

# 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：環状一本鎖抗体を構成ユニットとする二重特異性抗体の基盤技術開発

Development of technology for bispecific antibodies composed of cyclic single-chain antibodies

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：森岡 弘志

Hiroshi Morioka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人熊本大学大学院生命科学研究部（薬） 教授

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Professor

## II 研究開発の概要

現在、数多くの抗体医薬品が利用され、新たな医療用抗体の開発も進んでいる。しかし、抗体の標的が細胞外に限定されるため、標的分子の枯渇が指摘されている。そのため、単純な抗体医薬品から高度な技術を要する次世代抗体へと開発の主戦場がシフトしつつある。がん細胞と T 細胞を一過的に架橋することで効率的にがん細胞を殺傷する二重特異性 T 細胞誘導抗体 (BiTE 抗体) は、次世代抗体の一種である。BiTE 抗体は開発難易度が高く、通常の抗体医薬品に比べてより長い開発期間を要する。一本鎖抗体 (scFv) は、抗体の可変領域 (VH および VL ドメイン) をペプチドリンカーで連結させた分子量約 27,000 の低分子抗体である。scFv は、大腸菌などの微生物でも比較的容易に大量調製が可能であり、かつ、高機能化を目的とした遺伝子操作および細工が容易であるという特長を有する。そのため、BiTE 抗体の構成部品としての有用性が高い。一方で、scFv は、溶液中では VH と VL が近接した「閉じた状態」と解離した「開いた状態」の平衡にあり、特に「開いた状態」では scFv 同士の VH と VL の分子間相互作用により会合体、さらにはより大きな会合凝集体を形成する。この scFv 特有の凝集性は、均質性の低下や免疫原性などの問題を引き起こし、scFv の実用化の障害となっている。本研究開発の代表者らは scFv の N 末端と C 末端をペプチドリンカーで連結させた環状 scFv を創製し、低分子抗体としての特徴を保持しつつ、凝集性の問題を解決できる画期的な分子を見出している。一方で、環状 scFv には末端がないために融合タンパク質を作製することが困難である。本研究課題の目的は、① 環状 scFv を二重特異性抗体に加工するためのケミカルライゲーション法を開発し、② その生物活性を評価することで環状 scFv を新たな低分子二重特異性抗体フォーマットとして確立することである。

上記研究目的を達成するために、本研究課題では以下の 1～4 の技術を確立した。

## 1. 環状 scFv の生産に適した大腸菌発現系の構築

scFv は分子内にジスルフィド結合を有する。大腸菌体内は還元環境にあるため、一般に大腸菌体内で scFv を発現させると正しいジスルフィド結合が形成されず、正しい構造に折りたたまれない。そのため、通常では、封入体に含まれる scFv を回収し、変性剤存在下で可溶化した後に再活性化（巻き戻し）操作により調製されるが手間と時間がかかる。これまでに、代表者らはジスルフィド結合が形成されやすいように改変された市販の大腸菌とシャペロン共発現系を組み合わせることで scFv を大腸菌体内に活性を有する状態で発現させることが可能であることを明らかにしてきた。本研究課題では、共発現タンパク質を工夫することで、大腸菌体内インテイン反応を利用した環状 scFv 調製法の改良を進めた。

酵母由来のスルフヒドリルイソメラーゼ (Erv1p) および大腸菌由来のジスルフィドイソメラーゼ (DsbC) を共発現させるためのプラスミドを構築し、これを市販の大腸菌株 (Shuffle T7) に対して組み込んだ大腸菌株を作製した。これを用いることで、環状 scFv を効率的に調製することが可能となった。また、本発現系は、多くの種類の環状 scFv および非環状 scFv において、Shuffle T7 とシャペロン共発現を組み合わせた以前のシステムに比べて収量が高かった。また、環状 scFv の物理化学的評価のために用いた抗原タンパク質のいくつかは本発現系を適用して調製した。そのため環状 scFv の応用研究を進める上で有用であるだけでなく、ジスルフィド結合を有するタンパク質の研究に広く適用可能な有用な技術と考えられる。

## 2. 糊化デンプンを用いたマルトース結合タンパク質の分離手法の開発

大腸菌体内インテイン反応を利用した環状 scFv 調製において、大腸菌における発現効率、菌体内での可溶性の向上を目的として、発現の際にマルトース結合タンパク質 (MBP) を N 末端に付加したコンストラクトとして発現させている。このコンストラクトは、発現・折りたたみ後に、大腸菌体内で自発的にインテイン反応が起こり、環状 scFv は MBP から切り出されると同時に環状化反応が進行する。環状 scFv の精製において、MBP を除去する過程が必要であるが、この際、市販のアミロース固定化樹脂を用いていた。この担体は、15 mL で 45,000 円程度と高価であり、かつ、大腸菌に含まれるアミラーゼにより担体が徐々に失活するため再利用すると結合容量が低下する。そのため、アミロース固定化樹脂に替わる、安価で使い捨て可能なクロマトグラフィー担体の開発が必要であった。デンプンがアミロースと、分岐構造を持つアミロース類似体であるアミラーゼから構成されることに着目し、デンプンによる MBP について検討した。その結果、デンプンを水中で加熱して糊化し、洗浄操作を繰り返すことで調製した安価で使い捨て可能なクロマトグラフィー担体として利用可能であることを見出した。本手法は MBP 融合タンパク質の精製に広く利用可能な技術であり、本研究課題において使用した抗原タンパク質の一部は本手法を用いて精製した。

## 3. 計算化学的手法に基づく抗体物性の迅速改善法の開発

分子動力学法 (MD) により scFv の熱安定性を向上させる手法の構築を行った。短い MD (50 ns × 3 runs = 150 ns) によりゆらぎが大きい領域 (Weak spot) を特定し、その領域のゆらぎを抑える変異をコンピューター上で作成し、再度短い MD (50 ns × 3 runs = 150 ns) により評価することで熱安定性が高い抗体クローンを取得する手法を構築した。この手法を 2 種類の scFv に適用し、熱変性温度を 5°C 以上向上させることに成功した。要求される計算リソースは小さく、計算に要した時間は、九大にある GPU 搭載ノード (1 ノードあたり CPU (Intel Xeon Gold 6140, 18 cores/CPU) × 2、GPU (NVIDIA Tesla P100, 3584 CUDA cores/GPU) × 4 を搭載) を 3 ノード使用した場合には、1 クローンにつき 6 時間程度であった。GPU を搭載した中程度の性能の PC があればラボの PC でも実施可能であり、実用的な手法と言える。

#### 4. ビスマレイミドリンカーを用いた環状 scFv の BiTE 抗体への加工技術の開発

マレイミド基を両端に有する市販の PEG リンカー (ビスマレイミドリンカー)を用いた環状 scFv の二重特異性抗体への加工法を開発した。リンカーは安価に入手可能であるが、2種類の環状 scFv と PEG リンカーを単純に混合させて反応させた場合には、2種類のホモダイマーと1種類のヘテロダイマーが形成され、100%反応が進行した際には目的とするヘテロダイマーの割合は50%である。一般に環状 scFv は電荷および分子量が近い場合、ホモダイマーとヘテロダイマーの分離は困難であり、選択的にヘテロダイマーを生成する反応プロトコール上の工夫が重要である。反応の手順、溶液条件、精製条件を工夫することで、ヘテロダイマーを選択的に生成可能な手法を構築した。収率の点で課題はあるため、今後も生成法の改良が必要であるが、*in vitro* 生物活性評価およびマウスを用いた *in vivo* 生物活性評価に必要な量の BiTE 抗体の作製に成功した。PEG リンカーの長さや環状 scFv の組み合わせを変えて調製した複数の BiTE 抗体について、細胞系を用いた市販のキットを用いて評価したところ、環状 scFv だけでは活性を示さないが BiTE 抗体とすることで細胞障害活性を示すこと、また、細胞傷害活性の EC<sub>50</sub> と同等の濃度域でサイトカインが分泌されることが確認され、本手法で構築した二重特異性抗体が BiTE 抗体として機能していることが確認された。

Various antibody drugs are currently used in clinical, and new antibody drugs are under development. However, the targets of antibodies are limited to the extracellular space, depletion of target molecules has been pointed out. Development research is shifting from the normal IgG type antibody drugs to the next-generation antibodies that require sophisticated technologies. The next-generation antibody drug involves BiTE antibody (bispecific T-cell Engager), antibody-drug conjugate (ADC), biparatopic antibody and small antibody (single chain Fv (scFv) and VHH antibody). Of these, the BiTE antibody, which efficiently kill cancer cells by transiently cross-linking cancer cells and T cells, are one of the plausible targets for drug discovery.

Single chain Fv antibodies (scFv) are low molecular weight antibodies with a molecular weight of 27,000 consisting of the variable regions (VH and VL domains), which are connected by a flexible peptide linker. In general, scFv antibody can be expressed by using microorganisms such as *E. coli*, and can be prepared in a shorter time as compared to IgG type antibody, which is usually expressed by using eukaryotic cells (*e.g.*, CHO cells). Moreover, small molecular size of scFv enables easy genetic manipulation and engineering to produce highly functional molecules. Therefore, scFv antibodies are regarded as a useful component for construction of BiTE antibodies. On the other hand, scFv antibodies are in equilibrium between the "closed state" in which VH and VL are assembled and the "open state" in which VH and VL are dissociated in solution, and the "open state" form tend to form oligomers and even larger aggregates through intermolecular molecular VH-VL interactions. This aggregation propensity of scFv protein causes serious problems such as reduced homogeneity and immunogenicity, which prevents the practical use of scFv antibodies. The principal investigators of this research have created a cyclic scFv by linking the N- and C-termini of the scFv with a peptide linker, and have discovered an innovative molecule that solves the aggregation problem without disrupting antigen binding affinity and without largely increasing molecular size. Cyclic scFv, however, does not possess N- and C-terminus, making it difficult to create fusion proteins. The objectives of this research project are to (1) develop a chemical ligation method to process cyclic scFv into bispecific antibodies and (2) establish cyclic scFv as a new small molecule bispecific antibody format by evaluating its biological activity.

To achieve the above research objectives, the following 1-4 techniques were established in this research project.

1. Establishment of an *E. coli* expression system suitable to produce cyclic scFv.
2. Development of a separation method for maltose-binding proteins by using gelatinized starch.
3. Development of a fast method to design thermostable scFv mutants based on the computational chemistry.
4. Development of processing technology of cyclic scFv into BiTE antibody using bismaleimide linker.