

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



I 基本情報

研究開発課題名: 高性能中分子医薬のスマートデザイン基盤技術開発

Development of AI design technology for creating high-performance middle molecule drugs

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: 門之園 哲哉

Tetsuya Kadonosono

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

国立大学法人東京工業大学・生命理工学院・准教授

Tokyo Institute of Technology・School of Life Science and Technology・Associate Professor

II 研究開発の概要

抗体医薬は治療効果が高い一方で、複雑な構造と大きな分子量 (150 kDa) を持つため化学合成できず、組織浸透性が低いために適用疾患が限られることや、製造コストが高額であることなど、新たな課題が顕在化している。抗体医薬の安価な代替医薬として、分子量が小さく化学合成が可能で、標的結合性を有するペプチド医薬の開発が期待されている。しかし、これまでに標的結合ペプチドが多数報告されているが、いずれのペプチドも抗体と比較すると結合力や特異性が弱く、医薬にまで昇格した例はない。研究開発代表者らは、標的結合ペプチドを足場分子に組み込み、ゆらぎを適切に抑制することで、強い結合力を持つ結合分子 **Fluctuation-regulated Affinity Protein (FLAP)** を創出できることを示してきた。本研究開発では、従来の FLAP デザイン技術を発展させ、機械学習による高性能化ステップを取り入れた FLAP スマートデザインシステムを構築した。また、スマートデザインシステムの必須要素であるスクリーニング技術の企業導出を目標とした。

令和元年度は、フェノタイプ・スクリーニングシステムを構築した。FLAP ライブラリーと抗原を細胞膜上に共発現させ、その中から蛍光標識抗体を利用して抗原結合 FLAP 発現細胞群を同定するシステムの構築を行い、スクリーニングに使用する細胞株とセルソーターによる細胞分取条件を決定した。さらに、FLAP ライブラリーをコードするプラスミドライブラリーを構築した。また、FLAP の体内動態を評価するための技術を確認した。FLAP の足場となる合成ペプチドを近赤外蛍光色素で標識し、マウスに投与して生体イメージングを行ったところ、尾静脈投与あるいは腹腔内投与のどちらの投与方法でも足場ペプチドの体内動態を継続的に観察できることが明らかになった。また、機械学習による高性能 FLAP 予測技術を確認するために、学習モデルと特徴量を検討した。先行研究で取得した抗体や他の機能性タンパク質のデータを使用し、学習モデルとして従来のベイズ最適化

に加えて、ニューラルネットワークを検討した。特徴量として、先行研究で使用した T-scale を含む 10 種類以上の特徴量を検討した。その結果、予測対象のタンパク質や活性の種類ごとに、最適な学習モデルや特徴量が異なるなどの知見を蓄積することができた。

令和 2 年度は、フェノタイプ・スクリーニングシステムと FLAP ライブラリーをコードするプラスミドライブラリーを利用して、乳がんマーカー HER2 に結合する FLAP を細胞膜上に発現している変異細胞群を回収し、次世代シーケンスにより多数の HER2 結合 FLAP 群の遺伝子配列を同定した。続いて、タグタンパク質を融合した FLAP を発現するための遺伝子を、2 段階の PCR により人工合成する条件を最適化し、全ての FLAP 群の遺伝子を合成した。この遺伝子群を鋳型として無細胞合成システムで発現させ、並列 ELISA で HER2 への結合力を測定した。新たに開発した FLAP 融合遺伝子の並列合成技術は、大腸菌などを用いる従来の遺伝子組換えと比べると非常に短時間かつ低コストで遺伝子が調整できる。さらに、無細胞発現システム、並列 ELISA 測定と合わせて、FLAP 候補配列の結合力評価を完全に自動化することも可能になった。本技術は、中分子ペプチド医薬の初期スクリーニングにおいて、汎用的な技術として利用できる。

次に、FLAP 群のアミノ酸配列と HER2 結合力を教師データとして、機械学習により結合力が向上する高性能 FLAP を予測した。前年度に検討した学習モデルと特徴量の中から、FLAP に最適なセットを選択して探索した結果、多数の高性能 FLAP を予測することができた。さらに、次年度に高性能 FLAP の腫瘍組織浸透性および薬効を評価するために、それぞれの評価技術を確立した。腫瘍組織浸透性評価においては、蛍光色素を標識したペプチドを HER2 発現腫瘍の担がんモデルマウスに投与し、組織切片を作成して蛍光観察する技術を確立した。また、薬効評価においては、HER2 発現がん細胞株の増殖抑制作用を評価するシステムを構築した。

令和 3 年度は、前年度までに取得した教師データおよび確立した機械学習による予測技術を利用し、HER2 結合親和性が強化された高性能 FLAP を予測した。予測された上位 2 種の高性能 FLAP (ML-R1 および ML-R2) と、教師データ取得の際に結合力の強かった上位 2 種の FLAP (FS-R1 および FS-R2) を化学合成し、バイオレイヤー干渉法により HER2 への結合力を測定した。その結果、ML-R1 および ML-R2 はそれぞれ解離定数が 10 nM 程度と強く HER2 に結合することが分かった。この値は、FS-R1 や FS-R2 よりも 4 倍以上小さく、研究開発計画で目標としていた結合力を達成した。このように、スマートデザインシステムの構築に成功した。また、システムの企業導出に向けてスクリーニング技術の特許を出願した。

本年度はさらに、高性能 FLAP の薬効、毒性、免疫原性、体内動態を評価した。HER2 発現がん細胞株の増殖抑制作用を測定する薬効評価において、高性能 FLAP は抗体医薬と同程度の抑制作用を示した。マウスの体重変化を指標とする毒性試験では、高性能 FLAP を複数回投与してもコントロールと比べて体重に有意差はなく、毒性は確認されなかった。マウス脾臓細胞の IL-2 産生量を指標とする免疫原性試験では、高性能 FLAP 刺激による IL-2 産生量の増加は認められず、免疫原性は確認されなかった。HER2 発現がん細胞株を皮下移植した担がんモデルマウスの生体イメージングによる体内動態評価では、高性能 FLAP の腫瘍への集積が認められたが、抗体と比べると腫瘍からの消失が速く、この特徴を活かした薬剤開発、あるいは腫瘍内での安定性を高めるための工夫が必要であることが示唆された。

令和 4 年度は、スマートデザインシステムの高度化を目的として、抗原 HER2 に結合する分子を細胞膜上に発現している変異細胞群を高精度に回収するための各種条件を最適化した。続いて、抗原親和性を評価する新規技術を開発し、500 種類以上の分子群の HER2 親和性を一括で評価することに成功した。また、この親和性値を教師データとした機械学習が可能であることを確認した。さらに、機械学習において深層学習による特徴量を利用することで、予測精度を 30% 以上向上させることに成功した。最後に、システムの企業導出に向けてスクリーニング技術の特許を PCT 国際出願した。

令和 5 年度は、スマートデザインシステムの汎用化のために、様々な抗原に結合する分子 (モダリティはペプ

チド、小型タンパク質、ナノボディ、抗体単鎖可変領域フラグメント (scFv)、二重特異性 T 細胞誘導抗体 (BiTE)) の親和性最適化を進めた。各分子に対して活性評価システムを構築し、活性が最大になる親和性を持った変異型分子のデザインを目指した。その結果、抗原 HER2 に結合するペプチドのスマートデザインに成功し、汎用性を示すことができた。一方、抗原によっては機械学習に十分な教師データを取得できなかった例もあり、さらなる高性能化が必要であることも明らかになった。このように、本研究によりスマートデザインシステムの基盤の構築に成功し、汎用化に向けた今後の改良すべき点を明確にすることができた。

本研究開発の成果として、令和元年度～令和 5 年度の間に論文発表 13 件、学会・シンポジウム等における発表 67 件、特許出願 2 件、を達成した。

Antibody drugs are highly effective but face challenges due to their complexity, large size, limited tissue penetration, and high production cost. Peptide drugs offer a cheaper alternative, being smaller, chemically synthesizable, and possessing target-binding properties. However, existing target-binding peptides haven't reached antibody drug efficacy. Our previous research demonstrated the creation of binding molecules with strong affinity, termed Fluctuation-regulated Affinity Proteins (FLAPs), by grafting target-binding peptides from antibody drugs into scaffold molecules and appropriately reducing fluctuation of the peptides. In this research, we constructed the FLAP Smart Design system using machine learning for creating FLAPs comparable to antibody drugs. We also aimed to license Smart Design system technologies to companies.

In 2019, we established a phenotype screening system to identify FLAP-expressing cell populations bound to antigens. This involved co-expressing the FLAP library and antigens on cell membranes, utilizing fluorescently labeled antibodies for detection. We determined suitable cell lines and sorting conditions, and constructed a plasmid library encoding the FLAP. Additionally, we developed a technique to evaluate FLAP pharmacokinetics in vivo using near-infrared fluorescently labeled synthetic peptides administered to mice. For high-performance FLAP prediction via machine learning, we assessed learning models and features, exploring Bayesian optimization and neural networks, along with over 10 features including T-scale. Insights into optimal models and features were gained based on target protein type and activity.

In 2020, we used the phenotype screening system and FLAP library to isolate mutant cell populations expressing FLAPs binding to HER2, a breast cancer marker. Next-generation sequencing identified gene sequences of many HER2-binding FLAPs. We optimized gene synthesis via two-step PCR and expressed them using a cell-free system. Binding affinity to HER2 was measured via parallel ELISA, enabling rapid, cost-effective gene prep, and automation. Machine learning predicted high-affinity FLAPs, yielding numerous candidates. Evaluation methods for tumor tissue penetration and efficacy were established, including fluorescent observation of labeled peptides in tumor-bearing mice and assessing growth inhibition in HER2-expressing cancer cell lines.

In 2021, using previous year's data and machine learning, we predicted and synthesized FLAPs (ML-R1 and ML-R2) with high HER2 binding affinity. Bio-layer interferometry showed their dissociation constant of ~ 10 nM to HER2, indicating that we got high-performance FLAPs and successfully established a Smart Design system. We have applied for the relevant patent. Then, high-performance FLAPs were evaluated for efficacy, toxicity, immunogenicity, and pharmacokinetics. They showed similar growth inhibition to antibody drugs, no toxicity in body weight, and no increase in IL-2 production, indicating safety and lack of immunogenicity. In vivo imaging showed FLAP accumulation in tumors, but they disappeared faster than antibodies, suggesting stability improvements are needed.

In 2022, we aimed to upgrade the Smart Design system by optimizing the conditions for recovering cell populations expressing molecules that bind to the HER2 antigen. Additionally, we developed a new technology to evaluate the HER2 affinity of over 500 molecules in parallel and improved the accuracy in machine learning more than 30% by using features from deep learning. Moreover, we filed a patent application for the screening technology under the PCT international system.

In 2023, we aimed to increasing applicable modalities in Smart Design system by optimizing the affinity of molecules binding to various antigens, including peptides, small proteins, nanobodies, single-chain variable fragments (scFv), and bispecific T-cell engagers (BiTEs). As a result, we succeeded in the Smart Design of peptides binding to the HER2, demonstrating their versatility. However, in some cases, insufficient training data were obtained for certain antigens, indicating the need for further upgrade of the system. Thus, this research successfully constructed the smart design system and clarified points for future improvements.

As a result of this research, we achieved 13 published papers, 67 presentations at conferences and symposiums, and filed 2 patent applications during 2019-2023.