

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：ヒトウテログロビン蛋白質を利用した低分子化二重特異性抗体の構築

Construction of low molecular weight bispecific antibodies using human uteroglobin protein.

研究開発実施期間：令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：鎌田 春彦

KAMADA, Haruhiko

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センター

プロジェクトリーダー

National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Center for Drug Design Research,

Project Leader

II 研究開発の概要

本研究は、ヒトのウテログロビン (UG) 蛋白質を利用した二重特異性抗体作製技術を確立することを目的とする。UGはわずか16 kDaの二量体を形成する分泌蛋白質であり、これを骨格とすることで、Fcを有しない低分子量の二重特異性抗体を作製できる。この手法では、ペプチドリンカーなどで連結する方法とは異なり、野生型IgG抗体と同様、可変領域のN末端が他の可変領域と連結されずに露出するために、抗原結合の制約が少ない。さらには、二量体形成の性質を有しながら、分子量が低く保たれ、かつヒト蛋白質の使用により、免疫原性が生じる可能性を最低限に留めることができる。本研究で創出する技術では、簡便に低分子化二重特異性抗体を作製できるため、T細胞傷害型二重特異性抗体や感染症中和抗体など、新規抗体フォーマットを持つ抗体医薬の開発に広く利用できる可能性があり、有用な技術になると期待される。

本目的を達成するために、以下の研究項目に分け、研究を実施した。

1) 改変型UGの最適化

ヘテロ二量体を最も高効率に取得させるための改変型UGを見出すため、アミノ酸変異を導入したUGを作製した。独自に取得したヒトUGの構造情報から、独自に設計した8種類のアミノ酸変異を導入し、ヘテロ二量体形成能を評価した。その結果、8種類のアミノ酸のうち、2種類のアミノ酸については改変によってタンパク質の安定性が著しく低下するため、発現しないことが明らかになった。また、それ以外のアミノ酸でも、発現はするもののヘテロ二量体を組まないものが多く、アミノ酸の選択が重要であることが明らかになった。また、アミ

ノ酸変異を導入した UG 作製の結果から、より効率的にヘテロ二量体を形成する複数のアミノ酸ペアに関して検討した。その結果、D33 と K51、および S5 と L68 の組合せについては、収量も十分確保でき、ヘテロ二量体を組むことが明らかになった。電気的な相互作用、あるいは疎水的相互作用を利用して設計するために PISA を用いた解析を実施した。その結果、改変型 UG の作製のためのアミノ酸変異の導入部位は K51 と D33 は、塩橋を形成していることが明らかになった。この K51 と D33 についてはそれぞれ、二種類の塩橋を形成しやすいアミノ酸変異を導入することが最適であることが明らかになった。上記の多段階の解析結果から、最終候補分子を選別した。

2) 二重特異性抗体の作製と試験管内評価

本研究開発項目では、PD1/PD-L1 に結合する二重特異性抗体を作製した。この理由として、①市販されている既知の安定性の高い抗体配列が入手できる点、②通常の PD1/PD-L1 複合体形成を阻害することでの免疫チェックポイント阻害効果を示し、抗腫瘍効果などを指標にした解析が可能である点などを考慮に入れ、モデル抗体として選択した。PD1/PD-L1 に対する各モノクローナル抗体として、解析に利用する上で最適な抗体の選別を目的に、7種類の抗体 (Pembrolizumab, Spatalizumab, Tislelizumab, Cetrelizumab, Avelumab, Durvalumab, Cosibelimab) を発現させた。各抗 PD1/PD-L1 抗体はいずれも安定して発現し、分解物はほぼ検出されなかった。また、安定性の評価系として Thermal shift assay を用いた結果においても、いずれの抗体も高い安定性を示し、抗体間での違いはほぼないことが明らかになった。SPR 解析を用いたバイオセンサーによる評価で、各抗体の親和性については、大きな差が認められなかったことから、抗原への結合量が最も多かった抗体として Cetrelimab と Avelumab を選択し、改変型 UG との融合体を作製することとした。

評価系に用いる細胞として、PD-L1 を強制発現させた CHO-K1 細胞と、PD1 を発現させた TCR 発現 Effector 細胞を共培養し、NFAT promoter 下流にレポーター遺伝子として Luciferase を発現する Effector 細胞からの Luciferase 分泌を指標とした評価系を構築した。その結果、各抗 PD1/PD-L1 野生型抗体のみならず、野生型 IgG をベースとする二重特異性抗体、UG 改変型低分子化二重特異性抗体のいずれもが、抗体の濃度依存的な Luciferase 発現の上昇を誘導し、in vitro での評価が可能であることが明らかになった。

3) 二重特異性抗体の動態評価

本研究開発項目では、UG あるいは UG 改変型低分子化二重特異性抗体のサルでの血中動態を観察した。まず、血中濃度の測定に関して、UG に対するポリクローナル抗体によって評価した。その結果、我々で独自に作製した抗ヒト UG ポリクローナル抗体は、サル UG への反応性を持たず、ヒト UG にのみ特異的に反応することが明らかになった。また、本抗体を用いることで、10ng/mL から 0.1ng/mL という極めて低濃度の範囲で、UG の動態を評価できることが明らかになった。この ELISA 系を用いて実際にサルに UG 改変型低分子化二重特異性抗体を投与し、経時的に血液を採取することで、体内安定性・血中滞留性を評価した。コントロールとして、我々で作製した Avelumab と比較した結果、血中半減期は約 1/4 に低下していることが明らかになった。本結果は、抗体の低分子化に伴って、組織への移行性が増加すること、Fc 受容体への結合領域がないために、血中濃度を保つための抗体のリサイクリング活性が低下する、ことが要因となることが示唆された。また、各種血清中の生化学的パラメーターなどを測定した結果においても、投与したカニクイザルで、顕著な一般毒性は観察されず、安全性が高いことが明らかになった。

4) 二重特異性抗体の in vivo 活性評価

今回作製した抗体の活性、特に免疫チェックポイント阻害の活性を、野生型 IgG と *in vivo* での活性を比較検討した。マウスの PD1 および PD-L1 を認識する抗体の取得を目指し、実際に UG 改変型低分子化二重特異性抗体を作製することで、その評価を実施した。モデルマウスとして免疫チェックポイント阻害の活性評価に汎用されている MC38 の細胞株移植動物モデルを利用し、マウス PD1 および PD-L1 を認識する抗体を作製した。MC38 細胞株を移植したモデルマウスに対して野生型の二重特異性抗体および UG 改変型低分子型二重特異性抗体を投与し、腫瘍サイズの変化を指標に測定した結果、UG 改変型低分子型二重特異性抗体は、野生型 IgG をフォーマットとする二重特異性抗体と比較して、同等あるいはそれ以上の抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。本結果は、動態特性が野生型 IgG と比較して低い UG 改変型低分子化二重特異性抗体の有用性、特に組織移行性の向上が、抗腫瘍効果の発現に影響を及ぼすことを示すものであり、極めて興味深い結果であることが示唆された。

今回の研究成果から、UG 改変型低分子化二重特異性抗体は、一般的な IgG 製剤と比較して、低分子化を実現するとともに、極めて容易に二重特異性抗体を作製しうるスキュッフォールドとしての役割を持つことが明らかになった。本技術は、二重特異性抗体のフォーマットを作る上で、単純なリンカーとしての役割を持つ以上に、抗体の Fab をそのまま利用できる汎用性の高い技術であることも明らかになった。特に、これまで活用例が少ない固形がんを対象とする抗体医薬の開発において、抗体を scFv 化する必要がなく、また、抗体を融合させた UG 改変体同士を混合するだけで、ピュアな二重特異性抗体が作製できることは特筆すべきことであると考え。今回作製した PD1/PD-L1 の二重特異性抗体が、通常野生型 IgG と同等あるいはそれ以上の活性を持つことは、PD1/PD-L1 ターゲットとする抗体医薬品の開発に通じるものであり、また低分子化が抗腫瘍効果を増強する可能性を示唆する結果であると考え。

The aim of this study is to establish a technology for the production of bispecific antibodies using human uteroglobin (UG) protein, a secreted protein that forms homodimers, as a backbone for hetero-dimerization to produce low molecular weight bispecific antibodies that do not contain Fc. As the technology developed in this research can easily produce low molecular weight bispecific antibodies, it has the potential to be widely used in the development of T-cell engaging bispecific antibodies and neutralizing antibodies for infectious diseases and is expected to be useful as a new antibody drug format.

The following studies were carried out for this purpose.

(1) Optimization of modified UG

To find a modified UG with the highest efficiency in heterodimer formation, we created mutant UGs by amino acid exchange. We also evaluated heterodimer formation by introducing mutations found in our previous study. Among the eight amino acids, we investigated several pairs that form heterodimers more efficiently and found that D33 and K51 and S5 and L68 form heterodimers with sufficient yield. In addition, some of the other amino acid mutations resulted in expression but did not form heterodimers, suggesting that the choice of amino acids is important. Protein Interfaces Surfaces and Assemblies (PISA) analysis, which can predict electrical or hydrophobic interactions, was performed for the design of the mutant UGs. The formation of salt bridges between K51 and D33 was found to be optimal for the generation of modified UGs.

(2) Generation of dual specificity antibodies and in vitro evaluation

To select the most appropriate antibodies for the analysis, seven different commercial antibodies were used to express PD-1 and PD-L1. Each of the antibodies showed a high degree of stability and almost no degradation products were detected. After the evaluation of the property, Cetrelimab and Avelumab were selected as the antibodies with the highest amount of binding to each of the antigens to form a fusion with the UGs. We established an evaluation system using CHO-K1 cells, which express PD-L1, and TCR-expressing effector cells, which express PD1, as the cells for the evaluation system. These effector cells express luciferase as a reporter gene downstream of the NFAT promoter, and PD1 activity can be evaluated using luciferase secretion as an indicator. The results showed that not only each PD1/PD-L1 wild-type antibody, but also both the wild-type bispecific IgG antibody and the UG-modified small molecule bispecific antibody induced a concentration-dependent increase in the luciferase expression of the antibody, which could be evaluated in vitro.

3) Evaluation of bispecific antibody kinetics

To evaluate the developability of UG-based bispecific antibodies, we observed their blood kinetics in cynomolgus monkeys. The ELISA system using the anti-human UG polyclonal antibody that we had originally produced reacted specifically only with human UG and not with monkey UG. Blood half-life was found to be reduced to around a quarter. In addition, as a result of the biochemical parameters in the serum, no significant general toxicity was observed in the administered cynomolgus monkey, which indicates a high degree of safety.

4) In vivo evaluation of small molecule PD-1/PD-L1 antibodies

Using naked IgG antibodies as controls, the activity of the antibodies produced in this study was compared in vivo. Naked bispecific antibodies and UG-based bispecific antibodies were administered to tumor model mice transplanted with MC38 cells. Changes in tumor size were measured as an indicator. The results showed that the UG-based bispecific antibodies had

an anti-tumor effect that was comparable to or better than that of the naked IgG bispecific antibodies. The findings demonstrate that the increased tissue translocation effect of antibody miniaturization influences the onset of anti-tumor activity.

The results of this study showed that UG-based antibody drugs can be used as scaffolds to easily produce bispecific antibodies at lower molecular weight than conventional IgG preparations. This technology is more than just a simple linker for the production of antibody formats with dual specificity; it is also a highly versatile technology that allows the antibody Fab to be used in its native form. The fact that the PD1/PD-L1 bispecific antibody produced in this study has equal or greater activity than a conventional IgG-type antibody is a good indication for the development of antibody drugs targeting PD1/PD-L1. It also suggests that the low molecular weight of the antibodies may enhance the anti-cancer activity of the antibodies.