

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：蛋白質連結反応による二重特異性抗体医薬品作製法に関する研究開発
Study of bispecific antibody drugs constructed by protein ligation

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：真壁 幸樹
Koki Makabe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人山形大学 大学院理工学研究科 教授
Yamagata university, Graduate school of science and engineering, professor

II 研究開発の概要

[研究背景] 抗体医薬品はがんなどの幅広い疾患の治療薬として確固たる地位を占めている。しかし、高額であり、また標的の枯渇などの課題があるため、少量で従来の抗体の効果を超えた次世代の抗体医薬品の開発が進められている。それらの中で、二重特異性抗体は一分子で二種類の抗原に同時に結合でき、がん細胞と免疫細胞に同時に結合できるタイプは有望な次世代がん治療薬として研究されている。本研究では、これまでの二重特異性抗体の作製で問題となっていた理論収率の低さや製造コストの高さ、小型抗体の安定性が低いなどの問題を、蛋白質同士を連結することができる連結ユニットを用いて克服する。具体的には、既存の抗体医薬品を基にして、蛋白質連結反応によって、IgG 型二重特異性抗体 ([A]課題) および主鎖が環状化した小型二重特性抗体 ([B]課題) の二種類のタイプの作製と評価を行った。抗体医薬品を中心としたバイオ医薬品の高い薬価は社会問題となっており、低濃度で治療効果の高い二重特異性抗体を副産物がない高い効率で作り出せるようになれば、製造コストを引き下げることが可能となる。また、微生物による安価で大量の調製が可能になる。これによって高齢化社会を迎えた先進国で問題となっている社会保障費の抑制に繋がると期待できる。

[研究成果] 研究成果について年度ごとに述べる。

初年度である令和 2 年度は連結酵素を融合した、各種抗体分子の作製から開始した。目的蛋白質配列をコードする遺伝子配列を設計し、人工遺伝子合成サービスに遺伝子の合成を依頼した。環状二重特異性抗体と通常の二重特異性抗体は微生物発現系では分子サイズが大きいため、まず、動物細胞発現系での検討を行い、引き続き微

生物細胞での発現を検討した。動物細胞の培養系では、付着細胞、浮遊細胞それぞれ蛋白質の発現を行い、浮遊細胞による発現で良好な収量が得られることを見出した。さらにシャーレスケールから 100 mL 規模まで規模を拡大し、収量を維持したまま規模を大きくすることにも成功している。得られた目的蛋白質の精製方法に関して、His タグを融合した構成では Ni-NTA カラムを用い、Fc 領域をもつ構成では ProteinA カラムを用いて精製を行った。これまで、目的蛋白質の発現と精製に成功しており、さらに、いくつかの構成では連結反応の検討を進めた。連結反応では、想定通りの反応が起こらない組み合わせが見つかったため、連結酵素の種類や連結部位の配列を試みる予定である。

2 年目である令和 3 年度は、令和 2 年度に作製した[A]IgG 型二重特異性抗体、および [B]環状小型二重特性抗体の発現ベクターに基づいて蛋白質の作製を進めた。[A]課題 IgG 型二重特異性抗体については、前年度までに IgG の片方の Fab の連結反応に成功していたが、残りの一方の Fab については連結反応が成功していなかった。このため、連結部位のアミノ酸配列を検討し、更に異なった分離インテインの適用などを検討し、連結反応が進行する条件の検討を行った。結果、異なった分離インテインの利用では反応の進行は確認できなかったが、連結部位アミノ酸配列を改変した変異体で連結反応に成功した。反応生成物を Fc および Fab に特異的なカラムを用いて精製し、目的産物の精製に成功した。Her2 陽性細胞と CD3 陽性細胞を用いたフローサイトメトリーにより、抗原への結合能を確認した。細胞傷害性試験から活性化 T 細胞を介した抗腫瘍活性の増強が確認できた。[B]課題 環状小型二重特性抗体では、環状化反応後に目的蛋白質が生成することを確認し、Ni-NTA カラムとゲルろ過による精製を行った。目的産物が高い抗腫瘍活性を持つことを細胞傷害活性試験で明らかにした。追加配分で導入した相互作用測定装置と動物細胞振盪培養装置により予備的な測定結果を得ており、最終年度での研究進展が加速されている。

最終年度である令和 4 年度は、これまでに作製してきた[A]IgG 型二重特異性抗体、および [B]環状小型二重特性抗体を用いて実験を進めた。昨年度までに、連結反応に成功し、[A][B]両課題の目的産物の作製に成功している。[A]IgG 型では通常の IgG 型と同等のサイズの分子であることをサイズ排除クロマトグラフィーで確認し、また、熱安定性も IgG と同様な安定性であることを示差走査型蛍光法によって明らかにした。Biacore によるがん抗原への結合活性測定ではおや抗体の Fab と同程度の結合活性を示した。[B]の小型環状化二重特異性抗体では示差走査型蛍光法によって直鎖状小型二重特異性抗体と同程度の安定性であることを確認した。昨年度に小型環状化二重特異性抗体の高い抗腫瘍活性を *in vitro* 試験によって明らかにしていたので、マウス腫瘍移植モデルによる抗腫瘍活性評価に進んだ。マウスモデルでの測定は、研究開発計画における最終段階と位置づけており、そこまで計画通り完了できた。結果は、小型環状化二重特異性抗体の収量が比較的低いため、高濃度条件でのマウス測定に十分な量の調製ができなかったため抗腫瘍活性は観察できなかったが、どの程度の濃度を用いるべきかの指針を明確にできた。

[研究意義] 本課題の目的であった二種類の異なったタイプの二重特異性抗体の作製に成功した。特に[B]課題の環状小型二重特異性抗体では *in vitro* にて低い濃度での活性を見出した。高い活性を持つ新しい二重特異性抗体

の発見は新しい治療薬の候補となる。今後は社会実装を目指した実用化を進め、実際の治療に使えるところまで展開していきたい。

[Background]

A bispecific antibody (bsAb) has two different antigen recognition sites in one molecule and can bridge two antigens simultaneously. Such property makes the bsAb as a promising next-generation antibody drug. Though its high potency, difficulty in production of bsAb limits its applicability.

To overcome the limits, here we propose the use of intein technologies to create bispecific antibodies. In this proposal we will plan to create two types of bsAbs. One is an IgG-type bsAb [project A] and another is a small bsAb with a circular backbone structure [project B].

[Results]

[Project A] Construction of IgG-type bsAb using intein technology.

To construct the IgG-type bsAb, we used specifically ligation. Two Fab parts and a Fc part were separately constructed with ligating units. The separately prepared pieces were expressed and purified, then these portions were ligated in one tube. The target bsAb was purified by protein A and L columns. The product was evaluated by biophysical techniques to confirm whether the affinity toward the two different antigens were conserved.

[Project B] Construction of circular bispecific scFvs using intein mediated reaction.

Small bsAb such as tandem scFvs, also known as BiTE, is small in size and can penetrate the cancer tissue. By using the ligation technology, completely new type of small bsAb with the circular backbone can be created. If the bsAb connected circularly, the antigen binding loops positions to opposite directions and thus it could be the desirable orientation for two different antigens.

We constructed a circular tandem scFv via terminal ligation. The resulting circular tandem scFv, termed Cyclobody Ex3, was evaluated by flowcytometry to evaluate the target binding activity. We found Cyclobody Ex3 had target binding activity to two different antigens. Then we evaluated the in vitro cytotoxic activity. We found Cyclobody Ex3 showed higher cytotoxic activity comparing with the tandem one.

Our results obtained in this project will expand the molecular construction technology for bsAb construction.