

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19119

研究課題名（和文）＜混ぜる＞抗体工学 ～二重特異性抗体の効率的な創出法の開発～

研究課題名（英文）Development of an Efficient Method for Creating Bispecific Antibodies by Mixing

研究代表者

鎌田 春彦（Kamada, Haruhiko）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：00324509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、単純かつ高効率に二重特異性抗体の創出が可能な新しい抗体作製技術を開発し、タンパク質を「混ぜる」という観点から開発することを目指す。近年の抗体医薬の開発において、より高い機能を持った抗体モダリティの開発に期待が寄せられている。特に、通常モノクローナル抗体に代わる二重特異性抗体の作製については、既に上市された複数の抗体医薬が存在することに加えて、臨床応用を視野に入れた基礎的研究が加速しており、現実的に臨床応用が可能な抗体誘導体の開発が有望視されている。そこで本研究で我々は、Fab-arm exchange (FAE) 技術を用いて二重特異性抗体の創出を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で、naked IgGに関する混ぜる技術を確認したうえで、先行しているUGを活用した二重特異性抗体の創出法を確立することで、将来的に二重特異性抗体の学術分野を活性化することが可能となる。このような単純な作製法を普及によって、これまで抗体作製に関わってきた研究者間のコラボレーションが進み、二重特異性抗体開発に向けた研究が加速するものと期待される。特に、二重特異性抗体の創出が強く期待されている、固形がん等の難治性疾患の治療薬が加速的に増えるプラットフォーム技術になるものと期待しており、学術的・社会的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a new antibody production technology that enables the simple and highly efficient creation of bispecific antibodies from the perspective of "mixing" proteins. In the recent development of antibody drugs, there are high expectations for the development of antibody modalities with higher functionality. In particular, with regard to the production of dual-specificity antibodies to replace ordinary monoclonal antibodies, in addition to the existence of several antibody drugs already on the market, basic research with a view to clinical application is accelerating, and the development of antibody derivatives that can realistically be used in clinical practice is promising. Therefore, in this study we attempted to create bispecific antibodies using Fab-arm exchange (FAE) technology.

研究分野：抗体工学

キーワード：抗体医薬 二重特異性抗体

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでの研究過程で、ヒト UG をモデルタンパク質として利用し、UG のアミノ酸改変体をスキュッフォールドとする新しい二重特異性抗体の創出を実施してきた。in vitro での混合による抗体の作製は、H 鎖と L 鎖の交換反応を生じてしまうという抗体工学の問題点を解決する上で、極めて有意義な技術になり得るが、上記の UG を用いた検討では、十分な二重特異性抗体の作製効率が得られない、という課題があった。実際に我々の検討では、混合による抗体の形成はおおよそ 50% 程度にとどまり、産生効率をより向上させる必要があることが我々独自の研究からも明らかになっている。そこで上記の課題を克服するために、天然に起こる現象を有効活用した効率の良い二重特異性抗体の作製に应用可能な方法の確立を本研究で目指したいと考えた。

二重特異性抗体を創出するために、先行して UG を用いた研究を実施してきたが、先述したようにその作製効率の課題を克服しきれていない。そのため、新しいアプローチを模索している中で、天然の抗体が持つ特徴的な性質に着目した。世界的にもこのように天然の抗体が持つ特徴からヒントを得て効率的に抗体を産生する技術に应用した報告は殆どない。本研究は、ユニークな着眼点に基づき、効率化の糸口を模索するという意味において探索的な意義が大きく、挑戦的な要素が多分にある。これまで申請者は、この方法を応用したことはなく、また、これまでの報告も数少ないことから、効率化については挑戦的な要素が多分にある。但し、申請者はこれまで、UG の研究から、アミノ酸の改変技術のノウハウが蓄積されており、これまでの実験結果と合わせて、効率化が可能ではないか、と考えている。

## 2. 研究の目的

本研究では、二つの異なる抗体分子を単純に「混ぜる」(混合する)ことで、近年医薬品への応用が加速している二重特異性抗体を、簡便かつ効率的に創出する方法を開発することを目的とする。二重特異性抗体の作製を効率的に行うため、ヒト IgG4 に特徴的な性質である「Fab-arm exchange (FAE)」を応用し、in vitro で効率的に二重特異性抗体が作製可能な技術プラットフォームの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、臨床的に使用価値の高いヒト IgG1 をベースに、簡便かつ効率的に二重特異性抗体を創出するための技術開発を目的とする。本目的の達成のためには、天然に存在する抗体の中でヒト IgG4 に特徴的な性質である「Fab-arm exchange (FAE)」の特徴を利用した、「混ぜる」だけで二重特異性抗体の創出が可能な技術開発を行う予定である。FAE は、ヒト IgG4 に特徴的に起こる、H 鎖-L 鎖複合体の交換反応をもとにした抗体工学技術の一つであり、in vitro では二種類の IgG4 サブクラス抗体を混合することで生じることが知られている。本研究ではこの FAE を利用し、ヘテロ 4 量体の抗体の二重特異性を達成することが可能なヒト IgG1 サブクラスをアミノ酸改変体として創出することを本研究のアウトプットとする予定である。これらの研究基盤をもとに、naked IgG の二重特異性を実施する上で、効率的な技術の確立を目指す。

令和 4 年度からの二年間での達成目標として、以下の研究を推進予定である。

### 【令和 4 年度】FAE を惹起するヒト IgG1 の分子設計と二重特異性抗体の作製

本実験計画では、二重特異性抗体の分子設計と実際に二重特異性抗体ができるのかどうかを評価し、Fab-arm exchange (FAE) を用いた二重特異性抗体の実現性を確認する。具体的には、FAE を生じる IgG4 の配列情報をもとに、その立体構造情報から判明している複数のアミノ酸を改変し、IgG1 型でも FAE を生じる改変体をデザインし、作製する。なお、二重特異性抗体の作製に向けて、対象とする二種類の抗体として、免疫チェックポイントの制御に関わる抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体を用いる予定である。PD-1 と PD-L1 に対する抗体は、それぞれ 3 つの抗体が医薬品としてすでに承認されており、配列既知の利用しやすいモデル抗体として利用できる。抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体をそれぞれ IgG1 サブクラスを Fc 領域に持つリコンビナント抗体として発現させ、各抗体を Expi293 哺乳類発現系を用いて作製する。抗 PD-1 抗体および抗 PD-L1 抗体の各アミノ酸を変異については、Fc 領域の相互作用領域である、405 番目から 409 番目のアミノ酸を改変する予定である。現在、予備実験段階であるが、我々独自の知見として、IgG4 と構造上類似しているヒトとマウスのとあるサブクラスの組み合わせが、naked IgG 型のヘテロ二量体を構築できることを見出ししており、本方法を利用することで、高効率な naked IgG 二重特異性抗体の作製が可能である可能性が高い。

### 【令和 5 年度】FAE により作製した二重特異性抗体の物性と活性の評価

令和 4 年度までに作製した抗体の作製した二重特異性抗体の結合活性や生物活性を培養細胞によって評価する。具体的には、各二重特異性抗体の PD-1/PD-L1 強制発現系に対する結合性を FACS で評価するとともに、PD-1 発現細胞に対するバイオアッセイ等を用いて検討する予定である。

本バイオアッセイ系としては、PD-1 と PD-L1 を強制発現させた細胞を作製し、細胞膜上に発現する PD-1、PD-L1 を認識する抗体の中和活性に関して検討する。具体的には、CHO 細胞等の膜上に PD-L1 を強制発現させ、T 細胞受容体を発現したエフェクター細胞上に PD-1 を強制発現させることで、T 細胞受容体支配下にある NFkappaB 活性化シグナルを、ルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子アッセイにて測定し、その中和活性を検討する。

#### 4. 研究成果 デザイン

ヒト IgG4 の FAE 反応はヒンジ領域の S228 と CH3 ドメインの R409 が穏やかな還元条件下においてそれぞれが互いに相互作用している残基との非共有結合が切断されることにより起こることが分かっている。ヒト IgG1 における両者のカウンターパートは P228 と K409 である。またアカゲザルの IgG4 でも FAE 反応がおこり、CH3 ドメインの L405 が関与している。ヒト IgG1 のカウンターパートは F405 である。そこで本研究では抗体の安定性に関わるヒンジ領域の改変を行わずに、CH3 ドメインのみのアミノ酸改変により FAE 反応が起こせないかと考え、ヒト IgG4 のアミノ酸に変換した K409R とアカゲザル IgG4 のアミノ酸に変換した F405L の変異体を作製し、FAE 反応がおこるかどうかを試した。抗体は抗ヒト PD-1 抗体であるセトレリマブと抗ヒト PD-L1 抗体であるアベルマブを用いた(図1)。

#### 二重特異性抗体の作製

セトレリマブ(K409R)とアベルマブ(F405L)の発現用プラスミドを構築し、それぞれを Expi293F にトランスフェクションし、発現・培養した。培養上清を回収し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製したタンパク質を等量ずつ混合し、還元剤としてメルカプトエチルアミンを終濃度 75mM となるように加えて 31 で 2 時間静置した。静置後、PBS で透析し透析外液を複数回変えることで還元剤を除いた。

二重特異性抗体の形成確認は陽イオン交換クロマトグラフィーにより行った。反応前後のサンプルの一部を 50mM HEPES-NaOH pH7.0 で透析し、陽イオンカラムにアプライした後、0 - 180 mM の塩化ナトリウム勾配により溶出した(図2)。その結果、セトレリマブ(K409R) FAE 反応物、アベルマブ(F405L)の順で溶出ピークが表れ、FAE 反応により二重特異性抗体が作製できたことが分かった。またクロマトグラムから、未反応のセトレリマブ(K409R)とアベルマブ(F405L)のピーク面積はメインピークと比べて約 10%以下であったことから、反応の収率は約 90%と高効率で反応が進むことが分かった。

#### 結合アッセイ

HEK293T 細胞の膜上に hPD-1 または hPD-L1 を発現させ、二重特異性抗体が結合するかをフローサイトメトリーにより確認した(図3と4)。hPD-1 発現細胞においてはセトレリマブ(K409R)とセトレリマブ(WT)、二重特異性抗体の 3 種で結合が見られ、h-PD-L1 発現細胞においてはアベルマブ(F405L)とアベルマブ(WT)、二重特異性抗体で結合が見られた。二重特異性抗体は hPD-1 と hPD-L1 の両者に結合し、結合力もそれぞれの抗体単独と比べて遜色はなかった。

#### バイオアッセイ

バイオアッセイは CHO 細胞の膜上に PD-L1 を強制発現させ、T 細胞受容体を発現した Jurkat エフェクター細胞上に PD-1 を強制発現させることで、T 細胞受容体支配下にある NFkappaB 活性化シグナルを、ルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子アッセイにて測定する(図5a)。中和活性がある場合はシグナルが伝達されて、基質の発光強度が増強する。バイオアッセイの結果、セトレリマブ(K409R)とアベルマブ(F405L)、二重特異性抗体で濃度依存的に発光強度の増加が見られた(図5b)。阻害活性曲線から EC50 を算出すると、二重特異性抗体が一番小さく、アベルマブ(F405L)の約 1/4 であった(図5c)。これは二重特異性抗体が hPD-1 と hPD-L1 の両抗原に同時に結合することができるため、それぞれ単独で抗原と結合する場合に比べて、低濃度で阻害することができたのではないかと考えられる。

#### まとめ

予想通り、ヒト IgG4 とアカゲザル IgG4 の FAE 反応関与残基を参考にヒト IgG1 の CH3 ドメインに変異を入れることでヒト IgG1 でも FAE 反応が起きることが分かった。また、この反応による収率は約 90%であり、反応により生成した二重特異性抗体は二つの抗原に結合し、二重特異性抗体にすることで抗体自体の機能を増強することができた。

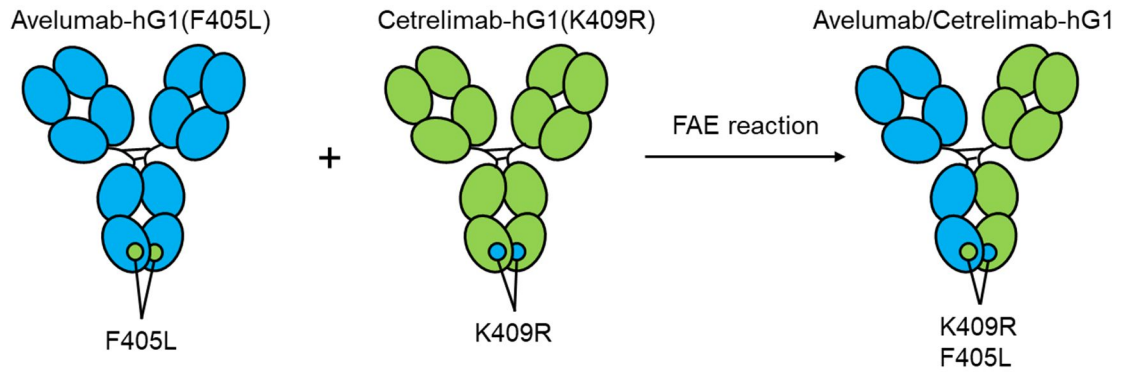


図 1. FAE 反応を利用した二重特異性抗体の作製模式図

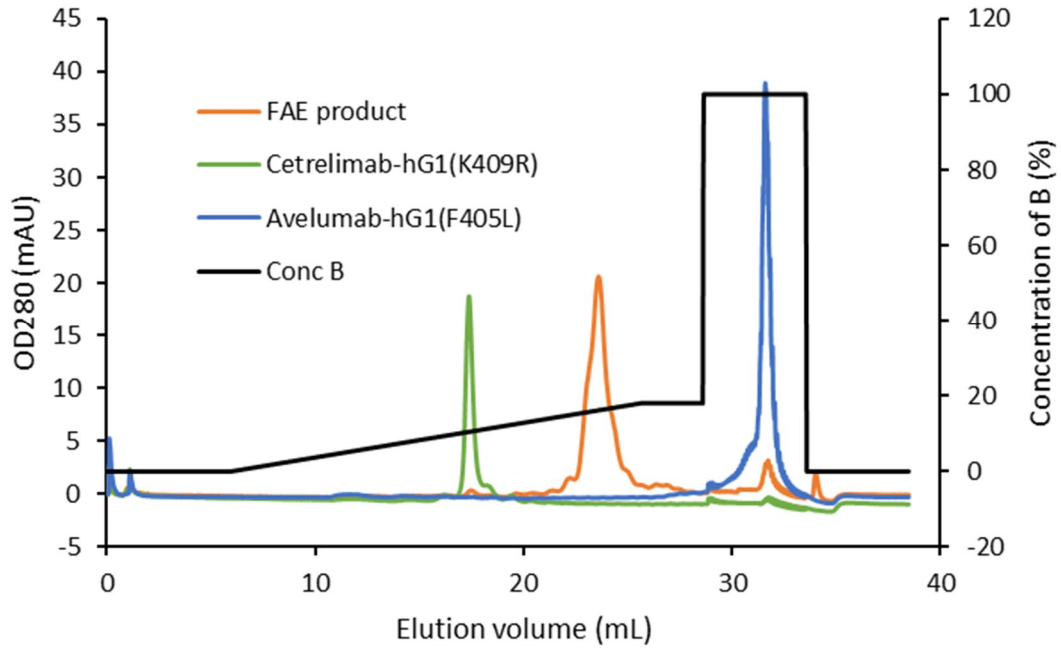


図 2. 陽イオン交換クロマトグラフィークロマトグラム

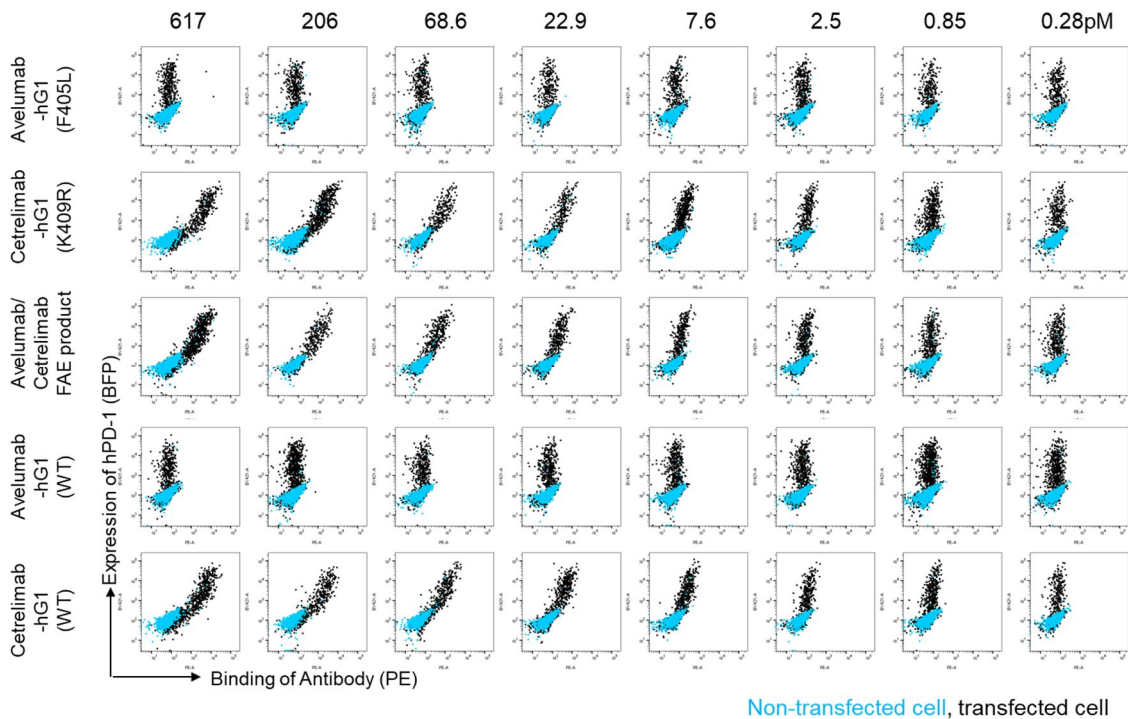


図 3. hPD-1 との結合実験

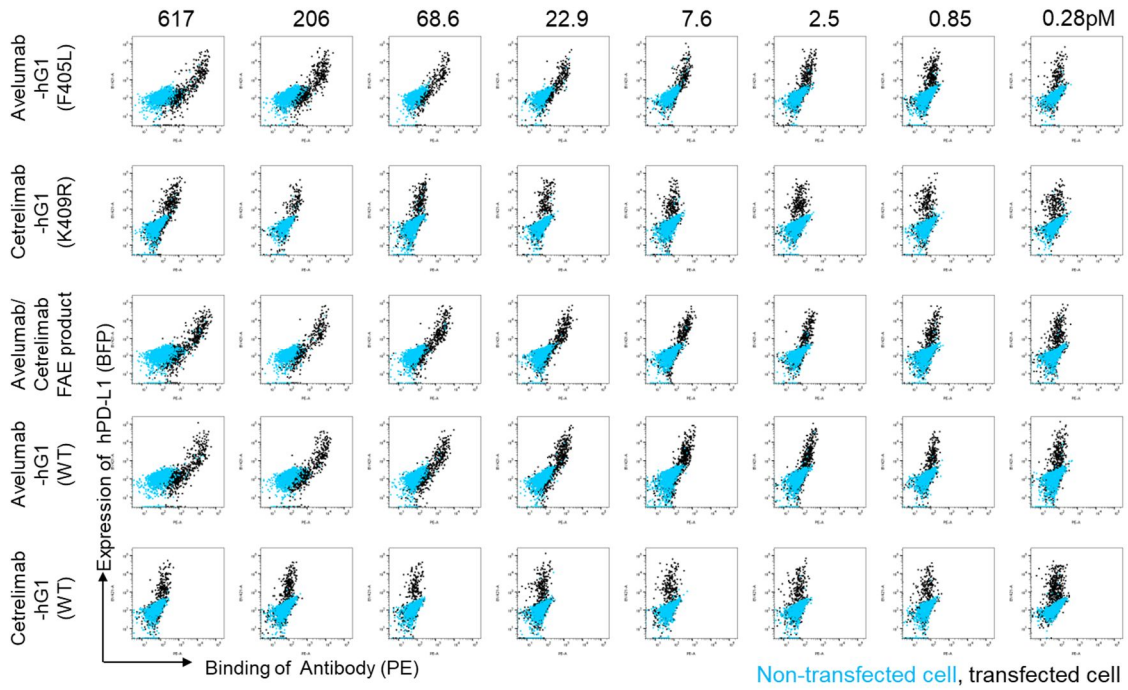
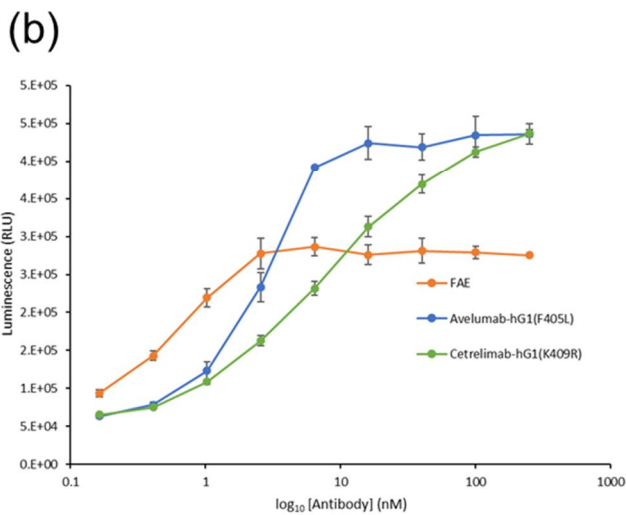
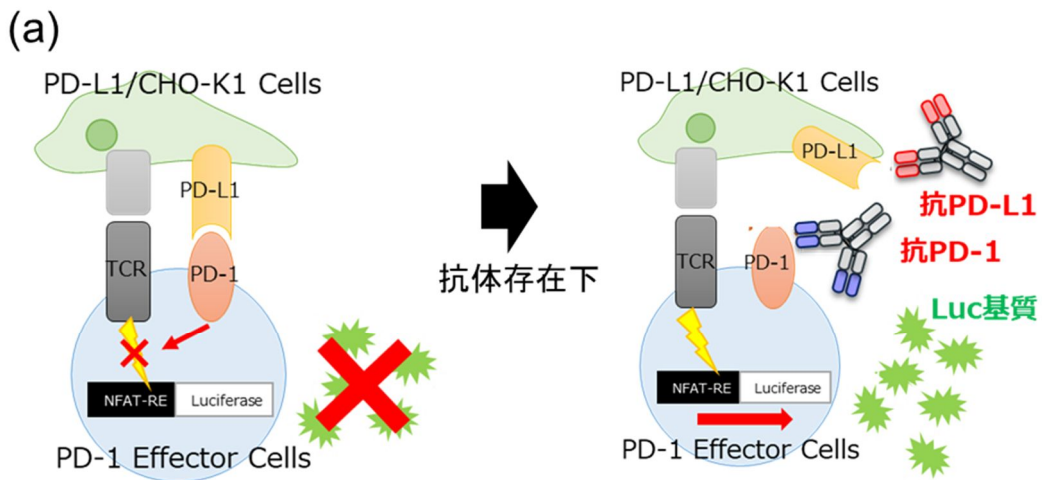


図 4. hPD-L1 との結合実験



Name	EC50
FAE	0.65
Avelumab-hG1(F405L)	2.68
Cetrelimab-hG1(K409R)	8.06

図 5. バイオアッセイ (a) バイオアッセイ模式図、(b)阻害活性曲線、(c)EC50

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------