

各 位

会 社 名 株式会社カイオム・バイオサイエンス
代表者名 代表取締役社長 小林 茂
(コード：4583 東証グロース)

第 1 回日本抗体学会での Tribody 創薬の研究成果発表のお知らせ

この度、当社の多価抗体作製技術 Tribody™を用いた研究成果を第 1 回日本抗体学会設立記念学術大会（開催地：鹿児島大学、開催期間：2022 年 11 月 26 日（土） - 27 日（日））において発表いたしましたので、お知らせいたします。

Tribody™は、当社が保有する 3 つの結合部位を持つ多価抗体を作製する技術であり、当社ではこの技術を用いた医薬品である CBA-1535 の臨床試験や新規創薬パイプラインの創出に向けた研究を進めております。本学会では当社がこれまでにイタリアの公的研究機関 Ceinge-Biotecnologie Avanzate と実施した Tribody™によるがん免疫療法に関する共同研究成果について発表いたしました。

また、当社では本共同研究によって得られた成果について特許出願を完了しており、特に 5T4×CD3×PD-L1 を標的とする 53L10 型 Tribody™は今後の当社の新たな創薬パイプライン（PTRY）として研究開発、事業化を推進してまいります。

発表の概要は以下の通りです。

発 表 日：2022 年 11 月 26 日

発表形式：ポスター

タイトル：「免疫チェックポイント分子を標的とした新規の二重特異性 Tribody 分子は T 細胞活性化能および抗腫瘍活性を向上させる」

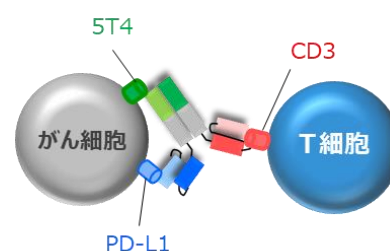
日本抗体学会 HP <https://antibodysociety.jp/>

<Tribody™とは>

Tribody™は分子工学的手法により作製した複数の抗原に対する特異性を持つ多重特異性抗体で、1 つの分子の中に 3 つの異なる抗原結合部位があり、異なる機能を組み合わせることが可能となる技術です。結合する標的や結合する手の数の組み合わせにより、これまで医薬品にできなかった標的に対する抗体の創製や複数薬剤の併用投与から解放される特徴を有するような抗体の創製が期待されます。

<PTRY とは>

標的分子を 5T4×CD3×PD-L1 とする Tribody™を用いて創製した当社の新たながん治療用抗体です。PTRY は in vivo 薬効試験において強い腫瘍増殖抑制効果を発揮することが確認されており、当社の重要な創薬パイプラインの一つとして位置付けております。



【本件に関する問い合わせ】

株式会社カイオム・バイオサイエンス IR 担当
電話：03-6383-3746

免疫チェックポイント分子を標的とした新規の二重特異性Tribody分子はT細胞活性化能および抗腫瘍活性を向上させる

橋本修一¹, 吉岡麻美¹, 高橋恒太¹, 井上俊和¹, 坂口いずみ¹, Margherita Passariello^{2,3}, Claudia De Lorenzo^{2,3}, 中村康司¹

¹ 株式会社カイオム・バイオサイエンス, ² Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples "Federico II", ³ Ceinge - Biotechnologie Avanzate

要旨

免疫チェックポイント分子阻害 (ICI) 抗体はがん治療に広く用いられているが、単一のICIによる治療は、効果を示す患者に限られることや治療進行に伴う耐性発現などの問題がある。我々はこの問題を解決するため、3つの抗原結合部位 (1つのFabドメインと2つのScFvドメイン) を持つ多重特異性抗体様分子であるTribodyフォーマットをICIおよびICIとT cell engager分子の併用として適用した。

まず我々は、PD-1、PD-L1、LAG-3に結合するScFv配列を基にして、これらをTribodyフォーマットの各アームに配置することで、上記ターゲットに対して二重特異性を持つ分子を複数作製した。これらの分子は、通常の抗体に用いられる発現精製系によって高度に精製可能であり、分子設計に対応したターゲット結合活性を有していた。これらのTribody分子をヒト末梢リンパ球を用いた*in vitro* T細胞活性化アッセイ系に用いたところ、単独の抗体およびその併用に比較して有意に高いインターロキン-2またはインターフェロンγの産生を誘導した。(ref. 1)

次に我々は、がん特異的抗原である5T4、T細胞を標的とするCD3、および上記の3つのチェックポイント分子のいずれかに同時に結合する、T cell engager型三重特異性Tribody分子を作製し、すでに当社において薬効が評価されている5T4とCD3を標的とするT cell engager型二重特異性Tribody分子 (CBA-1535) との薬効の比較を行った。その結果、作製した三重特異性Tribody分子はいずれも、*in vitro*での癌細胞とPBMNCの共培養系においてCBA-1535とそれぞれに対応するICI抗体の混合投与よりも強い細胞傷害活性を示した。またヒト肺癌細胞株であるA549細胞とヒトPBMNCを同時にNOD/SCIDマウスの皮下に移植したゼノグラフトモデルにおいて、CBA-1535よりも強力な抗腫瘍活性を示した。(ref. 2)

本研究の結果により、Tribodyフォーマットによって複数のICI、がん抗原標的抗体、T cell engager抗体を組み合わせることで、単独のICI抗体、二重特異性T cell engager抗体、またはそれらの併用に比べて大きく抗腫瘍活性の向上した、新規多重特異性分子を創生する可能性が示された。

Tribodyフォーマット

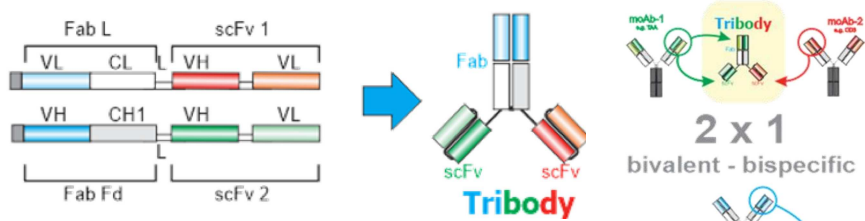


Fig.1 Tribodyフォーマットの構造

Tribodyは、抗体重鎖FdドメインとscFvを含むペプチド鎖と、抗体軽鎖とscFvを含むペプチド鎖からなる。1つのFabドメインと2つのScFvドメインに異なる抗体由来のペプチドを用いることができるため、1価結合ドメインの3重特異性Tribody、2価+1価結合ドメインの2重特異性Tribodyを作製することが可能である。本研究において用いられた抗PD-1、抗PD-L1、抗LAG-3の各抗体は、Sasso et al. (2018) (3)において取得が報告されたものを用いた。

PD-1, PD-L1, LAG-3抗体を持つTRシリーズTribodyの構築

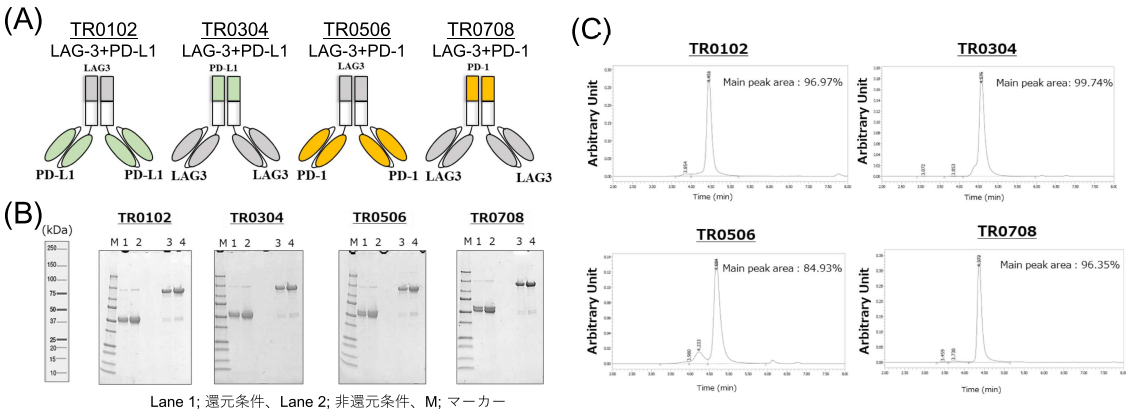


Fig.2 PD-1, PD-L1, LAG-3に対する結合アームを持つTRシリーズTribodyの発現・精製

(A) 抗PD-1、抗PD-L1、抗LAG-3 scFv抗体の配列を基に、図に示す構造をもつTribodyの発現ベクターを構築し、Expi293による一過性発現を行った。培養上清よりHisタグアフィニティ精製およびゲル濾過精製を行った。(B) Tribody最終精製タンパクのSDS-PAGEによる評価。(C) 精製タンパクのSECクロマトグラフィーによる評価。TRシリーズTribodyはいずれも高度に精製可能であった。

TRシリーズTribodyの結合活性

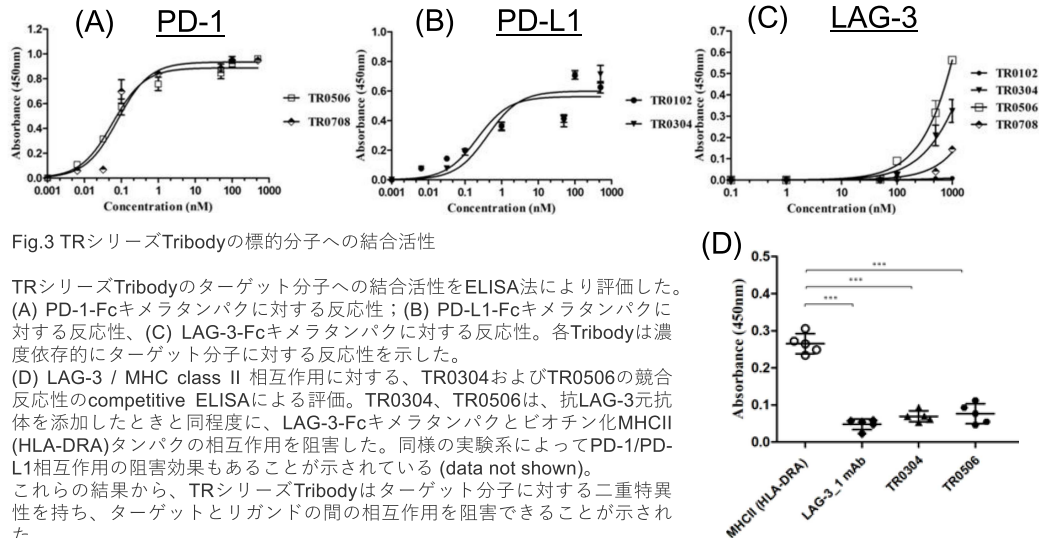


Fig.3 TRシリーズTribodyの標的分子への結合活性

TRシリーズTribodyのターゲット分子への結合活性をELISA法により評価した。(A) PD-1-FCキメラタンパクに対する反応性；(B) PD-L1-FCキメラタンパクに対する反応性；(C) LAG-3-FCキメラタンパクに対する反応性。各Tribodyは濃度依存的にターゲット分子に対する反応性を示した。(D) LAG-3 / MHC class II 相互作用に対する、TR0304およびTR0506の競合反応性のcompetitive ELISAによる評価。TR0304、TR0506は、抗LAG-3元抗体を添加したときと同程度に、LAG-3-FCキメラタンパクとビオチン化MHCII (HLA-DRA)タンパクの相互作用を阻害した。同様の実験系によってPD-1/PD-L1相互作用の阻害効果もあることが示されている (data not shown)。これらの結果から、TRシリーズTribodyはターゲット分子に対する二重特異性を持ち、ターゲットとリガンドの間の相互作用を阻害できることが示された。

TRシリーズTribodyは抗体の混合よりも高いT細胞活性化を示す

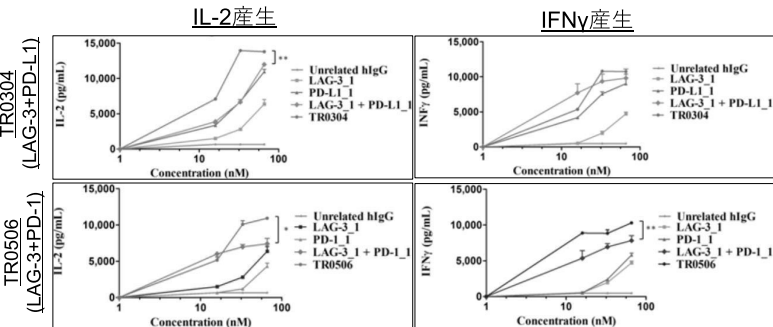


Fig.4 TRシリーズTribodyのヒトPBMNCの活性化能の評価

ヒトPBMNCを50 ng/mLのSEB (Staphylococcal enterotoxin B) 存在下で各抗体とともに培養し、培養上清中に産生するIL-2およびIFNγを定量した。TR0304、TR0506はそれぞれの元抗体の混合添加と同程度以上にIL-2、IFNγの産生を活性化させた。エラーバーは平均±標準偏差。p値；*** p≤0.001；** p≤0.01；* p≤0.05。

がん抗原5T4に結合する三重特異性Tribody

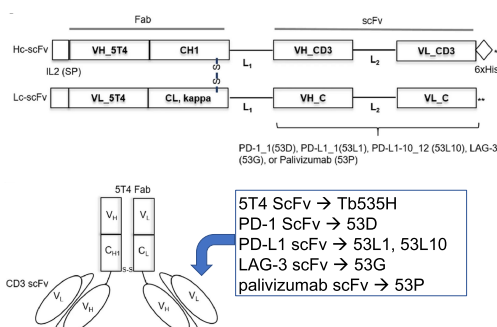


Fig.5 53XシリーズTribodyの構造

次に我々は、CD3とがん抗原5T4に対して結合し、もう一つの結合ドメインで各チェックポイント分子に対して結合する、53XシリーズTribodyを作製した。これは、当社において第1相臨床試験(JRCT2031210708)が実施されているTb535H (CBA-1535)と比較して、そのscFvアームの一方が、チェックポイント分子結合ドメインに置き換えられた構造となっている。また、PD-L1結合ドメインについては、元クローンであるPD-L1_1抗体に対して親和性向上を施したPD-L1-10_12抗体の配列を組み込んだものも53L10として作製した。陰性対照コントロールとして、非特異的な抗体としてpalivizumabのscFvアームを持つTribodyを同時に作成した。

53XシリーズTribodyの結合活性

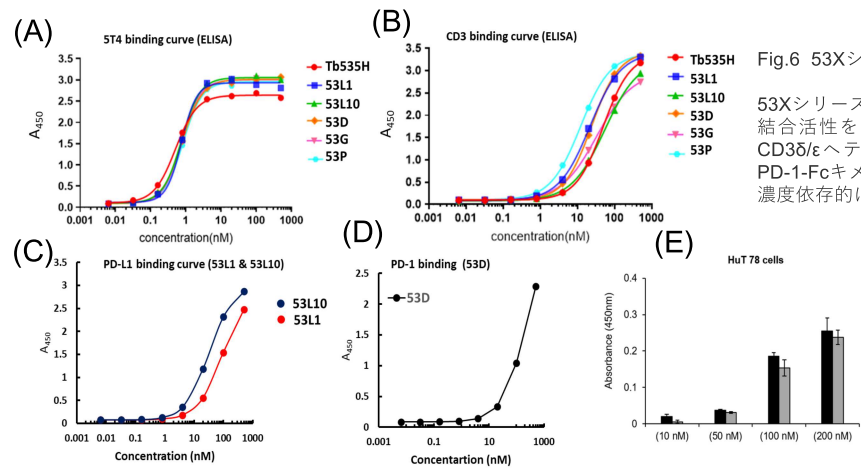


Fig.6 53XシリーズTribodyのターゲット結合性の評価

53XシリーズTribodyのそれぞれのターゲット分子への結合活性をELISA法により評価した。(A) 5T4；(B) CD3δ/εヘテロダイマー；(C) PD-L1-FCキメラ；(D) PD-1-FCキメラタンパクに対する反応性。各Tribodyは濃度依存的にターゲット分子に対する反応性を示した。(E) 53G TribodyのLAG-3への結合性を、LAG-3を発現するがPD-1、PD-L1の発現が無いことが知られているHuT78細胞株に対するcell ELISAで評価した。53Gおよび抗LAG-3元抗体は、濃度依存的にHuT78細胞に対する反応性を示した。

53XシリーズTribodyのT細胞活性化能の評価

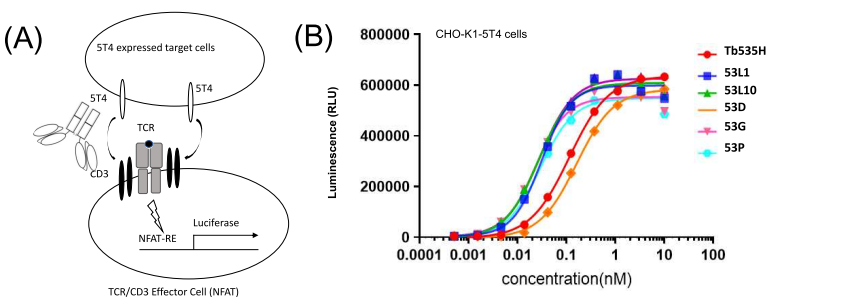


Fig.7 レポーターアッセイによる53XシリーズTribodyのT細胞活性化能の評価

(A) レポーターアッセイ (Promega社 T cell activation bioassay (NFAT)キット) の概念図。ターゲット細胞として、5T4強制発現CHO-K1細胞(CHO-K1-5T4)を用いた。(B) 各TribodyのNFATレポーター遺伝子活性化能。すべてのTribodyは濃度依存的にレポーター遺伝子の発現を活性化した。Tribody間でその強度に大きな差はなく、免疫チェックポイント分子結合ドメインの有無によって、CD3を介した活性化能はそこなわれなかった。

53Xシリーズのin vitro細胞傷害活性

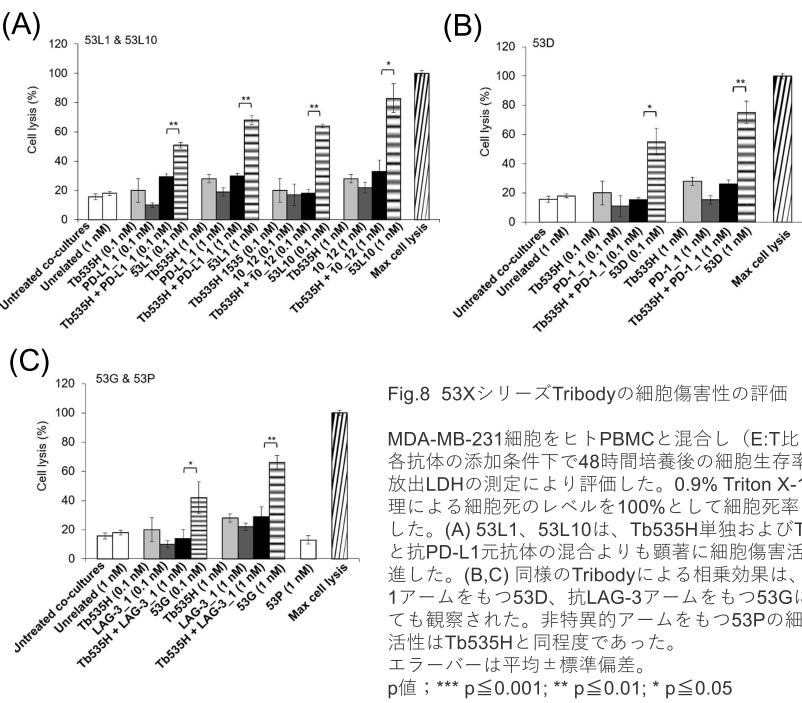


Fig.8 53XシリーズTribodyの細胞傷害性の評価

MDA-MB-231細胞をヒトPBMNCと混合し (E:T比 5:1)、各抗体の添加条件下で48時間培養後の細胞生存率を、放出LDHの測定により評価した。0.9% Triton X-100処理による細胞死のレベルを100%として細胞死亡率を算出した。(A) 53L1、53L10は、Tb535H単独およびTb535Hと抗PD-L1元抗体の混合よりも顕著に細胞傷害活性が亢進した。(B,C) 同様のTribodyによる相乗効果は、抗PD-1アームをもつ53D、抗LAG-3アームをもつ53Gについても観察された。非特異的アームをもつ53Pの細胞傷害活性はTb535Hと同程度であった。エラーバーは平均±標準偏差。p値；*** p≤0.001；** p≤0.01；* p≤0.05

53Xシリーズのin vivo 抗腫瘍活性

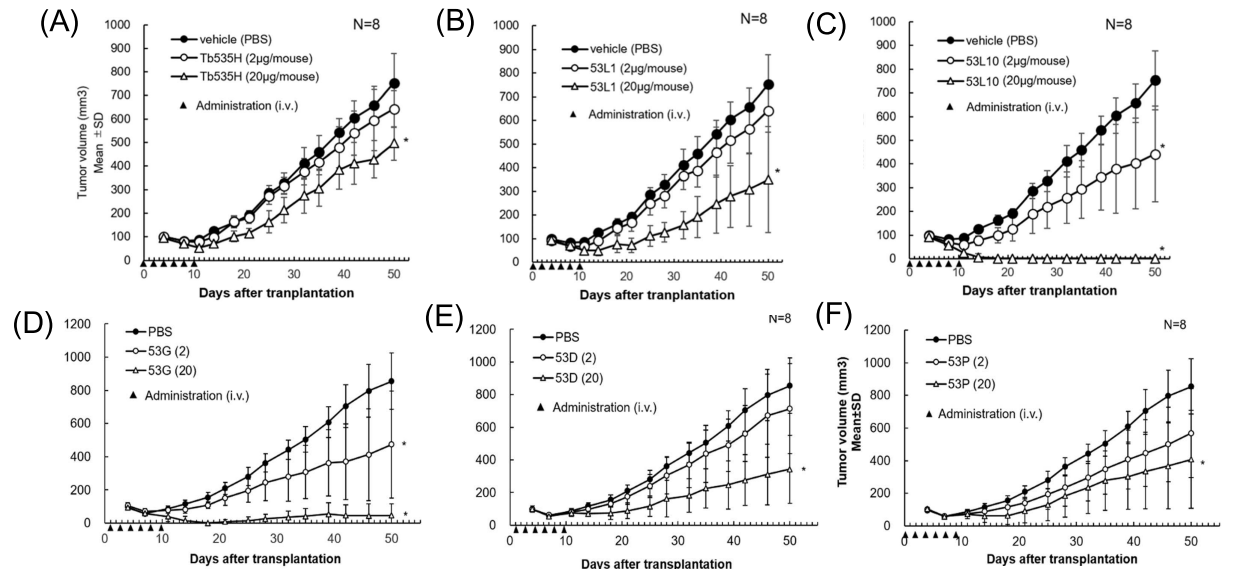


Fig.9 53XシリーズのA549細胞株マウスゼノグラフトモデルにおける薬効評価

(A~C) 5×10⁶個のA549細胞をヒトPBMNCとともにNOD-scidマウスに皮下移植し、図に示した量のTribodyを移植直後から1日おきに6回投与し、その後の腫瘍体積の変動を観察した。53L1と53L10の抗腫瘍活性はTb535Hを上回り、53L10の20 μg/mouseの投与では全例が完全に腫瘍が退縮した。(D~F) 同様の実験系により、53P、53D、53Gを評価したところ、53Gの抗腫瘍活性は53Pを上回った。53Dは53Pに比較して顕著な亢進はみられなかった。エラーバーは標準偏差。* P < 0.05 (Dunnett検定)。