

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) 二重特異性を有する完全ヒト抗体の迅速取得とそのシームレスな最適化
(英語) Rapid *de novo* generation of bispecific fully human antibodies and their seamless optimization

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日(予定)

研究開発代表者 氏名: (日本語) 瀬尾秀宗
(英語) Hidetaka Seo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 東京大学大学院・総合文化研究科・講師
(英語) Lecturer, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

II 研究開発の概要

抗体医薬は、その高い効果と安全性ゆえ現在バイオ医薬の主流であるが、将来的な標的抗原の枯渇や限られた作用機序に伴う限界が懸念されている。こうした状況を打開する次世代抗体医薬として、二種の抗原を認識する「二重特異性抗体」が注目されているが、これは「二種の通常抗体の遺伝子を発現ベクターに組み込み、培養細胞で共発現後、一つ一つ二重特異性を検証する」、という煩雑なプロセスで作製される。数千通りを組み合わせた例もあるなど、膨大な労力と時間を要する点がボトルネックとなっている。さらに、ベストな(従来型の)一重特異性抗体同士を組み合わせたからといってベストな二重特性抗体が得られるとは限らないという難しい問題も内包している。本提案では、全く新しい原理に基づき、簡単な細胞培養作業と磁気ビーズセレクションで迅速に二重特異性ヒト抗体を作製する技術の開発を目標とした。

我々は、抗体作製期間が約10日間と迅速な試験管内モノクローナル抗体作製技術、ADLibシステムを開発している(Seo et al. Nat. Biotech., 2005)。これは、鳥類免疫系細胞の抗体遺伝子座における相同組換えを亢進させ抗体提示細胞ライブラリを作製し、ここから抗原特異的クローンを取得する技術である。さらに我々は、治療用抗体に最適な「ヒト抗体」を迅速作製する「ヒトADLibシステム」を開発し(Seo et al. Mol. Cell Immunol., 2020)、様々な治療用抗体候補の取得に成功している。

本提案では、二重特異性抗体用細胞ライブラリを構築し、加えて二重特異性が担保される形でのクローンのセレクション技術およびその最適化の実現を目指した。本技術は、従来法よりも迅速かつ簡便に、さらにより確実に二重特異性抗体を作製可能な技術となる。また、本技術は様々な二重特異性抗体フォーマットに適用可能な汎用性の高い技術であることから、次世代抗体医薬探索の大幅な加速が期待される。

本提案は、様々な二重特異性抗体フォーマットに適用可能な、汎用性のある技術であることを示す目的で、二重特異性抗体のフォーマットとしては2種類の搭載を検討する計画とした（ここではそれぞれ「L型フォーマット」および「H型フォーマット」と呼ぶ）。まず、「L型フォーマット」については、L型二重特異性ヒト抗体フォーマットを導入した免疫細胞が作製可能（L型二重特異性抗体が安定的に発現出来る）であることを検証することから開始した。その結果、L型フォーマットの二重特性ヒト抗体遺伝子が安定的に維持され、L型ヒト二重特性抗体が高いレベルで発現されることを確認した。さらに、L型ベース細胞においてライブラリ化に必要な能力を保持しているかどうかを検証し、こうした能力を問題無く保持していることを確認した。

次に、実用的なライブラリを作製するのに必要な、抗体遺伝子の制御系の開発を行った。これには元々2つのアプローチでの実現を想定していたが、非常に重要な要素技術になることから、万全を期すためにさらにバックアップとして1つのアプローチを着想し、計3つのアイデアを検討した。それぞれに関し、実現するために必要な材料を設計、開発し、まずは以前に作製したヒト抗体発現免疫細胞に導入したところ、2種については想定通りに機能することが明らかになった（うまく機能した2種のうち1種はバックアップとして着想したアイデアであった）。なお、3種のうち1種については期待通りには機能しないことが明らかになった。そこで、うまくいった2つのアプローチのうち1種を選び、これを導入したL型ベース細胞（以下、本細胞を「ライブラリ作製用L型細胞」と呼ぶ）を作製した。その上で、この制御系を搭載させることで、L型ベース細胞の性質をライブラリ作製に適した形で制御しうることも確認した。次に、このライブラリ作製用L型細胞を用い、ライブラリ作製を行った。その結果、期待した通りに多様化したライブラリを作製出来たことが確認された。次に、本ライブラリを用いて抗原特異的抗体の作製を試み、抗原特異的クローンの取得に成功している。

また、H型フォーマットを搭載した技術についても開発を行った。L型の時と同様、まずはH型二重特異性ヒト抗体フォーマットを導入した免疫細胞が作製可能（H型二重特異性抗体が安定的に発現出来る）であることを検証することから開始した。その結果、モデル二重特異性抗体を安定的に発現することが確認され、H型フォーマットの導入が可能であることが示された。この結果を踏まえ、H型二重特性ヒト抗体の遺伝子を導入するのに必要な材料や抗体ライブラリとして十分な多様性を創出するのに必要な要素を導入する材料を開発し、その後これらを免疫細胞に導入し（得られた細胞を以下、「H型ベース細胞」とする）、これが安定的に維持され、高いレベルで発現されることを確認し、H型フォーマットを搭載した。さらに、H型ベース細胞を用いたライブラリを作製し、抗原特異的抗体作製にも取り組み、特異的クローンの取得に成功した。

さらに、本技術の汎用性を実証すべく、次世代抗体への適用に取り組んだ。その際、本事業とは別途開発した技術を投入し、より効率的にライブラリが作製可能な形で次世代抗体フォーマットを搭載させた。これにより、既存のL型、H型フォーマットに加え次世代抗体フォーマット、更に理論的には非抗体のバイオ医薬品フォーマットにも適用可能であることが示唆され、本技術の汎用性が示された。これらの研究開発を通し、二重特異性ヒト抗体フォーマットを搭載した免疫細胞を作製することで、様々なフォーマットの二重特異性ヒト抗体を簡便かつ確実に二重特異性ヒト抗体を作製する技術基盤が整備されたといえ、次世代抗体医薬探索に一石を投じる技術になりうると考えられる。

Monoclonal antibodies (mAbs) have become the mainstream in biopharmaceuticals due to their high

efficacy and safety. However, there are concerns regarding the future depletion of target antigens and the limited modes of action. To overcome these limitations, bispecific antibodies that recognize two different antigens are gaining attention as the next-generation antibody therapeutics. However, the generation of bispecific antibodies is a complicated process that involves the cloning of the genes for two types of conventional antibodies into an expression vector, co-expressing them in cultured cells, and then verifying their bispecificity one by one. This approach, sometimes involving thousands of combinations, requires significant time and labor, which poses a bottleneck. Furthermore, it is not guaranteed that combining the best monospecific antibodies will yield the best bispecific antibody. Our proposal aims to establish a technology for rapidly producing bispecific human antibodies using a simple cell culture process and magnetic bead selection, based on a completely new principle.

We have developed the "ADLib system," an in vitro monoclonal antibody generation technology that can generate antibodies within approximately 10 days (Seo et al. *Nat. Biotech.*, 2005). This is a technology to generate antibody-presenting cell libraries by enhancing homologous recombination at the antibody loci in immune cells, which are avian immune system cells, and to obtain antigen-specific clones from them. Furthermore, we have developed the human ADLib system for rapid generation of human antibodies suitable for therapeutic purposes (Seo et al. *Mol. Cell Immunol.*, 2020), and have succeeded in obtaining a variety of therapeutic antibody candidates.

In this proposal, we constructed bispecific antibody libraries based on these findings, and developed technology for selecting clones with bispecificity. This novel technology allows for the generation of bispecific antibodies more rapidly, easily, and reliably than the conventional methods. Furthermore, as the system can be applied to various bispecific antibody formats, it is expected to significantly accelerate the exploration of next-generation antibody therapeutics.

This proposal included two bispecific antibody formats (referred to as "L-format" and "H-format") to demonstrate the versatility of this technology. First, we started by verifying that immune cells incorporating the L-format bispecific antibody could be constructed and that they could stably express L-format bispecific antibodies and we confirmed that L-format bispecific antibody genes were stably maintained and expressed at high levels and that the L-format base cells possessed the abilities required for library generation.

Next, we developed an antibody gene control system required for constructing practical libraries. We examined three approaches and developed materials needed for each approach and first introduced them into the previously constructed human antibody-expressing cells. Two approaches worked as expected, while one approach did not meet expectations. We chose one of the successful approaches to introduce into the L-format base cells (hereafter "L-format Cells for library") and confirmed that this system could control their properties to make them suitable for library generation. We then used these L-format Cells for library to construct a diverse library and successfully obtained antigen-specific clones.

We also developed the technology incorporating the H-format. Similar to the L-format, we first verified that the cells incorporating the H-format bispecific antibody could be constructed and that they could stably express H-format bispecific antibodies. Based on this result, we developed materials to introduce H-format human bispecific antibodies and elements necessary for generating diversity. After introducing them into cells, we confirmed that the H-format bispecific antibody

was stably expressed at high levels. We then constructed an H-format library and successfully obtained antigen-specific clones.

To demonstrate the versatility of this technology, we also applied it to next-generation antibodies. We used technology developed independently from this project to construct next-generation antibody formats that could efficiently generate libraries. This demonstrated that this technology could be applied to existing L and H formats, next-generation antibody formats, and theoretically even formats for non-antibody biologics, proving the system's high versatility. Through these R&D efforts, we established a potential platform technology capable of efficiently producing various bispecific human antibodies using immune cells equipped with different bispecific formats. This work promises to advance the search for next-generation antibody therapeutics significantly.