

# 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：免疫原性に起因する副作用の回避を指向した鏡像型 VHH 抗体の開発

Development of mirror-image VHH antibodies circumventing immunogenic side Effects

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：野中 元裕

Motohiro Nonaka

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 大学院医学研究科人間健康科学系専攻 准教授

Associate Professor, Department of Human Health Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University

## II 研究開発の概要

抗体をはじめとするバイオ医薬品の投与によって、患者体内で投与抗体そのものに対する抗薬物抗体 (anti-drug antibody, ADA) が生じ、治療効果の低下や有害反応に繋がる場合がある。研究開発代表者らは、全配列が D-アミノ酸から構成される“鏡像型タンパク質 (D-タンパク質)”がプロテアーゼ耐性であること、また、最小抗体である VHH 抗体は化学合成可能であることに着目し、疾患に関与するケモカインに対して高親和性を示す VHH (variable domain of heavy chain of heavy chain antibody) 抗体を D-タンパク質として創製すれば、ADA の出現を回避したバイオ医薬品を提供できると考えてきた。

本研究開発課題では、研究開発代表者が保有する標的分子に結合するペプチド配列を迅速にスクリーニングする技術と、研究開発分担者が保有する VHH 抗体の効率的な化学合成技術とを組み合わせ、構築した鏡像型 VHH 抗体を効率的に探索するプラットフォームを用いて、結合活性を有する鏡像 VHH 抗体 (D-VHH 抗体) の取得を行った。具体的には、以下の 3 項目の成果で示すように、炎症や線維化に関与するサイトカインである MCP-1 (CCL2) 等を標的分子とし、鏡像 VHH 抗体の活性・薬物動態・免疫原性を調べることによって、新規デザイン技術としての鏡像 VHH 抗体のコンセプトを確立した。

### 1) MCP-1 機能阻害剤としての D-VHH 抗体の取得

本研究全体を通して、生体内のサイトカインに対して結合活性を有する D-VHH 抗体を獲得する目的で、鏡像ディスプレイ法を用いた。その手法とは、まず、標的タンパク質の D-タンパク質を化学合成し、それに結合活性を有する VHH 抗体配列をスクリーニングによって取得する。次に、取得した配列情報に基づき、D-アミノ酸

を用いて VHH 抗体を化学合成する、というプロセスである。本研究では、この鏡像ディスプレイ法を実施するために、スクリーニングに用いる MCP-1 の鏡像体 (D-MCP-1) を、確立済みの L-MCP-1 の化学合成プロセスに倣って合成を行った。次に、ファージ上に VHH 抗体を提示させたライブラリーを作製した。VHH 抗体の 3 種類の相補性決定領域 (CDR: Complementarity-Determining Region) のうち、CDR3 のみをランダム化したものや、CDR1 ~CDR3 全てをランダム化したもの等、計 8 種類のライブラリーを設計、作製した。しかし、以上のライブラリーを用いて D-MCP-1 を対象としたスクリーニングを行ったが、いずれもファージの濃縮は認められなかった。

そこで、スクリーニングのヒットの効率を上げるために、ファージディスプレイでの免疫ライブラリーを作製する目的で、アルパカに D-MCP-1 の免疫を行うこととした。D 体のタンパク質は免疫原性を示さないことが考えられたため、キャリア (KLH) とのコンジュゲートが動物体内で抗体を強制的に誘導できるかどうかの事前検討を行った。具体的には、D-MCP-1 の断片化ペプチドを KLH にコンジュゲートし、BALB/c マウスに単回投与した。その結果、C 末端領域の KLH-ペプチドを投与したマウスにおいて高い抗体の産生が認められた。この結果を受け、アルパカに対し、D-C41 ペプチド (D-MCP-1 の C 末端 41 アミノ酸残基からなるペプチド) の KLH コンジュゲートを免疫した。その結果、VHH を含む IgG<sub>2</sub> および IgG<sub>3</sub> では、D-C41 ペプチドに対する吸光度が特異的に上昇した。以上の結果から、D-C41 に対する免疫が成立したとして、62 日目の末梢血単核細胞 (PBMC) を採取し、Total RNA を用いて免疫ライブラリーを作製した。D-MCP-1 を用いたバイオパニング産物からモノクローンのファージを選択し、結合実験を実施した結果、D-MCP-1 に特異的に結合するファージクローンが 3 種類得られた。

次に、ファージクローンの配列情報をプラスミドベクターに組み込み、大腸菌株を用いて組換え体 VHH 抗体を作製した。表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて解析を行ったところ、3 種類の組換え体 VHH 抗体はいずれも D-MCP-1 に対して濃度依存的なレスポンスを示した。最も良好なレスポンスが確認された VHH (B6) 抗体の配列をもとに、D-VHH 抗体を化学合成した。SPR 解析の結果、取得した D-VHH 抗体は L-MCP-1 のみならず D-MCP-1 にも結合することが明らかとなった。この結果は予想外であったが、体内には D-MCP-1 は存在しないため、今後、他の分子への非特異的吸着が無い場合は薬剤として利用可能となる可能性があると考えている。

## 2) VEGF-A 機能阻害剤としての D-VHH 抗体の取得

確立済みの化学合成プロセスに倣って His タグ標識 L-VEGF-A および D-VEGF-A の化学合成を実施した。この D-VEGF-A を標的にして、(1) にて作製した VHH ライブラリーを用いてスクリーニングを行ったところ、3 種類のクローンを得た (クローン#1-3)。次世代 DNA シーケンス解析の結果、これらクローンはいずれも回収された全ファージのうち、カウント数が上位の配列であった。一方、L-VEGF-A に対しても同様のスクリーニングを行い、クローン#4 を得た。これらのファージクローンを用いて、L-/D-VEGF に対する結合実験を行ったところ、#1-3 は L-VEGF に、#4 は D-VEGF に、それぞれの鏡像体と比較して 100 倍以上の数のファージが結合した。

次に、それぞれのクローンの配列をプラスミドベクターに組み込み、大腸菌株を用いて組換え体 VHH 抗体を作製した。組換え体 VHH と VEGF の相互作用を SPR によって解析したところ、いずれのクローンにおいても良好な結合が認められ、特にクローン#3 において最も高い親和性がみられた。最も親和性の高かったクローン#3 の配列に基づき D-VHH の化学合成を行った。研究項目 (1) と同様のプロセスにて合成した。その結果得られた D-VHH は、CD スペクトルにおいて組換え体 L-VHH とほぼ鏡像関係であることが示された。続いて、得られた D-VHH と L-VEGF の親和性を SPR にて解析した。その結果、D-VHH の濃度依存的に L-VEGF へのレスポンスが認められ、解離定数 ( $K_D$  値) は  $287 \pm 9$  nM を示した。

最後に、D-VHH #3 における VEGF-VEGFR 間の結合阻害効果を調べる目的で、競合阻害実験を行った。その

結果、コントロールとして用いた L-VHH #4 では阻害効果が見られた一方、D-VHH #3 は最大濃度 (10 μM) においても阻害効果を示さなかった。この結果から、今回得られた D-VHH #3 は VEGF の受容体への結合部位とは異なる部位に結合することが示唆された。

本研究項目で得られた D-VHH は、L-VEGF-A に結合し、D-VEGF-A には結合しなかったことから、鏡像関係にある分子を識別することが明らかにされた。この結果は、抗体分子の鏡像ディスプレイ法のコンセプトを示した初めての例である。今後はスクリーニングで得られたその他のクローンについても調べ、VEGF の機能阻害効果を有するものを獲得する予定である。

### 3) D-VHH 抗体の免疫原性・生体内安定性の評価

まず、L-Caplacizumab 単量体の化学合成ルートを確立した後に、L-Caplacizumab 単量体、および、D-Caplacizumab 単量体の大量合成を完了した。次に、BALB/c マウスに対して頻回投与することで、L-/D-Caplacizumab 単量体の免疫原性を調べた。その結果、L 体を投与したマウス血清には抗薬物抗体が抗原濃度依存的に検出されたのに対し、D 体投与マウスでは、腹腔投与と皮下投与の投与経路に依らず抗薬物抗体ほとんど検出されなかった。以上の結果から、D-VHH 抗体は免疫原性をほとんど有さないことが明らかにされた。

次に、D-VHH 抗体の体内動態を調べるために、放射性プローブ (<sup>111</sup>In) 標識をした L-VHH および D-VHH を作製した。マウスに尾静脈投与した後に時間経過ごとに臓器を回収し、放射活性を測定した。その結果、L-VHH および D-VHH で優位な差は認められず、大部分が腎臓に集積したものの脳への移行は検出されなかった。また、腎組織以外は1時間後にはほぼシグナルは消失していた。以上のことから、D-VHH の体内動態は L-VHH と同様に腎排泄を受け、体内動態の違いはほとんどないことが明らかとなった。

また、(2) にて同定された VEGF-A に対する L-VHH および D-VHH (クローン#3) についても同様に免疫原性試験を行った。その結果、Caplacizumab の試験結果と同様に、D-抗 VEGF-A VHH 抗体を投与した群において、ほとんど抗薬物抗体は産生されなかった。以上から、2 種類の D-VHH 抗体 (D-Caplacizumab 単量体および抗 VEGF-A D-VHH 抗体) において、再現性をもって D-VHH 抗体が免疫原性を有さないことが示された。

Administering therapeutics such as antibodies sometimes lead to the production of anti-drug antibodies (ADAs) in patients, resulting in reduced therapeutic efficacy. In this project, by focusing on the idea that mirror-image antibodies with all sequences consisting of D-amino acids are protease-resistant, we aimed to provide D-protein VHH antibodies against chemokines with reduced level of ADAs. Here, we have constructed a platform to efficiently identify mirror-image VHH antibodies (D-VHH antibodies) by combining technologies to screen peptide sequences that bind to target molecules and to chemically synthesize VHH antibodies. In particular, as shown in the following three specific aims, we established the concept of mirror-image VHH antibodies as a novel design technology by investigating the activity, pharmacokinetics, and immunogenicity of D-VHH antibodies using chemokines, such as MCP-1 (CCL2), a cytokine involved in inflammation and fibrosis, as the target molecules.

#### 1) Identification of D-VHH antibodies against MCP-1

Throughout the project, a mirror-image display screening was used to obtain D-VHH antibodies with binding activity against cytokines. First, the D-protein of the target protein is chemically synthesized, and VHH antibody sequences with binding activity to the D-protein are obtained by phage biopanning. VHH antibodies are then chemically synthesized using the D-amino acids based on the obtained sequence information. In this study, to perform the mirror-image display screening, D-MCP-1 was synthesized following the established chemical synthesis process of L-MCP-1. Next, libraries of VHH antibodies displayed on phage were prepared, including eight different libraries in which only CDR3 of the three complementarity-determining regions (CDRs) were randomized or all of CDR1 to CDR3 were randomized. However, none of the above libraries were enriched when screened for D-MCP-1. Therefore, we switched our strategy to an immune library by immunizing alpaca with D-MCP-1. Since it was considered that the D-MCP-1 was not immunogenic by itself, D-MCP-1 was conjugated with a carrier protein (e.g. KLH). Immunization with the KLH conjugate showed significantly high antibody titration in the serum. The resulting immune library was used for biopanning against D-MCP-1 and monoclonal phages were selected. After the binding experiment, three phage clones that bind specifically to D-MCP-1 were obtained. Analysis of surface plasmon resonance (SPR) using recombinant VHH antibodies showed that all three recombinant VHH antibodies exhibited a concentration-dependent response to D-MCP-1. Based on the sequence of the VHH (B6) antibody that showed the best response, a D-VHH antibody was chemically synthesized. Unexpectedly, SPR analysis revealed that the obtained D-VHH antibody bound not only L-MCP-1 but also D-MCP-1. We anticipate that, since D-MCP-1 is not present in the body, it could be used as a drug unless there is non-specific binding to other molecules.

#### 2) Identification of D-VHH antibodies against VEGF

To obtain D-VHH antibodies, chemical synthesis of His-tagged L-VEGF-A and D-VEGF-A was carried out following the established method. Screening using the VHH library (1) against D-VEGF-A resulted in identification of three clones (clones #1-3) that were the top sequences among all recovered phages. SPR analysis for the interaction between the recombinant VHH antibodies and VEGF demonstrated significant binding with all clones, with clone #3 exhibiting the highest affinity. Based on the sequence of clone #3, chemical synthesis of D-VHH was carried out using the same process as (1). The affinity of the obtained D-VHH and L-VEGF was analyzed by SPR, showing a specific response to L-VEGF and a dissociation constant (KD value) of  $287 \pm 9$  nM.

### 3) Immunogenicity of D-VHH

First, a route of chemical synthesis for monomeric L-Caplacizumab was established, followed by the large-scale synthesis of both L-Caplacizumab and D-Caplacizumab monomers. The immunogenicity of the L- and D-Caplacizumab monomers was evaluated by multiple administration to BALB/c mice. As a result, anti-drug antibodies were detected in the serum of mice treated with L-Caplacizumab monomer, while little anti-drug antibodies were detected in mice treated with D-Caplacizumab monomer, regardless of the administration route (intraperitoneal or subcutaneous route). The immunogenicity of L-VHH and D-VHH (clone #3) against VEGF-A, identified in (2), was also tested. As a result, little anti-drug antibodies were produced in the group treated with anti-VEGF-A D-VHH antibodies. Collectively, our studies demonstrated that D-VHH antibodies have little immunogenicity.