日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 完全ヒト抗体×ファージライブラリによる組織特異的移行性抗体 AccumBody の開発と次世代複合バイオリジクスへの応用

(英語) Development of tissue-specifically delivering antibody AccumBody via fully human antibody/phage library technologies and its application for next generation multifunctional biologics

研究開発実施期間: 令和 元年 10月1日～令和 6年 3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 伊東 祐二
(英語) Ito, Yuji

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人 鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授
(英語) Kagoshima University・Graduate School of Science and Engineering・Professor

II 研究開発の概要

本課題では、日本発の独自技術開発により、今や医薬品の主役と言える存在になった抗体医薬品の次世代型医薬品の創製に向け、本分野での国際競争力を高めることを目標とした。この達成のため着目したのが、『送達分子としての抗体+活性を担う分子』の組み合わせからなる複合バイオリジクスであり、組織特異性が高い抗体 AccumBody と治療用薬剤を連結することで、中枢、腸、筋を標的とした疾患領域での『標的組織に効率よく送達され長期に滞留するような治療効果の高い医薬品』の創出を目指した。

本課題では、鳥取大学の持つ人工染色体による完全ヒト抗体産生技術 (TC) と、鹿児島大学のファージライブラリ技術を融合した技術 (TC×Phage 技術) に加え、東京薬科大学の薬効評価技術、鹿児島大学の部位特異的修飾法による抗体の高機能化技術を駆使することで、組織移行性抗体 AccumBody による多機能性複合バイオリジクス医薬群の創出を、以下の5つの研究目標、その中で設定した開発項目に従って推進した。各研究目標に対する研究開発の成果およびその意義等について

報告する。

1) 研究目標 1 : 脳移行性抗体による多発性硬化症治療薬の創出 脳への薬物送達が可能で脳移行性抗体 (脳 AccumBody) の特定とともに、多発性硬化症をモデル疾患として、これに対する治療効果を持つ薬剤と脳 AccumBody を連結・融合したバイオリグクスを調製して、その薬効を評価することを目標とした。

開発項目① : 脳移行性 AccumBody の開発 前 AMED 事業である「先端的バイオ事業」の中で見出した、脳への滞留機能を持つ抗体、即ち抗 MOG、抗 CADM-3、抗 CSPG-5 抗体のマウスを使った機能の検証を進めるとともに、新たな脳 AccumBody の単離を、TC×ファージ技術を使って進めた。その結果、抗 MOG、抗 CADM-3、抗 CSPG-5 抗体の機能性の評価とともに、新たに 1 種の抗原に対する脳 AccumBody を特定した。現在、特許出願に向け、機能性の評価を進めている。

開発項目② : 脳 AccumBody と生理活性物質との連結による脳移行性治療薬の開発 脳 AccumBody と脳ミエリンの形成促進効果を有する生理活性物質の融合体を作製した。この融合体の脳組織移行性を見るため、蛍光標識した融合体をマウスに投与し、24、48、72 時間後に灌流後、摘出した脳の蛍光イメージングを行い、脳組織への移行を確認した。次に、脳の炎症に対する治療効果を、多発性硬化症 (EAE) モデルマウスを使って検証した。しかしながら、融合体の低投与量では、ある程度の有効性がみられたものの、投与量を増加させても、治療スコアの改善は見られず、むしろ、スコアの憎悪が見られた。この原因については解明中である。現在、脳移行性技術として、血液脳関門 BBB に高発現するトランスフェリン受容体 TfR に対する抗体を使った手法が多く試みられているが、我々の脳 AccumBody は、TfR による脳移行性とは異なるパスウェイで脳送達を達成する技術である。本研究で得られた情報は、脳への薬物送達を達成する新たな技術確立に向けた極めて有用であると考えている。

2) 研究目標 2 : 腸移行性抗体による炎症性腸疾患治療薬の創出 腸への薬物送達が可能で腸移行性抗体 (腸 AccumBody) の特定と、炎症性腸疾患に対する治療効果を持つ薬剤 (R-spondin) と腸 AccumBody とを連結・融合した複合型バイオリグクスの薬効を評価することを目標とした。

開発項目③ : 腸移行性 AccumBody の開発 腸移行性抗体、即ち腸 AccumBody として、TC×ファージ技術により、抗 GPA33 抗体を単離した。蛍光標識した抗 GPA33 単鎖 Fv-Fc を、マウスに静注投与すると、腸に特異的に移行し、24 時間後に腸での滞留が最大となった。蛍光強度の比較から、コントロール抗体に比べ、24 倍もの移行が確認された。この結果と次項の治療効果のデータをもとに、特許出願 (特願 2022-186944, PCT/JP2023/041789) を行った。

開発項目④ : 腸 AccumBody と生理活性物質との連結による腸移行性治療薬の開発 腸移行性治療薬の開発に向けて、腸組織再生因子である R-spondin との連結体、融合体を作製し、腸炎症モデルである DSS マウスモデルを使った評価を行った。

抗 GPA33 単鎖 Fv 抗体と、R-spondin もしくはその活性ドメインの連結体、融合体を種々作製し、それらのマウス腸オルガノイドに対する増殖活性を評価した。R-spondin1-Fc (陽性コントロール) の活性発現に必要な最小量が 200 ng/mL であるのに対し、融合体は、わずか 0.8 ng/mL での活性が確認された (活性は 200 倍以上)。さらに、定量的レポーターアッセイによる Wnt シグナルの評価では、融合体は、陽性コントロールの 1/3000 の低用量で、細胞へのシグナル伝達を起こすことが分かった。そこで、DSS 投与による腸炎症モデルマウスでの評価を行ったところ、融合体では、有意な腸炎症病態スコアの改善と、腸組織の炎症・組織破壊からの回復が病理学的解析により確認された。

以上の様に、腸 AccumBody と腸組織再生因子の融合体は、腸炎症病態に対する高い治療効果を示しており、本研究のコンセプト『送達分子としての抗体+活性を担う分子』の組み合わせからなる

複合バイオロジクスの有用性を示した結果である。このコンセプトをさらに、他のモダリティへと応用した治療薬への展開が期待される。

3) 研究目標3：筋移行性抗体による Duchenne 型筋ジストロフィー治療薬の創出 筋への薬物送達が可能筋移行性抗体（筋 AccumBody）の特定とともに、Duchenne 型筋ジストロフィーをモデル疾患として、これに対する治療薬 Eteprilsen と筋 AccumBody とを連結した抗体核酸複合体の薬効を評価することを目標とした。

開発項目⑤：筋移行性 AccumBody の開発 TC×Phage 技術により、筋肉組織に比較的高発現している Tfr を標的として、筋 AccumBody の単離を進めた。抗体ファージライブラリ構築後、ヒトとマウス Tfr に交差活性を持つヒト抗体（単鎖 Fv）の単離を試みたが、ヒト、マウスそれぞれに特異的な抗体は単離できるものの交差活性を持つ抗体の単離に至らなかった。そこで、ヒトとげっ歯類 Tfr を免疫したアルパカ由来の VHH 抗体ライブラリからバイオパンニングを行い、最終的にヒトとマウス Tfr に交差活性を有する VHH に対する抗体（VHH 抗体）の単離に成功した。この VHH-Fc の筋 AccumBody の蛍光標識を行い、尾静脈から投与 3 時間後に灌流し、摘出した筋組織の蛍光イメージングを行った結果、コントロール抗体に比べ、8 倍（大腿筋）の蛍光強度を示したことから、この抗体を筋 AccumBody として利用することとした。

開発項目⑥：筋 AccumBody と生理活性物質との連結による筋移行性治療薬の開発 Duchenne 型筋ジストロフィー治療薬として、すでに上市されているエキソンスキッピング誘導モルフォリノ核酸 Eteprilsen を、筋 AccumBody と連結することで、筋肉への薬物送達が向上した抗体核酸複合体の創製を進めた。本研究で開発した（開発項目⑩参照）抗体部位特異的コンジュゲート手法である tCAP 法により筋 AccumBody (VHH-Fc) の Fc の Lys248 にアジド基を導入し、DBC0 化した Eteprilsen を混合してクリック反応により連結を行い、コンジュゲート化した。まず、ヒト iPS 細胞 (201B7) から筋分化した細胞を使って、コンジュゲートのエキソンスキッピングの効率を確認したところ、Eteprilsen 単独に比べ、10 倍以上の効率の増加がみられた。そこで、コンジュゲートをジストロフィン遺伝子エクソン 49-50 欠損導入マウス (Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウス) に投与し、腓腹筋を使った PCR 産物によるアガロース電気泳動でのエキソンスキッピングの確認を行った。その結果、1-2% のスキッピングに由来する PCR 産物のバンドが検出された。

以上の結果は、筋 AccumBody を使った核酸医薬品の高機能化による治療効果の向上が可能であることを示している。今回用いたコンジュゲートと類似の抗体核酸複合体による高機能化核酸医薬がすでに、臨床試験に進んでいる。このような抗体核酸複合体の開発競争に打ち勝つには、現在の筋 AccumBody による送達機能の強化、増強を進めていく必要がある。

4) 研究目標4：次世代完全ヒト抗体産生マウス 完全ヒト抗体の作製効率向上、および高精度なバイオ医薬品抗原性評価を実現するため、完全ヒト抗体産生動物について以下 2 つの免疫系遺伝子改変を実施した。

開発項目⑦：Ultimmune マウスの開発 複合型バイオロジクスの抗原性評価のためのヒト完全免疫系を有する完全ヒト免疫系マウスの開発を進めた。部分的にヒト免疫系を持つマウスにおいて、免疫系細胞が正常マウスと同等に産生されることを確認した。

開発項目⑧：完全ヒト抗体産生ヌードマウスの開発 AccumBody 開発などに貢献できるヒト抗体産生ヌードマウスの開発に成功した。ヒトがん細胞移植後、固形がん形成を確認し、フローサイトメトリー解析により、完全ヒト抗体産生の条件を検討した。

5) 研究目標5：次世代部位特異的抗体修飾技術 IgG 抗体の高機能化において必要な部位特異的修飾法として、Fc の Lys248 を特異的に修飾する CCAP 法を前プロジェクトで開発したが、

CCAP 法の更なる改良に向けた研究を、試薬の低分子化、VHH を用いた CCAP 法、CCAP 試薬の安定化の 3 つの観点から進めた。

開発項目⑨：低分子化 CCAP の開発（2020 年 11 月開発中止） CCAP 試薬の抗体親和性ペプチドとして 17 残基の IgG 結合ペプチド（IgG-BP）ペプチド用いている。CCAP 法では、最終生成物に IgG-BP が残留するため、CCAP 生成物を医薬品として使用するには抗原性の懸念があった。そこで、残留する IgG-BP の抗原性を減弱させるため、CCAP 試薬の低分子化を試みた。しかし、低分子化の過程で抗体への親和性減少による標識効率の低下が避けられず、開発を中止した。

開発項目⑩：VHH-CCAP の開発 CCAP 試薬として用いている IgG-BP ペプチドの代わりに、Fc 特異的 VHH 抗体を用いた CCAP 法の開発を行った。CCAP 試薬のリンカー部分の改良を並行して進め、部位特異的な結合により Fc と VHH が 1:1 で共有結合複合体を形成する技術を確認した。

開発項目⑪：CCAP 改良 CCAP 法の課題であった CCAP 試薬内の化学的に不安定な構造を改良した 2 つの技術を開発した。一つは、IgG-BP ペプチド内のジスルフィド（SS）結合の改変である。1,1-ジクロロアセトンによって SS 結合の 2 つの硫黄原子間にメチル基を挿入した構造を導入することで、還元剤に対して安定な試薬を創製した。この安定化技術は、抗体精製用ペプチドリガンドへも応用され、アルカリ洗浄にも耐性をもつ抗体精製アフィニティペプチド樹脂を開発し、特許を出願した（特願 2019-193830、特願 2020-186833）。もう一つは、異なる Fc 親和性ペプチド Z34C を用いて進化型 CCAP 法である tCAP 法を開発した。これは、修飾標的 Lys248 の側鎖に、アジド LysGlyGly のみを導入する技術であり、この手法で修飾した抗体は、クリック反応を利用して様々なリガンドを容易に連結できるだけでなく、開発項目⑨での課題でもあった生成物に Fc 親和性ペプチドが残存する問題を解決した手法である。また、この tCAP 試薬は中性条件下では、極めて安定である。この抗体修飾技術に関して、特許を出願した（特願 2021-146504）。

In this project, we aimed to enhance international competitiveness in the field of next-generation antibody drugs, which have become key players in the pharmaceutical industry by developing original technologies from Japan. Focusing mainly on the complex biologics of "antibodies as delivery molecules + molecules responsible for their activity," the goal was to create drugs with high therapeutic efficacy in specific disease areas by linking AccumBody, an antibody with high tissue specificity, with therapeutic agents.

Research Goals and Achievements:

1. Brain-accumulating Antibodies:

Development Item 1: The functionality of antibodies with intracerebral retention was verified, and a new intracerebral AccumBody was isolated.

Development Item 2: We prepared a fusion protein of brain AccumBody with a bioactive substance and evaluated its therapeutic effect against encephalitis using EAE model mice. However, although some efficacy was observed at low doses of fusion, treatment scores did not improve with increasing doses, but rather scores worsened.

2. Bowel-accumulating Antibodies:

Development Item 3: Bowel AccumBody (anti-GPA33 antibody) was isolated using TC x Phage technology and specific targeting to the intestine was confirmed. Patent pending.

Development Item 4: We developed a fusion protein of Bowel AccumBody and R-spondin, and confirmed its high therapeutic efficacy in DSS model mice, demonstrating its effectiveness against bowel inflammation.

3. Muscle-accumulating Antibodies:

Development Item 5: Muscle AccumBody (anti-TfR antibody) was isolated using TC x Phage technology and specific targeting to muscle was confirmed.

Development Item 6: We developed an antibody-oligonucleotide conjugate linking muscle AccumBody and Eteprilsen and confirmed improved exon skipping efficiency in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy.

4. Next-Generation Fully Human Antibody-Producing Mice:

Development Item 7: Fully human immune system mice were developed for antigenic evaluation of complex biologics. We confirmed that the same levels of immune system cells were produced in partially human-immune mice as in normal mice.

Development Item 8: We succeeded in developing human antibody-producing nude mice that can contribute to the development of AccumBody, etc. After transplantation of human cancer cells, solid tumor formation was confirmed, and the conditions for fully human antibody production were examined by flow cytometry analysis.

5. Next-Generation Site-Specific Antibody Modification Technology:

Development Item 9: Attempts were made to miniaturize the CCAP reagent, but development was discontinued due to decreased affinity with the antibody.

Development Item 10: We established a CCAP method using Fc-specific VHH antibody and developed a site-specific conjugation technique using this method.

Development Item 11: The tCAP method was developed to solve the problem of residual Fc affinity peptides in CCAP method, and a patent was filed.

Utilizing these technologies, we aimed to create next-generation antibody drugs with high therapeutic efficacy targeting the brain, bowel, and muscles. This research is a major step toward strengthening Japan's international competitiveness in drug development.