

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：環状一本鎖抗体を活用した二重特異性 T 細胞誘導抗体の基盤技術開発

Development of foundational technologies for bispecific T-cell engaging antibodies utilizing cyclic single-chain antibodies

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：森岡 弘志

Hiroshi Morioka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部（薬） 教授

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

II 研究開発の概要

現在、抗体医薬品の利用・開発は隆盛を極めている。特に、高度な技術を要する次世代型抗体の開発が注目されており、従来の抗体医薬品では達成できない薬効が期待されている。二重特異性抗体もその一つである。

一本鎖抗体（scFv）は、抗体の可変領域（VH および VL ドメイン）をペプチドリリンカーで連結させた分子量 27,000 の低分子抗体である。scFv は、次世代抗体モダリティとして期待されているが、その凝集性の高さからこれまで実用化が困難とされていた。本研究開発課題の代表者らは、これまでに、scFv の N 末端と C 末端をペプチドリリンカーで連結させた環状一本鎖抗体（環状 scFv : CscFv）を開発することで、抗原結合能を低下させることなく、凝集性による製剤学的課題を解決できる画期的な方法の開発に成功した。さらに、腫瘍抗原（HER2）と T 細胞表面抗原 CD3 を認識する医療用抗体（Trastuzumab および OKT3）を基に作製した 2 種類の環状 scFv を PEG リンカーで連結した二重特異性 T 細胞誘導抗体〔環状 scFv/PEG リンカー型 BiTE (Bispecific T-cell Engager) 抗体 : CscFvPB-BiTE 抗体〕の構築を進めて、この BiTE 抗体が *in vitro* 生物活性評価においてがん細胞に対する高い殺傷能を有し、BiTE 抗体濃度依存的に T 細胞の活性化が起きることを確認した。一方で、環状 scFv を用いた BiTE 抗体を抗体モダリティとして確立していく上での課題も明確になっている。

そこで、我々は環状 scFv を用いた BiTE 抗体の基盤技術開発と非臨床 POC の取得に向けて、下記（１）～（３）の研究を行った。

- （１）CscFvPB-BiTE 抗体の調製を効率化する汎用的な技術開発を行った。
- （２）CscFvPB-BiTE 抗体について、ヒトの免疫系およびヒトがん細胞を移植したヒト化マウスモデル系を用いる *in vivo* 生物活性評価に基づく投与方法の検討を行い、非臨床 POC の取得に向けた研究を進めた。
- （３）自己集合型ペプチドリリンカーを用いて調製した環状 scFv 型 BiTE 抗体の創製に関する基盤技術開発を行い、環状 scFv/ペプチド型 BiTE 抗体（CscFvSAP-BiTE 抗体）を得た。この CscFvSAP-BiTE 抗体について、（２）と同様に生物活性評価と投与方法を検討し、非臨床 POC の取得に向けた研究を進めた。

- (1) 非臨床 POC の取得に向けて、まずは PEG リンカー型 BiTE 抗体の生産方法の改良を行った。環状 scFv の収量を向上させるため、scFv 単量体構造を安定化し、二量体形成の抑制を目的とした新規ペプチドリンカーを計算化学的手法に基づき創製した。具体的には、*de novo* 設計により VH-VL 間の相互作用面周辺に結合することで VH-VL 間相互作用を増強し得るペプチドリンカー配列を取得し、分子動力学法による評価、ペプチドリンカーに変異導入し、再び分子動力学法により評価するサイクルを複数回繰り返し、単量体構造が最も安定となるリンカー配列へと最適化した。このような方法により取得した新規ペプチドリンカー配列について、実際に HER2 を標的とした scFv に導入したところ会合性が抑制されることが確認された。複数の scFv について新規ペプチドリンカーを導入し、その汎用性を実証した。さらに、複数種の環状 scFv について、Glue リンカーの汎用性を確認し、純度、収量、生産効率の改善が認められた。一方で大腸菌発現系とは別に、哺乳類細胞発現系を用いた環状 scFv の調製を進めた。収量、純度、タンパク質物性および抗原結合活性に関する評価に基づき、培養条件の最適化を行った。一過性発現系によって培地から得られた環状 scFv の収量は、環状 scFv の種類によりばらつきはあるが、現時点で培地 1L あたり約 10~40mg 程度であった。収量の更なる向上を目指して、培養条件の検討と安定発現株の樹立を進める。
- (2) HER2 を発現するマウスメラノーマ細胞 B16F10 株および HER2 を発現しない B16F10 株を樹立した。これらを C57BL/6 マウスに皮下移植した後に、HER2 を標的とする CscFvPB-BiTE 抗体を投与し、腫瘍の大きさおよび重量を指標として *in vivo* 生物活性を評価した。その結果、CscFvPB-BiTE 抗体投与群においてのみ、腫瘍成長の有意な抑制が認められた。さらに、HER2 陽性 B16F10 細胞株の微静脈投与による肺転移モデルにおける検討を行い、CscFvPB-BiTE 抗体の投与により肺に形成された腫瘍の数が有意に減少すること、肺以外の臓器への腫瘍転移も抑制されていることが確認された。加えて、HER2 抗原陽性の胆管細胞がん (cholangiocellular carcinoma ; CCA) 患者腫瘍組織移植モデル (patient-derived xenografts:PDX) マウスに対して、ヒト末梢血単核細胞を移植し、同様の実験を進めたところ、CscFvPB-BiTE 抗体投与群においてのみ、腫瘍成長の有意な抑制および腫瘍重量の低下が認められた。これにより、CscFvPB-BiTE 抗体が PDX モデルマウスにおいても抗腫瘍活性を有することが明らかとなった。また、CscFvPB-BiTE 抗体のマウス体内分布を解析するために、C57BL/6 マウスを用いて HER2 安定発現 B16F10 細胞株がんモデルを作製し、I-131 で標識した CscFvPB-BiTE 抗体を投与して、マウス体内分布・組織移行性を解析した。その結果、CscFvPB-BiTE 抗体は、腫瘍組織、免疫細胞が存在する組織ならびに腎臓に集積し、一方で脳にはほとんど集積していないことが明らかになった。本結果から CscFvPB-BiTE 抗体がマウス体内で抗原を発現する組織に分布し、腎臓により排泄されることが示唆された。以上の結果から、CscFvPB-BiTE 抗体は、異なる *in vivo* 微小環境においても安定した抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、医療応用の可能性が示唆された。
- (3) CscFvPB-BiTE 抗体は多段階反応により調製するため、生産性向上の点で課題がある。そこで、自己集合型の E3 および K4 ペプチドを用いた新規 BiTE 抗体調製法の開発を行った。E3 または K4 ペプチドをそれぞれ付加した 2 種類の環状 scFv を混合することにより、E3/K4 ペプチドの自己集合によりヘテロ二量体を形成し、CscFvSAP-BiTE 抗体をワンポットで調製した。本調製法は、従来の CscFvPB-BiTE 抗体の調製法に比べ、最終生産性が約 4 倍に向上した。また、SPR 解析および Pull-down アッセイにより、CscFvSAP-BiTE 抗体は BiTE 抗体の構成部品となる環状 scFv と同程度の結合親和性を保持し、二重特異性を持つことが示された。さらに、C57BL/6 マウス皮下移植モデルを用いた *in vivo* 実験において、CscFvSAP-BiTE 抗体は優れた抗腫瘍活性を示し、本フォーマットの有効性を実証した。本成果は、生産量を向上させることで、環状 scFv を基盤とした BiTE 抗体の産業展開を前進させるものであった。

本研究開発技術は、従来の抗体医薬品では解決が困難であった課題を克服し得る、抗体モダリティとしての発展が期待される。

Currently, the use and development of antibody therapeutics are rapidly expanding. In particular, the development of next-generation antibodies requiring advanced technologies is attracting attention, since they are expected to achieve therapeutic effects that are undruggable with conventional antibody therapeutics. Bispecific antibodies are an example of them.

A single-chain antibody (scFv) is a small size antibody fragment with a molecular weight of 27,000, in which the variable regions (VH and VL domains) of the antibody are connected by a flexible peptide linker. While scFvs are expected to be attractive molecules for constructing advanced antibody therapeutics, their application is limited due to their propensity to oligomerize. We have so far developed an innovative method that solves the pharmaceutical challenges caused by aggregation without reducing the antigen-binding ability by producing a cyclic single-chain antibody (cyclic scFv; CscFv) in which the N-terminus and C-terminus of scFv are connected by a peptide linker. Furthermore, we constructed a bispecific T-cell engaging antibody (BiTE antibody) by connecting CscFvs using a polyethylene glycol (PEG) linker, which was prepared based on two therapeutic antibodies (Trastuzumab and OKT3) that recognize tumor antigen (HER2) and T-cell surface antigen (CD3) respectively. We named this small antibody molecule CscFvPB-BiTE antibody. Based on *in vitro* biological analysis, CscFvPB-BiTE antibody was confirmed to exhibit a high antitumor effect and activated T-cell dependent on CscFvPB-BiTE antibody concentration. However, problems in establishing BiTE antibodies using CscFvs have also become apparent.

We therefore conducted the following studies through (1) to (3) to develop fundamental technologies for BiTE antibodies using CscFvs for therapeutic application, and to obtain non-clinical proof-of-concept (POC).

- (1) We developed versatile techniques for efficient preparation of BiTE antibodies.
- (2) We investigated *in vivo* biological evaluation and administration methods of CscFvPB-BiTE antibody using the human immune system and a humanized mouse model system transplanted with human cancer cells, and advanced research toward obtaining non-clinical POC.
- (3) We developed fundamental technologies for preparation of CscFv-type BiTE antibodies using self-assembling peptide linkers, and named CscFvSAP-BiTE antibody. We then evaluated *in vivo* biological activity and investigated administration methods of CscFvSAP-BiTE antibody, similar to (2), and proceeded with research aimed at obtaining non-clinical POC.

To obtain non-clinical POC, we first improved the protocol for preparation of CscFvPB-BiTE antibodies. To improve the yield of CscFv, the novel peptide linker was invented based on computational chemistry methods. The novel peptide linker was designed to increase VH-VL interaction to stabilize the scFv monomer structure and suppress its oligomerization. In addition to the *E. coli* expression system, we also proceeded with the preparation of CscFv using a mammalian cell expression system. Culture conditions were optimized to improve yield, purity, stability, and antigen-binding activity. Further optimization of culture conditions and establishment of stable expression strains are ongoing to maximize the preparation yield.

We established the transformed mouse melanoma B16F10 cell line expressing HER2. The transformed B16F10 cells were subcutaneously transplanted into C57BL/6 mice. Subsequently, the HER2-targeting CscFvPB-BiTE antibody was administered, and *in vivo* anti-cancer activity was evaluated based on tumor size and mass. Significant suppression of tumor growth was observed only in the CscFvPB-BiTE antibody-administered group. Furthermore, in a lung metastasis model induced by nasal vein injecting the HER2-positive B16F10 cell lines into C57BL/6 mice, administration of the CscFvPB-BiTE antibody significantly reduced the number of tumors formed in the lungs, as well as in other organs. Similar experiments were conducted on HER2 antigen-positive cholangiocellular carcinoma (CCA) patient-derived xenografts (PDX) mice, and resulted in significant suppression of tumor growth and reduction in tumor weight only in the CscFvPB-BiTE antibody-administered group. To examine the distribution of the CscFvPB-BiTE antibody in mice, the I-131-labeled CscFvPB-BiTE antibody was administered to C57BL/6 tumor model mouse established by the HER2-stable-expressing B16F10 cell line. As

a result, the CscFvPB-BiTE antibody was accumulated in tumor tissue, tissues containing immune cells, and the kidney, while hardly accumulating in the brain. Based on these results, the CscFvPB-BiTE antibody exhibited stable antitumor effects even in different *in vivo* tumor microenvironments, suggesting its potential for medical application.

Since CscFvPB-BiTE antibodies are prepared through a multi-step reaction, there are challenges in improving productivity. Therefore, we developed a novel BiTE antibody preparation method using self-assembling pair, the E3- and K4-peptides. By mixing two types of CscFv conjugated with either E3- or K4- peptide respectively, a heterodimer was formed through the self-assembly of the E3/K4 peptides, and CscFvSAP-BiTE antibodies were produced in a one-pot reaction. This preparation method resulted in approximately four times higher final productivity compared to the conventional method for preparing CscFvPB-BiTE antibodies. Furthermore, SPR analysis and pull-down assays showed that the CscFvSAP-BiTE antibody maintained a binding activity comparable to that of the CscFv that constitutes the BiTE antibody, demonstrating its bispecificity. Moreover, the CscFvSAP-BiTE antibody exhibited excellent antitumor activity in C57BL/6 mice subcutaneously transplanted with HER2-positive B16F10 cell lines, suggesting the usefulness of this format *in vivo*. This achievement was assumed to accelerate the industrial development of BiTE antibodies based on CscFv. The technology is expected to overcome challenges that are undruggable with traditional therapeutic antibody format.