

令和 3 年 6 月 10 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960771

氏 名 穴見 康昭

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ヒューストン（国名： 米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

トリプルネガティブ乳がんに対する二重特異性抗体-薬物複合体の開発

3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 5 月 11 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： テキサス大学ヘルスサイエンスセンター ヒューストン校

部局名： ブラウン分子医薬研究所

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

<研究目的・背景>

トリプルネガティブ乳がん (TNBC) は、全ての乳がんの 10-20%を占め、他の乳がんよりも予後が悪く治療が困難である (図 1)。TNBC は、乳がん治療における代表的な特異的マーカーであるエストロゲン受容体・プロゲステロン受容体・HER2 を発現しないため、現在の治療戦略は、化学療法と外科的切除や放射線治療の組み合わせに限られる。しかし、ほとんどの化学療法剤 (抗がん剤) が示すオフターゲット毒性による深刻な副作用により、治療の中断を余儀なくされるケースが多い。

HER2 陽性乳がんに対する治療薬である Kadcyla は、抗 HER2 ADC である。しかしながら、上述のように Kadcyla は、TNBC を治療することはできない。そこで、抗 HER2 ADC に対してがん特異的リガンドを化学的に付加し、二重特異性抗体-薬物複合体 (bispecific ADC) を構築することができれば、HER2 陽性乳がんだけでなく、TNBC も標的化することができるものと考えた。葉酸は葉酸受容体 (FR) と強く相互作用する生体内リガンドであり、一般的な抗原-抗体間の相互作用に近いレベルの親和性($K_D = 0.1-1$ nM)を示す。また、FR は TNBC を含む様々ながん細胞に過剰発現しており、ドラッグデリバリーシステム開発において頻繁に用いられる。特に、約 80%の TNBC において FR が過剰発現していることが報告されている。以上の背景から、本研究では、がん特異的リガンドとして葉酸 (Folic acid) を使用し、二重特異性抗体-薬物複合体 (bispecific ADC) を構築し、上記課題を解決することを目的に研究に着手した。

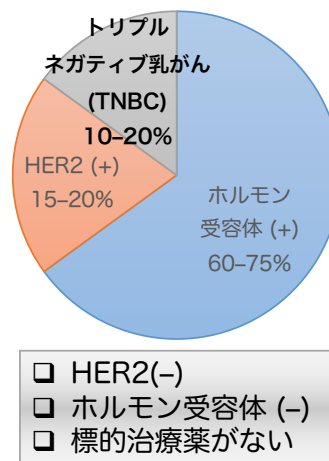


図 1. TNBC の特徴

<研究実施状況>

二重特異性 ADC の構築

(1) 分岐型非対称リンカーの合成と mAb-リンカー複合体の構築

はじめに、リシンを母核とした分岐型非対称リンカーを合成した (図 2)。種々リンカーは、Fmoc 基及び Boc 基により α 位、 ϵ 位のアミノ基が保護されたリシンを出発原料とし、アミドカップリングと脱保護を繰り返すことで合成した。抗がん剤および葉酸は、2 種の異なるクリック反応 (二重クリック反応) を組み合わせることで導入するため、分岐型非対称リンカーには、アジド基およびメチルテトラジン基を採用した。また、抗体への導入効率や二重クリック反応の反応性をスクリーニングするために、分岐点であるリシンの母核とアミノ基、アジド基、メチルテトラジン基の間に様々なポリエチレングリコール (PEG) 鎖を持つ化合物を合成した。

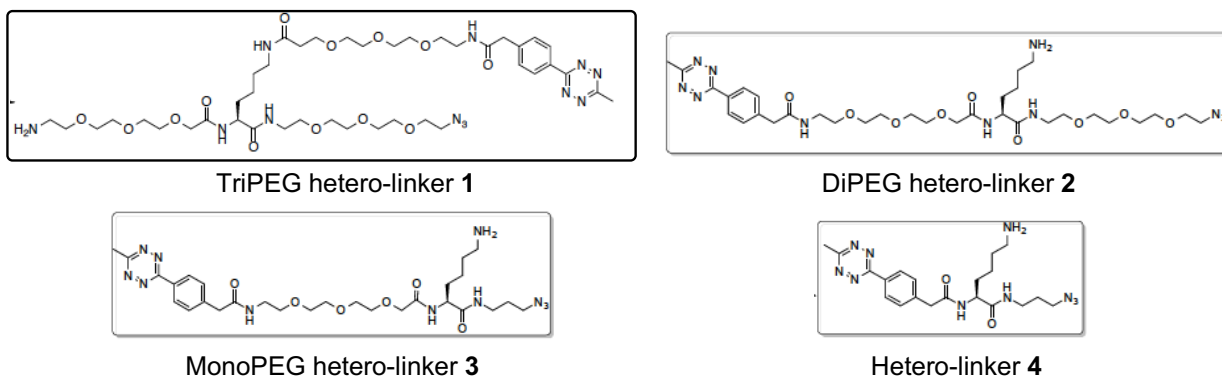


図 2. 分岐型非対称リンカー

続いて、化学的組成が均一な二重特異性 ADC を構築するために、microbial transglutaminase (MTGase) を用いてリンカーコンジュゲーション反応を行い、最適なリンカー構造を同定した (図 3)。MTGase を用いることで、当研究グループでは、対称な分岐型リンカーをヒト IgG1 の 295 位グルタミン (Q295) 選択的かつ定量的に導入することができることを既に報告している。コンジュゲーションの進行は、LC/MS にて確認した。興味深いことに、PEG 鎖をもたない hetero linker 4 が最も導入率が高く、全ての未修飾抗体を mAb-リンカー複合体へと変換することに成功した。この知見を基に、今後の二重特異性 ADC の構築には、hetero linker 4 を使用することにした。

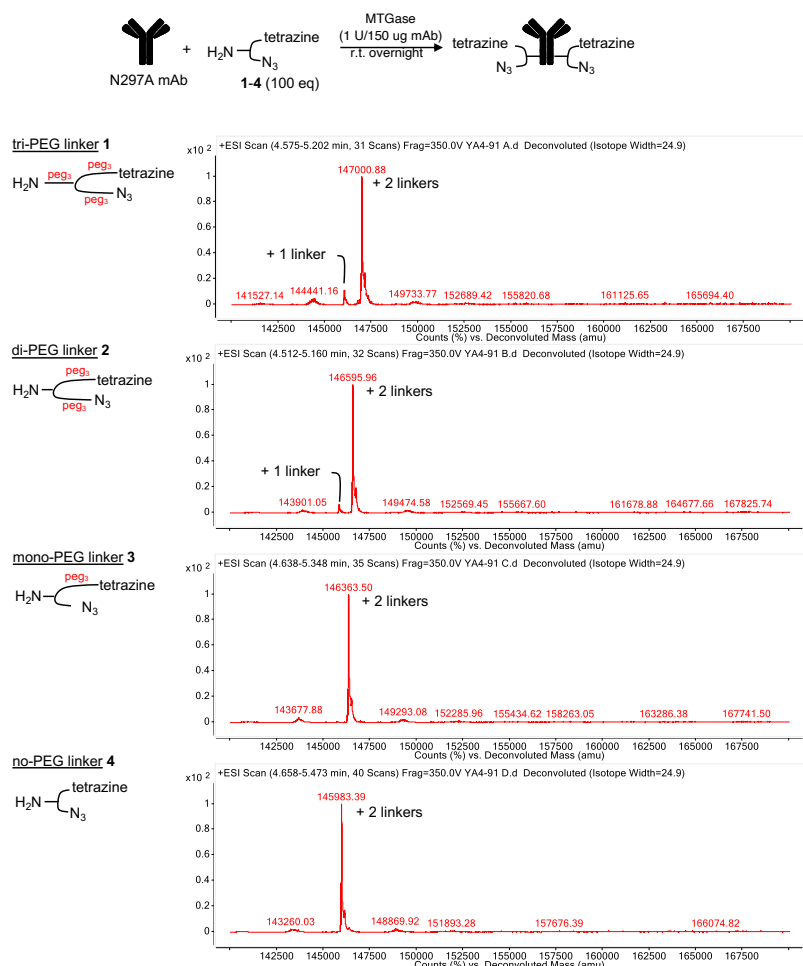


図 3. mAb-リンカー複合体の構築

(2) 葉酸フラグメントの合成

次に、葉酸フラグメントの合成に着手した。当研究グループでは、リンカー部位のアジド基と定量的に反応する dibenzocyclooctyne (DBCO) を有する monomethyl auristatin F (MMAF、抗がん剤) フラグメントを既に合成していたため、葉酸フラグメントには、hetero linker 4 のメチルテトラ

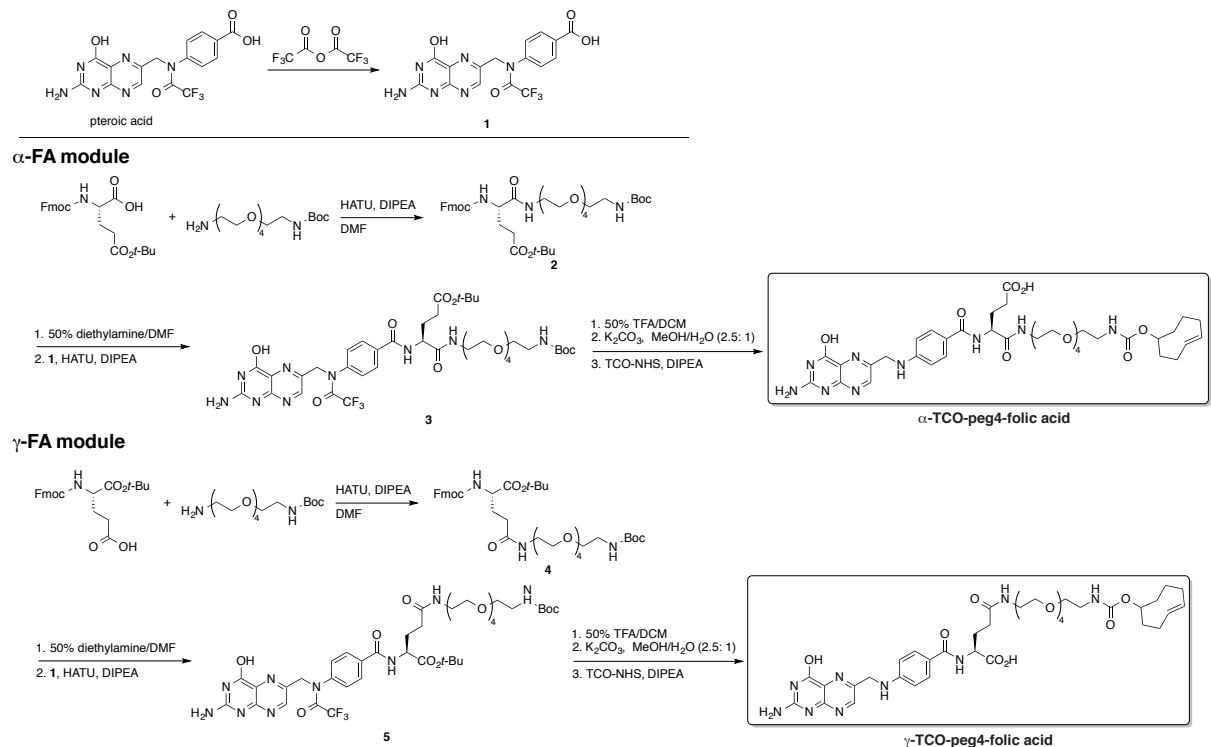


図 4. α -及び γ -選択的 TCO-葉酸モジュールの合成

ジン基と反応する *trans*-cyclooctene (TCO) を導入することにした。葉酸は、2つの修飾可能なカルボキシル基 (α -と γ -) をもち、修飾部位により生体内分布が異なることが報告されている (Boss S.D. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1, 74.)。そのため、 α -TCO-PEG4-葉酸フラグメントと γ -TCO-PEG4-葉酸フラグメントをそれぞれ合成した (図4)。また、抗体構造から葉酸の最適な距離を検討するために、 α 、 γ -の混合物ではあるが、様々な長さの PEG 鎖 (PEG4, 12, 24) を有する葉酸フラグメントも合成した。

(3) 二重特異性 ADC の構築

次に、(1) で構築した mAb-リンカー複合体と (2) で合成した葉酸フラグメントおよび当研究室で開発した MMAF フラグメントを水中で反応 (二重クリック反応) させることで、二重特異性 ADC を構築した。なお、本研究では、リンカー、薬物フラグメント、及び葉酸フラグメントを別々に調製した後に組み合わせるモジュール式合成戦略を採用するため、mAb-リンカー複合体を一度構築すれば、導入する薬物・リガンドフラグメントを適宜変更するだけで多種多様な ADC を短期間に構築することが可能である。図5に示すように、それぞれのモジュールが交差反応せず、抗体1分子に対して MMAF と葉酸が4分子ずつ導入された抗体-薬物比 (drug-to-antibody ratio; DAR) 4+4 の二重特異性 ADC を構築することができた (LC/MS にて確認)。

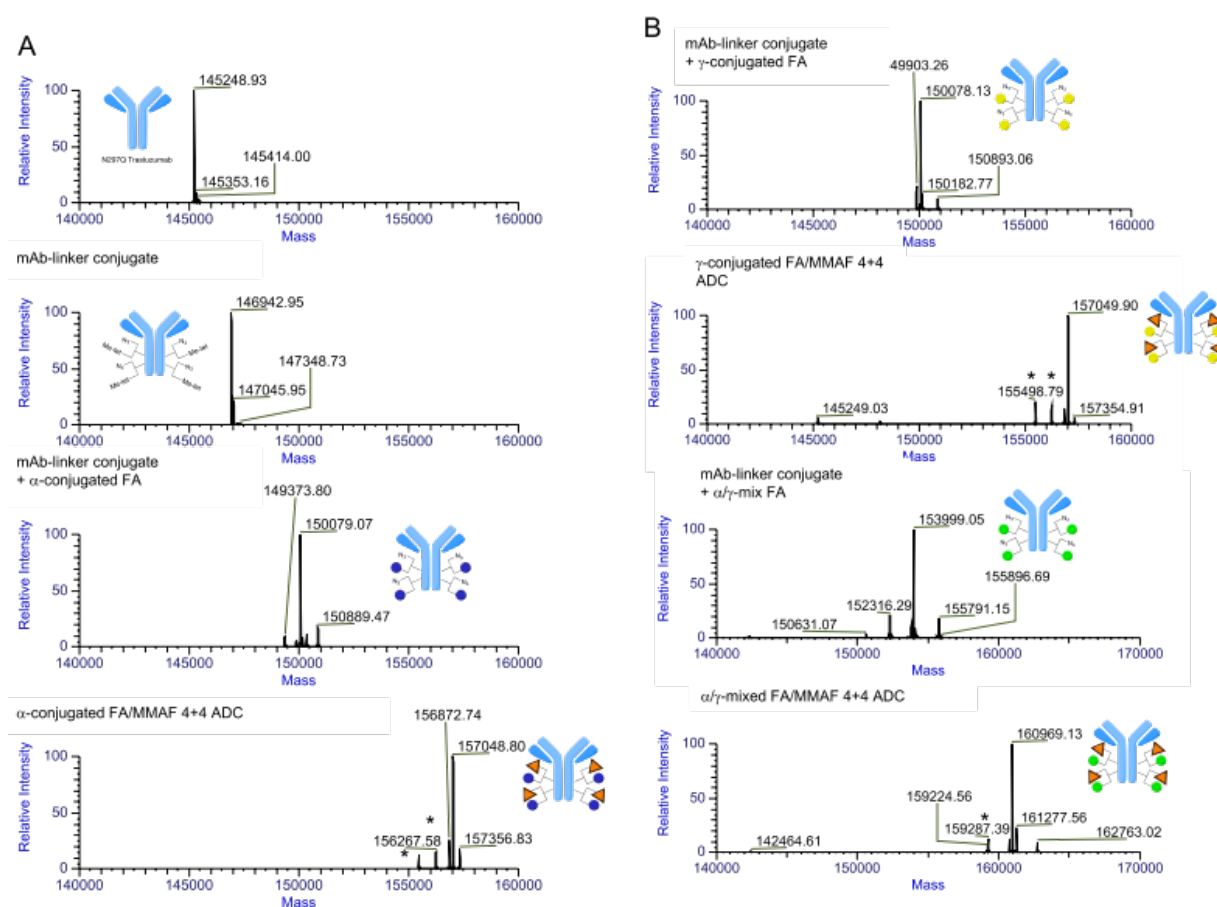


図5. 二重特異性 ADC の構築

二重特異性 ADC の物理化学特性と生物活性評価

(1) 物理化学特性の評価

構築した種々二重特異性 ADC の疎水性を hydrophobic interaction chromatography (HIC) によって評価した。疎水性が高すぎる ADC は、体内から速く排出されることが報告されている。このため、比較的疎水性の高い MMAF を搭載する ADC の疎水性を評価することは重要である。葉酸が4分子結合した DAR (4+4) 二重特異性 ADC は、通常の MMAF のみを有する ADC と同等の疎水性を示した。これは、葉酸の水溶性が高いため、ADC の疎水性には寄与しなかったものと考えられる (図6A)。続いて、ADC を 37 °C で2週間静置し、サイズ排除クロマトグラフィーにより凝集度合いを

測定した。HIC 解析同様、比較的疎水性の高い MMAF を搭載するため、高温で長時間静置することで ADC は凝集体を形成する可能性がある。この凝集体は、体内からの排出速度に大きな影響を及ぼすため、本段階で凝集しにくい ADC 構造を見極める必要がある。その結果、全ての二重特異性 ADC は、顕著な凝集体を形成しなかった (図 6B)。さらに、酵素 (カテプシン B) による MMAF 分子の放出に対する葉酸分子の影響を調査するために、二重特異性 ADC を 37 °C でカテプシン B とインキュベートした。その結果、二重特異性 ADC は、4 時間で全ての MMAF 分子を放出し、葉酸はカテプシン B による MMAF 分子の放出を阻害しないことが明らかになった (図 6C)。

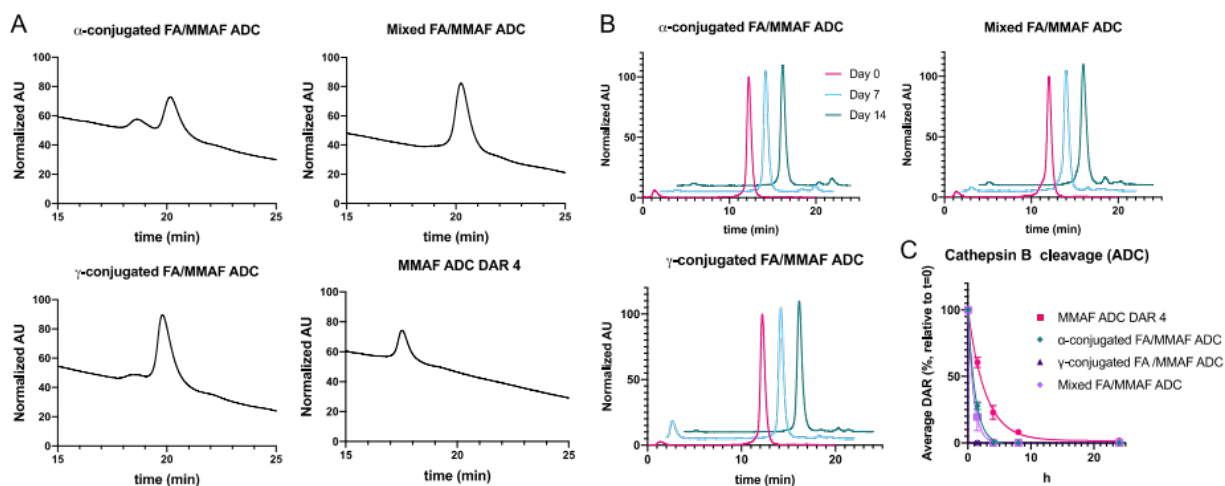


図 6. 二重特異性 ADC の物理化学特性

(2) 生物活性評価

構築した二重特異性 ADC の抗原 (FR と HER2) に対する結合能を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって評価した (図 7A)。FR 陽性細胞として KB 細胞 (FR+, HER2-)、HER2 陽性細胞として KPL-4 細胞 (FR-, HER2+) を使用した。その結果、HER2 のみの ADC は、FR に対する結合能を示さなかったものの、スペーサーとして peg24 を有する α, γ-混合葉酸二重特異性 ADC が FR に対して高い結合能を示した。α-あるいは γ-位置選択的な葉酸二重特異性 ADC は、FR に対して中程度の結合能を示した。また、全ての二重特異性 ADC は、HER2 に対する結合能を維持し、FR と HER2 両陰性細胞である HEK293 細胞には結合能を示さなかった。この結果から、FA の付加により抗体本来の HER2 に対する結合能を保ち、想定どおり FR にも結合できることが明らかになった。

続いて、KB 細胞、KPL-4 細胞、HEK293 細胞を用いて二重特異性 ADC の細胞殺傷能を評価した (図 7B)。全ての二重特異性 ADC は、スペーサーの長さや α, γ-のコンジュゲーション位置にかかわらず KB 細胞と KPL-4 細胞に対して強い細胞殺傷能を示した。一方、HEK293 細胞には、効果を示さなかった。このことから、二重特異性 ADC は抗原 (FR と HER2) 特異的に細胞殺傷能を示すことが明らかになった。さらに、FR を発現している TNBC である CAL51 細胞における細胞殺傷能も評価した (図 7C)。その結果、FR 陽性細胞である KB 細胞と同様、全ての二重特異性 ADC は、同等の細胞殺傷能を示した。以上のことから、葉酸を結合させた二重特異性 ADC は、HER2 陽性細胞のみならず FR 陽性の TNBC や他の腫瘍細胞も殺傷できることが明らかになり、TNBC 治療の有用なプラットフォームになり得ることが示唆された。

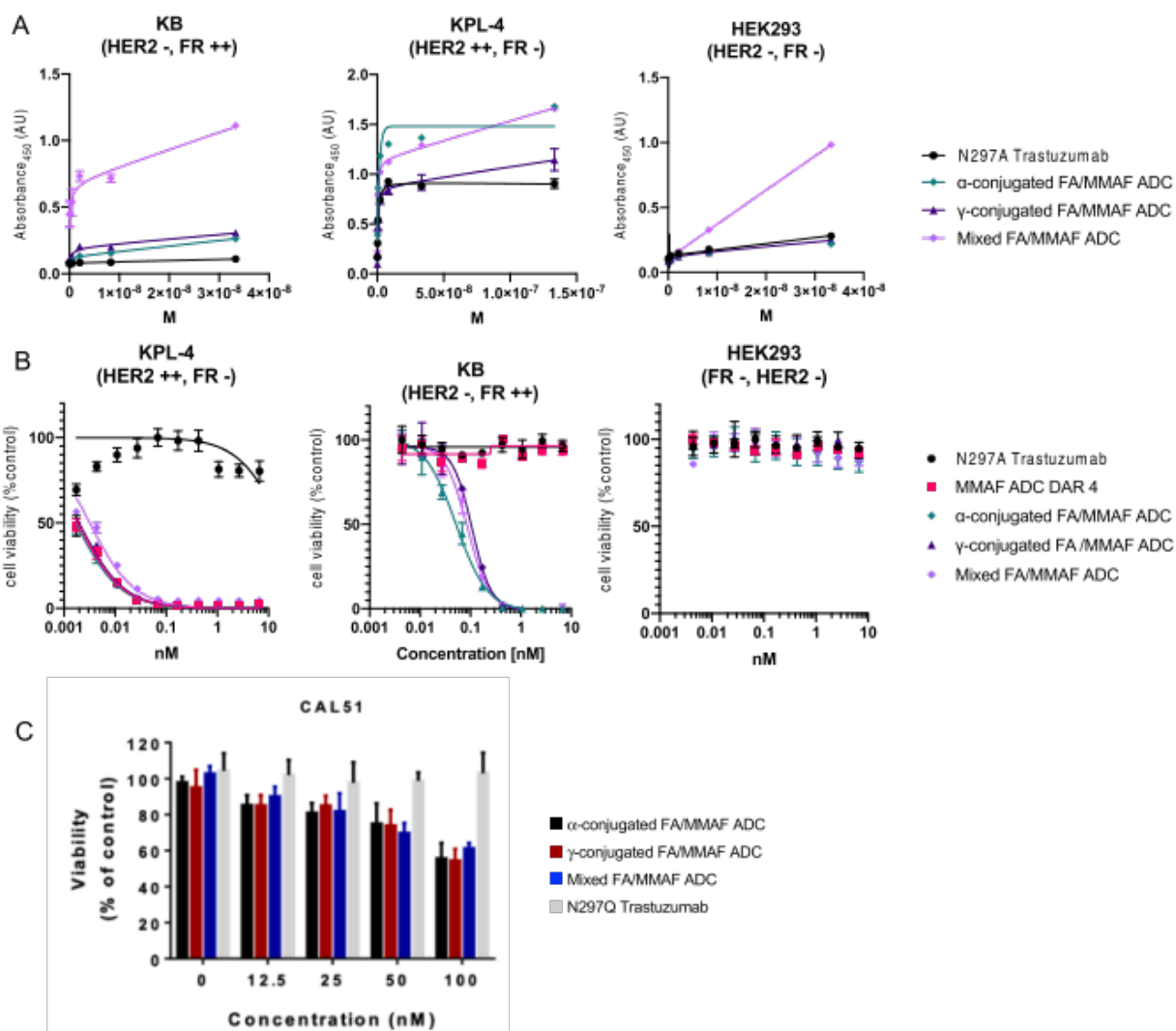


図 7. 二重特異性 ADC の結合能および細胞殺傷能

<今後の展望>

これまでの成果は、*Bioorg. Med. Chem.* **2021**;32:116013 に発表済みである。現在は、マウスを用いた薬物動態試験とマウス体内分布試験、さらに TNBC 担がんマウスモデルの治療試験を検討中であり、葉酸の導入がどのように ADC の血中安定性及びオフターゲット毒性の発現に影響を及ぼすかを評価し、がん組織及び他の臓器への集積率を比較することで、ADC の毒性プロファイルを詳細に調べる予定である。また、治療実験からは TNBC 治療における二重特異性 ADC の有用性を立証したいと考えている。