

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：バイパラトピック抗体のパネル化による機能的人工抗体の探索デザインの高度化
Development of systematic methods to select biparatopic antibodies using epitope-equalized antibody panel

研究開発実施期間：平成 30 年 5 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：秋葉 宏樹
AKIBA, Hiroki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人京都大学 大学院薬学研究科 助教
Kyoto University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Assistant Professor

II 研究開発の概要

バイパラトピック抗体 (BpAb) とは標的分子の異なる 2 つのエピトープに結合する抗体可変領域を用いた二重特異性抗体である。本研究は独自の抗体選別技術 (エピトープ均質化抗体パネル、特許 7054209) を利用し、BpAb デザイン技術を高度化することで、モノクローナル抗体では達成できない高機能人工抗体の取得法を開発することを目的とした。

結合によりアゴニストやアンタゴニストとして働く機能抗体は抗体医薬の有用な作用機序の 1 つである。この活性の多くは拮抗阻害あるいは抗原の集合状態の変化や高次構造変化に基づく。しかし通常抗体 (cIgG) は可変領域 (Fv) のホモ多量体であり、抗原の変化を誘起する活性に限界がある。そこで、機能抗体を積極的に作るために、異なる 2 つのエピトープに結合する Fv を有した BpAb が作製され、抗原架橋による細胞膜上の分子集合誘起活性で成果を出している。BpAb はこのような集合体形成のみならず、同一分子上の架橋を含めた抗原構造に対する多様な影響が期待される。しかし、合理的デザインに必要な Fv の組み合わせ探索法は確立されていない。本研究では、これを見いだすために、異なるエピトープに結合する複数の抗体を利用した網羅的 BpAb パネルを作製し、そこからエピトープ組み合わせと活性創出の関係を導き出した。

1) BpAb スクリーニングフォーマットの創出

BpAb 作製法には、異なる Fv を遺伝子工学的に連結する必要がなく、また Fv の安定性等、本研究の目的とは無関係な性質の影響を最小限にするためにヘテロ Fc を用いつつ、網羅的構築に適した二重特異性抗体作製法を新たに開発する必要があった。通常型抗体の混入を避けつつ、可能な限り対称性の高い構造とする目的で、intein-

mediated protein trans-splicing (IMPTS) を利用する技術を採用した。まずヘテロ Fc の設計について、既存の技術 (disulfide-linked knobs-into-holes) の最適化として、ヒト抗体が天然に示すアロタイプに依存した安定性の違いを明らかにした (Akiba et al, *Antib. Ther.* **2019**, *2*, 65-69)。この分析により、本研究で用いられる定常領域の安定性が保証された。また IMPTS の配列最適化として、コンセンサス配列を挿入するのではなく天然抗体の配列と置き換えることによって、研究開始後に報告された 2 つの文献記載のもの (Han et al, *Methods* **2019**, *154*, 32-37; Hofmann et al, *mAbs* **2020**, *12*, 1731938) と同等の収率を示しながら、高い対称性を兼ね備えた方法を開発した (Akiba et al, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19411)。原理上、同一の変換領域をもつホモ二量体抗体が形成されない点が利点である。さらに精製の最終ステップをサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) とすることで、SEC 純度の高い BpAb を常に得られ、個別の精製条件検討の不要な、スクリーニングに最適な系の構築に成功した。

2) TNFR2 に対する BpAb パネル

最初の例として、細胞膜上でリガンド TNF α と結合し三量体となることを基点に、膜上クラスターを形成し活性化する TNFR2 を選択した。TNFR2 は制御性 T 細胞 (Treg) を中心とする免疫細胞の一部集団に発現し、その活性化が Treg の増殖に関連するといわれている。そのため、免疫系の活性化・不活性化を通じた腫瘍や自己免疫疾患の治療に有用であると考えられる。

開発に先立って、TNFR2 に対する 5 つの異なるエピトープを認識する抗体 (TR45, TR92, TR94, TR96, TR109) の可変領域配列を取得した。また、ヒト TNFR2 の領域をマウス TNFR2 に置き換えた変異体 (計 18 点) を細胞上に発現させ、結合を分析することで、それぞれの抗体エピトープ領域を明らかにした。

続いて、5 点の抗体から、10 点の BpAb からなるパネルを取得した。作製された BpAb パネルに属する各分子の生物活性を cIgG と共に TNFR2 強制発現 Ramos-Blue 株によって分析した。cIgG は 5 つとも弱～中程度のアゴニストであり、うち 1 点 (TR109) がアンタゴニストであった。一方で、BpAb のうち 6 点がすべての cIgG を上回る強いアゴニスト活性 (最大活性値) を示した。さらには、BpAb のうち 2 点は TR109 よりも強いアンタゴニスト活性を示した。特筆すべきは、強いアンタゴニスト BpAb は cIgG にはみられたアゴニスト活性が抑制されたことである。いずれの分子も TNFR2 発現レポーター細胞への強い結合がフローサイトメトリーにより確かめられ、アゴニスト活性と結合の強さには相関がなかった。一方で、それぞれの分子が示しうるアゴニスト活性の最大値に対する比活性の濃度依存性が結合の濃度依存性とよく一致し、抗体結合が活性制御に直結すると見出された。

この結果を踏まえ、cIgG ならびに組換え抗原蛋白質との複合体構造を分析した。サイズ排除クロマトグラフィー・多角度光散乱分光 (SEC-MALS) によって複合体の分布ならびにその絶対分子量を求めた。その結果、cIgG は 2 つの同一の変換領域があることに対応して antibody:TNFR2 = 1:2 の複合体 (220 kDa) を形成した。一方で、BpAb のうちアゴニスト活性をみせた Bp96-92 と Bp109-96 はいずれも antibody:TNFR2 = 2:2 よりも大きな 200-500 kDa 程度の複合体の混合とみられる分布を示した。さらに、アンタゴニスト活性をみせた Bp109-92 は 1:1 の複合体 (180 kDa) を形成した。単粒子分析法であるマスコットメトリーでも同様の複合体分布を示した。他の BpAb ならびに cIgG についても SEC-MALS により分析したところ、アゴニスト活性の強い BpAb は大きな複合体、中程度の BpAb と cIgG は 1:2、アゴニスト活性のない (強いアンタゴニストを含む) BpAb は 1:1 複合体のみを形成した。すなわち、複合体サイズが生物活性を制御することを明らかにした。

TNFR2 に対する BpAb については、エピトープ相対位置からアゴニスト活性を自在に制御できることが強く示唆された。エピトープが位置する側を {Group I, TR109, TR45, TR92 の 3 つ : TNF α 結合界面に同じ} {Group II, TR94, TR96 の 2 つ : TNF α 結合界面ではない側} という 2 グループに分類する。Group I または II のどちらか一

方から 2 つの Fv をとった BpAb は 1:1 複合体を形成する。Group I と II の両方から各 1 つの Fv をとった BpAb は、1:1 複合体を形成できず、大きな複合体を形成する。この違いが生物活性に直結するため、可変領域どうしが結合競合しない限り、エピトープ位置の選択によって、BpAb の活性を制御できるということを明らかにした。上述の成果から特許出願し（特許 7101433）、ベンチャーに導出した。

本研究では特にアンタゴニストの重要性が見出されたため、有力なアンタゴニスト Bp109-92 を詳細に検討した。1:1 複合体構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析に付したところ、2 つの抗原結合フラグメント (Fab) が並列したような複合体構造の観察に成功した。2 つの Fab が同時に 1 つの TNFR2 分子に結合していることを確実にした。また、健常人由来の末梢血単核細胞 (PBMC) を利用して、Treg の TNF α 依存的な増殖活性の阻害能を検証したところ、Bp109-92 は CD4⁺TNFR2⁺細胞の増殖、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg の増殖を阻害する活性があった。アンタゴニストが Treg の活性を抑えることで、腫瘍免疫を活性化しうするため、本研究の成果から医薬品開発につながる可能性が示された (Akiba et al, *bioRxiv* 2022, doi:10.1101/2022.12.15.520217)。

3) TNFR2 に対する BpAb の構造依存性

2) はスクリーニング用フォーマットにより評価を実施していたので、他の二重特異性抗体フォーマットによっても同様の評価を実施した。上記と同様に 2 つの可変領域を 1 つずつ有し、開発品に用いられている IgG 型二重特異性抗体フォーマットを利用した場合には、類似の活性を示した一方で、2 つの可変領域を 2 つずつ有するフォーマットを利用した場合には、アンタゴニストと同じ可変領域を用いた場合にもアゴニスト活性を示した。また、アゴニスト BpAb のうち 1 つの構造を改変することで、アンタゴニスト活性を示す分子が創出された。BpAb の活性にはエピトープ組み合わせのみならず抗体構造も大きく影響することが明らかとなった。

4) CD30 に対する BpAb パネル

CD30 は TNFR2 と同じ TNF 受容体スーパーファミリータンパク質の一員であり、リガンド結合による 3 量体形成を起点に活性化する。CD30 の異なる 9 つのエピトープに結合する抗体群から、36 点からなる BpAb パネルを取得した。CD30 は遺伝子重複により相同性の高い領域を 2 つもつため、エピトープの詳細位置の同定に困難を極めたものの、61 点の変異体に対する結合活性により明らかにした。これらの生物活性を TNFR2 同様にレポーター細胞によって分析したところ、複数の強いアゴニストと、アゴニスト活性を示さない強力なアンタゴニストを含めた、多様な生物活性を示す分子が取得された。TNFR2 の場合とは異なり、多数の BpAb が強力なアンタゴニストであった。これは遺伝子重複領域の存在、また構造不定領域に結合する抗体が含まれていたために、1:1 結合する BpAb が多く取得されたためと考えられる。いくつかの BpAb について SEC-MALS による複合体分析を実施したところ、TNFR2 と同様に、概ね強いアゴニストほど大きな複合体を形成しやすい傾向が観察された。

CD30 は Brentuximab vedotin の標的であり、ADC 標的としても注目されている。そこで創出された BpAb 群の ADC 適用性を培養細胞系において毒素標識二次抗体により評価したところ、Brentuximab vedotin の母抗体 cAC10 と同等の活性を示す BpAb が含まれることが明らかとなった。

5) 総括

本研究では TNFR2 を標的に BpAb の網羅的分析を実施し、エピトープ情報を含め、抗体構造と活性の関係性を明らかにすることができた。また、同じ TNF 受容体スーパーファミリーに属する CD30 に対する BpAb と共通のメカニズムが理解された。少なくとも TNFRSF を標的とする場合には、BpAb の活性を操るための設計指針を立てることに成功した。分子集合体形成特性から薬理活性をもたらす場合には同様のデザインが可能であると考

えられ、本事業の目的である、創薬の基盤としての汎用性（応用性）、継続・発展性のある技術の創出に成功した。

Biparatopic antibody (BpAb) is a bispecific antibody using two variable fragments (Fv) binding two different epitopes of a single antigen. In this research, we developed a method to design and select BpAbs efficiently using our original epitope normalization technique.

1. Development of BpAb screening format. For this purpose, we developed an efficient method to screen IgG-like bivalent BpAbs from multiple combinations of Fv. To avoid contamination of homo-bivalent side product, we selected a method to produce IgG-like BpAb by intein-mediated protein trans-splicing (IMPTS). First, we optimized heterodimeric Fc production method by disulfide-linked knobs-into-holes from allotypic variations (Akiba et al, *Antib. Ther.* **2019**, 2, 65-69). Second, IMPTS was optimized to generate highly symmetric IgG-like bispecific antibody (Akiba et al, *Sci. Rep.* **2021**, 11, 19411). In our optimized method, homo-bivalent side product is not produced in principle. By setting up the final purification step using size-exclusion chromatography, high purity of the product is guaranteed without optimization of the purification steps by each BpAb. Highly efficient system for BpAb screening was successfully developed.

2. BpAb panel for TNFR2. TNFR2 is activated by the formation of cluster on cell membrane through binding to trimeric ligand, TNF α . TNFR2 is expressed on certain subsets of lymphocytes including regulatory T cells (Tregs), and its signaling is related to the proliferation of Tregs. TNFR2 is thus expected as a drug target in oncology and immunology. We first obtained five antibodies (TR45, TR92, TR94, TR96, TR109) that bind different epitopes of TNFR2. Epitopes of the antibodies were determined using 18 mutants. From the five antibodies, ten BpAbs were generated. Biological activity of these antibodies was evaluated using reporter cells. All five conventional IgG antibodies (cIgGs) were moderately agonistic, while one cIgG, TR109, was an antagonist. On the other hand, six BpAbs were strong agonists, and two BpAbs were strong antagonists. One antagonist, Bp109-92, did not show agonistic activity.

To gain mechanistic insights of these activities, we analyzed the size of immunocomplexes formed by cIgGs and BpAbs with TNFR2 by size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering detector (SEC-MALS). Immunocomplexes of bivalent cIgGs with TNFR2 were 220 kDa, corresponding to 1:2 complex as expected. Agonistic BpAbs formed large complexes ranging mainly from 200 to 500 kDa including 2:2 to 3:3 complexes. In contrast, antagonistic Bp109-92 exclusively formed 180 kDa complex corresponding to 1:1 complex. Similar observation was found in mass photometry. Size of immunocomplex strongly affected the agonistic activities of the antibodies. Combined with the information on the epitope sites, potential design strategy for agonistic or non-agonistic BpAbs was developed.

Structural analysis in cryo-electron microscopy revealed that strong antagonist, Bp109-92, utilize both Fvs for binding TNFR2 to afford strong interaction. In addition, TNF α -dependent proliferation of CD4⁺TNFR2⁺ cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs among peripheral blood mononuclear cells was inhibited. These observations support the potential of Bp109-92 developed into a biotherapeutics (Akiba et al, *bioRxiv* **2022**, doi:10.1101/2022.12.15.520217).

3. Structure-activity relationship of anti-TNFR2 BpAbs. In Section 2, BpAbs were produced by a screening-optimized by a method described in Section 1. We evaluated some of BpAbs by using different bispecific formats. Similar observations were found for commercially developed bivalent IgG-like formats as in Section 2 both in case of a strong agonist and an antagonist. However, tetravalent BpAb showed strong agonistic activities even when Fv pairs used for antagonist was used. Structural modification also resulted in the alteration of an agonistic BpAb into an antagonist.

4. BpAb panel targeting CD30. CD30 is a member of TNF receptor superfamily proteins which are activated in a similar mechanism as TNFR2. We obtained 36 BpAbs using Fvs from nine antibodies binding different epitopes of CD30. When

their biological activities were evaluated using reporter cells, strong agonists and antagonists were found. Contrary to the observation in TNFR2, many BpAbs were antagonists, probably reflecting flexibility of CD30 molecule and the existence of gene duplication in the extracellular region of CD30. Observation in SEC-MALS analysis was consistent with the biological activity as observed in the case of TNFR2. Because CD30 is a target of antibody-drug conjugate (ADC), Brentuximab vedotin, potential applicability of the BpAbs for ADC was analyzed using a secondary immunotoxin. Many BpAbs were found to show similar potential as cAC10, an original antibody of Brentuximab vedotin.

5. Summary. We developed multiple BpAbs against TNFR2 and successfully revealed the mechanism of action in a structure-activity relationship. Common working mechanism of BpAbs against TNF receptor superfamily proteins was suggested, and design strategy of BpAbs was established. Similar design may be possible for any target controlled by cluster formation, and this fulfils the aim of this AMED project for the development of drug design strategies.