

# 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：物理化学／計算科学を駆使したヒト化単ドメイン抗体取得系の高度化と汎用化

Development of the system for humanized sigle domain antibodies acquisition based on biophysical and computational approach

研究開発実施期間：平成 30 年 4 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：中木戸 誠

Makoto Nakakido

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京大学 大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 講師

Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

本研究では、抗体改変技術と計算科学の手法を組み合わせることにより、ヒト化された骨格に基づく単ドメイン抗体のライブラリを作製し、試験管内での抗体選択を行うことによって、より効率的に抗体を取得する系の構築を目指した。その中で、以下に記す一連の成果を得た。

### (1) アルパカ免疫による抗体取得

合成ライブラリの構築に先立ち、複数の抗原に対してアルパカ免疫からの抗体スクリーニングにより、いずれの標的抗原に対しても  $\text{nM}^{-1}$  オーダーの高い親和性で結合するクローンの取得に成功した。さらに、病原性微生物である化膿レンサ球菌の表層タンパク質 SPs0871 に対する単ドメイン抗体については、抗体が標的タンパク質に対して高親和性で結合するのみならず、リガンド結合を阻害することを明らかにした (Yamawaki et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2021)。さらに、黄色ブドウ球菌の表層タンパク質 IsdH/IsdB に対する単ドメイン抗体については、得られた抗体が臨床分離株である MRSA 株の増殖阻害効果を有することを明らかにした。

### (2) 初期型合成ヒト化単ドメイン抗体ライブラリの構築と計算科学に基づく取得抗体の改変

初期型合成ライブラリとして、過去に報告されているヒト化単ドメイン抗体の配列を参考に、CDR 領域に多様性を持たせたヒト化単ドメイン抗体をファージ表面に提示させたファージライブラリを構築した。作製した合成 VHH 提示ファージライブラリからパニングを行うことにより、合成ライブラリからリゾチーム結合ヒト化単ド

メイン抗体の取得に成功したが、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質として調製を試みたところ、可溶性が極めて低くその大部分が不溶性画分に発現する結果となった。可溶性画分から精製したタンパク質についてもサイズ排除クロマトグラフィーを用いて分子量を解析したところ、凝集体を形成しており、単量体として組み換えタンパク質を調製することは困難であった。そこで、計算科学的手法によって得られた抗体の立体構造モデルを構築し、分子シミュレーションにより凝集性に寄与している可能性がある箇所をアミノ酸残基レベルで同定した。凝集形成に寄与していると考えられるアミノ酸残基に変異を導入した改変型ヒト化単ドメイン抗体を作製し、同様に大腸菌発現系を用いて発現・精製を行ったところ、大幅に凝集性が改善され、単量体として組換えタンパク質を得ることに成功した。しかし、得られた抗体について表面プラズモン共鳴によって抗原に対する親和性を評価したところ、おおよそ  $30 \text{ mM}^{-1}$  と親和性が非常に低いことが明らかとなった。

### (3) 最適化ライブラリの設計

#### (3-1) 骨格の選定と最適化

新規合成ライブラリの作製のため、臨床試験によって低免疫原性が確認されている複数種のヒト化単ドメイン抗体の抗体骨格に対し、公開データベースに登録されている EGFR に対する単ドメイン抗体の複数クローンの CDR をそれぞれ移植した合成単ドメイン抗体を作製し、分子の熱安定性ならびに抗原への結合親和性について解析した。その結果、CDR 移植に伴う熱安定性ならびに抗原に対する結合親和性の変化に差が見られた。この要因について知見を得るため、移植に伴い安定性や抗原に対する親和性の減弱が見られた Vobarilizumab 骨格に CDR を移植した合成単ドメイン抗体について結晶構造解析をおこなったところ、移植に伴い、CDR3 の構造が大きく変化することが示唆された。この結晶構造を基に分子動力学計算を行ったところ、CDR3 と骨格の中の FR2 領域間の相互作用が示唆されたため、その相互作用部位を改変した変異体を作製したところ、熱安定性および抗原への親和性がともに向上し、CDR3 と骨格間の相互作用が単ドメイン抗体の安定性および抗原への結合のために重要であることが明らかとなった (Kinoshita et al. *Protein Sci* 2022)。これらの結果を踏まえ骨格と相互作用する必要のある長い CDR3 を有するライブラリと比較的短い CDR3 を有するライブラリで、それぞれ FR2 領域の配列を改変した異なる骨格を用いることとした。

#### (3-2) CDR 配列の設計とライブラリ構築

優れた安定性を有する単ドメイン抗体ライブラリを作製するため、抗体の構造データベースに登録されている単ドメイン抗体の配列を網羅的に解析した。その結果、CDR1 および CDR2 の残基長はほぼ均一であるのに対し、CDR3 の長さは多様に分布することが明らかとなった。そこで、多様な抗原およびエピトープを認識する抗体を取得可能なライブラリを作製するため、CDR3 の長さが異なる 3 つのライブラリを作製することとした。さらに、データベースから得た配列の網羅的解析から見出した CDR 配列の偏りを踏まえ、また (3-1) で見出した骨格配列配列固定を含め、合成単ドメイン抗体のライブラリを設計、構築した。

#### (3-3) 各種標的タンパク質に対する抗体取得と機能解析

作製した合成ライブラリを用いて、様々な標的タンパク質に対するヒト化単ドメイン抗体を取得し、それぞれ機能解析を行った。以下、抗原毎に記載する。

##### (3-3-1) EGFR

ライブラリ設計に際して合成単ドメイン抗体の解析に用いた EGFR に対して、3 つのライブラリからのパニン

グによって計 11 クローンのヒト化単ドメイン抗体を取得した。得られた抗体について、大腸菌発現系により組換えタンパク質として調製し、安定性および抗原に対する結合を評価したところ、いずれのクローンについても 61 °C以上という、免疫から取得した VHH 抗体に匹敵する高い熱安定性を有していた。また、表面プラズモン共鳴法によって EGFR に対する結合親和性を解析したところ、79~598nM<sup>-1</sup> と、免疫から取得した抗体に比するとやや低親和性ながら、抗原に対して特異的に結合する抗体クローンの取得に成功した。これら抗体について、Dual injection assay と呼ばれる SPR の解析手法を用いてエピトープ分類を行ったところ、それぞれのライブラリから取得した抗体ごとに異なるエピトープを有することが明らかとなり、ライブラリ毎に認識しやすいエピトープが異なる、すなわち標的部位に応じたライブラリの使い分けが可能であることが示唆された。

### (3-3-2) IsdB

免疫から取得した VHH 抗体を用いて生物活性の評価系を構築した黄色ブドウ球菌の表層タンパク質である IsdB に対して抗体の取得を試みた。その結果、いずれも T<sub>m</sub> が 69°C以上という極めて安定性の高い抗体クローンが複数得られ、抗原タンパク質に対する結合についても確認された。しかし、菌に対する増殖抑制効果は確認できなかった。

### (3-3-3) シナプス形成に寄与するタンパク質群

シナプス間隙において機能する複数種のタンパク質に対してヒト化単ドメイン抗体を取得した。各抗原に対し、0.11~400 nM<sup>-1</sup> の親和性での結合が確認され、変性温度はいずれも 60°C以上と安定な抗体であった。また、取得抗体のうち複数のクローンについて抗原抗体複合体の結晶構造解析にも成功しており、それら抗体による抗原認識機構を精査したところ、免疫から取得した単ドメインによく見られる凹凸型の抗原認識とは異なり、標的タンパク質の平坦な部分を認識するクローンであることが明らかとなった。さらに、これら抗体が細胞染色によって細胞上に発現した抗原を認識することが確認されたのに加え、抗体を磁気ビーズ上に固定した抗体固定ビーズを神経細胞と共培養することにより、プレシナプス分化を引き起こすことが確認された。このように、本プロジェクトにおいて構築したヒト化単ドメイン抗体ライブラリから各種抗原に対し、多くの有用な抗体が得られており、これらの抗体について今後様々な用途での研究開発が見込まれる。また、本研究で構築した合成ライブラリが今後のヒト化単ドメイン抗体開発に活用されていくことが期待される。

In this study, we have aimed to develop a novel platform to obtain humanized single domain antibodies through the construction of synthetic humanized single domain antibody library based on antibody engineering techniques and computational approaches. The achievements are described below.

(i) Antibody acquisition from alpaca immunization

Prior to the construction of synthetic library, we obtained single domain antibodies toward several different antigens from alpaca immunization. These antibodies recognized the antigens with high affinity. Also, an antibody to SPs0871 from *Streptococcus pyogenes* inhibited ligand binding of target protein. Furthermore, an antibody to IsdH/IsdB from *Staphylococcus aureus* suppress the growth of clinically isolated MRSA strains.

(ii) Construction of first generation synthetic humanized single domain antibody library and engineering of obtained single domain antibody relying on computational method

We constructed first generation synthetic humanized single domain antibody library referring previously reported humanized single domain antibody sequences. From the library, an anti-Lysozyme single domain antibody was obtained. However, when the antibody was expressed by *E.coli* expression system, solubility of the antibody was poor and made aggregation. Therefore, we utilized computational method to develop model structure of the antibody and identified amino acid sequences that contribute to aggregation. Then, we prepared modified single domain antibody with mutations at those amino acid residues and expressed the mutant using *E.coli* expression system. The solubility of the antibody was drastically improved by the mutation. However, the analysis using surface plasmon resonance revealed the affinity to antigen was very weak.

(iii) Design of optimized library

To design improved synthetic libraries, we developed synthetic single domain antibodies by CDR grafting from several anti-EGFR single domain antibodies derived from database onto several humanized single domain antibodies, which have been confirmed to have low antigenicity through clinical trials, and analyzed the thermostability and binding activity toward the antigen. As a result, we observed the reduced thermostability and binding activity for some combinations. To gain insight the molecular mechanism why the CDR grafting worsen the antibody, we solved the crystal structure of the antibody and revealed the grafted CDR adopted significantly different structure from the parental antibody. As the molecular dynamics simulation using the crystal structure indicate there are critical intramolecular interactions between CDR3 and framework region we generated antibody mutants with modified amino acid residues at such interacting region. By the mutation, both thermostability and antigen binding activity were significantly improved (Kinoshita et al. Protein Sci. 2022), indicating the importance of these intramolecular interactions for single domain antibodies.

(iv) Library construction, antibody acquisition from the library, and functional characterization of the antibodies

Based on this observation, we designed novel three synthetic humanized single domain antibody libraries with different length of CDR3 loop. Then, we isolated humanized single domain antibodies for several different targets; EGFR, IsdB, and several proteins related to synapse formation. We succeeded in the antibody acquisition for all the antigens with high thermostability and considerable affinity to each antigen. In addition, we confirmed that antibodies toward proteins related to synapse formation recognized antigens expressed on the cell surface and some antibodies immobilized on magnetic beads induced synaptic differentiation to neuronal cells by co-culture. These result guarantees the value of our novel synthetic humanized single domain antibody library and these libraries are expected to serve as a platform to acquire humanized single domain antibodies efficiently.