

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 新しい糖鎖創薬の標的・HEG1に対する抗体医薬の開発

(英語) Development of antibody drug against a new target for glycan-related drug, HEG1

研究開発実施期間: 平成30年11月15日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 辻 祥太郎

(英語) Tsuji, Shoutaro

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター・臨床研究所・主任研究員

(英語) Kanagawa Cancer Center, Research Institute, Project Leader

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

悪性中皮腫はアスベストの曝露が主要原因で発生し、有効な治療法がない悪性腫瘍として大きな社会問題となっている。本研究では、我々の開発した特異性の高い抗中皮腫抗体 SKM9-2 を用いて次世代抗体医薬である二重特異性抗体の作出と薬効検証を行い、殺中皮腫効果の高い極めて有望な医薬品シーズであることを確認した。また、抗体のヒト化、製剤時安定化の改変、医薬品生産細胞株で使用するための新たな発現ベクターの開発、ヒト化 SKM9-2 のセルバンク製造など、医薬品実用化に向けて必要となる目標を達成した。さらに、中皮腫細胞上 HEG1 の解析、中皮腫がん組織における SKM9-2 の糖鎖依存性の解析、結晶構造解析による SKM9-2 の糖ペプチド認識機構の解明、SKM9-2 とは異なる部位を認識する糖鎖依存性抗 HEG1 抗体の作製、細胞上に結合した抗 HEG1 抗体の取り込みの確認を行い、研究開発計画当初の目標である HEG1 の糖鎖創薬標的としての評価を完了した。本解析から HEG1 は中皮腫に対する糖鎖創薬標的として適していると判断した。

1) 二重特異性抗体の作製と評価

SKM9-2 を用いた二重特異性抗体を作製するにあたり抗体形状の検討を行った。タンデム scFv をはじめとする複数の形状の二重特異性抗体を検討し、分子構造が安定で産生量が多く、活性も強い Fab-scFv 型を二重特異性抗体として選抜した。

精製された二重特異性抗体について、SKM9-2 エピトープを含むリコンビナント蛋白質を用いた Biacore 解析、および Jurkat 細胞を用いた FACS 解析により反応性を確認した後、ヒト末梢血単核球を用いて中皮腫細胞傷害活性の確認を行った。その結果、二重特異性抗体治療薬として上市されている blinatumomab と同程度の強力な殺細胞活性を有することが明らかとなった。HEG1 を発現していない A549 に対して、細胞傷害は確認されなかった。これにより *in vitro* における薬効の POC を取得した。

In vivo での薬効評価のため、中皮腫細胞株を超免疫不全マウスの皮下に移植し、ヒト末梢血単核球と二重特異性抗体を腹腔内投与した。二重特異性抗体を投与されたマウスでは腫瘍の増大が有意に抑制された。さらに、ルシフェラーゼを安定発現する中皮腫細胞株を超免疫不全マウスの腹腔内に移植し、ヒト末梢血単核球と二重特異性抗体を腹腔内投与した。ルシフェリンの発光にて腫瘍細胞の検出を行うと、二重特異性抗体を投与されたマウスでは腫瘍が完全に消失していた。従って、二重特異性抗体が *in vivo* でも強力な中皮腫細胞傷害活性を有することが示された。これにより *in vivo* での薬効の POC を取得し、本研究課題の主要な目標を達成した。

2) 医薬品化に関する最適化検討

通常よりも高産生クローンが多数分離可能な新たな発現ベクターを開発し、本課題で開発した二重特異性抗体を医薬品産生用の CHO 細胞に遺伝子導入して、二重特異性抗体を安定発現する高産生クローンの取得に成功した。これと並行して、抗体の結晶構造解析、物理化学的、生物学・免疫化学的安定性の改良に向けた SKM9-2 抗体のヒト化、CDR 領域の安定性向上の改変、シグナルペプチドの検討など二重特異性抗体の最適化検討を行った。

SKM9-2 の糖ペプチド認識機構について明らかにするため、合成糖ペプチドエピトープを用いて Biacore により解析を行った。抗体の認識には二本のシアル化された T 抗原が必要であった。次に二つのシアル化 T 抗原をもつエピトープペプチドと SKM9-2 の Fab を用いて結晶解析を行った。最終的に 1.9Å の分解能のデータが得られ、SKM9-2 が HEG1 ペプチドと二カ所のシアル化 O 型糖鎖を同時に認識するユニークな糖ペプチド認識抗体であることが明らかとなった。

SKM9-2 のヒト化については、種々のヒト化抗体のフレームワーク領域の配列を参考に SKM9-2 の H 鎖および L 鎖の CDR 配列を含むヒト化 H 鎖および L 鎖の候補配列を作製し、反応性の低下しない組み合わせを選抜し、ヒト化抗体とした。製造工程や保存中の脱アミド化やアスパラギン酸異性化を防ぐため、反応性に影響が出ない範囲で CDR 配列のアミノ酸置換を行い、安定化改変体とした。さらに、ヒト抗体遺伝子のシグナルペプチドの代表的な配列をシグナルペプチドとして検討し、発現量が最も多くなる配列を医薬品用のヒト化 SKM9-2 配列と決定した。なおこのヒト化 SKM9-2 配列は定常領域を IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 に変更した場合でも極端に産生量、活性が低下することはなく、可変領域として安定で、必要に応じて各サブクラスを選択可能であると考えられた。

抗 CD3 抗体側のヒト化は Jurkat 細胞への結合を FACS で測定することにより行った。計 40 種類の配列から scFv 体に適したものを選抜し、ヒト化 SKM9-2 の Fab と連結して、ヒト-ヒト化二重特異性抗体とした。この抗体の精製法を構築した後、*in vitro* での活性の検証を行って製剤化の際の生産候補配列を決定した。これにより、研究開発計画当初の目標を超えた最終目標（製剤化の際の生産候補配列を決定）を達成した。

ヒト-ヒト化二重特異性抗体の開発と並行してヒト化 SKM9-2 の IgG 体についての検討も進めた。定常領域をヒト IgG1, IgG2, IgG3, IgG4、または IgG4PE 体（医薬品用 IgG4 変異体）とした抗体を一過的に発現させ、精製した。Biacore を用いてそれぞれの抗体の親和性を測定し中皮腫細胞株への結合を FACS にて確認した。いずれのサブクラスでも活性に大きな影響はなく、どれでも医薬品応用が可能であった。キメラ SKM9-2 には顕著な ADCC を見いだせなかったため（中皮腫細胞がエフェクター細胞に対し耐性が高いた

めと推測される)、ヒト化 SKM9-2 の IgG 体を抗体治療薬として用いるには、ADC のようなコンジュゲート抗体化を行う必要がある。副作用低減のためにエフェクター活性は不要と考え、医薬品候補のサブタイプとしては IgG4PE 体を選択することとした。ヒト化 SKM9-2 の IgG 体については、現在、医薬品化のためにセルバンク化を進めており、今後、企業導出が予定されている。

3) がん抗原としての HEG1 の解析

SKM9-2 の中皮腫組織に対する糖鎖依存性を解析するため、中皮腫組織病理切片を neuraminidase A で処理し SKM9-2 で免疫組織染色を行ったところ、SKM9-2 の結合が完全に消失し SKM9-2 の中皮腫細胞に対する結合がシアル化糖鎖修飾依存的であることが明らかとなった。

糖鎖非依存的 HEG1 抗体と SKM9-2 を用いて、中皮腫組織切片と市販のヒト組織マイクロアレイの免疫染色を行った。中皮腫組織では SKM9-2、W10B9 とともに染色が認められ、SKM9-2 のほうが濃く検出される傾向にあった。染色の分布には両者に差は認められなかった。ヒトの主要な臓器では、SKM9-2 はこれまでの報告どおり一部の毛細血管を除いて主要組織で陰性であった。W10B9 も多くの組織で陰性であったが、一部の組織で陽性となり、SKM9-2 と染色像に差が見られた。以上の結果から、多くの健常組織には基本的に HEG1 は発現していないこと、中皮腫以外で HEG1 が発現していてもエピトープ内の糖鎖修飾を持たないために SKM9-2 と反応しないことが示唆された。

中皮腫細胞膜上の HEG1 の分子数とターンオーバー時間は一般的な膜タンパク質とほぼ同等であり、特定の切断部位で選択的に切り出されて shedding される可能性は少ないと考えられた。SKM9-2 および他の抗 HEG1 抗体は細胞表面に結合後、細胞内に取り込まれエンドソームに移行することが示唆された。また、表面分子数と細胞内への集積性から、HEG1 は ADC や放射標識抗体のようなコンジュゲート抗体薬の標的にもなりうることが示された。

近位依存性ビオチン標識法を用いて HEG1 と相互作用する細胞内分子を同定した。この解析から HEG1 の生理機能に関して重要な知見が得られた。

以上により、目標としていた HEG1 体内動態の解析、抗 HEG1 抗体の抗体医薬としての性能の検証も完了し、マイルストーンを達成した。また、新たに作製した抗 HEG1 モノクローナル抗体のなかに、脱糖鎖処理により HEG1 に対する反応性が消失するクローンが 1 つ見いだされた。このクローンは HEG1 に対する親和性が高く SKM9-2 とエピトープが異なる。そのため SKM9-2 と二重特異性抗体化することで、HEG1 分子間の架橋能を有し抗体の細胞内在化能を上げた抗体として医療応用できる可能性が考えられた。今後、コンジュゲート抗体医薬品への応用を検討している。

本研究開発により、ヒト化 SKM9-2 (IgG4PE 体) とヒト-ヒト化二重特異性抗体、二つの中皮腫治療薬候補の開発に成功した。ヒト化 SKM9-2 についてはコンジュゲート抗体化により中皮腫に対する抗体医薬の実用化が見込める。すでに実用化に向けてヒト化 SKM9-2 のセルバンク構築を進めており、医薬品企業との共同研究にて中皮腫に対する抗体医薬品として開発を進める。また、ヒト-ヒト化二重特異性抗も生産候補配列を決定し、今後、医薬品産生用 CHO を用いた高産生細胞株の樹立を予定している。薬効薬理試験、安全性の検証を行い、実用化に向けて非臨床ステージの開発を進める予定である。

In this study, we investigated modality of bispecific antibody including an anti-mesothelioma antibody SKM9-2. We examined several forms of bispecific antibodies containing tandem scFv, and selected Fab-scFv type, which has a stable molecular structure, high production, and strong activity, as the bispecific antibody. The purified bispecific antibody was checked the binding activity to SKM9-

2 epitope by surface plasmon resonance and the T cell binding activity by FACS, and then analyzed the T cell dependent cellular cytotoxicity against mesothelioma cells. We confirmed that the bispecific antibody has a cytotoxic activity as strong as blinatumomab, a bispecific antibody drug on the market. The bispecific antibody did not have activity to A549 cell lines without HEG1 expression. In this way, we obtained the proof of concept for pharmacological efficacy *in vitro*. In subcutaneous xenograft model of mesothelioma cells, the bispecific antibody suppressed the tumor growth with PBMC. In intraperitoneal xenograft model, both injection of the bispecific antibody and PBMC rejected mesothelioma cells completely. We confirmed that the bispecific antibody has a strong cytotoxicity against mesothelioma in the body and obtained the proof of concept for pharmacological efficacy *in vivo*. As a result, we achieved the main goals of this research project.

We also achieved developmental goals for practical application of antibody drug. A new expression vector for production of antibody drug was developed and the bispecific antibody-highly producing CHO clone was obtained. In addition, humanization of SKM9-2 antibody, stabilization substitution for production and storage, examination of signal peptide, and cell bank construction of humanized SKM9-2 was performed. Fully humanized the bispecific antibody was also developed. To investigate glycopeptide recognition of SKM9-2, SKM9-2 binding to synthesized glycopeptides was analyzed by surface plasmon resonance. The SKM9-2 binding required two sialylated T antigens linked on the epitope peptide. Crystal structural analysis using SKM9-2 Fab and a sialylated epitope peptide revealed that SKM9-2 simultaneously recognizes the peptide sequences of epitope and two sialylated T antigens.

Furthermore, we completed observation of mesothelioma-specific expression of sialylated SKM9-2 epitope by IHC comparative analysis using SKM9-2 and a glycan-independent anti-HEG1 monoclonal antibody, analysis of turnover time and molecule number of HEG1 on mesothelioma cells, verification the internalization of anti-HEG1 antibody binding to cell surface, and establishment of a new glycan-dependent anti-HEG1 monoclonal antibody that recognizes the different region from the SKM9-2 epitope. From these analyses, we determined that HEG1 is a suitable target for a glycan drug discovery for mesothelioma. Besides, we found a molecule associated with HEG1 using the proximity-dependent biotin identification and obtained important information about physiological function of HEG1 by this finding.

In order to clinically apply the research results of this project, we are presently planning practical study on drug production of humanized SKM9-2 and the bispecific antibody.