

日本医療研究開発機構
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(国際競争力のある次世代抗体医薬品製造技術開発)
事後成果報告書

I 基本情報

研究開発課題名：

(日本語) 高機能な次世代抗体を‘迅速に’創出・生産する「ロボティクス×デジタル」を基盤とした革新技術
開発

(英語) Development of innovative technologies for ‘rapid’ creation/production of advanced, high-
performing next-generation antibodies based on <Robotics x Digital>

研究開発実施期間：令和 3 年 7 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 近藤 昭彦

(英語) Akihiko Kondo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 国立大学法人神戸大学・大学院科学技術イノベーション研究科・客員教授

(英語) Visiting Professor, Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University

II 研究開発の概要

1. 課題全体の概要

本提案では、多重特異性抗体や抗体複合体等の次世代抗体を迅速に創出・生産できる優位性の高い「ロボティクス×デジタル」基盤を開発する。特に、生成 AI 等のタンパク質配列生成技術の進展によって候補となる抗体の配列数は近年加速的に増加しているものの、現実的に評価可能な配列数とは大きなギャップがあり、このことが高性能・高機能な次世代抗体の創出を阻んできた。このことから、これまで開発を進めてきた微生物を宿主とした低分子抗体生産系や、ハイスループット実験自動化システム、*in silico* シミュレーション、機械学習、等の独自の強み技術をさらに高度化するとともに、各要素技術を統合していくことで、優位性の高い「ロボティクス×デジタル」基盤を開発する。また、開発した基盤を用いて目的とする分子標的に対する高性能な低分子抗体を作出し、高機能な次世代抗体を迅速に創出・生産できることを実証する。モデル抗原に対する次世代抗体の開発を実施し、リード分子の取得や高度化、特性解析、培養細胞での機能評価や動物試験、部位特異的修飾技術による ADC 化などをおよそ 1 年という期間で迅速に実施できることを実証した。

2. 研究開発項目 1. 「次世代抗体の迅速な創出・生産を可能とする「ロボティクス×デジタル」基盤の構築」の概要

生育が早く超並列育種が可能な“微生物を宿主とした低分子抗体生産系”に、“自動 DNA 合成×自動タンパク質精製”，“マイクロ流体システム”，“大規模配列解析×機械学習”，“モジュール組合せ最適化”，“構造安定化シミュレーション”，“統合データ管理システム”等を独自の強み技術として組み合わせた基盤を構築した。主な成果を以下に記す。

- ・プラスミド・菌株の迅速・多並列作出のためのロボティクス基盤を構築し、抗体モジュールをさまざまな配置で並び替えた次世代抗体の分泌酵母を並列作出した。ハイスループットタンパク質精製・評価のためのロボティクス基盤と組合せることで、抗体モジュールの組合せ最適化プラットフォームを構築した
- ・発現量と標的結合親和性の両物性を最適化させるマルチタスク機械学習を実施し、両物性を高速に改良するプラットフォームを構築した
- ・抗体モジュールの構造安定性を分子動力学シミュレーションと自由エネルギー摂動法により予測するパイプラインを作成し、モデル抗体の安定化、すなわちピキア酵母における分泌生産性の向上や、精製抗体の熱安定性の向上に成功した

3. 研究開発項目 2. 「高機能・高性能な次世代抗体の迅速創出技術の開発」の概要

ロボティクス×デジタル基盤を用いて「多様な抗体モジュールの取得と成熟化」や「多様な抗体モジュールの組合せによる多重多価抗体の作出」を推進することで、高性能な目的機能や物性（親和性・生産性・安定性など）を持つ抗体モジュールや多重多価抗体等を‘迅速に’達成できる技術を開発する。また、薬剤等を狙った位置にのみ導入可能な「酵素による部位特異的架橋法」を構築して高機能かつ高品質な抗体複合体の創出を実施した。主な成果を以下に記す。

- ・ピキア酵母ディスプレイ技術とこれを用いた進化分子工学によるリード抗体分子の高速な成熟化系を構築、モデル抗体においてその効果を実証した
- ・ピキア酵母を用いた免疫用抗原タンパク質の調製から、ニワトリ免疫による抗体取得までを高速に実施するプラットフォームを構築し、実際に得たオミクロン変異型 SARS-CoV-2 を認識する抗体を研究試薬として導出した

4. 研究開発項目3. 「微生物による次世代抗体生産の実用化に向けた技術開発」の概要

ロボティクス×デジタル基盤を用いて高生産・高品質な次世代抗体の製造に利用可能な“実用ピキア酵母株”を樹立し、生産プロセスの高度化を目指す。本年度の主な成果を以下に記す。

- ・流加速度に応じて高精度にタンパク質生産性を制御し、高密度菌体を迅速に得た後、連続培養へ展開できる培養系を確立した。
- ・新規抗体の有効性・安全性を適切に評価するためには、開発段階における詳細な糖鎖解析及びホストセルプロテイン分析が不可欠である。これまでに、ピキア酵母を用いて生産させた抗体の製造工程におけるホストセルプロテインの低減に向けて、プロテオーム解析を行い、ホストセルプロテインを同定した。さらに、ホストプロテイン遺伝子を欠損したピキア酵母株を用いて、抗体の生産性や性能を損なわずにホストセルプロテインを低減することに成功した。
- ・ニワトリ免疫により取得したヒト化 scFv 抗体をピキア酵母と CHO 細胞でそれぞれ生産させた場合の活性の差異を調べ、両者に顕著な差が見出されないことを実証した
- ・ピキア酵母により生産した BiTE 抗体には糖鎖が付加していることを明らかにした。糖鎖付加の低減を目的として、ピキア酵母由来アミノ酸改変 ScFv の構造解析を実施し、特定のアミノ酸改変の組み合わせが糖鎖付加抑制に有効であることを実証した。またモデル抗原を標的にしてニワトリ免疫により取得・ピキア酵母生産したリード抗体には、糖鎖がほとんど付加しないことを明らかにした。さらに、CHO 細胞生産の場合との比較も実施し、宿主細胞や培養方法の違いに起因する糖鎖不均一性の差異を明らかにした。

1. Project overview

In this project, we focused on developing a platform which leveraging both laboratory automation and computational technologies to solve the bottleneck in discovering potent next-generation antibodies, including multi-specific antibodies and antibody-drug conjugates (ADC). Specifically, the number of candidate DNA sequences generated using the recent technologies, including generative AI for designing possible protein sequences, far exceed the practical number of sequences that can be evaluated, hampering the efficient discovery of highly potent next generation antibodies. To address this, we have developed a novel, integrated platform for developing next generation antibodies, by leveraging, advancing, and further integrating the technologies we have developed before, such as the microbial platform producing small antibodies, the laboratory automation platform for the high-throughput antibody screening, the protein structure simulation, and the machine-learning-based techniques. We demonstrated the platform is highly advantageous by applying this to complete all the process for developing highly potent next-generation antibodies within almost a year, including the process to identify the antibody candidates through the animal immunization followed by the process for antibody maturation, characterization, and preclinical efficacy evaluation using animal cells (in vitro) and animals (in vivo), and ADC.

2. Project overview for “development of a platform leveraging both laboratory automation and computational technologies to enable to rapidly discover next-generation antibodies”

The main achievements are as follows: (1) We have established a rapid, automation platform to enable the construction of plasmids and strains in parallel and applied this to produce different bivalent-bispecific antibodies, followed by the high-throughput characterization using the automated protein purification system. (2) We have established a multi-task machine-

learning platform to rapidly optimize expression levels and binding affinities of antibodies. (3) We have established a pipeline to predict antibody stability using molecular dynamics simulation and free energy perturbation simulation and demonstrated its utility by using the model antibodies.

3. Project overview for “development of technologies for rapidly discover next-generation antibodies”

Through the discovery and maturation of various antibody modules and the screening of multi-specific and multi-valent antibodies, we have developed several technologies to rapidly improve binding affinity, productivity, and stability of antibody modules, as well as to enable site-specific modification of antibodies to create antibody-drug conjugates. The main achievements are as follows: (1) We have established a rapid evolutionary platform based on yeast cell-surface display technology using yeast *Pichia pastoris* for the maturation of antibody candidates. (2) We have established a streamlined workflow including all processes from virus antigen production using highly efficient protein secretion system using yeast *Pichia pastoris* to avian immunization to identify antibodies. The workflow demonstrated by discovering a specific antibody against omicron mutant of SARS-CoV2 virus.

4. Project overview for “development of technologies toward the practical production of next-generation antibodies using microbial hosts”

We focused on the establishment of the practical production platform for next-generation antibodies using yeast *Pichia pastoris*. The main achievements are as follows: (1) We have established a fermentation procedure to precisely control the antibody productivity depending on the substrate feeding rate, enabling high-cell density fermentation followed by a continuous antibody production. (2) We have identified possible host cell proteins derived from yeast and successfully engineered yeast to alleviate the secretion of one the major host cell proteins without affecting the antibody productivities and functionalities. (3) We found no detectable difference between the antibody functionalities produced with yeast and Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. (4) We have evaluated the glycosylation pattern of different antibody modules derived from both mouse and avian immunization produced using yeast *Pichia pastoris* and found that in some case the specific residues are glycosylated, which could be alleviated by mutating the glycosylated residues without affecting the antibody productivities and functionalities. By comparing the antibody production using CHO cells, we obtained additional insights into the difference in glycosylation pattern between the case for CHO and yeast.