

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：中分子アゴニスト創薬のロジカルデザイン～OX40 アゴニスト開発を実施例として～
Innovative designing for therapeutic agonists using single domain antibody

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：高折晃史
Akifumi Takaori-Kondo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：教授
国立大学法人京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学
Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

II 研究開発の概要

抗体医薬は、アンタゴニスト抗体、アゴニスト抗体の 2 つに大きく分けられる。この 2 つは作用メカニズムが異なり、開発の手法も異なる。アンタゴニスト抗体は標的分子の相互作用領域を認識エピトープとすることにより有効な抗体の作製が可能である。たとえば、ニボルマブは、PD1 における PD1 リガンドとの相互作用領域に結合し、リガンドの結合を阻害するアンタゴニスト抗体である。一方、アゴニスト活性を持つ抗体はリガンドとの相互作用領域に結合するだけでなく、標的分子のコンフォメーションを活性型に誘導することができなければならないため、より複雑な条件を満たす必要がある。アゴニスト抗体は的中率が低く、創出が困難であるため、通常はマウススペースの巨大な抗体ライブラリを立ち上げ、膨大な数のクローンについて 1 つずつウェットの系でテストすることにより、ようやく創出が可能になる。もしアゴニスト活性の標的となるエピトープを認識する抗体シーズをロジカルに作出する方法が確立できれば、より広い標的分子に対するアゴニスト抗体の創出が簡便になるのみならず、劇的な時間短縮とコストダウンが可能となる。

本研究開発では、ラクダ科の single domain antibody の抗原結合部位である variable domain of heavy chain of heavy chain antibody (VHH) を活用し、アゴニスト抗体を効率よく取得する VHH 技術の理論検証 (POC) を目的とした。VHH は単一遺伝子にコードされているため、重鎖と軽鎖の組み合わせで抗原結合部位が規定されるマウス抗体と異なり、各 VHH のエピトープ情報は単一遺伝子配列データとして扱うことができる。VHH はハイブリドーマを要せず、遺伝子情報で管理できるため数理解析に最適であり、しかも中分子であることから、浸透性が良くアゴニストとして運用性が高い。

T 細胞の活性化を増強する T 細胞共刺激分子は、がん免疫療法の魅力的なターゲットである。本研究開発では腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーの一員である OX40 を標的分子としてアゴニスト活性を持つ VHH 抗体を開発することを目的とした。OX40 のリガンドである OX40L は抗原提示細胞、活性化 B 細胞、血管内皮

細胞に発現し、アゴニスト抗体は OX40L と同等のアゴニスト機能をもつ医薬である。1996 年に申請者らのチームが樹立した OX40 アゴニスト抗体は抗腫瘍 T 細胞を活性化しがん細胞を殺傷することから、OX40 アゴニスト抗体は治療に応用可能であり、マウス由来の OX40 アゴニスト抗体は臨床試験が行われている。

本研究開発では、ヒト OX40 に対してアゴニスト活性を持つ新規 VHH 抗体を開発するため、OX40 を免疫したアルパカから得た VHH ライブラリをファージに発現させてパニングし、次世代シーケンサによる解析により 10 万クローン程度からなる OX40 分子表面のフルカバーライブラリを作製した。これと並行して OX40L と結合した OX40-OX40L 複合体でもパニングを行い同規模のライブラリを作製した。OX40-OX40L 複合体では標的エピトープが OX40L によって覆われており、標的エピトープを認識する VHH 群は競合的に排除される。両群の比較により、OX40 における OX40-OX40L 相互作用領域を認識する VHH 群を同定した。

OX40 に対する VHH 抗体のクローンは、クラスタリング解析により 28 の主要クラスターに分類された（大きなクラスターから A, B, C... と命名）。このうち 11 クラスターから代表的な 37 クローンを選び、フローサイトメトリーで OX40 を安定発現した Jurkat 細胞への結合性を調べたところ、すべての VHH が OX40 に対する結合能を示し、特に最大クラスターであるクラスター A の VHH が OX40 への良好な結合能を示した。エピトープを推定するために、OX40 に対する結合親和性が比較的高い 3 つのクラスター（A, C, E）から 14 クローンを選び、組換え OX40L 又は既存のマウス由来 OX40 アゴニスト抗体（315 抗体）との結合競合性を検証したところ、クラスター A に属する VHH は OX40L 及び 315 抗体の両者により完全に阻害される一方、クラスター C 及び E に属する VHH は OX40L で完全に阻害されるが、315 抗体では部分的にしか阻害されなかった。これらの結果は、全ての VHH が OX40L 又は 315 抗体のいずれかと OX40 上のエピトープを共有しており、同じクラスターに属する VHH は OX40 上の同じエピトープを共有している可能性が高いことを示唆している。また、このことは、OX40 に結合する VHH 群および OX40-OX40L に結合する VHH 群の比較により、OX40-OX40L の相互作用領域に結合する VHH クローンを抽出した我々の手法の方法的妥当性を示している。

OX40 の下流には NF- κ B がある。上記の方法により抽出された各 VHH クローンが OX40 に対するアゴニスト活性を有するかを評価するため、OX40 を安定発現させた Jurkat 細胞株を用いて NF- κ B レポーターアッセイを実施した。クローン No. 1, No. 2, No. 3, No. 4 は固相化した状態で強い NF- κ B 活性化能を示した。さらに、ヒト T 細胞上の OX40 に対するアゴニスト活性を評価するため、抗 CD3 抗体および各クローンの VHH 抗体でコーティングしたマイクロウェルで CD4 陽性 T 細胞を 96 時間培養し、細胞増殖とサイトカイン産生を評価した。VHH クローン No. 1 は最も強力に CD4 陽性 T 細胞の増殖を促進し、IFN- γ , GM-CSF, IL-10, IL-13 の産生を増強した。クローン No. 2, クローン No. 3, クローン No. 4 も良好な T 細胞増殖刺激能と IFN- γ 産生亢進能を示した。これらのクローンは、CD8 T 細胞の IFN- γ 産生も刺激した。興味深いことに、クローン No. 4 は、OX40 との結合親和性が低いにもかかわらず、クローン No. 2 やクローン No. 3 と同等かそれ以上のアゴニスト活性を示した。

上記のアッセイは、すべてマイクロウェル上で固相化した VHH 抗体を用いて行われ、非固相化状態の VHH 抗体モノマーは OX40 を活性化しなかった。OX40 は三量体化して活性化することから、生体内における非固相化状態で VHH 抗体にアゴニスト活性を発揮させるためには、VHH 抗体の三量体化が必要と考えられた。そこで、OX40 に対するアゴニスト活性の最も強いクローン No. 1 について VHH 抗体をリンカーで結合し、三量体化 VHH 抗体を作製したところ、三量体化した VHH クローン No. 1 は可溶型の状態でも CD4 陽性 T 細胞の増殖及び IFN- γ および GM-CSF 産生を促進し、OX40 シグナルを活性化することが確認された。

VHH クローン No. 1 のモノマー及び三量体について OX40 との会合及び解離のキネティクスを評価した。VHH クローン No. 1 のモノマーは OX40 と良好な会合を示したが、解離は急速であった（ $K_{off}=2.77E-03$ ）。OX40 発

現 Jurkat 細胞株を用いて OX40 への結合能を評価したところ、50%受容体占有濃度が、VHH クローン No. 1 モノマーでは 0.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったのに対し、三量体では 0.024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と大きく低下した。三量体では Koff が低下したためと考えられた。三量体の受容体占有率は 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でほぼ飽和し、CD4 陽性 T 細胞の増殖により評価したアゴニスト活性を発揮させるための有効濃度は 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

VHH 抗体は生体内での半減期が非常に短く、そのことが十分な治療効果を発揮させる際の障害となっていることが知られている。VHH 抗体の生体内での半減期を延長する方法として、目的の VHH 抗体と血清アルブミンに対する VHH 抗体をリンカーで結合し、VHH 抗体をアルブミンにターゲティングする方法が報告されている。VHH クローン No. 1 の三量体に抗血清アルブミン VHH 抗体をリンカーで結合してヘテロ四量体を作製し、マウスにおいて静脈内投与後の血中半減期を測定したところ、三量体では 1.1 時間であった半減期が、ヘテロ四量体では 48 時間に延長した。以上より、有効濃度を保つには 3 日ごとに VHH ヘテロ四量体 100 μg を投与すれば十分であると判断された。

VHH クローン No. 1-抗血清アルブミン VHH 抗体ヘテロ四量体の生体内での効果を調べるため、ヒトリンパ腫細胞株を NOG マウスに接種する異種腫瘍移植モデルを用いて検証を行った。リンパ腫細胞の接種から 5 日後にヒト由来 CD19 CAR-T 細胞を輸注し、3 日ごとに VHH ヘテロ四量体 100 μg を静脈内投与した。CAR-T 細胞は OX40 を発現していた。IVIS イメージングで、VHH ヘテロ四量体を投与したマウスは、コントロールマウスよりも腫瘍の進行が遅く、生存期間が有意に延長した。また、VHH ヘテロ四量体を投与したマウスでは、コントロールマウスよりも末梢血 CAR-T 細胞の増殖がより強く起こることが確認された。

VHH クローン No. 1 の OX40 に対するアゴニスト活性の構造生物学的メカニズムを検討するため、OX40 のどのドメインに VHH が結合するかを検討した。OX40 の細胞外ドメインは 4 つの CRD ドメインから構成される。我々が同定した VHH クローンはヒト OX40 に結合するが、マウス OX40 には結合しないことから、ヒト OX40 の各 CRD ドメインをマウス OX40 の CRD ドメインで置換した組み換え体を作製し、各 VHH クローンの OX40 置換体に対する結合能を評価した。VHH クローン No. 2, No. 3 及び 315 抗体は、CRD3 をマウス型に置換した OX40 に結合せず、CRD3 に結合することが示された。興味深いことに、VHH クローン No. 1 の結合はすべての各 CRD 置換体で減少し、この結果は生理的なりガンドである OX40L と同じであった。このデータは、VHH クローン No. 1 が OX40L と同様に広い結合面で OX40 に結合することを示唆した。

最後に核磁気共鳴法を用いて、VHH クローン No. 1 の構造を分子レベルで解析した。その結果、VHH クローン No. 1 は長い CDR3 ループを持ち、広く平面的な抗原結合部位を形成していることがわかった。VHH クローン No. 1 と OX40 の相互作用を化学シフト摂動法で観察したところ、8 つの相互作用する残基が確認された。そのほとんどが CDR3 ループに位置しており、VHH クローン No. 1 が CDR3 ループを介して OX40 に結合することが確認された。

以上のように、遺伝子配列の解析や遺伝子の改変が容易であるという VHH 抗体の特徴を利用した我々の方法は、ウェットの系でのスクリーニングにかかる抗体クローンの数を最小限にすることができ、効率よく、生理的リガンドと類似した作用メカニズムを持つ優れたアゴニスト抗体を得る方法論として優れている。VHH 技術とバイオインフォマティクスの組み合わせは、さまざまな標的分子に対して特異的な機能を持つ抗体医薬を生み出す強力なツールとなり得ることが示された。

Antibody drugs can be divided into two main categories: antagonistic antibodies and agonistic antibodies. These two types of antibodies have different mechanisms of action and therefore require different development strategies. For example, an antagonistic antibody can be obtained simply by targeting an epitope in the ligand-binding domain to block the receptor-ligand interaction. An agonistic antibody, on the other hand, must meet a more complicated requirement: it must be able to induce the active conformation of a target molecule. Agonistic antibodies are difficult to develop due to low hit rates, so a tedious *in vitro* screening of a large number of clones should be performed. If a logical method for generating an antagonist antibody can be established, it will not only enable the generation of agonistic antibodies against a wider range of targets, but also drastically reduce labor and cost.

The purpose of this study is to validate our methodology of a logical designing agonistic antibodies by taking advantages of the characteristics of the variable heavy chain (VHH) domain derived from camelid single domain antibodies. We targeted OX40, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, as OX40 has been shown to enhance the activity of anti-tumor T cells upon activation and is a promising target for cancer immunotherapy.

We first generated a VHH library of approximately 100,000 clones covering the entire surface of the OX40 molecule by phage display. We also generated a VHH library that recognizes the OX40-OX40L complex, and by comparing the two libraries, we identified VHH clones that recognize the OX40-OX40L binding domain. These VHH clones were classified into 28 major clusters by clustering analysis. Thirty-seven representative clones from 11 clusters were selected, and 14 clones with higher binding affinity to OX40 were identified. Among these, four clones were further selected based on the results of an NF- κ B reporter assay. These four clones also showed an enhancing effect on human primary T cell proliferation and cytokine production.

We finally selected clone #1, which had the highest OX40 activation activity, and created a trimerized VHH antibody to enable it to induce the OX40 activation signal in a soluble form. VHH antibodies are known to have a very short half-life *in vivo*. Therefore, a heterotetramer was generated by linking the VHH clone #1 trimer to an anti-serum albumin VHH antibody. The heterotetramer displayed remarkably prolonged half-life *in vivo*. The *in vivo* effects of the VHH heterotetramer were evaluated using NOG mice inoculated with lymphoma cell lines treated with CD19 CAR T cells. Mice treated with the VHH heterotetramer showed significantly delayed tumor progression and prolonged survival compared to control mice.

Structural analysis revealed that the VHH clone #1 bound to OX40 with a wide surface spanning from CRD1 to CRD4, mimicking the binding mode of OX40L, the physiological ligand for OX40. This finding suggests that it may be logical to target an epitope in the binding domain of the physiological ligand to efficiently develop an antagonistic antibody.

Taken together, our methodology, which exploits the advantages of VHH antibodies, minimizes the number of antibody clones required for *in vitro* screening and can accelerate the development of agonistic antibodies. Our study demonstrated that VHH technology is a powerful tool for generating antibody drugs with specific functions against a variety of targets.