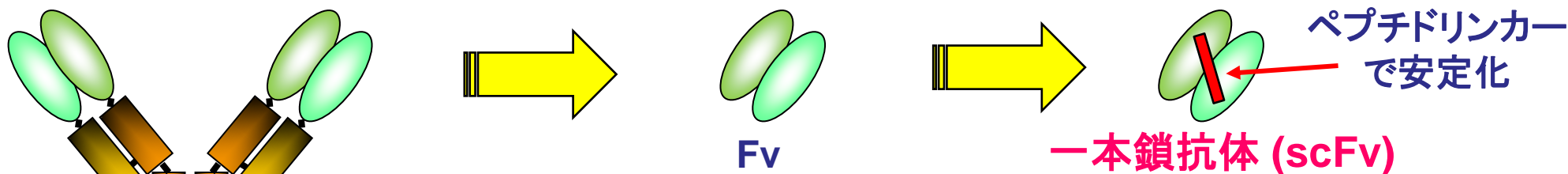
教授 浅野 竜太郎

2023年 9月 7日

# 本技術の概要

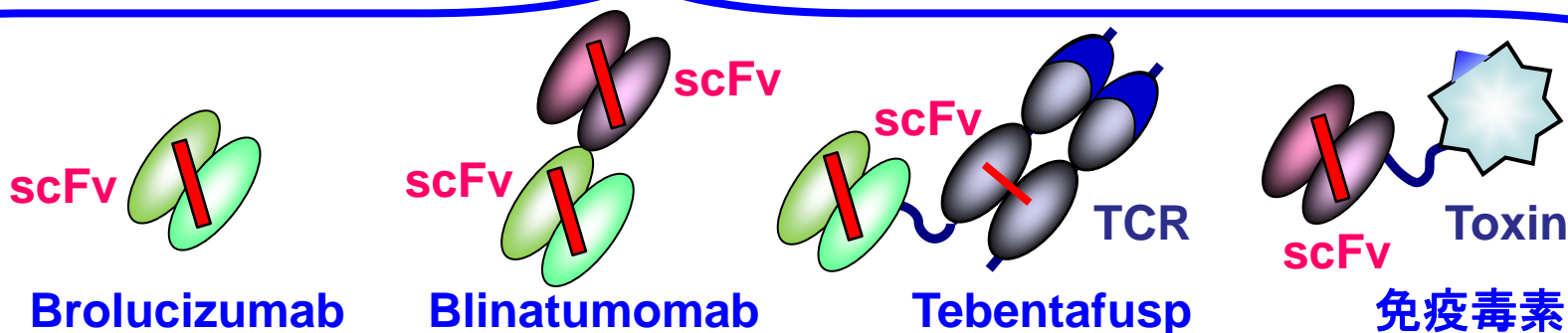
- 一本鎖抗体 (scFv) に特異的に結合する核酸アプタマーを開発。
- scFvは、医薬品やセンシング素子として幅広く利用されているが、scFvを特異的に検出する汎用技術がないことが実用化の妨げ。
- 核酸アプタマーは修飾が容易であるため、scFvを特異的に修飾、あるいは検出できるツールを提供。
- 汎用されているペプチドリンカーである (GGGGS) x 3を有するscFvの特異的な化学修飾や検出が可能。

# 発明の背景と問題点



- 微生物で容易に調製可能
- 汎用的な次世代抗体モダリティ
- 低分子ならではの薬効に期待
- センサ素子としても利用
- 人工抗体の構成要素として利用

- ×均一な修飾法が未確立
- ×短い血中半減期
- ×薬物動態解析等が困難
- ×精製用人工タグの免疫原性
- ×巻き戻しによる調製が低効率



scFvは、様々な利点を有し、既に医薬品としても認可されているが、特異的な修飾や検出が容易でないことが問題

# 抗scFv核酸アプタマーの応用例



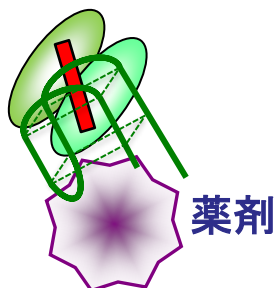
## 抗scFv核酸アプタマー

- 化学合成と化学修飾が容易
- 内在性の抗体と区別が可能
- 広範囲のscFvに対して適用



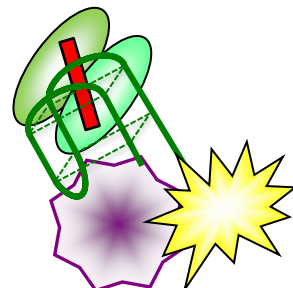
蛍光物質

イメージング能の付与

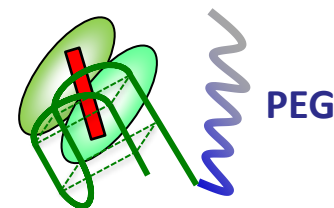


薬剤

治療効果の付与

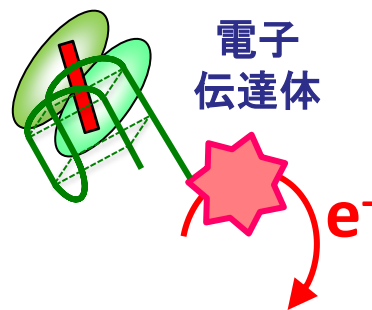


Theranostics分子



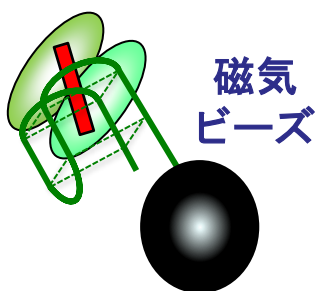
PEG

薬物動態の制御



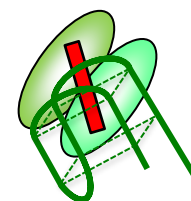
電子伝達体

電気化学センサ (モニタリング) 素子

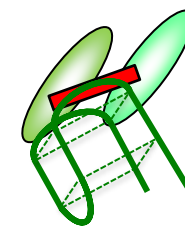


磁気ビーズ

精製リガンド



リンカーの抗原性を低減



巻き戻し添加剤

抗scFv核酸アプタマーは、scFvの医療応用を大いに促進し得る。

# scFvの検出に際しての従来技術に対する優位性

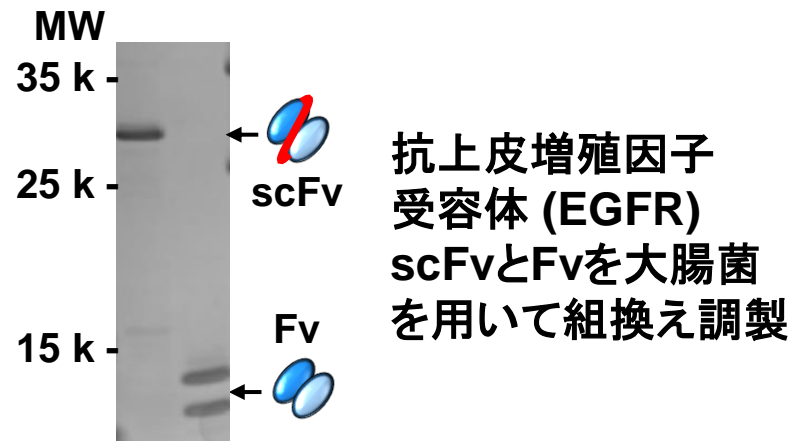
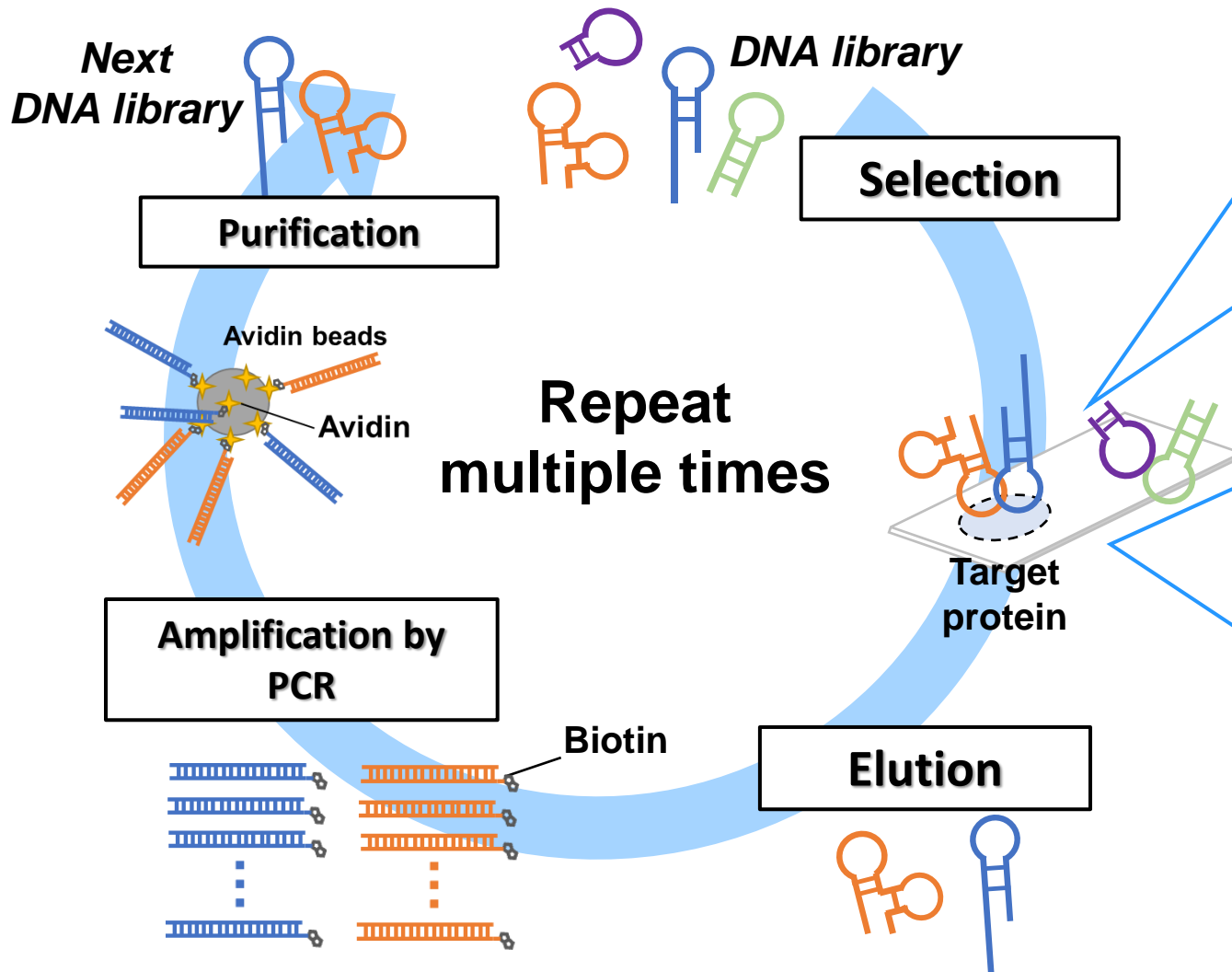
- 抗体のFc領域に結合する核酸アプタマーは生体内に存在する、内在性の抗体にも結合してしまう。
- 抗イディオタイプ抗体は特定の抗体医薬しか検出できない。
- 抗scFv抗体は、均一な化学修飾等がscFvと同様に困難。
- scFvは生体内に存在しないため、その特異的な化学修飾や検出を可能とする抗scFv核酸アプタマーは、scFvの医薬化を促進し得る。

# 本技術と従来技術との比較表

	本技術	競合技術1	競合技術2	競合技術3
構成	抗scFv 核酸アプタマー	抗Fc 核酸アプタマー	抗イディオタイプ 核酸アプタマー	抗scFv抗体
特徴 ・適用	広範囲のscFvの検出、および化学修飾等による機能付与が可能。内在性の抗体と区別可能。scFvの結合と競合しない。	IgG等のFcを有する抗体の検出、および化学修飾等による機能付与が可能。内在性の抗体と区別不可。	特定の抗体の検出、および化学修飾等による機能付与が可能。抗体の結合と競合する。	広範囲のscFvの検出が可能。化学修飾等による機能付与は困難。
その他		報告は多数 センサ応用も多数 Int J Mol Sci. 2020; 21(16):5748 (Review)	数件報告例	数件報告例

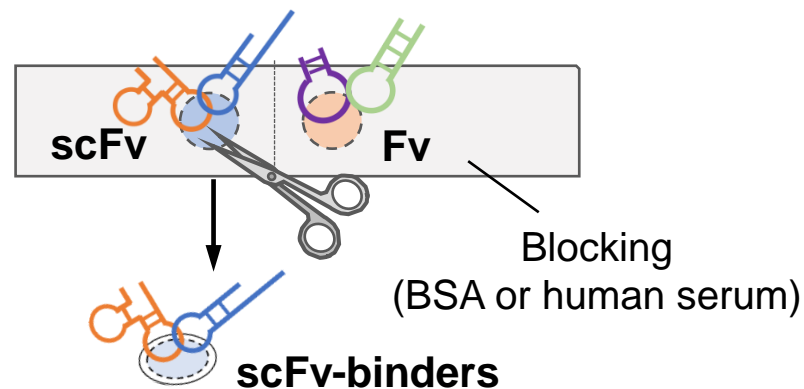
# 競合選択による抗scFv核酸アプタマーの取得

SELEX (Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment)



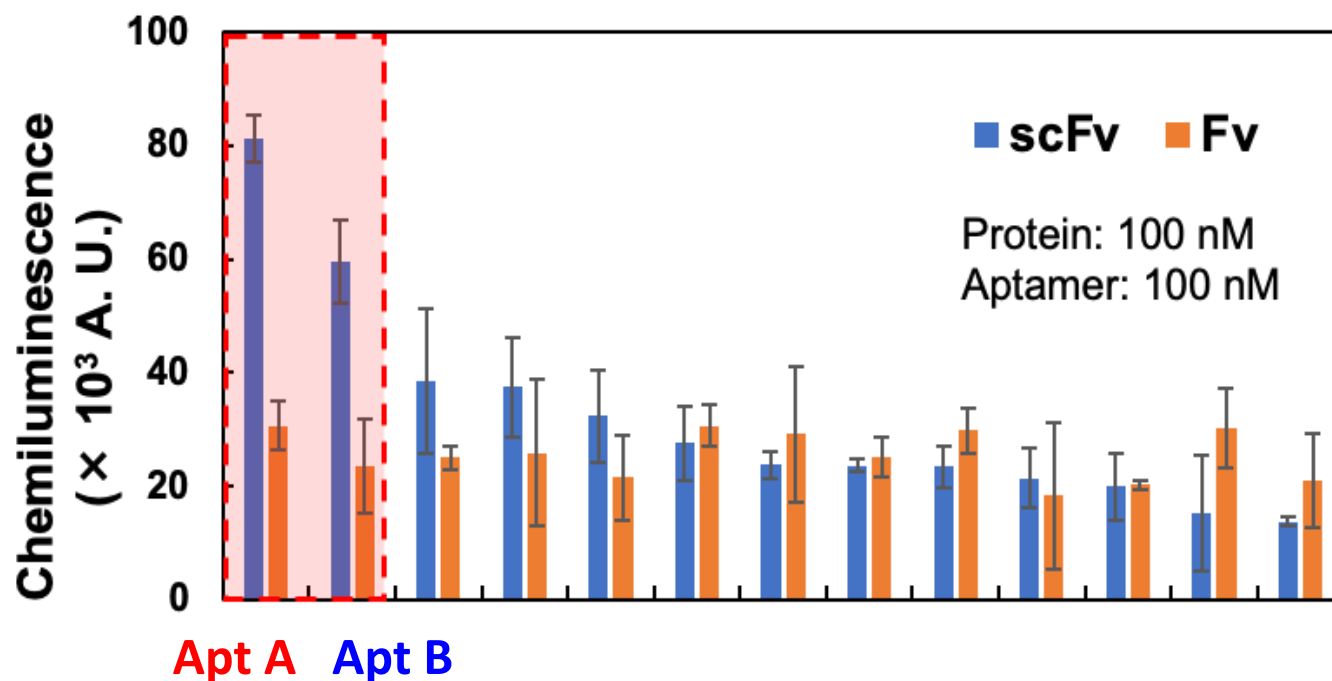
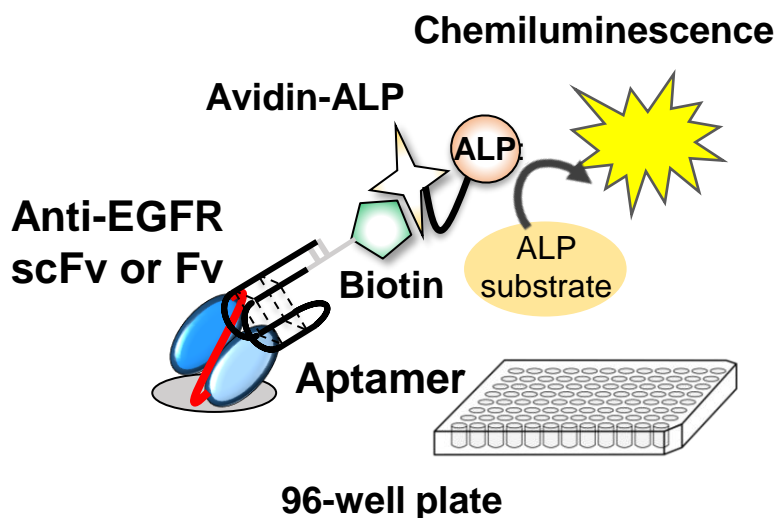
## Competitive selection

研究グループ独自技術  
(特許第4706019号)



# ELONAによるスクリーニング

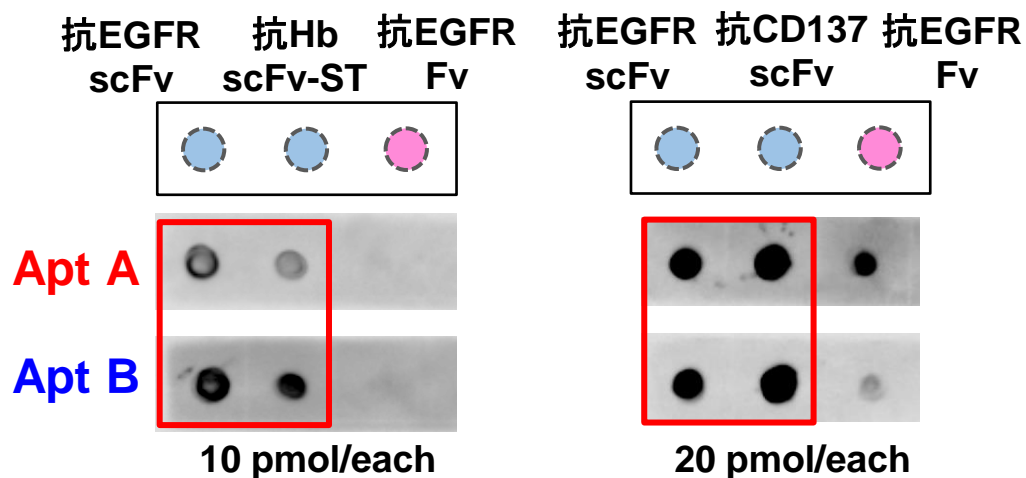
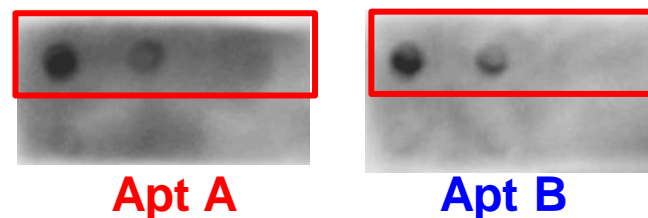
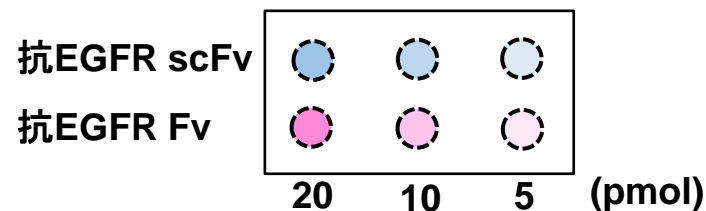
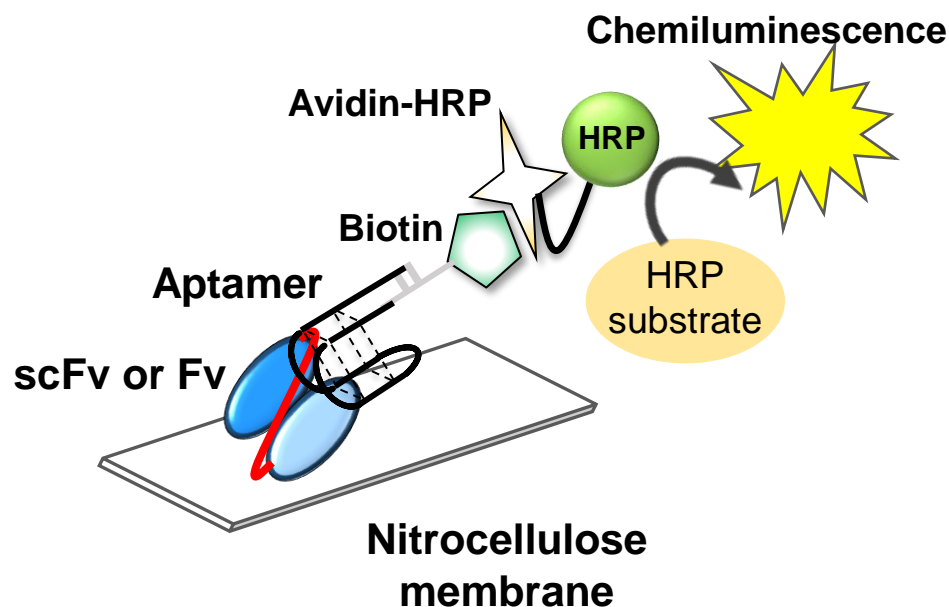
## Enzyme-linked oligonucleotide assay (ELONA)



2種のアプタマー (Apt A, Apt B) にscFv特異的な結合を確認

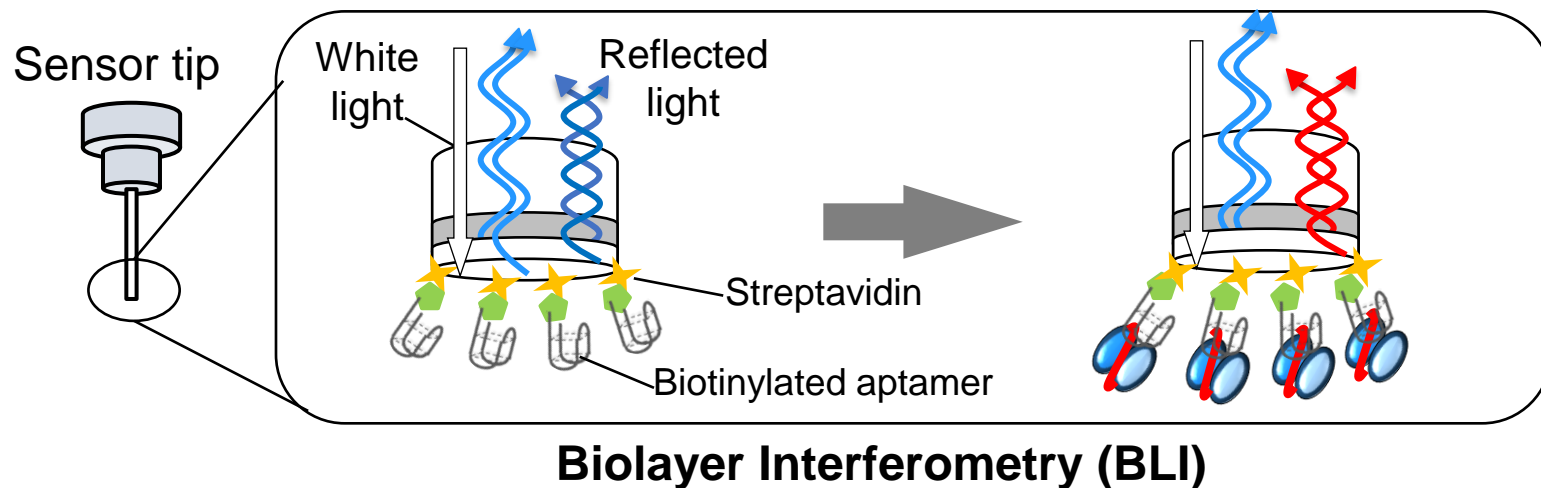


# ドットプロットによる結合評価

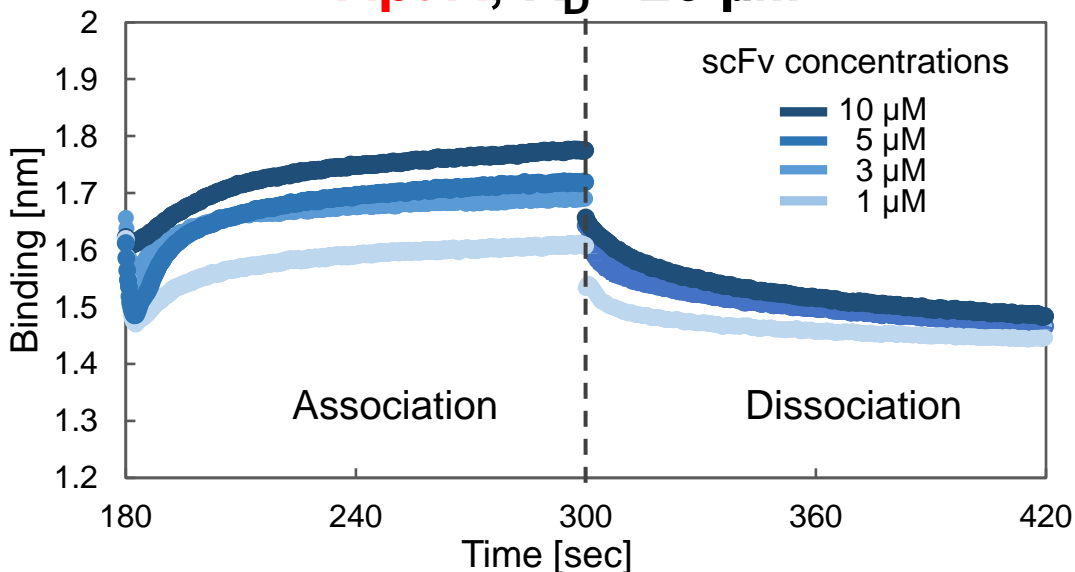


scFv特異的な結合と種々のscFvへの結合を確認

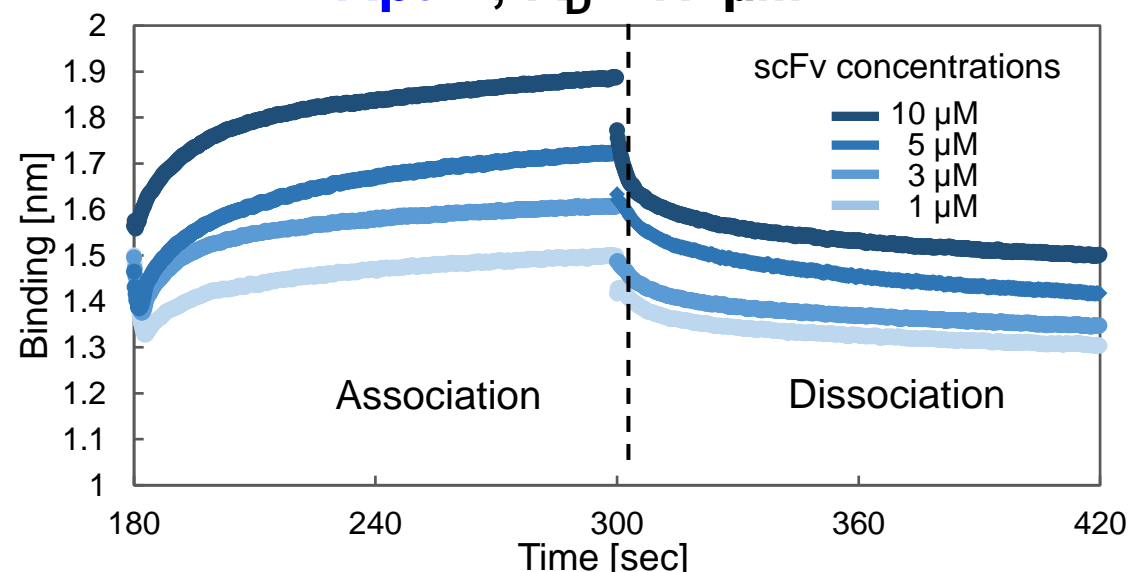
# BLIによる解離定数の算出



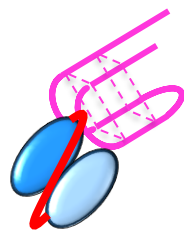
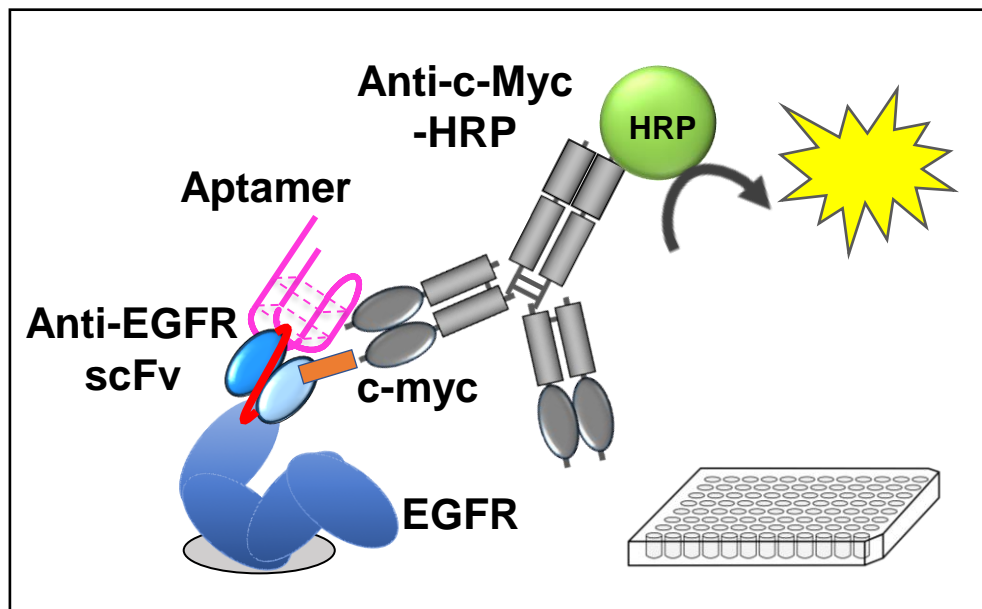
**Apt A,  $K_D = 26 \mu\text{M}$**



**Apt B,  $K_D = 17 \mu\text{M}$**



# 抗scFv核酸アプタマーの結合によるscFvへの影響

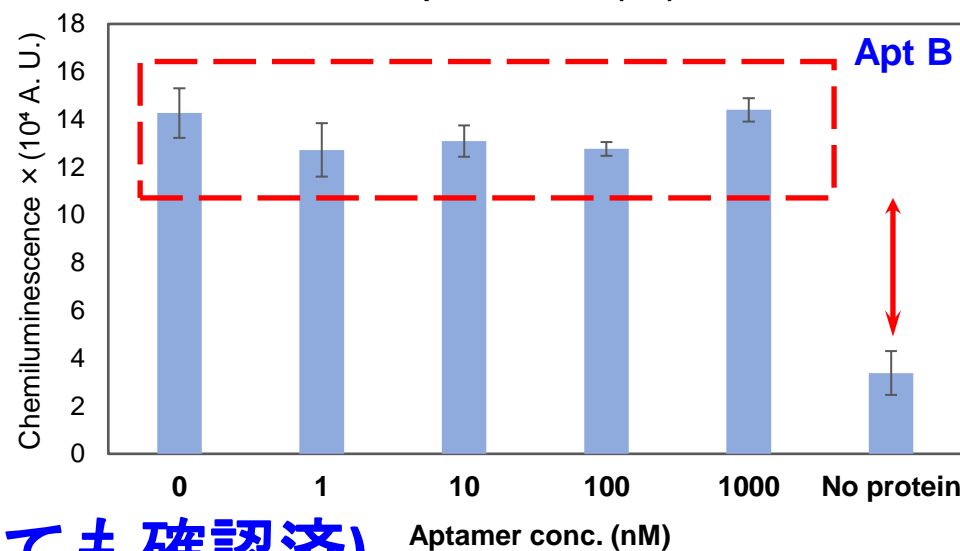
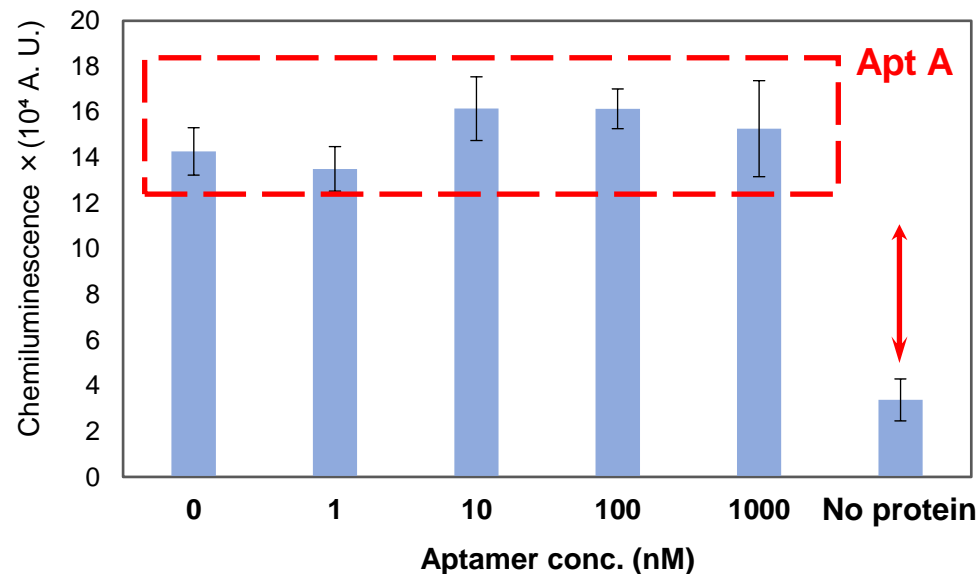


## scFv-aptamer complex

scFv: 100 nM

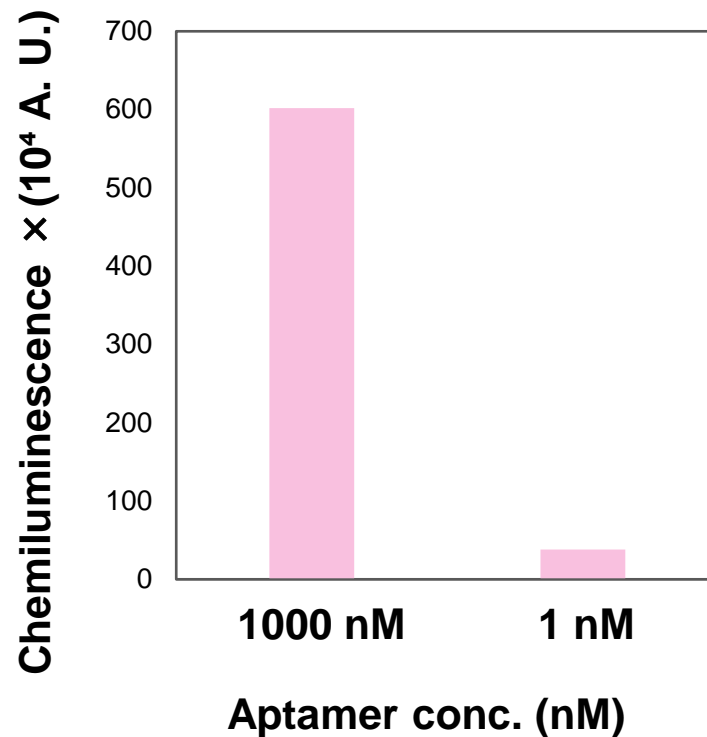
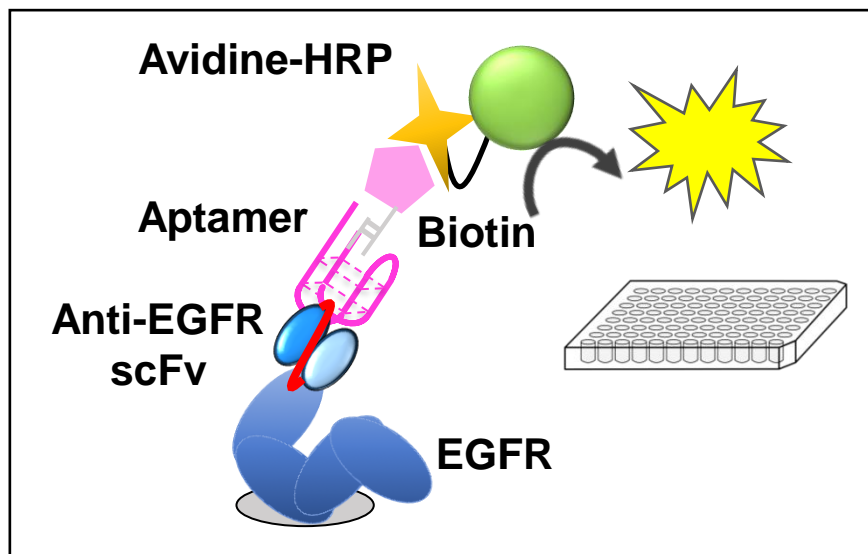
Aptamer: 0 nM ~ 1000 nM

(Shaking at 600 rpm, 1 h, r.t.)



抗scFv核酸アプタマーの結合は  
scFvの結合を妨げない (他のscFvに対しても確認済)

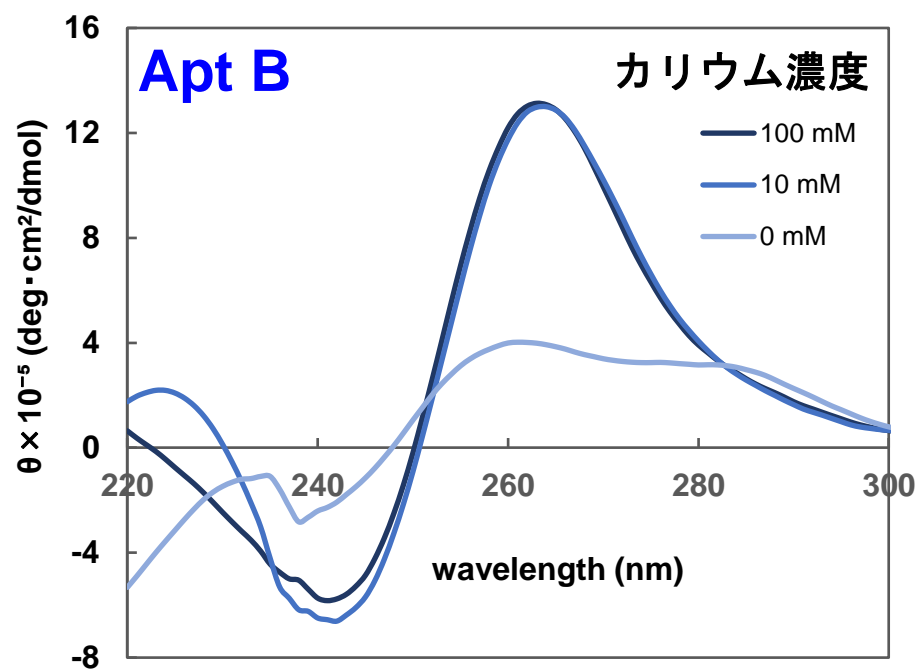
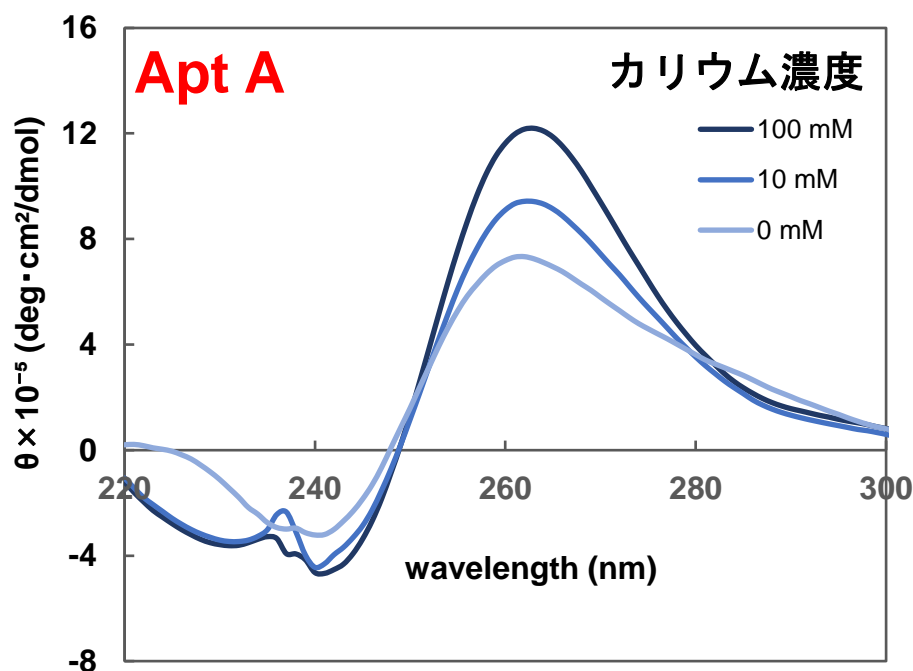
# 抗scFv核酸アプタマーの結合によるscFvへの影響



アプタマー濃度に依存したscFvの検出を確認

# 抗scFv核酸アプタマーの二次構造評価

## CDスペクトル測定 (pH 7.4)



## 平行型G4構造を示唆

# scFvの電気化学計測

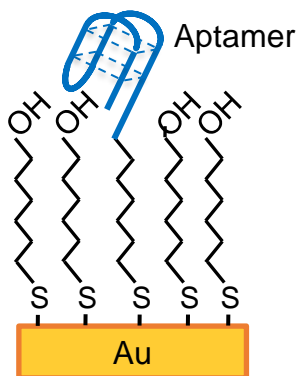
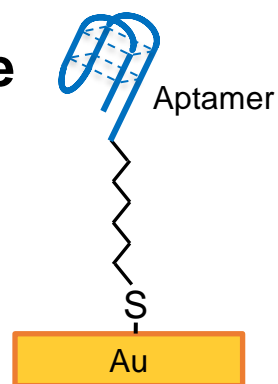
Cleaned gold disc electrode

1  $\mu$ M  
Thiol-modified aptamer

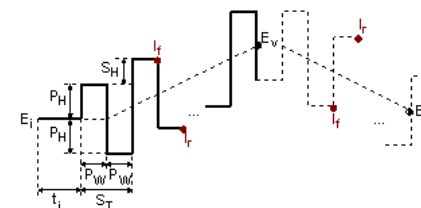
Aptamer-modified  
gold disc electrode

10 mM  
6-mercapto hexanol

Blocked aptamer-modified  
gold disc electrode



## Square wave voltammetry (SWV)



**Assay solution**

100 mM PPB+NaCl  
(pH7.4)

**10 mM Ferricyanide**

**Electrodes**

WE: Gold disc

RE: Ag/AgCl

CE: Pt wire

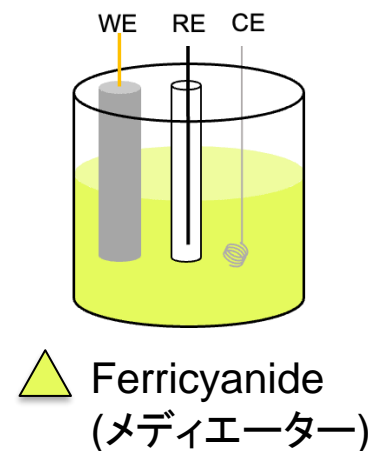
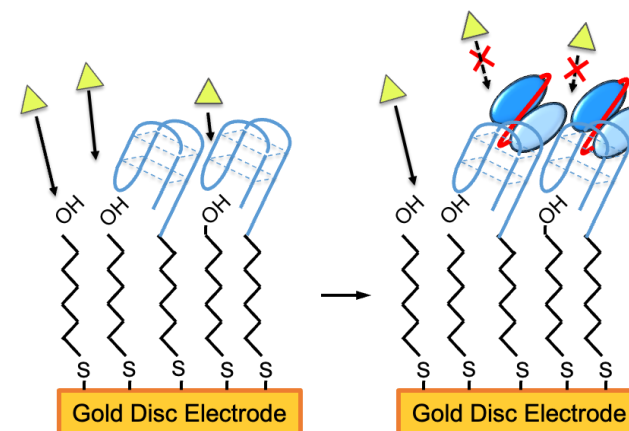
**Scan**

-2.5 to 2.5 V vs Ag/AgCl

$P_H$ : 150 mV

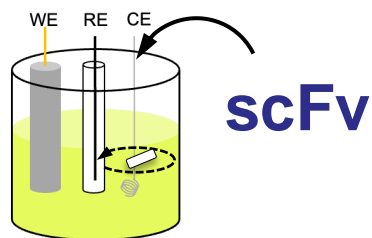
$P_W$ : 200 ms (= 20 Hz)

$S_H$ : 10 mV



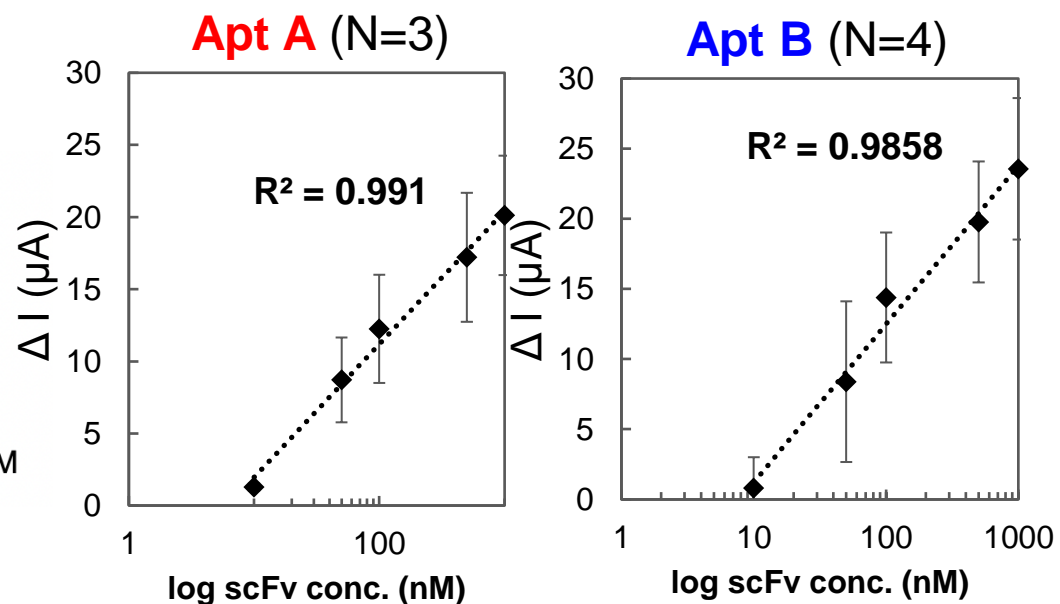
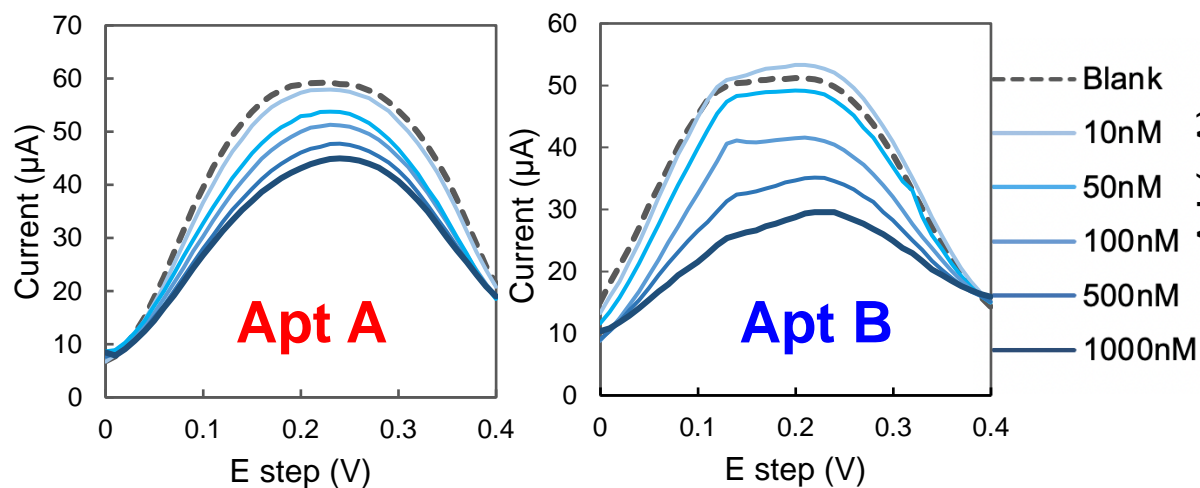
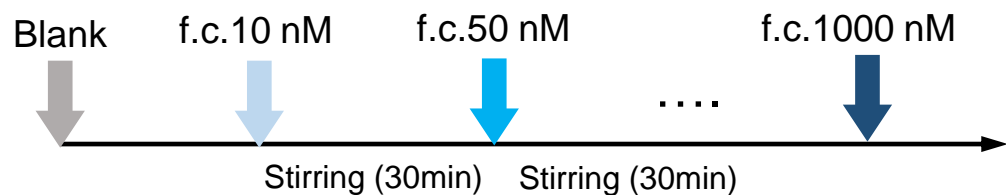
scFvへの結合がもたらすメディエーターの  
電極へのアクセスの影響を評価

# scFvの電気化学計測



$$\Delta I = I_0 - I$$

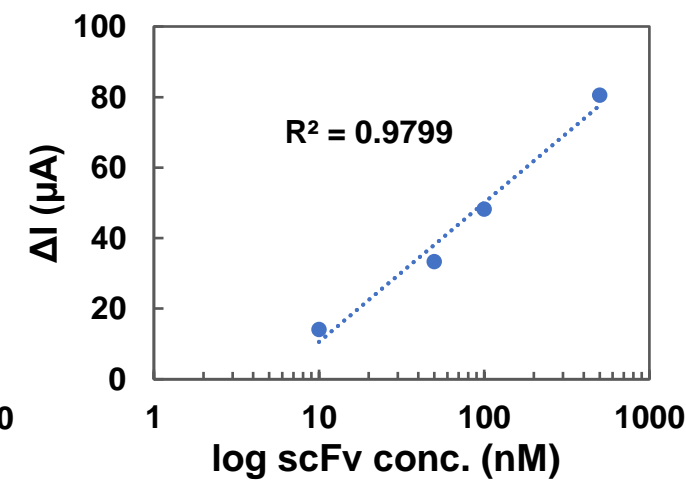
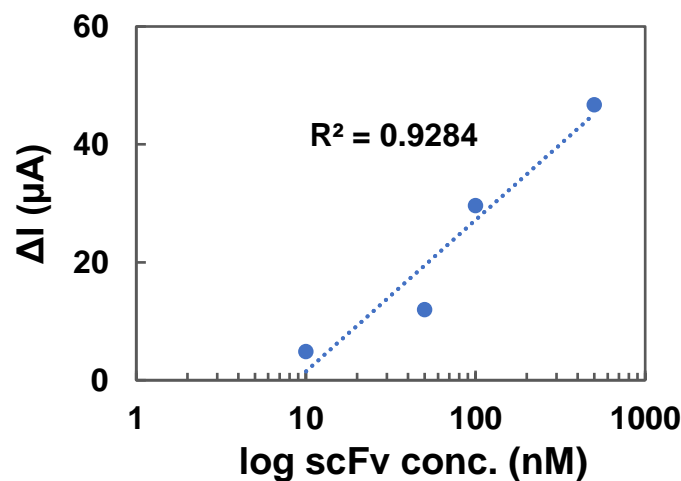
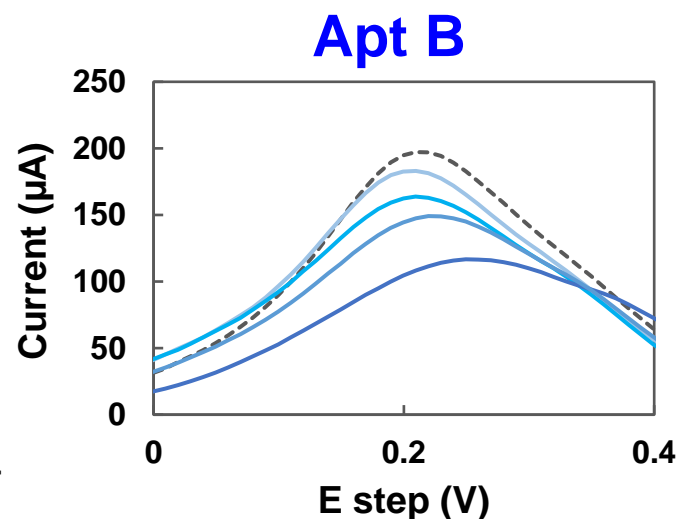
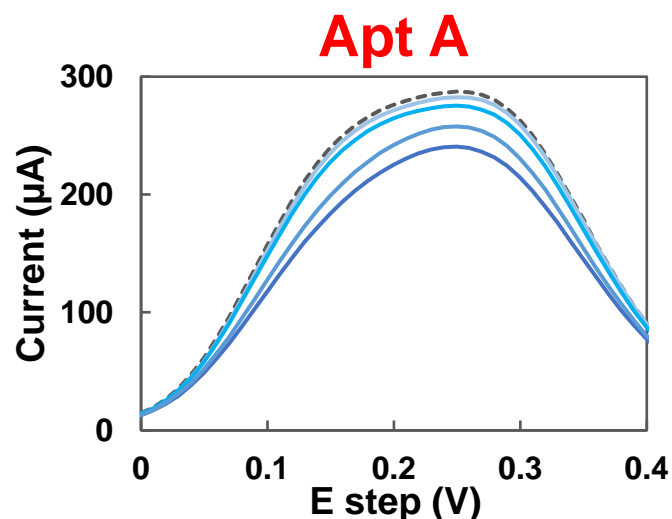
$I_0$  : Peak current at blank  
 $I$  : Peak current at each scFv conc.



scFv濃度依存的なピーク電流変化を観測

# 培地中でのscFvの測定

LB培地を  
10倍希釈し  
scFvを添加

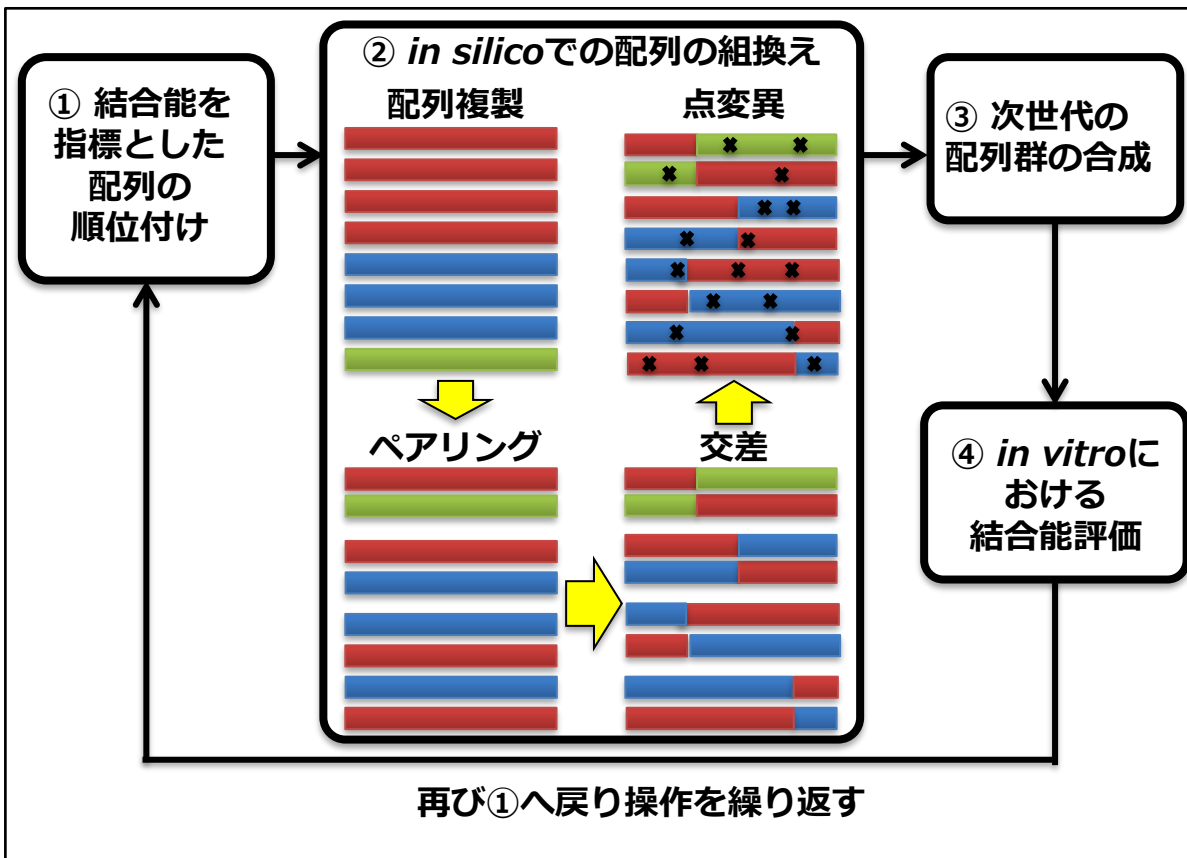


培地を10倍希釈することで測定可能

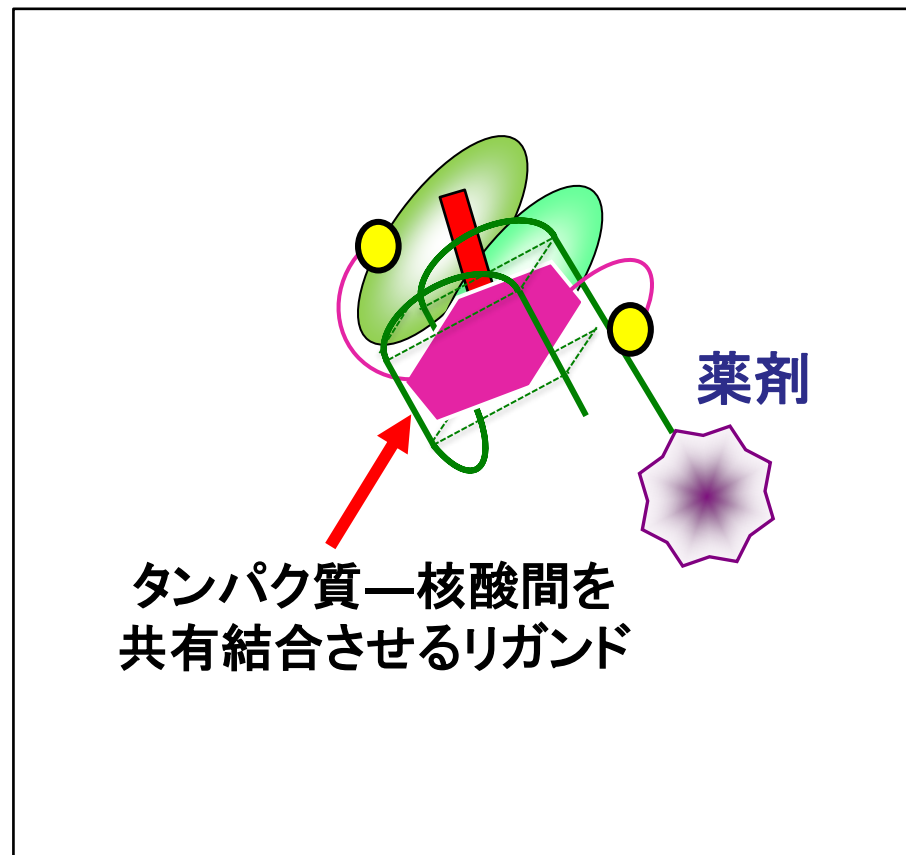


# 実用化に向けた技術的課題と今後の展開

## 医薬品応用に向けた高親和性化



*in silico* maturation法  
による親和性の向上



scFvと核酸アプタマー間の  
化学架橋剤の利用検討

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：一本鎖抗体結合アプタマー
- 出願番号：出願済み、未公開
- 出願人：東京農工大学
- 発明者：浅野 竜太郎、池袋 一典

# お問い合わせ先

---

東京農工大学  
先端産学連携研究推進センター

Tel 042-388-7550

Fax 042-388-7553

e-mail [suishin@ml.tuat.ac.jp](mailto:suishin@ml.tuat.ac.jp)



MORE  
SENSE

Tokyo University of  
Agriculture and Technology

