

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) サメ VNAR 作製プラットフォームを基盤とした次世代抗体医薬品の開発技術
高度化
(英 語) Technological advancement of next-generation antibody drug development
technology based on the shark VNAR production platform

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) 竹田浩之
(英 語) Hiroyuki Takeda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立大学法人愛媛大学プロテオサイエンスセンター・准教授
(英 語) Associate Professor, Proteo-Science Center, Ehime University

II 研究開発の概要

本研究開発課題は、サメ由来の単ドメイン抗体である VNAR (Variable New Antigen Receptor) を、実用的かつ魅力的な新たな創薬モダリティとして育成・確立すること、また VNAR を生産、活用するための関連技術の高度化を目的とした。ラクダ科動物由来の VHH と共通する小さい分子量、高い復元力、改変の自由度や低コスト生産といった利点を持ちつつ、長い CDR3 を介して抗原の立体構造を認識するなど独自の特性を有する VNAR は、サメへの免疫操作をはじめとする作製のハードルの高さから創薬モダリティとしての価値が定まっていなかった。本課題では、代表機関である愛媛大学が構築した VNAR 作製技術「フカボディプラットフォーム」を中核とし、サメへの免疫、抗体の取得、大量生産、構造改変、そして動態評価に至る一連の技術高度化に取り組んだ。設定されたすべての研究開発項目において予定していたマイルストーンを達成し、目標を大幅に上回る成果を上げた。

研究開発の第一の柱である VNAR 作製技術の高度化においては、創薬標的として重要性の高い膜タンパク質に対する特異的抗体の取得が推進された。サメ免疫とファージディスプレイ技術を駆使し、EGFR、複数の CD マーカー、細胞内タンパク質分解に関与する膜タンパク質など、多様な膜タンパク質に対して目標を大きく上回る合計 49 クローンの VNAR の取得に成功した。中でも、がんの治療標的である EGFR に対する VNAR クローン、A20 は極めて高い親和性 ($K_D = 1.2 \text{ nM}$) を持ち、EGFR と EGF の相互作用を中和し EGFR リン酸化を阻害する活性を示した。

数ヶ月を要するサメの免疫プロセスやライブラリ作製工程を短縮するため、免疫未処理のサメ脾臓から大規模なナイーブラライブラリを構築した。ナイーブラライブラリは特に免疫動物体内で不安定な複合体に対する抗体取得で有効である。加えて、次世代シーケンシングを用いた抗体配列進化追跡法を用いた VNAR 作製技術を開発した。マウス、ヒトなどで実績がある抗体配列進化追跡法をサメ VNAR 遺伝子に最適化した。抗原免疫過程で経時的にサンプリングした PBMC から抽出した RNA を NGS を用いて RNAseq 解析し、免疫回数に伴う VNAR 抗体遺伝子の親和性成熟プロセスを観察した。免疫過程で存在率が高まった配列を特異的 VNAR クローンの候補配列として同定し、得られた組換え VNAR が抗原に結合することを確認した。

生産技術の面では、大腸菌発現と高圧リフォールディングによる低コスト製造技術の高度化を進めた。大腸菌で発現させた VNAR 封入体から効率的に VNAR を巻き戻し可溶化する系のスケールアップ条件を検討した結果、従来比で最大 6 倍の濃度の封入体懸濁液からでもリフォールディングが可能となり、大幅な生産効率の向上を達成した。この手法はモデル VNAR だけでなく、創薬標的である EGFR に対する VNAR、エピトープタグを挿入した改変体 VNAR、さらには VNAR 二量体、三量体の生産にも適用可能であることを実証した。加えて、細胞毒素を連結したイムノトキシンや、ラクダ由来 VHH の生産にも成功した。

抗体の修飾や高機能化を担うコンジュゲーション技術の開発では、独自の人工酵素の設計に取り組んだ。標的としたのは特異的な認識ペプチド配列を転移、連結する Sortase である。従来の野生型 Sortase A が持つ活性強度やカルシウム要求性などの弱点を克服するため、カルシウム非依存型の Sortase E を鋳型として計算科学に基づく祖先配列再構成法を利用し、新規酵素「AcSE5」の開発に成功した。我々は AcSE5 は天然型と比較して 1.6 倍の活性と高い熱安定性を持ち、低温条件下でも効率的に抗体連結を触媒できることを証明し、物質特許を出願した。さらに、生成物の切断を伴う逆反応や非特異的な副反応を抑制するため、複数の祖先型 Sortase E の X 線結晶構造解析を行い、特異性を制御するループ領域を特定した。制御ループを移植した改良型酵素「 Δ AcSE5」を創出し、極めて高い忠実度での精密なタンパク質連結が可能となった。この技術を用いて、VNAR-Fc タンパク質と蛍光タンパク質などが実際に連結されることを実証した。

本プロジェクトで最も革新的な成果の一つが、VNAR の更なる低分子化技術の確立である。X 線結晶構造解析によって抗 Venus VNAR と Venus 抗原との複合体構造を決定した。抗原認識に重要なアミノ酸残基と結合様式を特定した上で、これらのデータをもとに合理的設計ソフトウェア「PeptiCraft」を用いてミニチュア抗体を設計した。機械学習を用いた最適化により、分子量わずか 2.6 kDa でありながら、オリジナル VNAR を上回る親和性を持つ世界最小クラスのミニチュア抗体、M9 の創出に成功した。さらに、構造解析が困難な標的に対しては、パラトープマッピングのデータを AI プログラムに学習させることで、構造情報に依存せずに機能的なミニチュア抗体を生成する新手法を開発した。

創薬モダリティとしての実用化を見据え、VNAR およびミニチュア抗体の抗原性と体内動態評価を解析した。コモンマーモセットを用いた投与試験では、ヒト化していない VNAR、ヒト Fc 融合 VNAR、ミニチュア VNAR を投与し、安全性と動態を観察した。いずれの抗体を投与した群でも、顕著な有害事象は認められなかった。単量体 VNAR では抗薬物抗体 (ADA) の産生が認められ免疫原性リスクが示唆された。ヒト Fc と融合した VNAR やミニチュア VNAR では ADA は検出されなかったことから、ヒト化やミニチュア化によって ADA 産生を回避できる可能性が示された。なお、ADA リスクをさらに低減させるためのヒト化に関して抗原結合能を維持したままヒト抗体配列の置き換えに成功している。また、マウスを用いた動態試験では、先行研究の報告と同様、VNAR の末梢血中半減期は 10 分前後と短かったものの、投与後数時間が経過しても有効な薬物濃度を維持できることが確認された。

プロジェクト全体を通じて、サメ免疫に基づくシーズ探索から、AI による設計、高効率生産、生体内評価に至るまで、次世代抗体医薬の包括的な製造基盤が完成した。当初は VNAR 作製技術をプラットフォームとして企業に提供する形での社会実装を検討していたが、製薬企業等との対話を通じて、この新規モダリティの価値を証明し、社会実装を実現するためには *in vivo* での有効性や安全性の実データを提示する必要があることが明らかとなった。現在は、抗 EGFR VNAR A20 の創薬応用を目指し、前臨床データの取得準備を進めている。

This research and development project aimed to establish shark-derived single-domain antibodies, known as VNARs (Variable New Antigen Receptors), as a practical and attractive new drug discovery modality, while also advancing the associated technologies required for their production and application. Although VNARs share several advantages with camelid-derived VHH antibodies—including small molecular size, high resilience, flexibility for engineering, and cost-effective production—they also possess unique characteristics, such as the ability to recognize the three-dimensional structures of antigens through their elongated CDR3 regions. However, due to the high technical hurdles associated with shark immunization and VNAR generation, the value of VNARs as a drug discovery modality had not yet been fully established.

In this project, we centered our efforts on the "Fucabody Platform", a VNAR generation technology developed by Ehime University, and pursued comprehensive technological advancements encompassing shark immunization, antibody isolation, large-scale production, structural engineering, and pharmacokinetic evaluation. All planned milestones for the research and development items were successfully achieved, and the outcomes substantially exceeded our original targets.

In the first major pillar of the project, namely the advancement of VNAR generation technology, we promoted the acquisition of specific antibodies against membrane proteins that are highly important as drug discovery targets. By combining shark immunization and phage display technologies, we successfully obtained a total of 49 VNAR clones against a diverse range of membrane proteins, including EGFR, multiple CD markers,

and membrane proteins involved in intracellular protein degradation. Among these, the VNAR clone A20, targeting EGFR (a key therapeutic target in cancer), exhibited exceptionally high affinity ($K_D = 1.2$ nM) and demonstrated robust biological activity by neutralizing the interaction between EGFR and EGF, thereby inhibiting EGFR phosphorylation.

To shorten the shark immunization process and library construction workflow, which normally require several months, we constructed a large-scale naïve VNAR library derived from the spleens of non-immunized sharks. Naïve libraries are particularly effective for obtaining antibodies against unstable complexes that are difficult to maintain in immunized animals. In addition, we developed a VNAR generation technology utilizing antibody sequence evolution tracking by next-generation sequencing (NGS). This sequence tracking method, previously established in mice and humans, was optimized specifically for shark VNAR genes. RNA extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected sequentially during the antigen immunization process was analyzed by RNA-seq using NGS, enabling direct observation of the affinity maturation process of VNAR antibody genes over repeated immunizations. Sequences whose abundance increased during immunization were identified as candidate antigen-specific VNAR clones, and recombinant VNARs generated from these sequences were confirmed to successfully bind their target antigens.

Regarding production technologies, we advanced low-cost manufacturing methods based on *Escherichia coli* expression and high-pressure refolding. By optimizing scale-up conditions for the efficient refolding and solubilization of VNAR inclusion bodies expressed in *E. coli*, we achieved successful refolding even from inclusion body suspensions at concentrations up to six times higher than those used conventionally, resulting in a substantial improvement in production efficiency. We demonstrated that this method is applicable not only to model VNARs but also to VNARs targeting EGFR, engineered VNARs containing inserted epitope tags, and VNAR dimers and trimers.

In the development of conjugation technologies for antibody modification and functional enhancement, we designed novel artificial enzymes. Our target was Sortase, an enzyme capable of transferring and ligating specific recognition peptide sequences. To overcome the limitations of conventional wild-type Sortase A, such as insufficient catalytic activity and calcium dependence, we employed ancestral sequence reconstruction based on computational science, using a calcium-independent Sortase E as a template. This resulted in the successful development of a novel enzyme designated "AcSE5." We demonstrated that AcSE5 possesses 1.6-fold higher activity and superior thermal stability compared with the native enzyme, and can efficiently catalyze antibody conjugation even under low-temperature conditions. A patent application covering this invention has been filed. Furthermore, to suppress reverse reactions involving product cleavage and non-specific side reactions, we performed X-ray crystallographic analyses of multiple ancestral Sortase E variants and identified loop regions responsible for substrate specificity control. Based on these findings, we developed an improved enzyme termed " Δ AcSE5" by grafting the regulatory loop, thereby enabling highly precise protein conjugation with exceptional fidelity. Using this technology, we successfully demonstrated the actual conjugation of VNAR-Fc proteins with fluorescent proteins.

One of the most innovative achievements of this project was the establishment of a technology for the further miniaturization of VNARs. Using X-ray crystallography, we determined the complex structure between an anti-Venus VNAR and the Venus antigen. After identifying the amino acid residues and binding modes

critical for antigen recognition, we utilized the rational design software "PeptiCraft" to design miniature antibodies based on these structural data. Through optimization using machine learning, we successfully generated "M9," one of the world's smallest miniature antibodies. Despite having a molecular weight of only 2.6 kDa, M9 exhibits an affinity surpassing that of the original VNAR. Furthermore, for targets that are difficult to analyze structurally, we developed a novel approach in which paratope mapping data were learned by an AI program, enabling the generation of functional miniature antibodies without relying on structural information.

To evaluate the practical applicability of VNARs as a drug discovery modality, we investigated the antigenicity and pharmacokinetics (PK) of VNARs and miniature antibodies. In administration studies using common marmosets, non-humanized VNARs, human Fc-fused VNARs, and miniature VNARs were administered, and their safety and pharmacokinetic profiles were evaluated. No significant adverse events were observed in any treatment group. Regarding immunogenicity risks, the production of anti-drug antibodies (ADA) was detected in animals administered monomeric VNARs, suggesting a potential immunogenicity risk for unmodified formats. In contrast, ADA production was not observed in groups receiving human Fc-fused VNARs or miniature VNARs, indicating that humanization and structural miniaturization are highly effective strategies for evading ADA induction. To further mitigate immunogenicity risks, we successfully humanized the VNAR by replacing portions of its framework sequence with human antibody sequences while fully maintaining its high antigen-binding activity. Additionally, in pharmacokinetic studies conducted in mice, the peripheral blood half-life of VNARs was relatively short—approximately 10 minutes, which is consistent with previous literature. Nonetheless, we confirmed that therapeutically effective drug concentrations were successfully maintained for several hours post-administration, demonstrating their potential for sustained *in vivo* activity.

Throughout the project, we successfully established a comprehensive manufacturing and development platform for VNAR-based next-generation antibody therapeutics, encompassing seed discovery through shark immunization, highly efficient VNAR production, AI-assisted miniature VNAR design, and *in vivo* evaluation. Initially, we envisioned social implementation through the provision of our VNAR generation technology platform to industry partners. However, through discussions with pharmaceutical companies and related organizations, it became clear that demonstrating the value of this novel modality and achieving practical implementation would require the presentation of actual *in vivo* efficacy and safety data. We are currently preparing to obtain preclinical data aimed at the therapeutic application of the anti-EGFR VNAR clone A20.