



Title	新規抗体薬物複合体（ADC）技術の確立と次世代抗HER2 ADC薬DS-8201aの創出
Author(s)	扇谷, 祐輔
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61694
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

新規抗体薬物複合体（**ADC**）技術の確立と
次世代抗 **HER2 ADC** 薬 **DS-8201a** の創出

扇谷 祐輔

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

➤ 主論文

Yusuke Ogitani, Tetsuo Aida, Katsunobu Hagihara, Junko Yamaguchi, Chiaki Ishii, Naoya Harada, Masako Soma, Hiromi Okamoto, Masataka Oitate, Shingo Arakawa, Takehiro Hirai, Ryo Atsumi, Takashi Nakada, Ichiro Hayakawa, Yuki Abe, and Toshinori Agatsuma. DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1. *Clinical Cancer Research*, 2016 Mar 29, Online publication. [第 1 章 第 3-7 節、第 2 章]

Yusuke Ogitani, Katsunobu Hagihara, Masataka Oitate, Hiroyuki Naito and Toshinori Agatsuma. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody–drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. *Cancer Science*, 2016 Jul;107(7):1039-46. [第 3 章]

Yusuke Ogitani, Yuki Abe, Takuma Iguchi, Junko Yamaguchi, Tomoko Terauchi, Michiko Kitamura, Koichi Goto, Mayumi Goto, Masataka Oitate, Takashi Nakada, Takeshi Masuda, Koji Morita, and Toshinori Agatsuma. Wide application of a novel topoisomerase I inhibitor-based drug conjugation technology. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016 Aug 27, Online publication. [第 4 章]

➤ 参考論文

Takashi Nakada, Takeshi Masuda, Hiroyuki Naito, Masao Yoshida, Shinji Ashida, Koji Morita, Hideki Miyazaki, Yuji Kasuya, Yusuke Ogitani, Junko Yamaguchi, Yuki Abe, Takeshi Honda. 2016. Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26 (2016) 1542–1545. [第 1 章 第 2 節]

目次

緒論.....	2
本論.....	6
<u>第 1 章 DNA Topoisomerase I 阻害剤を用いた ADC 技術の確立.....</u>	<u>6</u>
第 1 節 実験材料と実験方法	
第 2 節 Exatecan 誘導体 (DXd) を用いた ADC 技術の開発	
第 3 節 DS-8201a の構造と遊離薬物 DXd (1)	
第 4 節 DS-8201a の有効性	
第 5 節 DS-8201a の薬効メカニズム	
第 6 節 DS-8201a の血中安定性と薬物動態	
第 7 節 DS-8201a の安全性	
第 8 節 小括 (1)	
<u>第 2 章 DS-8201a の T-DM1 との差別化.....</u>	<u>26</u>
第 1 節 実験材料と実験方法	
第 2 節 抗腫瘍活性評価	
第 3 節 HER2 低発現腫瘍に対する有効性	
第 4 節 小括 (2)	
<u>第 3 章 DS-8201a の bystander 効果.....</u>	<u>35</u>
第 1 節 実験材料と実験方法	
第 2 節 各 ADC と遊離薬物の構造と細胞膜透過性	
第 3 節 in vitro bystander 効果	
第 4 節 in vivo bystander 効果	
第 5 節 小括 (3)	
<u>第 4 章 DXd ADC 技術の汎用性.....</u>	<u>51</u>
第 1 節 実験材料と実験方法	
第 2 節 既存 ADC 抗体への適用	
第 3 節 抗 B7-H3 ADC の活性	
第 4 節 小括 (4)	
総括.....	57
結論.....	64
謝辞.....	65
参考文献.....	66

緒論

癌細胞に結合する抗体に、細胞毒性を有する薬物を結合させた抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate : ADC) は、選択的かつ効果的に癌細胞を死滅させることで、既存の化学療法剤と比較して広い治療域が期待される次世代抗体医薬品である。その作用メカニズムとしては、まず癌細胞上に発現する標的抗原に ADC が結合後、細胞内に内在化する。その後細胞内にて結合薬物が放出され抗癌作用を発揮するというものである[1]。現在 2 品目の ADC が上市されている。抗 CD30 抗体に Monomethyl auristatin E (MMAE) を結合させた SGN-35 (商品名 ; Adcetris) がホジキンリンパ腫と未分化大細胞リンパ腫の治療薬として[2,3,4]、また、抗 HER2 抗体であるトラスツズマブに DM1 を結合させた T-DM1 (商品名 ; Kadcyla) は ADC として初めて固形癌 (乳がん) を適応症として 2013 年に FDA に認可されている[5,6,7]。これらはいずれも抗体 1 分子に対して、平均 3 から 4 個程度のチューブリン重合阻害剤が結合されており、ともに優れた治療効果を示しその治療利用が広がっている。現在約 30 の ADC 品目が臨床試験を行っており ADC は将来的にも適応拡大が期待される次世代抗体の一カテゴリーとして注目度が高まっている[8]。

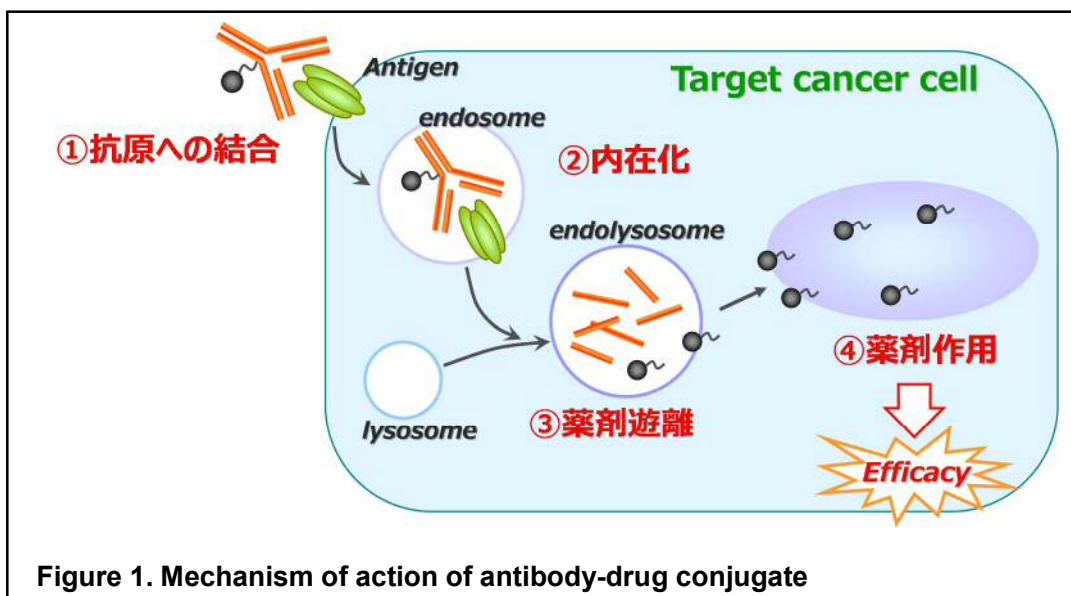


Figure 1. Mechanism of action of antibody-drug conjugate

ADC の基本概念、すなわち、抗癌剤を抗体に結合しミサイル療法に用いる、という概念は 1980 年代から提唱されてきたものの、プロトタイプの製剤では目ぼしい臨床成績が得られない状態が長らく続いていた。ADC は抗体部分、薬物部分、それらを結合するリンカー部分の 3 つの要素から構成されるが、ADC に適した薬物の選択、生体内でのリンカーの安定性に加え、抗体取得技術の向上や薬剤送達能の高い抗体を選択する技術の育成に時間を要したことが原因と考えられる。第一世代の ADC である gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) は抗 CD33 抗体に DNA アルキル化剤を結合させた ADC であり、CD33 陽性の再発急性骨髄性白血病の治療薬として 2000 年に承認されたが[9]、その 10 年後、市販後臨床試験にて製剤安定性及び有効性不足が示され承認取り下げとなった[10]。その後 Seattle Genetics 社及び Immunogen 社の 2 社の活躍により生体内でより安定で安全、そして腫瘍細胞への薬剤送達率の良い ADC 技術の開発が進み、第二世代の ADC である SGN-35、T-DM1 が誕生した。

現在臨床試験中の ADC の大多数は、MMAE や DM1、またはそれに類似したチューブリン重合阻害剤が結合した ADC であり、主に Seattle Genetics 社もしくは Immunogen 社の技術を適用した ADC である[8]。しかしながら、臨床試験において血小板減少症、好中球減少症、末梢神経障害など血中で遊離した結合薬物に起因すると考えられる用量規定毒性 (DLT : dose limiting toxicity) が複数見受けられ[11]、期待ほどの広い治療域を満たすことが出来ていない品目が多い。すなわち既存の ADC 技術には未だ改良の余地が多く残されており、より安全で、かつより強力な治療効果を示す ADC、そして複数の抗体に適用可能な ADC 技術の創製が期待されている状況である。

ここで、ADC 領域における現状の課題について以下にまとめた。

- 1) 薬物の種類に限りがあること

- 2) リンカーの不安定性
- 3) 薬物結合数に上限があること
- 4) 製剤中の結合薬物量の分布が不均一であること

1)については前述の通りチューブリン重合阻害剤が結合した ADC が多く存在するため、これら ADC に対し無効または耐性化した腫瘍に対して有効で、より広い抗腫瘍スペクトルを有する薬物の選定が求められている。2)についても前述の通りであるが、血中に遊離した薬物に起因する毒性発現が問題となっており、血中でより安定なリンカーの設計が必要である。T-DM1 では非臨床試験及び臨床試験における pharmacokinetics (PK) 解析において、血中での総抗体量と ADC 量の乖離、すなわち結合薬物の遊離が観察されており[5,12,13]、リンカーの改善により毒性軽減が期待できると同時に、血中 ADC 量増加による有効性の増大も期待できる。3)も重要な課題である。理論上、抗体に多くの薬物を結合させたほうが高い有効性が期待され、実際 SGN-35 でも薬物結合数増加に依存した *in vitro* の細胞障害活性の増大が認められている[14]。しかしながらマウス血中では薬物結合数増加に依存した血中クリアランスの増大が認められ、*in vivo* 抗腫瘍活性は 4 個結合体のほうが 8 個結合体よりも高かった[14]。薬物結合数増加に伴い ADC 体の物性が悪化したことが血中クリアランス増大の原因であると考えられる。従って、SGN-35 及び T-DM1 の平均薬物結合数

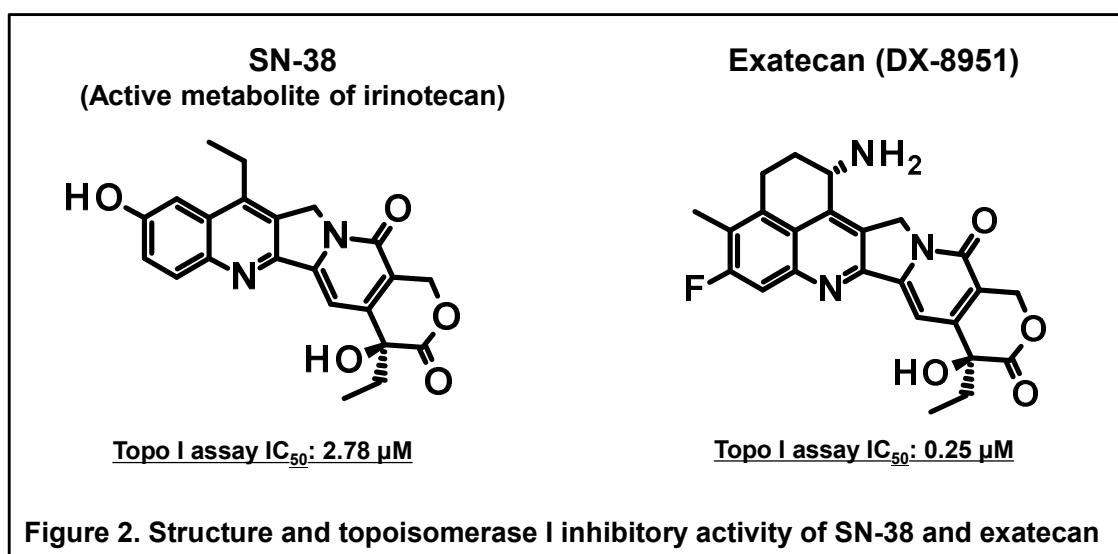
(Drug-to-antibody ratio: DAR) は 3-4 程度に制御されている。今後は多くの薬物を結合しても良好な物性プロファイルを示す ADC の設計が有効性増強のために求められる。最後に 4)について説明する。SGN-35、T-DM1 いずれの ADC も製剤中には 0 個結合体から 8 個結合体が混在しており、その平均値が 3-4 であることが報告されている[15]。すなわち製剤中の薬物分布が不均一であり製造コントロールが難しい。また、この場合 3)にも関連するが、製剤中に存在する 8 個結合体は血中にて早くクリアランスされ、有効性の低下及び毒性の発現にも影響する。

このような背景を踏まえ、本研究では現状の課題を克服可能な新規 ADC 技術、すなわち、
チューブリン重合阻害剤以外の作用機作の薬物を搭載し、血中で安定であり、高 DAR 化が
可能で、薬物分布が均一な ADC 技術の確立を目指し研究を行った。

本論

第1章 DNA Topoisomerase I 阻害剤を用いた ADC 技術の確立

イリノテカンなどの DNA topoisomerase I 阻害剤は臨床において大腸癌[16]、胃癌[17]など幅広い癌腫[18,19,20]に対し用いられており、その作用メカニズムとして、topoisomerase I と DNA の complex に結合、安定化させ DNA 二重鎖切断を誘導し、細胞をアポトーシスに導くことが知られている[21]。我々は過去にイリノテカン、そして新規 topoisomerase I 阻害剤 exatecan (開発コード ; DX-8951) の臨床開発を進めてきた。Exatecan はイリノテカンの活性本体である SN-38 よりも強い DNA トポイソメラーゼ I 阻害活性を有し、in vitro で種々の癌細胞に対して、より強い殺細胞活性が認められている[22]。また、マウスのヒト腫瘍皮下移植モデルでも強い抗腫瘍効果が認められ[23]、臨床試験でも一定の効果が認められたものの当時の開発意思決定により上市には至らなかった化合物であった[24]。今回このような研究開発経験を活かし、topoisomerase I 阻害剤を用いた新規 ADC 技術の構築を行った。抗体部分には T-DM1 により ADC としての有用性が証明されている抗 HER2 抗体、trastuzumab を用いることとした。



第1節 実験材料と実験方法

ADC の合成

抗 HER2 抗体として Roche 社より購入した trastuzumab、または第一三共株式会社にて生産した trastuzumab と同一のアミノ酸配列を有するモノクローナル IgG1 抗体を用いた。

ADC は、抗体鎖間のジスルフィド結合 (-SS-) を Tris 2-carboxyethyl phosphine hydrochloride (TCEP) により還元して生成したチオール基 (-SH) を、薬物リンカー末端のマレイミド基にマイケル付加させて合成した。ADC の凝集体率はサイズ排除クロマトグラフィーを用いて分析した。

DAR 算出と結合薬物分布解析

DAR は、UV 測定法により ADC の吸収波長を測定することで、抗体および薬物のモル吸光係数から算出した。または、1,4-dithiothreitol (DTT) 還元により L 鎖と H 鎖を分離し、逆相クロマトグラフィー分析により L0 (L 鎖)、L1 (L 鎖+1 drug)、H0 (H 鎖)、H1 (H 鎖+1 drug)、H2 (H 鎖+3 drug)、H3 (H 鎖+3 drug) の各ピーク面積値から算出した。結合薬物分布は疎水性相互作用クロマトグラフィー分析により解析を行った。

Topoisomerase I 阻害活性評価

SN-38 は東京化成工業株式会社から購入し、exatecan 及びその誘導体 (DX-8951 derivative: DXd) は第一三共株式会社にて合成されたものを用いた。Topoisomerase I は super coiled DNA を relaxed form に巻き戻す酵素活性を有する。阻害剤添加後の super coiled form を検出、定量することで阻害活性を算出した。Recombinant human topoisomerase I (TopoGEN, Inc.) 0.1 ng を段階希釈した各阻害剤と 5 分間反応後、250 ng の super coiled DNA pBR322 (Inspiralis Ltd.) を添加し 25°C で 60 分間反応した。反応液をアガロースゲルにて電気泳

動を行い、super coiled DNA のバンドを CCD イメージャー (E-BOX-VX2/20M、Vilber Lourmat) により定量した。Topoisomerase I 酵素無し、阻害剤無しのサンプルの阻害率を 100%、Topoisomerase I 酵素有り、阻害剤無しのサンプルの阻害率を 0%とした際の各阻害剤の各濃度における阻害率を算出し、50%阻害濃度 (IC₅₀) を GraphPad Prism を用いて算出した。

細胞

ヒト乳癌細胞株である KPL-4 は川崎医科大学紅林淳一教授から供与していただいた。ヒト胃癌細胞株 NCI-N87、ヒト乳癌細胞株 SK-BR-3 及び MDA-MB-468、培地は各細胞の推奨培地を用いた。MDA-MB-468 以外の細胞は 37°C、5% CO₂ 下で培養し、MDA-MB-468 は 37°C、CO₂ 負荷無しの条件で培養した。

細胞障害活性評価

各細胞を 1000 cells/90 µL/well となるように 96 穴細胞培養用マイクロプレートに添加し一晩培養した。翌日、培地で系列希釈した各 ADC 体、遊離薬物、または培地をマイクロプレートに 10 µL ずつ添加し、6 日間培養した。培養後、培養液と等量の CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ株式会社) を添加し、室温で 10 分間静置後にマイクロプレートリーダー (ARVO X3、パーキンエルマー・ジャパン) で発光量を計測し、各 well の細胞生存率を下記式に従い算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = 100 \times (T - B) / (C - B)$$

T: 検体添加ウェルの発光量

C: 検体非添加ウェルの平均発光量

B: 培地ウェル (細胞無し) の平均発光量

50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は、Sigmoid Emax モデルまたは 50%細胞生存率を挟む 2 濃度間の直線回帰法にて算出した。

フローサイトメーターによる HER2 発現解析

80 µL の wash buffer (5%FBS 入り PBS) に懸濁した各細胞に FITC 標識抗 HER2 抗体 (Anti-HER2/neu FITC、Becton, Dickinson and Company) または FITC 標識コントロール mIgG1 (FITC Mouse IgG1, Isotype Control、Becton, Dickinson and Company) を 20 µL ずつ添加した。氷上、遮光下で 20 分間染色後、wash buffer で 2 回洗浄し、0.5 µg/mL の propidium iodide (Thermo Fisher Scientific 株式会社) を含む wash buffer に懸濁後セルストレイナーを通して細胞を回収した。フローサイトメーター (FACS Calibur, Becton, Dickinson and Company) により各サンプルの生細胞 (propidium iodide で染色されない細胞集団) の FITC 強度を測定し、相対平均蛍光強度 (relative MFI、rMFI) を以下式により算出した。

$$\text{rMFI} = 100 \times \text{T} / \text{C}$$

T : FITC 標識抗 HER2 抗体処理細胞の平均蛍光強度

C : FITC 標識コントロール mIgG1 処理細胞の平均蛍光強度

抗腫瘍活性試験

雌性ヌードマウス (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj) は5週齢で日本チャールスリバー株式会社から購入した。購入後、室温23°Cおよび湿度55%に設定したspecific pathogen-free (SPF) 設定動物室内の個別換気ケージ内で飼育を行った。マウスはγ線照射固形飼料 (FR-2、株式会社フナバシファーム) および塩素添加上水道 (1-5 ppm) の自由摂取による飼育を行い、入荷後1週間以上の馴化期間を経た後に、実験に供した。いずれの実験も第一三共株式会社社内規定「実験動物に関する細則」に従って実施した。拡大培養したNCI-N87を移植日に回

収し、生理食塩水（大塚製薬工場） 1×10^8 cells/mLとなるように懸濁、調製し、100 μ Lずつ雌ヌードマウスの右腋窩部皮下に移植した。推定腫瘍体積が100-300 mm^3 となった時点で推定腫瘍体積を指標に群分けを実施した。

推定腫瘍体積は電子デジタルノギスを用いて腫瘍の長径（mm）と短径（mm）を測定し、下記式に従って算出した。

$$\text{推定腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \frac{\text{長径} \times \text{短径}^2}{2}$$

群分け日をDay 0と規定し、全てのADCをマウス体重に対し10 mL/kgの液量でDay 0に尾静脈投与した。群分け後週に2回、腫瘍の長径と短径を測定した。最終測定日の各群の腫瘍増殖抑制率（Tumor Growth Inhibition; TGI、%）は下記式に従って算出した。

$$\text{TGI (\%)} = (1 - T / C) \times 100$$

T: ADC 投与群の推定腫瘍体積の平均値

C: 溶媒投与群の推定腫瘍体積の平均値

ELISA 法による結合活性評価

イムノプレートに 2.5 $\mu\text{g/mL}$ の His タグ標識されたヒト HER2 細胞外ドメイン蛋白を一晩 4°C でコーティングし、翌日ブロッキング、系列希釈した human IgG1、抗 HER2 抗体または ADC を 37°C で 1.5 時間反応させた。洗浄後、2 次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG を 37°C で 1 時間反応させ、再洗浄後に TMB solution を添加し 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

ELISA 法によるリン酸化 Akt の検出

SK-BR-3 細胞を 96 穴細胞培養用マイクロプレートに播種し 4 日間培養後、系列希釈した各 ADC を添加し 24 時間接触させた。その後細胞を溶解し lysate 中の pAkt 量及び total Akt 量を PathScan Phospho-Akt1 (Ser473) Sandwich ELISA Kit 及び PathScan Total-Akt1 (Ser473) Sandwich ELISA Kit (ともに Cell Signaling Technology, Inc.) を用いて添付文書に従い測定した。Relative pAkt (%) は検体添加 well の pAkt 量を検体非添加 well の pAkt 量で割ることで算出した。各 well の pAkt 量は各 well ごとの total Akt 量で補正したものをを用いた。

ADCC 活性

抗体依存性細胞傷害 (Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity、ADCC) 活性はエフェクター細胞として健常人から採取したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を、ターゲット細胞として SK-BR-3 を用いて評価した。エフェクター細胞 (2×10^5 cells) と Cr^{51} ラベルしたターゲット細胞 (1×10^4 cells) を human IgG1、抗 HER2 抗体または ADC と混和した。4 日間培養後培養上清中にターゲット細胞から遊離した Cr^{51} を検出することで ADCC 活性を求めた。

ウエスタンブロッティング法

KPL-4 細胞に対し抗 HER2 抗体、DS-8201a、DXd (1) を処理し、24、48、72 時間後に細胞を回収し、Halt protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail を添加した M-PER lysis buffer (ともに Thermo Fisher Scientific Inc.) にて溶解し lysate を得た。Lysate は還元及び変性処理を行い、SDS-PAGE に供し、PVDF 膜に転写した。ブロッキング後、1 次抗体として anti-phospho Chk1 (Ser345; 133D3) rabbit mAb、anti-Chk1 (2G1D5) mouse mAb、anti-cleaved PARP (Asp214) antibody、anti- β actin (8H10D10) mouse mAb (以上 Cell Signaling Technology Inc.)、anti-phospho Histone H2A.X (Ser139) antibody (Millipore) 及

び anti-phospho Histone H2A.X antibody (Abcam Plc.) を規定の希釈倍率で 4°C で反応させた。その後メンブレンを洗浄し、蛍光標識 2 次抗体を SNAP intradermally (Millipore) を用いて 10 分間室温で反応させた。メンブレンの蛍光を Odyssey imaging system (LI-COR Inc.) で検出した。

血中安定性評価

DS-8201a を終濃度 10 µg/mL となるようにマウス、ラット、サルまたはヒト血漿に混和し、DXd(1)の遊離を 21 日間経時的に LC/MS-MS を用いて測定した。

薬物動態評価

DS-8201a を 3 mg/kg の投与量で雌性のカニクイザルに静脈内投与した。血漿中 DS-8201a、総抗体、及び DXd(1)濃度を投与後 672 時間まで経時的に測定した。血漿中 DS-8201a 及び総抗体濃度を ligand-binding アッセイ法にて測定した。検出下限は 0.100 µg/mL であった。血漿中 DXd(1)濃度は LC/MS-MS にて測定した。検出下限は 0.100 ng/mL であった。

安全性試験

DS-8201a を SD ラットまたはカニクイザルに 3 週間おきに 6 週間間歇静脈内投与した。試験を通じて一般症状、体重、摂餌量及び病理を観察した。最終投与の翌日に剖検した。さらに回復性を評価するためラットでは 9 週間、サルでは 6 週間の回復期間を設けて更に観察を継続した。

第2節 Exatecan 誘導体 (DXd) を用いた ADC 技術の開発

複数のリンカー構造を検討した。はじめに、ADC の基本骨格としてマレイミド構造とグリシン-グリシン-フェニルアラニン-グリシンからなるテトラペプチドから構成されるリンカーを用い、exatecan と抗体を結合させた。抗体への結合様式としては抗体を還元することで得られる鎖間システイン残基への結合を採用した。このテトラペプチドは細胞内リソソーム酵素によって切断される配列であることが過去の研究で報告されている[25]。この基本構造の ADC (entry 1) は HER2 陽性 KPL-4 細胞に対し IC₅₀ 値が 1 nM を下回る強い細胞障害活性を示したが、凝集体含有率が 26% と高く生体内での不安定性が懸念される (Table 1)。そこで凝集体含有率の低減を目的に、Figure 3 の X 部分にアルキル鎖長の異なるスペーサーを挿入し、各 ADC の凝集体含有率及び細胞障害活性を評価した。

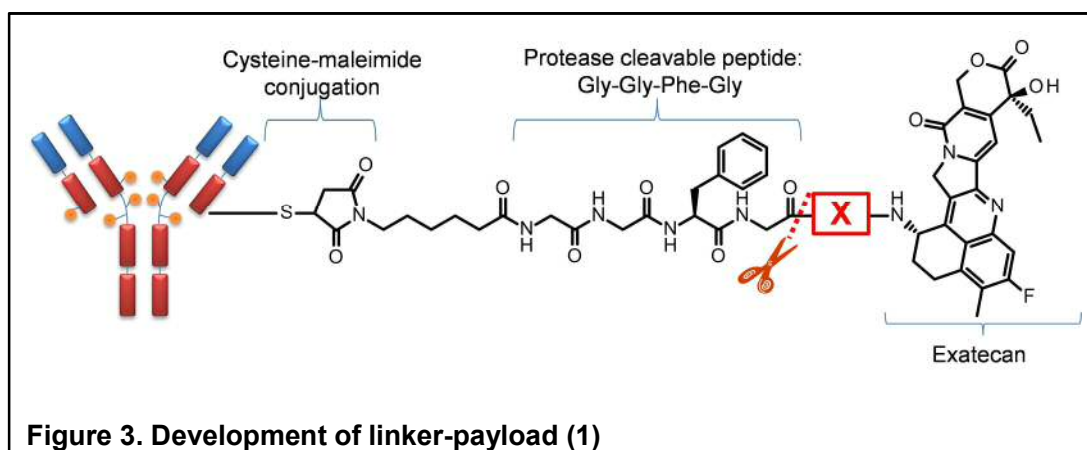


Figure 3. Development of linker-payload (1)

Table 1. Development of linker-payload (1)

Entry	X	DAR	Aggregate (%)	KPL-4 IC ₅₀ (nM)
1	None	3.4	26	0.33
2	-NH-CH ₂ -(C=O)-	3.2	3	0.39
3	-NH-(CH ₂) ₂ -(C=O)-	3.8	2	0.07
4	-NH-(CH₂)₃-(C=O)-	2.6	3	0.05
5	-NH-(CH ₂) ₄ -(C=O)-	3.4	4	0.07
6	-NH-(CH ₂) ₅ -(C=O)-	2.5	20	0.11

挿入したスペーサー、各 ADC の DAR、凝集体含有率、KPL-4 細胞に対する細胞障害活性を Table 1 に示した。アルキル鎖長が細胞障害活性と凝集体含有率に影響を与え、Gly-Gly-Phe-Gly と exatecan 間への γ -アミノ酪酸の挿入が最適であった (Entry 4)。次に、薬物結合数の増加を検討すべく、ADC の極性を高める構造を X および Y に施し、凝集体含有率に与える影響を検討した (Fig. 4)。

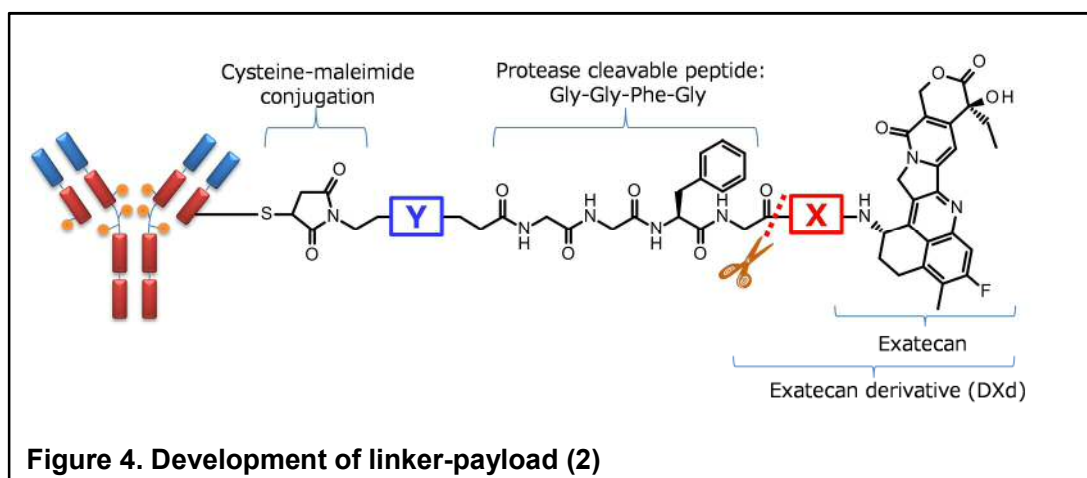


Table 2. Development of linker-payload (2)

Entry	X	Y	DAR	Aggregate (%)	KPL-4 IC ₅₀ (nM)
4	-NH-(CH ₂) ₃ -(C=O)-	-CH ₂ -	2.6	3	0.05
7	-NH-CH ₂ -O-CH ₂ -C(=O)-	-CH ₂ -	7.7	0.6	0.19
8	-NH-(CH ₂) ₃ -(C=O)-	-C(=O)-NH-(CH ₂ -CH ₂ -O) ₂ -	6.2	1	0.04

エーテル構造の挿入 (X or Y) により ADC 全体の極性を高め、高 DAR 化を低凝集率下で実現した (Table 2、entries 7、8)。より低い凝集体含有率でより高い DAR 化が可能であった entry 7 の ADC を最有望 ADC として選択し、先の詳細検討へ進めることとした。この ADC を DS-8201a と命名した。

第3節 DS-8201a の構造と遊離薬物 DXd (1)

前述の通り、DS-8201a は高 DAR 化が可能で凝集体含有率の低い ADC である。本節では DS-8201a の結合薬物分布、薬物遊離メカニズム、そして遊離薬物の特性について触れる。DS-8201a は鎖間システイン残基への薬物リンカーの導入を行っている。還元剤 TCEP で抗体内に 4 箇所存在する鎖間ジスルフィド結合を 8 個の SH 基に還元し、その全ての SH 基に薬物リンカーを反応させ、DAR8 の ADC 体の合成を行う (Fig. 5)。逆相クロマトグラフィーにより軽鎖、重鎖それぞれに結合している薬物数を、疎水性クロマトグラフィーにより ADC 体全体の結合薬物分布を分析したところ、Figure 6 に示すように DS-8201a には軽鎖の 1 箇所の SH 基、重鎖の 3 箇所の SH 基のほぼ全てに薬物リンカーが結合していた。従って薬物分布として DAR8 の画分がほぼ全てを占めおり、DS-8201a は均一性の非常に高い ADC であることが確認された。本ロットの平均薬物結合数は 7.7 であった。

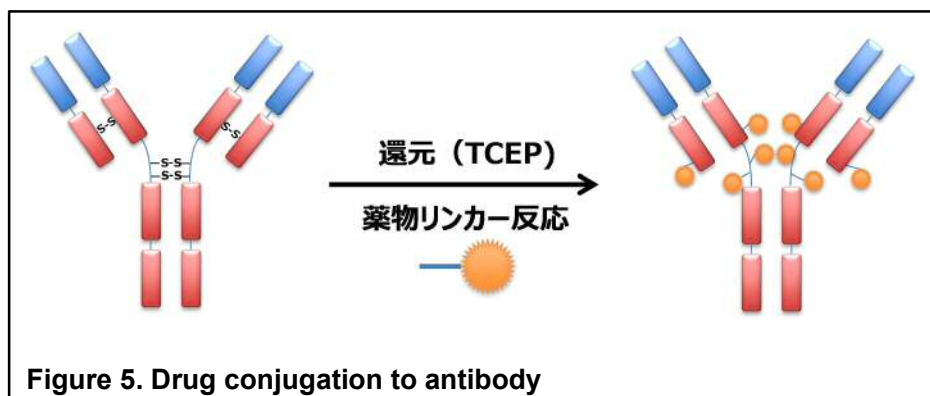


Figure 5. Drug conjugation to antibody

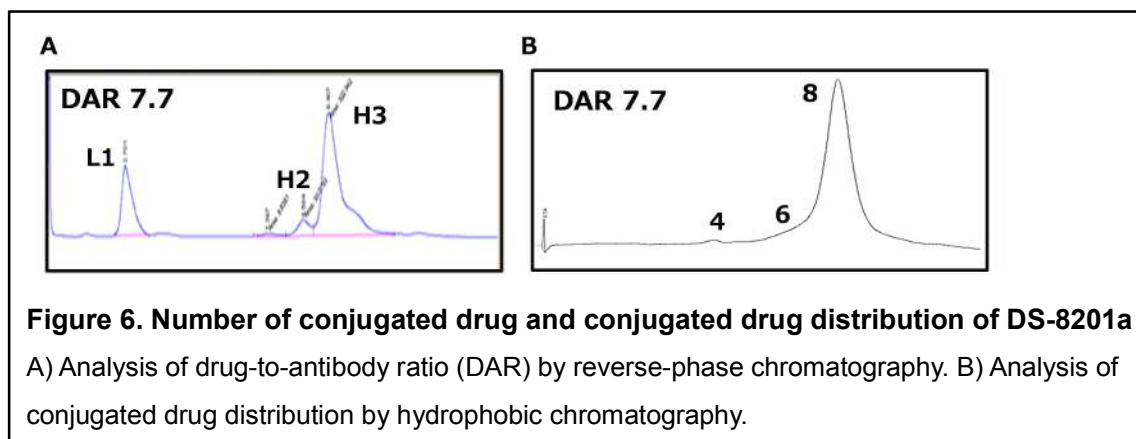
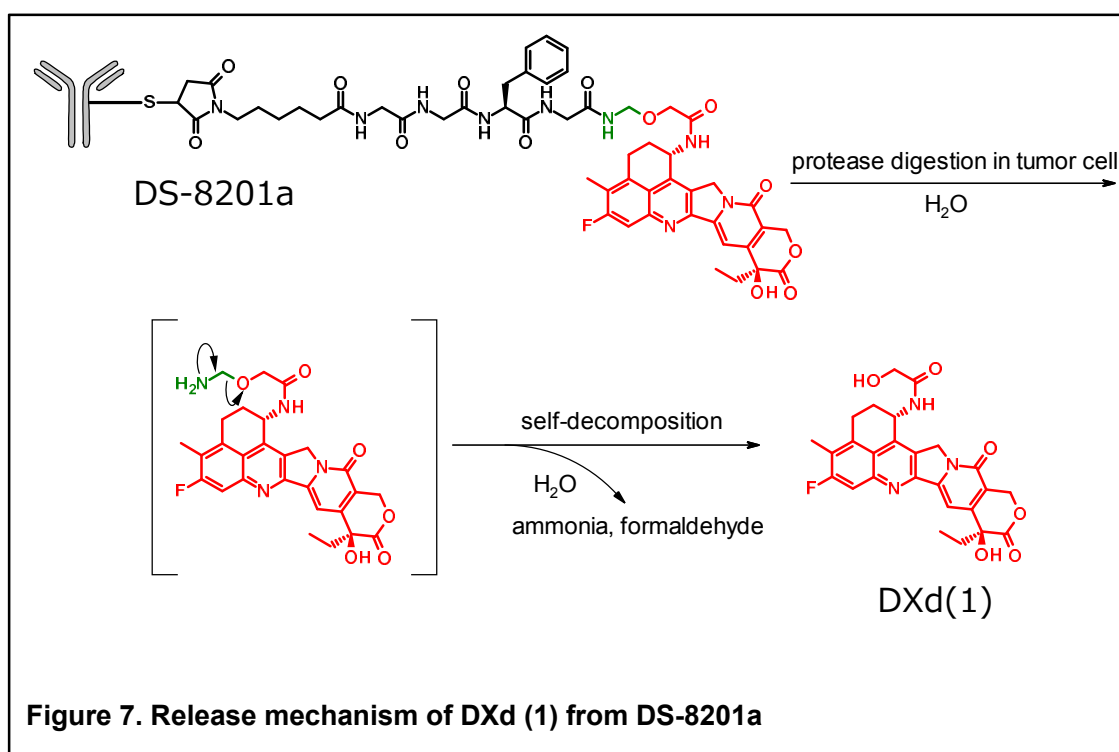


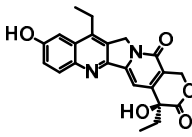
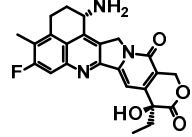
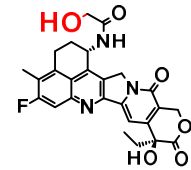
Figure 6. Number of conjugated drug and conjugated drug distribution of DS-8201a
A) Analysis of drug-to-antibody ratio (DAR) by reverse-phase chromatography. B) Analysis of conjugated drug distribution by hydrophobic chromatography.

次に、DS-8201a の薬物遊離メカニズムを Figure 7 に示す。癌細胞内に内在化後リソソーム内に移行した DS-8201a は、リソソーム内酵素により分解される。第一段階として GGFG リンカーの C 末部分で切断され、アミノメチレンを有する薬物が遊離される。しかしこのアミノメチレン部分（緑部分）は不安定であるため速やかに自己解離し、最終的に水酸基を有する薬物 DXd (1)（赤部分）が遊離する。



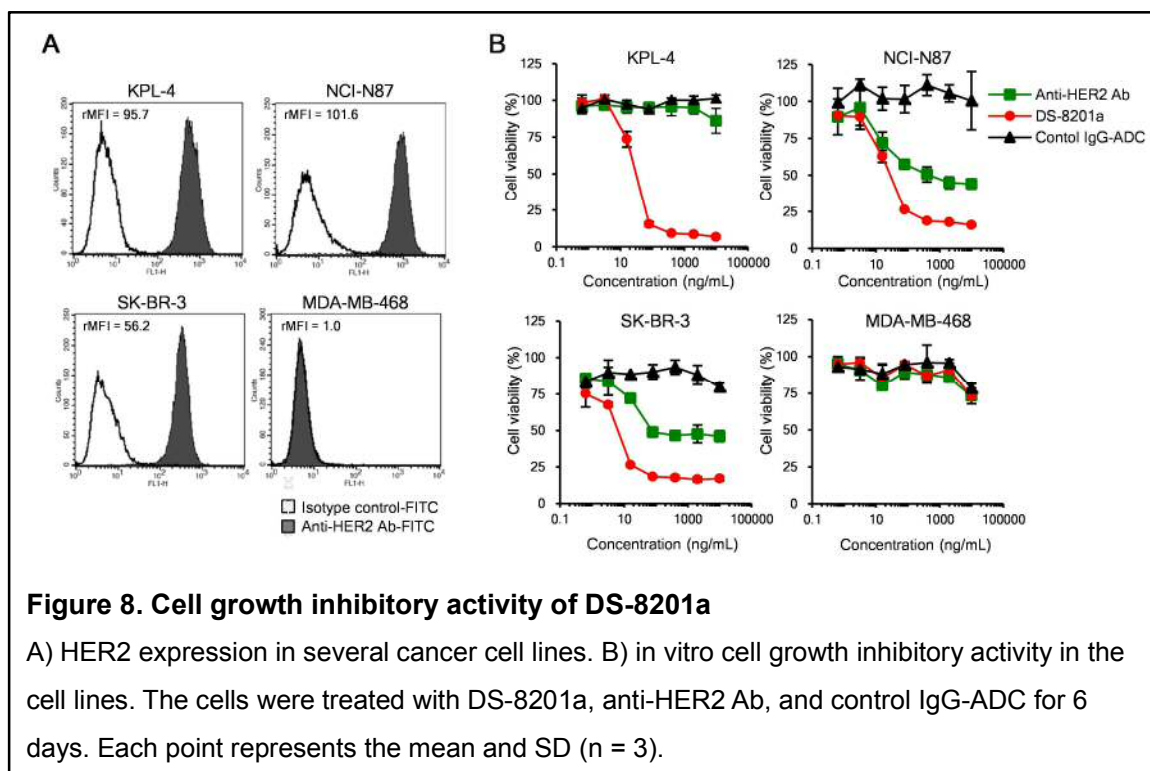
ここで DXd (1) の topoisomerase I 阻害活性を評価し SN-38、exatecan と比較した。DXd (1) の阻害活性は 0.31 μM であり、exatecan とほぼ同等の阻害活性を保持していた (Table 3)。

Table 3. Topoisomerase I inhibitory activity of SN-38, exatecan and DXd(1)

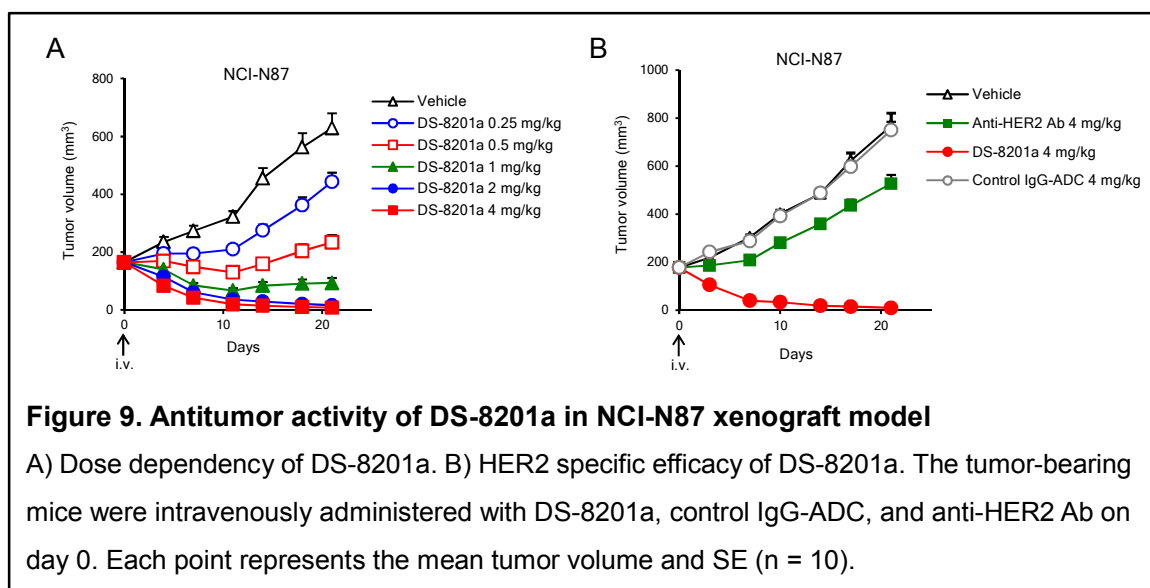
	 SN-38	 Exatecan	 DXd (1)
Topo I inhibition IC ₅₀ (uM)	2.78	0.25	0.31

第4節 DS-8201a の有効性

ここでは DS-8201a の有効性を *in vitro* 及び *in vivo* で評価した。まず複数の細胞株に対する DS-8201a の *in vitro* 細胞障害活性を抗 HER2 抗体とコントロール IgG に DXd (1) を結合させた control IgG-ADC と比較した。ヒト乳癌細胞株 KPL-4、SK-BR-3、MDA-MB-468 及びヒト胃癌細胞株 NCI-N87 の計 4 株の細胞膜上の HER2 発現をフローサイトメーターにより解析した。KPL-4、SK-BR-3 及び NCI-N87 の相対平均蛍光強度 (relative MFI、rMFI) はそれぞれ 95.7、56.2 及び 101.6 であり明確な HER2 の発現が認められた (Fig. 8A)。一方、MDA-MB-468 の rMFI は 1.0 であり、HER2 陰性細胞であることが確認された。HER2 陽性の KPL-4、SK-BR-3 及び NCI-N87 に対し DS-8201a は強い細胞障害活性を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 26.8 ng/mL、6.7 ng/mL 及び 25.4 ng/mL であった (Fig. 8B)。しかし HER2 陰性 MDA-MB-468 に対しては IC₅₀ 値が >10000 ng/mL と活性は認められなかった。抗 HER2 抗体は SK-BR-3 及び NCI-N87 に対して細胞障害活性を示したが、その活性は DS-8201a と比較して弱く IC₅₀ 値はそれぞれ 65.9 ng/mL 及び 204.2 ng/mL であった。全ての細胞株は DXd (1) に対し IC₅₀ 値が 1.43-4.07 nM と高い感受性を示したが、control IgG-ADC はいずれの細胞株に対しても活性を示さなかった (Fig. 8B)。これらの結果から、DS-8201a は HER2 発現に依存した細胞障害活性を示し、またその細胞障害活性は抗 HER2 抗体を ADC 化することにより増強されることが示された。



次に DS-8201a の in vivo 抗腫瘍活性を HER2 陽性 NCI-N87 xenograft model を用いて評価した。DS-8201a は投与量依存的な抗腫瘍活性を示し、1 mg/kg 以上の投与量を単回投与するだけで腫瘍の退縮が認められた (Fig. 9A)。その際マウスの体重減少及び一般状態の悪化は一切観察されなかった。同モデルにおいて、抗 HER2 抗体は 4 mg/kg 単回投与により部分的な腫瘍増殖抑制が認められ、投与 21 日後の溶媒対照群と比較した際の腫瘍増殖抑制率 (TGI) は 31%であった。一方で DS-8201a は同じ 4 mg/kg 単回投与によりさらに強い抗腫瘍活性を示し、TGI は 99%であり、in vitro と同様に ADC 化による活性の増強が認められた (Fig. 9B)。さらに、control IgG-ADC が腫瘍増殖を抑制しなかったことから DS-8201a の抗腫瘍活性が HER2 依存的であることが示唆された。



第 5 節 DS-8201a の薬効メカニズム

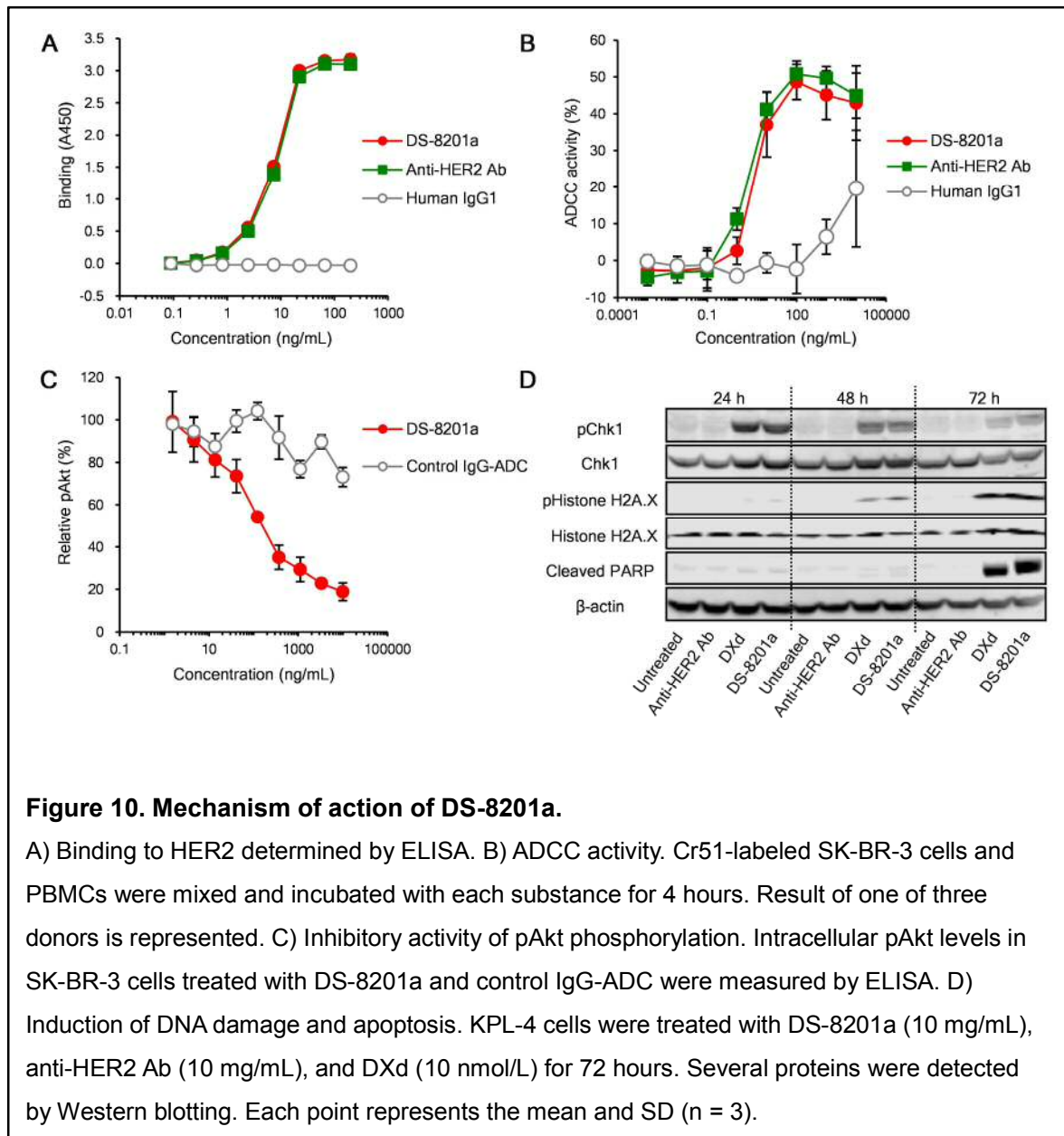
次に DS-8201a の薬効メカニズムについて評価を行った。抗 HER2 抗体 trastuzumab は HER family の中でも HER2 特異的に結合するが、まず ADC 化による HER2 結合活性への影響を HER2 細胞外ドメイン蛋白を用いた ELISA 法により調べた。その結果、結合定数 (Kd) は DS-8201a で 7.3 ng/mL、抗 HER2 抗体で 7.8 ng/mL であり、ADC 化は HER2 結合には影響しないことが示された (Fig. 10A)。

Trastuzumab の主な薬効メカニズムとして、免疫細胞上の FcγRIII に結合することによる抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性[26,27]及びリン酸化 Akt の抑制が挙げられる。リン酸化 Akt を抑制することで p27 の発現が亢進し、それに伴い細胞増殖が抑制される[28]。我々は DS-8201a が抗 HER2 抗体と同様の薬効メカニズムを保持しているかを確認した。まず ADCC 活性についてヒト末梢血単核細胞と HER2 陽性 SK-BR-3 細胞を用いて評価を行った。DS-8201a は最大活性として 48.6% の ADCC 活性を示し、その時の IC50 値は 3.8 ng/mL であり、その活性は抗 HER2 抗体と同等であった (Fig. 10B)。Akt のリン酸化に与える影響

として、DS-8201a は同じく SK-BR-3 細胞のリン酸化 Akt の downregulation を濃度依存的に誘導した。同じ実験条件において control IgG ADC はリン酸化 Akt の状態に影響を与えなかった (Fig. 10C)。Trastuzumab は SK-BR-3 細胞のリン酸化 Akt を約 70%減少させるという報告があることから[29]、DS-8201a は trastuzumab と同等の Akt リン酸化阻害活性を有すると考えられる。

次に、topoisomerase I 阻害による DNA 損傷とアポトーシス誘導能について評価した。DNA 損傷のマーカーである Chk1[30]と Histone H2A.X[31]のリン酸化及びアポトーシスマーカーである切断化 PARP[32]を KPL-4 細胞を用いてウェスタンブロッティング法により評価した。DS-8201a 10 µg/mL 処理により Chk1 と Histone H2A.X のリン酸化が誘導され、PARP の切断も観察された (Fig. 10D)。DXd (1)処理では DS-8201a 処理と同様の変化が認められた。一方抗 HER2 抗体 10 µg/mL の処理ではこれら蛋白の変動は認められなかった。このように DS-8201a は DXd (1)と同様に DNA 損傷とアポトーシスを誘導したことから、DS-8201a は DXd (1)の遊離により生じる topoisomerase I 阻害効果を有するものと推察された。

以上より、DS-8201a は抗体部分及び薬物部分の薬理活性を併せ持つ新規の作用機序に基づき、HER2 特異的な細胞増殖抑制活性及び抗腫瘍活性を示しているものと考えられた。



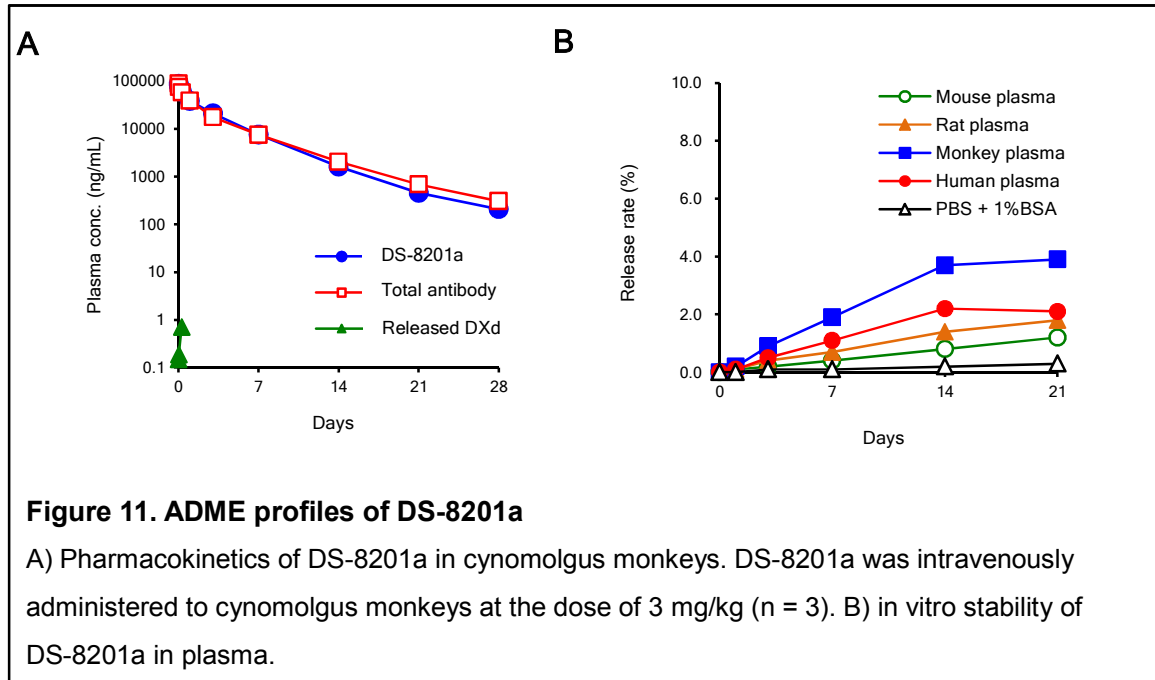
第6節 DS-8201a の血中安定性と薬物動態

緒言にも述べたように既存の ADC では高 DAR 化することで血中クリアランスが増大すること、血中で不安定であり薬物が徐々に遊離することが報告されている[14]。DAR8 である DS-8201a の血中安定性及び薬物動態を評価し、既存 ADC との優位性について検討した。

Figure 11A にはカニクイザルに DS-8201a を 3 mg/kg で単回静脈内投与した際の血漿中

総抗体濃度、DS-8201a 濃度及び遊離 DXd (1)濃度を示した。DS-8201a 濃度は投与後時間経緯に従い徐々に減衰したが、定常状態における分布容積は総抗体とほぼ一致し、薬物動態プロファイルに明確な差は無く、DS-8201a は DAR8 にも関わらず血中で高い安定性を示すことが明らかとなった。それに関連して DXd (1)濃度は非常に低く、投与初期の限られた時点でのみ検出され、それ以外の時点では検出限界以下であった。

続いて DS-8201a の動物種差間の血漿中安定性について *in vitro* で検証を行った。マウス、ラット、サル及びヒト血漿と DS-8201a を混和後 21 日間インキュベートし、遊離する DXd (1)量を、結合している DXd (1)量を 100%とした際の相対値として示した (Fig. 11B)。遊離率は 1.2%から 3.9%と種差によらず非常に低く、DS-8201a の高い血中安定性が確認され、臨床試験においても高い安定性が期待される。



第7節 DS-8201aの安全性

DS-8201aは、ヒトHER2と同様にカニクイザルHER2の細胞外ドメインに結合する一方で、マウス、ラットのHER2の細胞外ドメインとは結合しないことが、ELISA法により確認されている。したがって、DS-8201aの交差種としてカニクイザルを用いた間歇静脈内投与試験を実施し、さらに標的非依存的な作用の評価を目的としてラットの間歇静脈内投与試験を実施した。

DS-8201aのラットの間歇静脈内投与試験（3週おきに3回投与）では、最高用量の197 mg/kgまで死亡及び瀕死は認められなかった（Table 4）。主な毒性として、20 mg/kg以上で精巣及び消化管毒性が、60 mg/kg以上でリンパ・造血系毒性、皮膚及び切歯毒性、並びに腎毒性が観察された（Table 4）。これらの変化は、精巣及び切歯の変化を除き、回復性を示した。DS-8201aのカニクイザルの間歇静脈内投与試験（3週おきに3回投与）では、最高用量の78.8 mg/kgの雌1例で瀕死が認められた。瀕死例の主な毒性として、消化管毒性、造血系毒性、皮膚毒性、肝毒性及び腎毒性が認められた（Table 4）。瀕死の原因は、体重及び摂餌量の減少、並びに骨髄毒性及び消化管毒性に関連した状態悪化と考えられた。生存動物の主な毒性として、10 mg/kg以上で消化管毒性が、30 mg/kg以上で肺毒性、精巣毒性、及び皮膚毒性が観察された。また、78.8 mg/kgで造血系毒性、腎毒性、及び心電図異常（PR間隔の短縮及びQTcの延長）が認められた。これらの所見は肺毒性及び皮膚の色素沈着を除き、回復傾向が認められた。

Table 4. Summary of repeated dose toxicity studies in rats and monkeys

Species	CrI:CD(SD) rats	Cynomolgus monkeys
Doses	0, 20, 60 and 197 mg/kg	0, 10, 30 and 78.8 mg/kg
Regimens	Intravenous, Q3W Days 1, 22, 43 (3 times in total)	Intravenous, Q3W Days 1, 22, 43 (3 times in total)
No. of animals	10/sex/group (Main): all dose groups 5/sex/group (Recovery): 60 and 197 mg/kg groups	3/sex/group (Main): all dose groups 2/sex/group (Recovery): 30 and 78.8 mg/kg groups
Lethal dose	>197 mg/kg	78.8 mg/kg (1 female died)
Body weight	≤60 mg/kg: normal 197 mg/kg: low body weight gain	≤30 mg/kg: normal 78.8 mg/kg: decreased in 1 male and 1 female
Hematology	20 mg/kg: normal ≥60 mg/kg: decreased RBC and WBC parameters	≤30 mg/kg: normal 78.8 mg/kg: decreased RBC parameters
Target organs and tissues	≥20 mg/kg: intestines, testis ≥60 mg/kg: bone marrow, thymus, lymph node, skin, kidney, incisor	≥10 mg/kg: intestines ≥30 mg/kg: lung, skin, testis 78.8 mg/kg: bone marrow, kidney
STD ₁₀ /HNSTD	STD ₁₀ : >197 mg/kg	HNSTD: 30 mg/kg

Abbreviations: RBC, red blood cell; WBC, white blood cell.

以上より、DS-8201a のラット間歇静脈内投与試験での 10%に重篤な毒性が発現する投与量 (severely toxic dose in 10% of the animals: STD10) は 197 mg/kg より大きいと判断された。また、カニクイザルの間歇静脈内投与試験では、78.8 mg/kg で重度の状態悪化に

よる瀕死、及び生存動物例においても間質の炎症や肺胞水腫等の強い肺毒性が観察されたことから、重篤な毒性が発現しない最大投与量 (highest non-severely toxic dose: HNSTD) は 30 mg/kg と判断された。

第8節 小括 (1)

➤ Topoisomerase I 阻害剤を用いた独自の ADC 技術を樹立した。

特徴は以下の通り

- ✓ 既存の topoisomerase I 阻害剤 (イリノテカン) よりも高活性な薬物を搭載
- ✓ 低凝集性で高 DAR 化が可能
- ✓ 均一な薬物分布
- ✓ DAR 依存的な抗腫瘍活性
- ✓ 抗体部分の活性を保持できる
- ✓ 血中での高い安定性と高い安全性

➤ 既存 ADC の課題を克服した anti-HER2 DXd(1)を「開発候補品」DS-8201a」と命名し研究を進めることとした。

第2章 DS-8201a と T-DM1 の差別化

HER2 はヒト上皮増殖因子受容体 (EGFR) ファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼであり、細胞の増殖、分化に関与している[33]。乳癌、胃癌、膀胱癌、子宮頸癌、胆管癌、大腸癌、食道癌、頭頸部癌、肝臓癌、膵臓癌、肺癌、卵巣癌、唾液腺癌等非常に多くの癌において過剰発現や遺伝子増幅が報告されている[34,35]。また乳癌では過剰発現や遺伝子増幅が 25-30%の患者で認められ、予後不良との相関が報告されている[36,37]。

HER2 を標的とした医薬品として、trastuzumab[38,39]、lapatinib[40]、pertuzumab[41]、T-DM1[6]が HER2 陽性患者を対象にグローバルに承認されている。しかし trastuzumab 以外の薬は乳癌のみ、trastuzumab は乳癌と胃癌のみで承認を受けており、その他の HER2 陽性癌腫に対する抗 HER2 治療薬が存在しないことが課題として挙げられる。T-DM1 は trastuzumab にチューブリン重合阻害剤 DM1 を結合させた抗 HER2 治療薬の中で唯一の ADC である[42]。2013 年に HER2 陽性 (IHC3+, IHC2+/FISH+) の転移性乳癌患者の 2nd line 治療薬として承認され[6]、2015 年の売り上げとして既に 800 億円を超える医薬品として成長している。

本章ではこの T-DM1 と DS-8201a の有効性について比較した。DS-8201a の構造的差異点として、T-DM1 はチューブリン重合阻害剤 DM1 を結合しているのに対し、DS-8201a はトポイソメラーゼ I 阻害作用を有する DXd (1)を用いている点、T-DM1 の DAR が約 3.5 であるのに対し、DS-8201a の DAR は約 8 である点が挙げられ、結合薬物の作用機序が異なることから T-DM1 とは異なる抗腫瘍活性プロファイルが期待される。また、DAR の違いから DS-8201a はより多くの薬物を腫瘍細胞内に送達可能であると期待される。

第1節 実験材料と実験方法

ADCの合成

抗HER2抗体として第一三共株式会社にて製造した **trastuzumab** と同一のアミノ酸配列を有するモノクローナルIgG1抗体を用いた。DS-8201aは第1章第1節に記載の通り合成し、分析した。Anti-HER2 ADC(DAR3.4)はDS-8201aと同じ抗体、薬物リンカーを用いてDARが3.4となるように合成した。Control IgG-ADCは抗体部分に **purified human IgG** (Methyl Laboratories) を用いて、DS-8201aと同等のDARになるように合成した。T-DM1はGenentech Rocheから購入した。

細胞

AGSは大日本製薬株式会社、Calu-3、CFPAC-1、MDA-MB-361、MDA-MB-453及びSK-OV-3はATCC、JIMT-1はDSMZ、IGR-OV1はNational Cancer Institute、GCIYは理化学研究所、MKN-45はHealth Science Research Resources Bankからそれぞれ購入した。KPL-4は第1章第1節に記載の通り。培地は各細胞の推奨培地を用いた。細胞は37°C、5% CO₂下で培養した。

抗腫瘍試験

癌細胞株由来担癌マウスは第1章第1節に記載の通り実施した。KPL-4は 1×10^7 cellsの細胞を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し、13日後に群分けを実施した。JIMT-1は 3×10^6 cellsの細胞を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し、12日後に群分けを実施した。GCIYは 4×10^6 cellsの細胞を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し14日後に群分けを実施した。Capan-1はヌードマウス移植により維持をした固形腫瘍の腫瘍片(3mm角)を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し、20日後に群分けを実施した。癌患者由来の腫瘍

を移植した担癌マウスは臨床腫瘍をヌードマウス移植により維持継代した固形腫瘍を種腫瘍とし、腫瘍片（3～5 mm 角）を雌 SCID マウスの右側腹部に皮下移植した。推定腫瘍体積が 150-300 mm³ になった時点で群分けを行った。CFPAC-1 の試験では抗 HER2 抗体を投与後 3 時間後に DS-8201a を投与する群も設定した。各試験データを用いて腫瘍体積増殖率 [Relative tumor growth volume、TGv (%)] を下記式に基づき算出した。TGv はマウスごとに算出後、平均 TGv を求めた。

Tf ≥ Ti の場合

$$\text{TGv (\%)} = 100 \times (\text{Tf} - \text{Ti}) / (\text{Cfave} - \text{Ciave})$$

Tf < Ti の場合

$$\text{TGv (\%)} = 100 \times (\text{Tf} - \text{Ti}) / \text{Ti}$$

Tf: 薬物投与群マウスの最終測定日推定腫瘍体積

Ti: 薬物投与群マウスの投与開始日（Day 0）推定腫瘍体積

Cfave: 溶媒対照群の最終測定日推定腫瘍体積平均値（小数第 1 位）

Ciave: 溶媒対照群の Day 0 推定腫瘍体積平均値（小数第 1 位）

免疫組織化学

各担癌マウスの群分け時に腫瘍を採材した。採材直後に 10%中性緩衝ホルマリン液（和光純薬株式会社）に浸漬し、約 48 時間後に固定を終了し、定法に従いパラフィン包埋ブロックを作製後、薄切した。作製したスライドは株式会社エスアールエル・メディサーチに送付し、HercepTest II キット（DakoA/S 社製）を用いて定法に従い HER2 蛋白の免疫組織化学を実施した。HER2 蛋白発現の判定基準は腫瘍細胞の細胞膜での染色性およびその染色強度が対象となり、細胞質の反応は判定対象外とした。細胞膜の反応性は以下の基準で分類した。

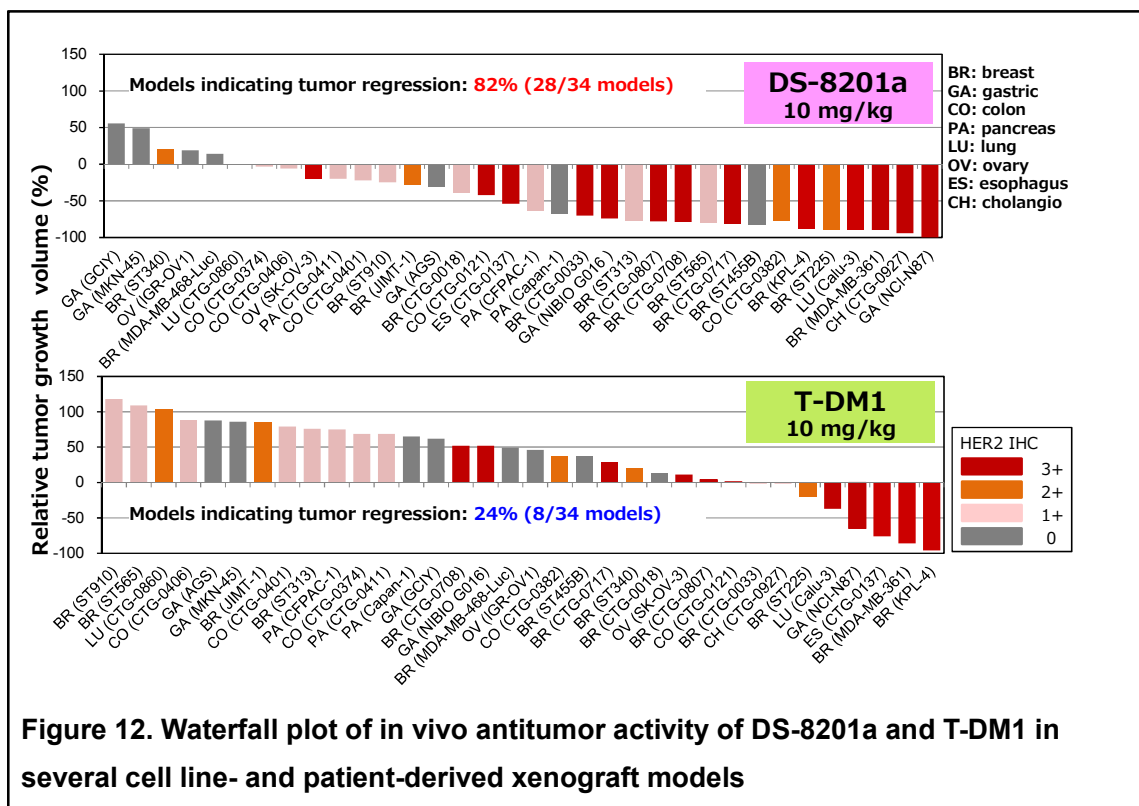
- 0 : 被検体組織中の腫瘍細胞の中で HER2 陽性細胞がない。または 10%に満たないもの
- 1+ : 被検体組織中の腫瘍細胞の中で HER2 陽性細胞が 10%以上あるが、腫瘍細胞の一部の膜に局限した弱い染色強度を有するもの
- 2+ : 被検体組織中の腫瘍細胞の中で HER2 陽性細胞が 10%以上あり、腫瘍細胞の膜に局限した連続性のある中等度の染色強度を有するもの
- 3+ : 被検体組織中の腫瘍細胞の中で HER2 陽性細胞が 10%以上あり、腫瘍細胞の膜に局限した連続性のある強度の染色強度を有するもの

第2節 抗腫瘍活性評価

DS-8201a 及び T-DM1 の in vivo 抗腫瘍活性を 13 種の癌細胞株由来担癌マウス (cell line-derived xenograft : CDX) モデル及び 21 種の癌患者由来の腫瘍を移植した担癌マウス (patient-derived xenograft : PDX) モデルを用いて評価した。PDX モデルは臨床腫瘍の組織構造を保持した腫瘍を形成可能なモデルであり、より臨床を反映したモデルとして近年抗がん剤評価に積極的に用いられている。評価に用いた計 34 種の担癌マウスモデルには乳癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、肺癌、胆管癌、食道癌の複数の癌腫を、また様々な HER2 発現プロファイルを有するモデルを選択した。

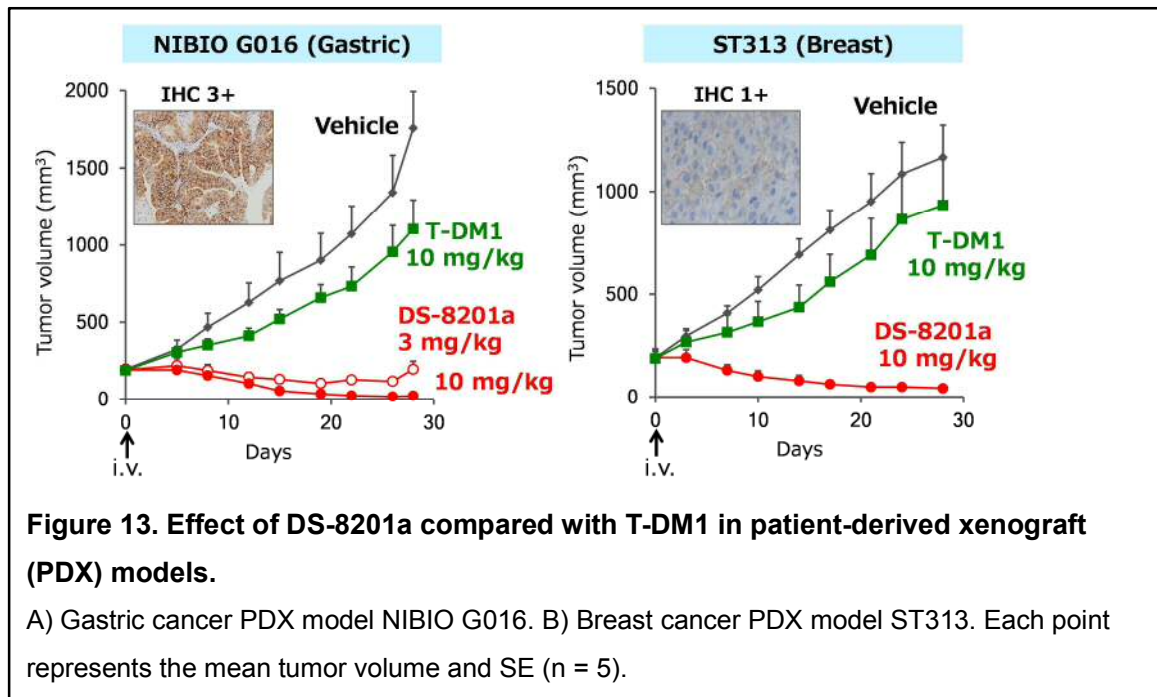
Figure 12 に DS-8201a 及び T-DM1 の腫瘍体積増殖率 (TGv、%) をまとめた。0%より値が大きい場合、投与開始時よりも腫瘍が増殖したことを示し、100%は溶媒投与群と同じ増殖をしたことを意味する。一方で 0%より値が小さい場合、投与開始時よりも腫瘍が退縮したことを示し、-100%は完全寛解を意味する。全 34 モデル中 DS-8201a は 28 モデル (全体の 82%) で、T-DM1 は 8 モデル (全体の 24%) で腫瘍を退縮させた。DS-8201a は IHC 0 から 3+の HER2 発現レベルのモデルに対して抗腫瘍活性を示したが、IHC 2+及び 3+モデ

ルでより強い腫瘍退縮が認められる傾向にあった。T-DM1 は腫瘍退縮が認められた 8 モデルのうち 7 モデルが HER2 3+の強陽性であった。DS-8201a が活性を示した IHC 0 のモデルでは、フローサイトメトリー法または定量的蛍光免疫染色法などの高感度な HER2 発現検出法にて解析した結果、HER2 発現が確認されている。また、臨床で部分寛解 (PR) が期待される TGv -30%以下の強い抗腫瘍活性は、DS-8201a 投与では 21 モデル(全体の 62%)、T-DM1 投与では 5 モデル (全体の 15%) で認められた。



ここで、T-DM1 が無効で DS-8201a が効果を示した例として IHC 3+と IHC 1+のモデルを挙げて説明する (Fig. 13)。ヒト胃癌 PDX モデルの NIBIO G016 に対して T-DM1 は無効であり、DS-8201a は 3 mg/kg の低用量でも強い腫瘍退縮効果を示した。このモデルは IHC 3+であるため、両 ADC による結合薬物の送達は十分であると予想されるが、両 ADC の感受性の差は結合薬物の感受性の差に起因すると推察される。ヒト乳癌 PDX モデルの ST313

も同様に T-DM1 は無効で DS-8201a は強い抗腫瘍活性を示したが、このモデルの HER2 発現は IHC 1+と弱陽性であった。そのため、両 ADC の感受性の差は DAR の差に起因すると推察される。

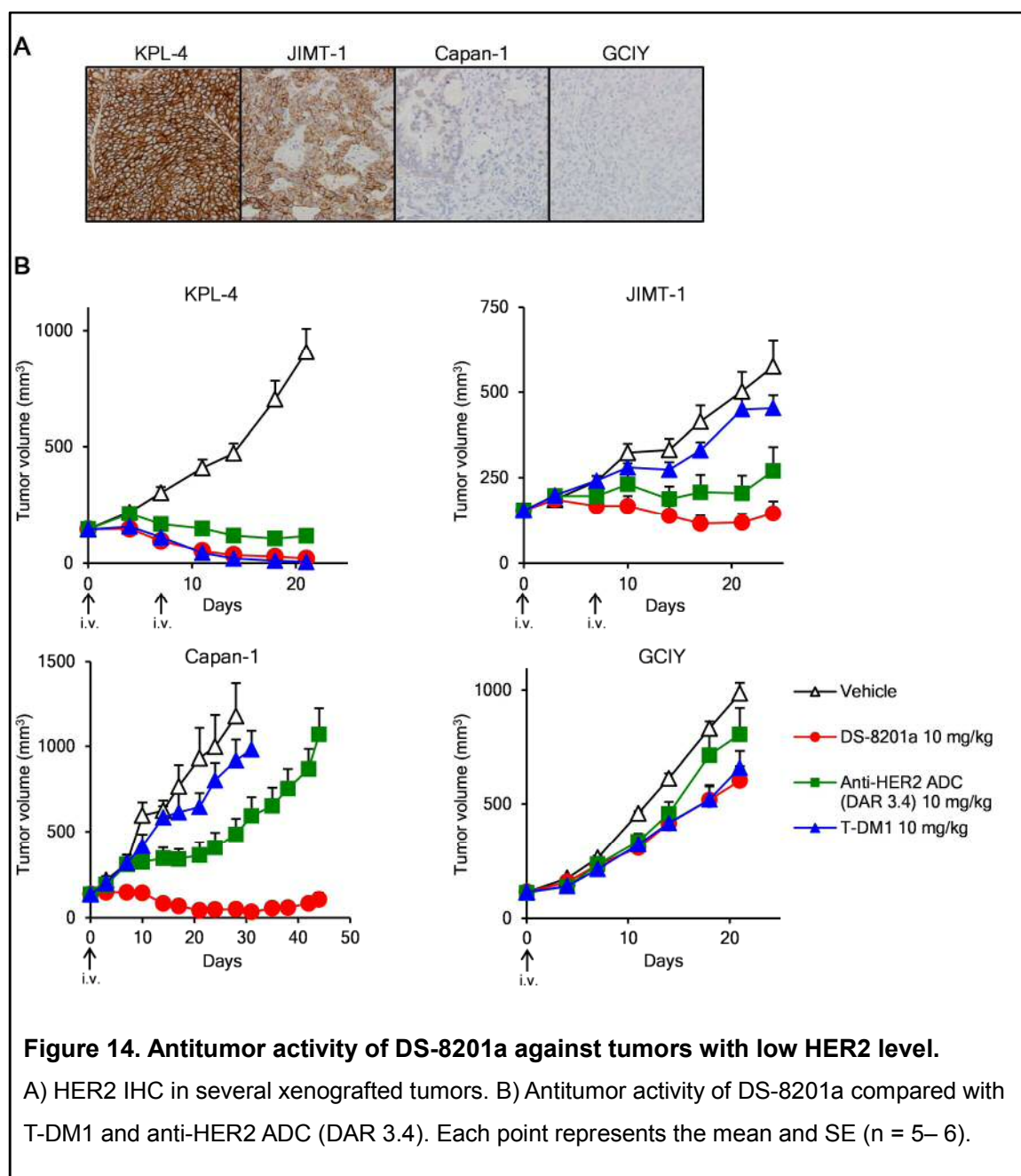


以上、DS-8201a は多くの癌腫に対して腫瘍退縮を示したこと、T-DM1 と比較して幅広い HER2 発現量のモデルに対して腫瘍退縮を示したことから臨床において幅広い HER2 発現患者層に対する有効性が期待される。

第3節 HER2 低発現腫瘍に対する有効性

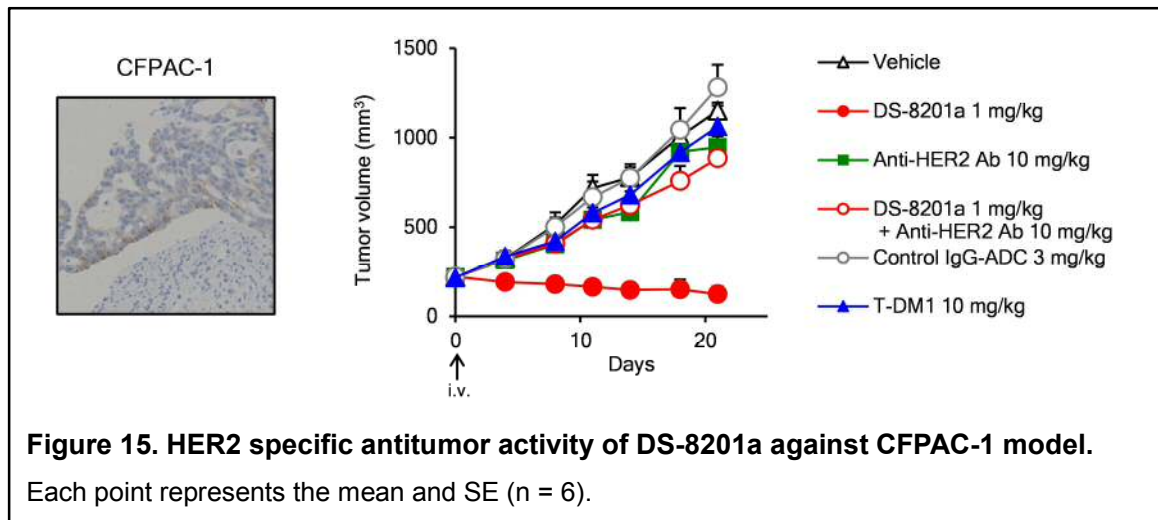
先の検討において DS-8201a の HER2 低発現モデルに対する有効性が示され、またその原因として高 DAR であることが推察された。現在 HER2 低発現腫瘍に対して有効な治療薬が存在せず、治療ニーズは非常に高い。ここでは DAR と有効性、そして HER2 発現量の関係について検討を進めたのでまとめる。

評価には HER2 発現レベルの異なる 4 種の CDX モデルを用いた。乳癌 KPL-4 は HER2 高発現、乳癌 JIMT-1 は中発現、膵臓癌 Capan-1 は低発現、胃癌 GCIY は非発現モデルである (Fig. 14A)。DS-8201a と T-DM と同時に DS-8201a と同じ linker-payload を結合させ、DAR を約半分に設定した ADC、anti-HER2 ADC (DAR 3.4) の評価も行った。その結果、T-DM1 は HER2 高発現の KPL-4 のみに対し有効性を示したが、DS-8201a は KPL-4 に加え HER2 中・低発現の JIMT-1 及び Capan-1 に対しても強い抗腫瘍活性を示した (Fig. 14B)。両 ADC とともに HER2 非発現モデルである GCIY に対しては効果を示さなかった。Anti-HER2 ADC (DAR 3.4) は全ての HER2 発現モデルに対して抗腫瘍活性を示したが、その程度は HER2 発現量に依存したものであった。中でも HER2 低発現 Capan-1 モデルに対する anti-HER2 ADC (DAR 3.4) の有効性は DS-8201a と比較して明確に弱かった (Fig. 14B)。これら結果より、高 DAR の ADC である DS-8201a は T-DM1 や anti-HER2 ADC (DAR 3.4) と比較してより多くの薬物を腫瘍細胞内に送達可能であり、HER2 低発現細胞に対して活性を示すに十分な薬物暴露を達成できていると考えられる。



次に、DS-8201a の HER2 低発現腫瘍に対する有効性が HER2 特異的なものであるか検討するため *in vivo* 競合阻害実験を行った。評価には HER2 低発現腫瘍である CFPAC-1 xenograft モデルを用いた。DS-8201a 1mg/kg 投与により強い腫瘍退縮が観察された一方で、10 倍量の抗 HER2 抗体の事前投与によりその抗腫瘍活性がキャンセルされた (Fig. 15)。また、DS-8201a の 3 倍量の control IgG-ADC 投与は有効性を示さなかった。以上より、

DS-8201a の HER2 低発現腫瘍に対する有効性は HER2 に依存したものであることが確認された。



第4節 小括 (2)

- DS-8201a は既存抗 HER2 ADC である T-DM1 と比較して、異なるメカニズムの薬剤を搭載している点薬物結合数が高い点が構造上の差異点である。
- DS-8201a は上記構造上の違いから、T-DM1 非感受性腫瘍、既存の抗 HER2 治療の適用外である HER2 低発現腫瘍に対し強い抗腫瘍活性を示した。
- DS-8201a は T-DM1 と差別化可能な、抗 HER2 治療の新しい選択肢の一つになりうる。

第3章 DS-8201a の bystander 効果

臨床フェーズにある半数以上の ADC は血液癌を標的としており、標的抗原の発現が不均一である固型癌を狙った ADC の開発は困難であると考えられてきた[8]。しかし近年、その解決策として期待される「Bystander 効果」を有する ADC の報告が非臨床研究レベルで幾つかされている[43,44,45,46]。Bystander 効果は近傍の細胞に対する効果を意味し、ADC の場合、標的発現癌細胞に内在化した ADC から遊離した薬物が、標的を発現していない近傍の癌細胞に対し抗腫瘍効果を発揮するというものである。Bystander 効果は、標的発現癌細胞周囲の癌細胞をも殺しうることから、標的発現が不均一な癌腫に対する有効性を示唆しうる。本章では DS-8201a の bystander 効果について検討を行った。また T-DM1 が bystander 効果を有さないという結果がいくつか報告されており、DS-8201a との更なる差別化ポイントとして期待されるため、比較検討も実施した。

第1節 実験材料と実験方法

ADC と遊離薬物

DS-8201a と anti-HER2-DXd (2) は第1章第1節と同様の方法により合成し、DAR は7から8であった。Control IgG- DXd (1) と control IgG- DXd (2) は抗体部分に purified human IgG を用いて、同等の DAR になるように合成した。T-DM1 は Genentech Roche から購入した。ADC の遊離薬物である DXd (1)、DXd (2) 及び Lys-SMCC-DM1 は第一三共株式会社にて合成をした。

脂溶性評価試験

各遊離薬物の 10 mM DMSO 溶液 (10 μ L) を PBS(-) 緩衝液飽和 n-オクタノール 0.99 mL に添加し、5分間攪拌した。この液 450 μ L を2本のチューブに分取し、それぞれに n-オクタノー

ル飽和PBS(-) 緩衝液を500 μL 添加して30分間振とう後遠心分離し、上相 (n-オクタノール相) と下相 (PBS相) を採取した。それぞれの相を80%アセトニトリル水溶液で適宜希釈してLC-MS/MS分析に供し、得られたピーク面積から以下の式より各化合物の分配係数 (Log D) を算出した。

$$\text{Log D} = \log [(n\text{-オクタノール相ピーク面積値} \times \text{希釈倍率}) \div (\text{水相ピーク面積値} \times \text{希釈倍率})]$$

膜透過性試験

各遊離薬物の10 mM DMSO溶液10 μL をDMSO 190 μL で希釈した (500 μM)。さらにpH 5.0とpH 7.4のDonor液用bufferでそれぞれ希釈し、化合物濃度5 μM のDonor液2種を調製した。Stirwell PAMPA Sandwich (pION社) のAcceptor plateのフィルター上にGIT-0 Lipid Solutin (pION社) を塗布し、Donor plateにpH 5.0とpH 7.4のDonor液を、Acceptor plateにAcceptor Sink Buffer (pION社) をそれぞれ添加し、Donor plateとAcceptor plateを重ね合わせ、25 $^{\circ}\text{C}$ 、4時間インキュベーションした。Donor液およびAcceptor液をそれぞれ回収し、適宜希釈しLC-MS/MSにより各化合物の濃度を測定した。内標に対する面積比およびインキュベーション時間からPAMPA Evolution DP (pION社) により膜透過係数 (permeability coefficient, P_{eff} , 10^{-6} cm/sec) を算出した。

癌細胞株

KPL-4、NCI-N87、MDA-MB-468は第1章第1節に記載の通り。MDA-MB-468-LucはMDA-MB-468細胞にluciferase遺伝子をlentivirus vector (Signal Lenti Reporter (Luc)、SA Biosciences Corp.) を用いて遺伝子導入後、0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のpuromycin含有培地によって薬剤耐性セレクションを行い樹立した。全ての細胞はRPMI 1640 medium (RPMI、Thermo Fisher Scientific株式会社) にウシ胎児血清を10%含有する培地を用いて37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件

下で培養を行った。

細胞増殖抑制活性評価

第1章第1節の記載と同様に評価を行った。KPL-4を1000 cells/well、MDA-MB-468細胞を2000 cells/wellとなるように96-wellマイクロプレートに播種し翌日、各検体を添加した。5日間培養後、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assayを添加し室温で10分間静置後にマイクロプレートリーダーで各ウェルの発光量を測定した。細胞生存率及びIC₅₀の算出は第1章第1節に記載の通り。

共培養実験

KPL-4 を 1×10^5 cells/mL に、MDA-MB-468 細胞を 3×10^5 cells/mL に培地でそれぞれ調製し、6-well プレートに 1 mL ずつ同じウェルに添加して 37°C、5% CO₂ 条件下で一晩培養した (mix wells、 1×10^5 cells + 3×10^5 cells/well、n = 6)。KPL-4 または MDA-MB-468 単一のウェルには各細胞懸濁液を 2 mL ずつ添加した。翌日 mix well から培養上清を除き、培地で 10 nM に希釈した各 ADC を 6 mL/well で添加し 37°C、5% CO₂ 下で 5 日間培養した。添加する ADC の濃度は先の細胞増殖抑制活性評価にて KPL-4 細胞に対して十分な細胞増殖抑制活性が認められた 10 nM と設定した。Untreated mix well、KPL-4 または MDA-MB-468 単一ウェルには培地を 6 mL 添加した。培養後各 well から接着した生細胞を 0.25% Trypsin 1 mM EDTA·4Na により剥離後回収し培地で洗浄後、自動細胞計数装置 (Cedex HiRes、Roche Diagnostics K.K.) を用いて生細胞数を計数した。回収した各ウェルの細胞を 1×10^6 cells ずつ分注し、氷冷した wash buffer (5% FBS 含有 DPBS) で 2 回洗浄した。 1×10^6 cells に満たないサンプルは細胞懸濁液全量を用いた。洗浄後、第 1 章第 1 節の記載に従い HER2 発現の解析を行った。KPL-4、MDA-MB-468 単一細胞サンプルの FITC 強度を指標に各 mix well サンプルにおける HER2 陰性細胞及び HER2 陽性細胞の存在比率を算出した。各 mix

well の生細胞数並びに HER2 陰性細胞と HER2 陽性細胞の存在比率から、各 mix well 中の KPL-4 と MDA-MB-468 細胞数を算出した。

抗腫瘍試験

第1章第1節の記載に従いNCI-N87は 5×10^6 cells、MDA-MB-468-Lucは 1×10^7 cellsずつ雌ヌードマウスの右腋窩部皮下に移植した。NCI-N87移植マウスは移植6日後、MDA-MB-468-Luc移植マウスは移植9日後に群分けを実施した。

イメージングを用いた共移植実験

NCI-N87 細胞を 1×10^8 cells/mL に、MDA-MB-468-Luc 細胞を 2×10^8 cells/mL に調製し、等量を混合後、100 μ L (5×10^6 cells + 1×10^7 cells) ずつ雌ヌードマウスの右腋窩部皮下に移植した。移植 6 日目に、生理食塩水で 15 mg/mL に調製した VivoGlo Luciferin (Promega Inc.) をマウス体重に対し 10 mL/kg の液量で全ての担癌マウスに尾静脈投与した (150 mg/kg)。約 10 分後に in vivo イメージングシステム (IVIS 200 Imaging System、PerkinElmer Inc.) を用いて移植腫瘍の luciferase 活性を発光検出により測定した。各担癌マウスにおける発光量 (Average Radiance [p/s/cm₂/sr]) を解析ソフトウェア (Living Image Software ver. 4.3.1、PerkinElmer Inc.) を用いて解析し、発光量が少ないまたは高いマウスを除外し、実験に用いるマウスを選抜した。翌日移植 7 日目に群分けを実施し、群分け日を Day 0 と規定した。各 ADC を Day 0 に尾静脈投与した。

さらに別検討として、NCI-N87 と MDA-MB-468-Luc 細胞を 10 匹の雌ヌードマウスの右腋窩部皮下に共移植した (5×10^6 cells + 1×10^7 cells)。また同じマウスの左側腹部皮下に MDA-MB-468-Luc 細胞を移植した (1.5×10^7 cells)。細胞移植 7 日目に 10 匹中 5 匹に DS-8201a を尾静脈内投与した。DS-8201a 投与日を Day 0 と規定した。

群分け後週に 2 回、腫瘍の長径 (mm) と短径 (mm) 及び luciferase 活性を測定した。最

終測定日は Day 14 とし、最終測定後実験終了とした。

免疫組織化学

NCI-N87 細胞または MDA-MB-468-Luc 細胞を移植した担癌マウス及び共移植した担癌マウスから腫瘍を細胞移植 8 日目に採材した。また抗腫瘍活性評価で最終測定を終了した全てのマウスを Day 14 (細胞移植後 21 日目) に採材した。採材した腫瘍は第 2 章第 1 節の記載に従いパラフィン包埋ブロックを作製後、HER2 の免疫組織化学 IHC を実施した。

第2節 各 ADC の遊離薬物の構造と細胞膜透過性

DS-8201a と T-DM1 の bystander 効果を評価するにあたり、遊離薬物の膜透過性が bystander 効果に与える影響も検討するため、DXd (1) と同等の Topo-1 阻害活性を有するが、低膜透過性の薬物 DXd (2) を遊離する ADC である anti-HER2 DXd (2) を評価に加えた。各 ADC 及び遊離薬物の構造を Figure 16 に示す。Anti-HER2 DXd (2) は第 3 章第 2 節にて合成した entry 8 の構造の ADC であり、DS-8201a 同様抗体鎖間のシステイン残基を介して GGFG リンカー、そして DXd (2) を結合させた ADC である。T-DM1 は腫瘍細胞中では結合薬物 DM1 ではなく、抗体への結合部位であるリジン残基及びリンカー構造を含めた Lys-SMCC-DM1 という構造で遊離することが報告されている[47,48]。この Lys-SMCC-DM1 は DM1 と同様にチューブリン重合阻害活性を有する[49]。

これら遊離薬物の細胞膜透過性について、分配係数 (Log D) 及び膜透過係数 (permeability coefficient、Peff) をもとに評価した。Log D と Peff の値を Table 5 に示す。DXd (1) の Log D は 2.3 であり、DXd (2) と Lys-SMCC-DM1 のそれより高かった (両薬物とも 0.2)。また、DXd (1) の Peff は pH5.0 と pH7.4 のどちらの条件下の評価においても DXd (2) 及び

Lys-SMCC-DM1 よりも高かった。両結果から、DXd (1)の細胞膜透過性は DXd (2)及び Lys-SMCC-DM1 よりも高いことが示され、癌細胞内で DS-8201a から遊離した DXd (1)は周囲の細胞に移行可能であり、bystander 効果を引き起こしうるということが推察された。一方で、DXd (2)及び Lys-SMCC-DM1 は周囲の細胞に移行し難いことが予想された。実際に各遊離薬物の細胞障害活性を評価したところ、DXd (1)と DXd (2)は同等の topoisomerase I 阻害活性を有するにもかかわらず、細胞に対する IC₅₀ 値には乖離があり、薬物の細胞膜透過性が影響しているものと示唆された。

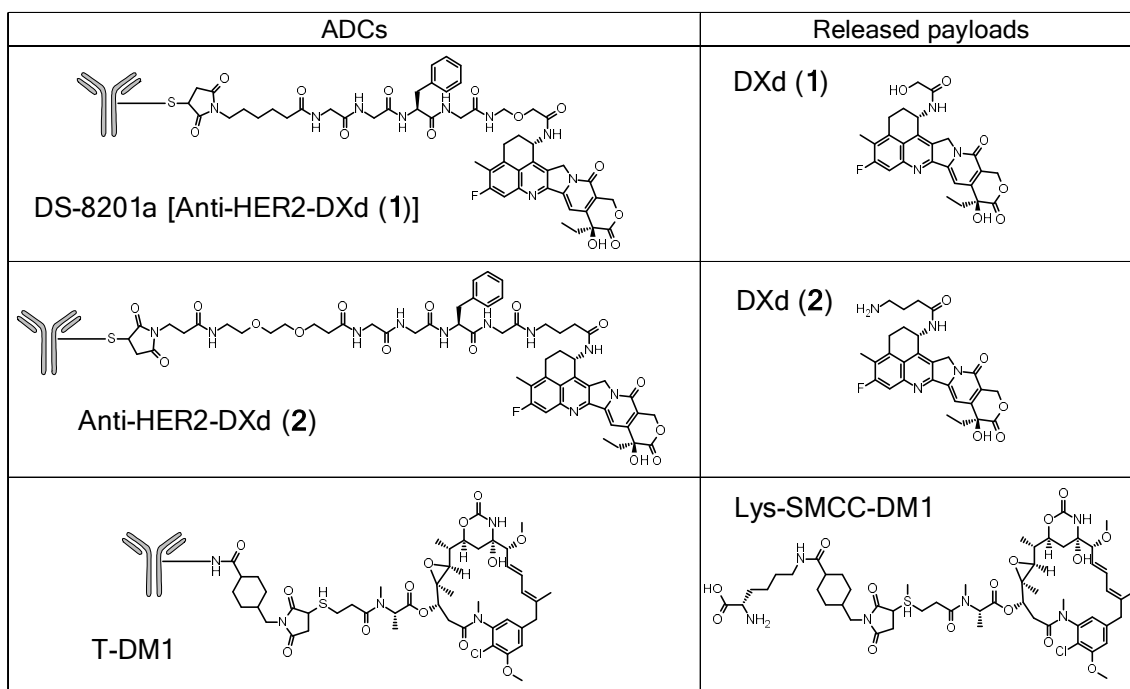


Figure 16. Structures of ADCs and released payloads.

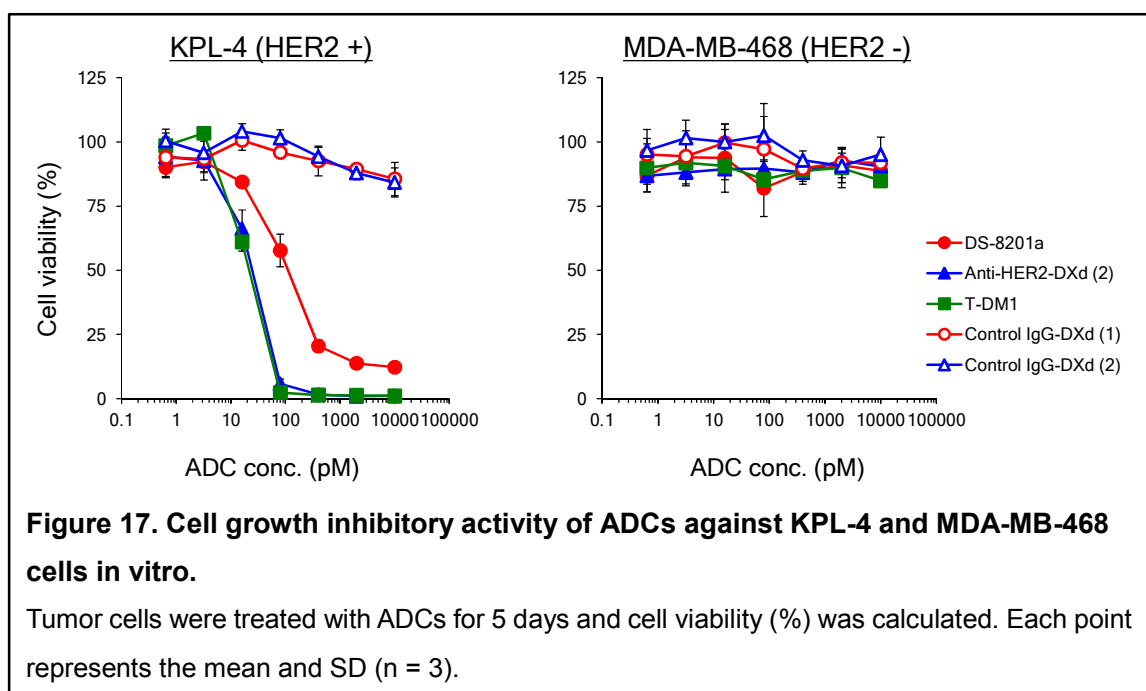
Table 5. Physicochemical parameters of ADC payloads

		DXd (1)	DXd (2)	Lys-SMCC-DM1
Molecule weight		493.5	520.6	1103.7
Log D	pH 7.4	2.3	0.2	0.2
PAMPA	pH 5.0	13	<0.1	<0.1
(Peff)	pH 7.4	12.2	<0.1	<0.1
Cytotoxicity	KPL-4	4	33.5	24.8
IC ₅₀ (nM)	MDA-MB-468	0.5	9.7	40.5

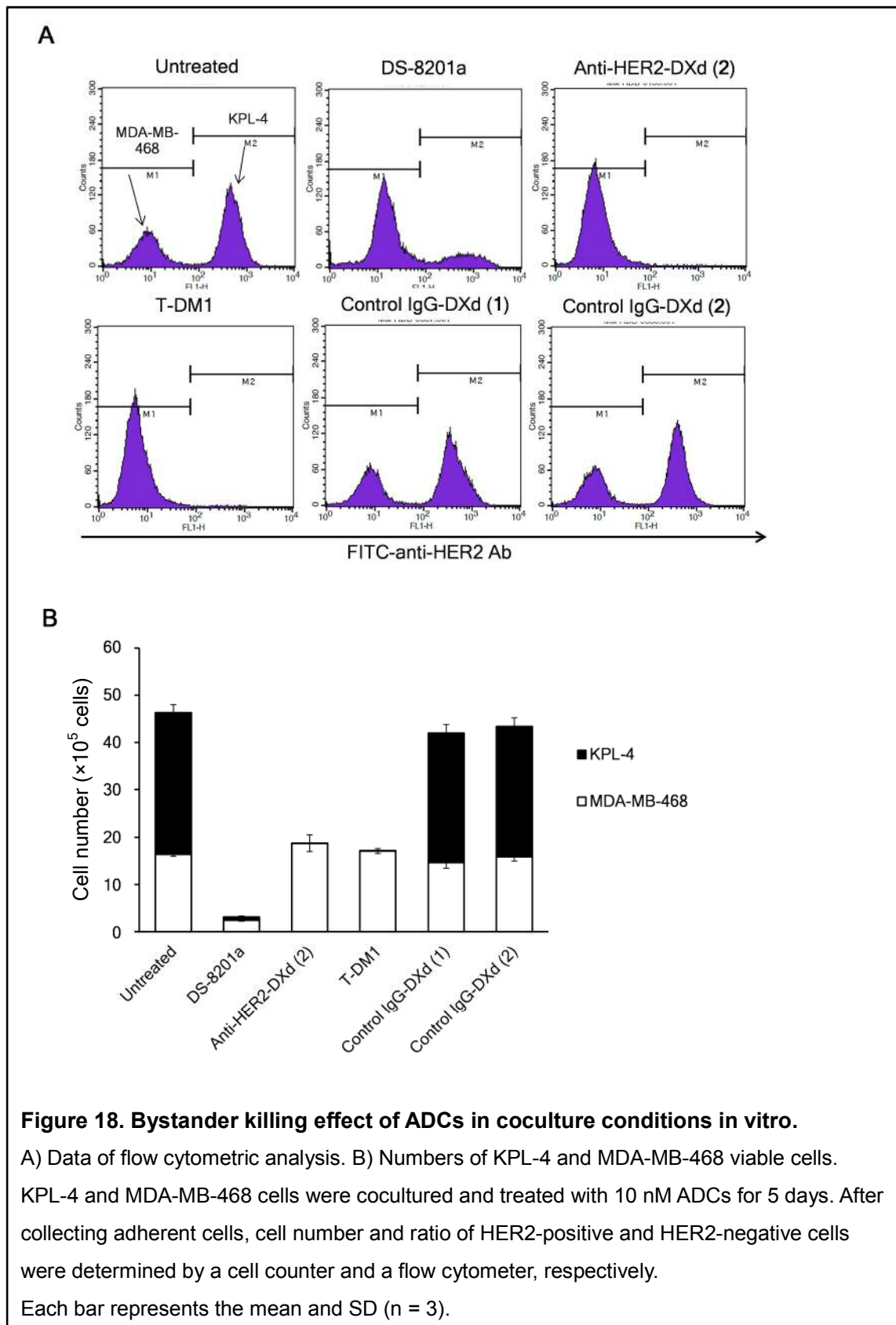
PAMPA, parallel artificial membrane perme-ability assay; Peff, permeability coefficient

第3節 in vitro bystander 効果

DS-8201a の bystander 効果を検証するために、HER2 陽性細胞と陰性細胞の共培養により HER2 発現が不均一な環境を作り出し実験を行った。HER2 陽性細胞としてヒト乳癌細胞株 KPL-4 細胞を、HER2 陰性細胞としてヒト乳癌細胞株 MDA-MB-468 細胞を用いた。まず各細胞に対する各 ADC 及び結合薬物の細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、DS-8201a、anti-HER2 DXd (2)及び T-DM1 はいずれも KPL-4 細胞に対し細胞増殖抑制活性を示したが、MDA-MB-468 細胞には活性を示さなかった (Fig. 17)。また control IgG-DXd (1) 及び control IgG-DXd (2)はいずれの細胞に対しても活性を示さなかったことから、3種の HER2 ADC はいずれも HER2 依存的に細胞増殖を抑制することを確認した。

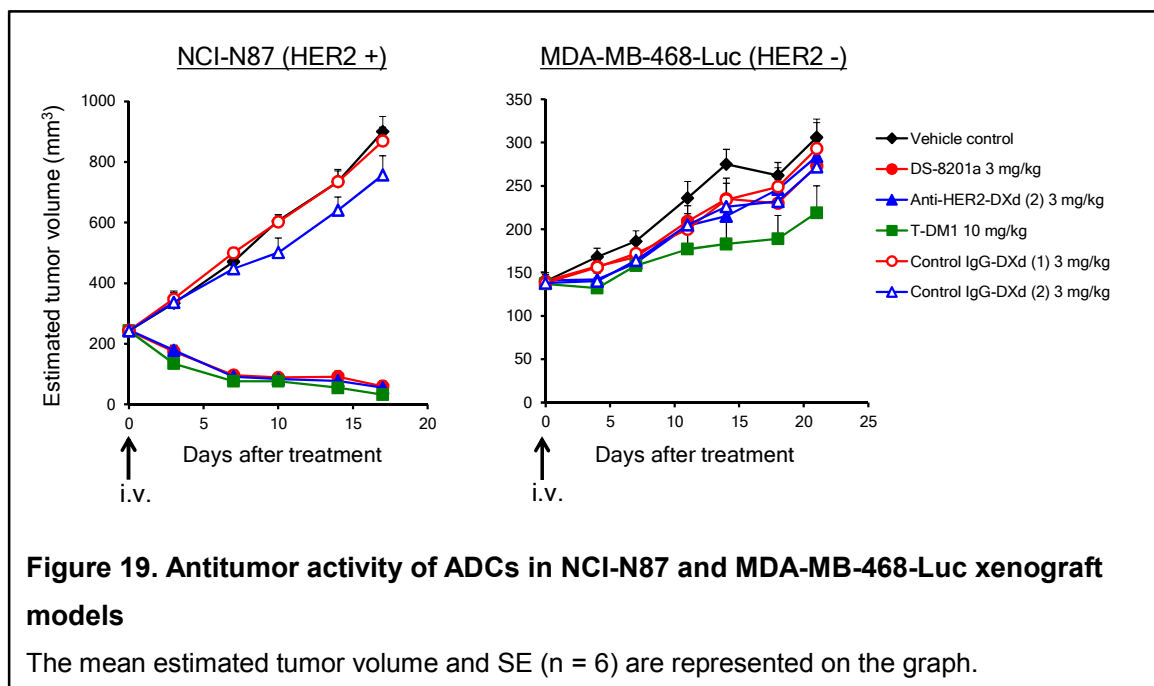


次に KPL-4 と MDA-MB-468 細胞の共培養系にて bystander 効果の有無を検証した。まず共培養系に各 ADC を添加した 5 日目の生細胞数を測定した。同時に KPL-4 と MDA-MB-468 細胞の割合を求めるため、HER2 陽性、陰性細胞の割合をフローサイトメーターを用いて解析した (Fig. 18A)。その結果、生細胞中には KPL-4 細胞と MDA-MB-468 細胞の存在を示す明確な 2 つのピークが観察され、生細胞数データと合わせて KPL-4 細胞と MDA-MB-468 細胞数を算出した。未処理群では KPL-4 細胞が約 65%、MDA-MB-468 細胞が約 35% の割合で存在していた (Fig. 18B)。DS-8201a 添加群では KPL-4 並びに MDA-MB-468 細胞の両方の細胞数の減少が認められ、総細胞数として未処理群の 10 分の 1 以下であった (Fig. 18B)。一方で anti-HER2 DXd (2) 及び T-DM1 添加群ではほぼ全ての KPL-4 細胞が消失していたのに対し、MDA-MB-468 細胞は未処理群と比較して優位な減少は認められなかった。先の実験結果から DS-8201a は HER2 特異的な細胞増殖抑制活性を有することが確認されたため、共培養系における DS-8201a の HER2 陰性細胞 MDA-MB-468 細胞に対する活性は遊離薬物 DXd (1) の影響であることが推察され、DS-8201a の高いバイスタンダー効果が in vitro において示唆された。また、control IgG ADC ではいずれの細胞に対しても細胞増殖抑制活性を示さなかった。



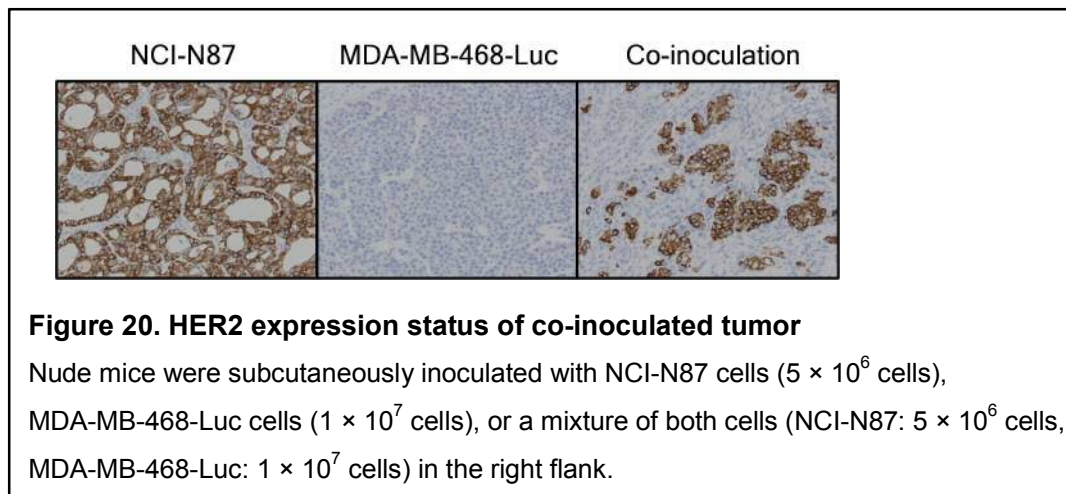
第4節 in vivo bystander 効果

HER2 陰性細胞を *in vivo* 共移植系にて検出するために、HER2 陰性細胞 MDA-MB-468 細胞に luciferase 遺伝子を導入した MDA-MB-468-Luc 細胞を用い *in vivo* イメージングシステムを樹立した。また *in vivo* での検討には HER2 陽性細胞としてヒト胃癌細胞株 NCI-N87 細胞を用いた。まずイメージング評価に先立ち、各細胞の xenograft model に対する各 ADC の抗腫瘍活性を評価した。NCI-N87 xenograft model に対し DS-8201a、anti-HER2 DXd (2) 及び T-DM1 の全ての HER2 ADC は 3 もしくは 10 mg/kg 投与により腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍活性を示した。一方で MDA-MB-468-Luc xenograft model に対してはいずれの HER2 ADC は有効性を示さず、各 HER2 ADC の HER2 特異的な抗腫瘍活性が確認された (Fig. 19)。

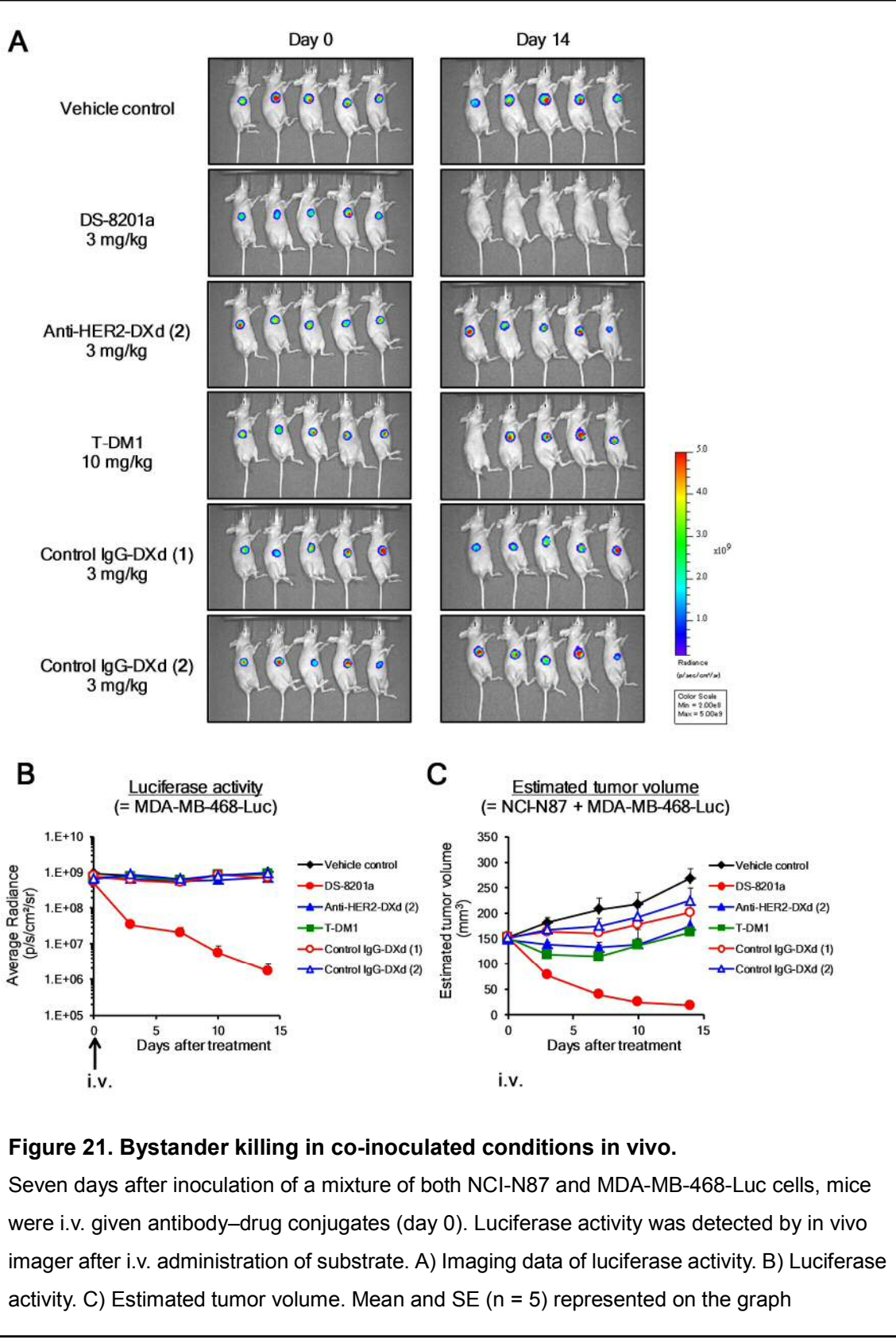


次に NCI-N87 と MDA-MB-468-Luc の共移植によって HER2 発現の不均一な腫瘍が形成されるかを HER2 の免疫組織化学 (IHC) にて確認した。NCI-N87 細胞のみを移植した腫瘍では癌部に HER2 の一様な発現が認められたのに対し、MDA-MB-468-Luc 細胞移植腫瘍

では HER2 陽性細胞は認められなかった (Fig. 20)。これら細胞の共移植腫瘍では両細胞から成る HER2 発現の不均一な腫瘍が形成されることが確認された (Fig.20)。



この共移植モデルに各 ADC を単回投与した後の、各マウスの luciferase 活性を発光イメージング画像として Figure 21A に、その定量値を Figure 21B に示した。DS-8201a 投与によりシグナルの明確な減弱が認められ、すなわち Luc 遺伝子を導入した HER2 陰性 MDA-MB-468-Luc 細胞の消失が確認された。その他の HER2 ADC、control IgG ADC ではこのような傾向は認められなかった。推定腫瘍体積の推移では、DS-8201a に加え anti-HER2 DXd (2)及び T-DM1 投与群でも腫瘍の増殖抑制が認められたが (Fig. 21C)、これは NCI-N87 細胞から成る HER2 陽性腫瘍部位の消失が原因であると考えられる。



そこで、投与 14 日目時点の各マウスの腫瘍における HER2 発現を IHC にて確認した。

Vehicle control 群では HER2 の不均一性が維持されていたが、anti-HER2 DXd (2) 及び T-DM1 投与群では HER2 陽性腫瘍部位はほぼ消失しており、HER2 陰性部分が大部分を占めていた (Fig. 22)。また DS-8201a 投与群では HER2 陽性部位並びに HER2 陰性部位も消失しており、採材組織の中に腫瘍細胞はほとんど観察されない個体も存在した (Fig. 22)。以上の結果から、DS-8201a は共移植条件では HER2 陽性細胞及び陰性細胞の双方に対し抗腫瘍活性を示し、anti-HER2 DXd (2) 及び T-DM1 は HER2 陽性細胞に対してのみ活性を示すことが確認された。

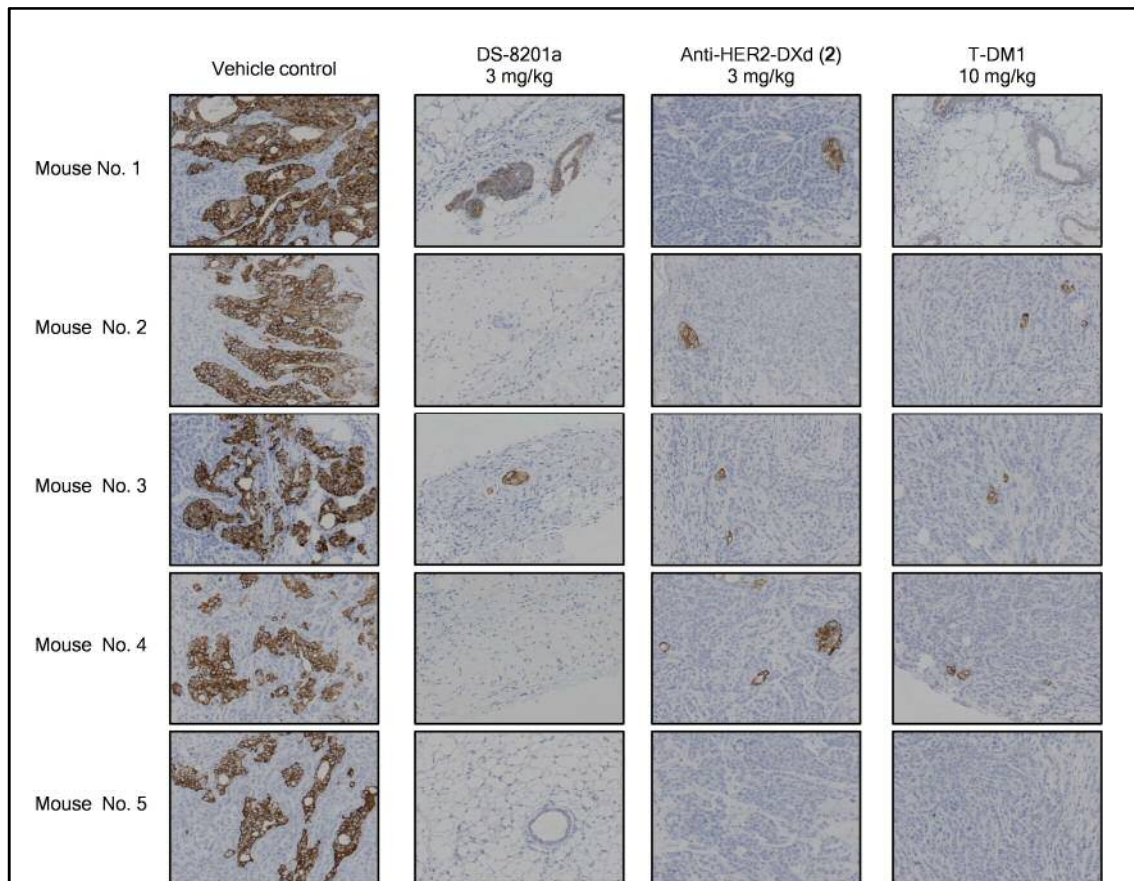
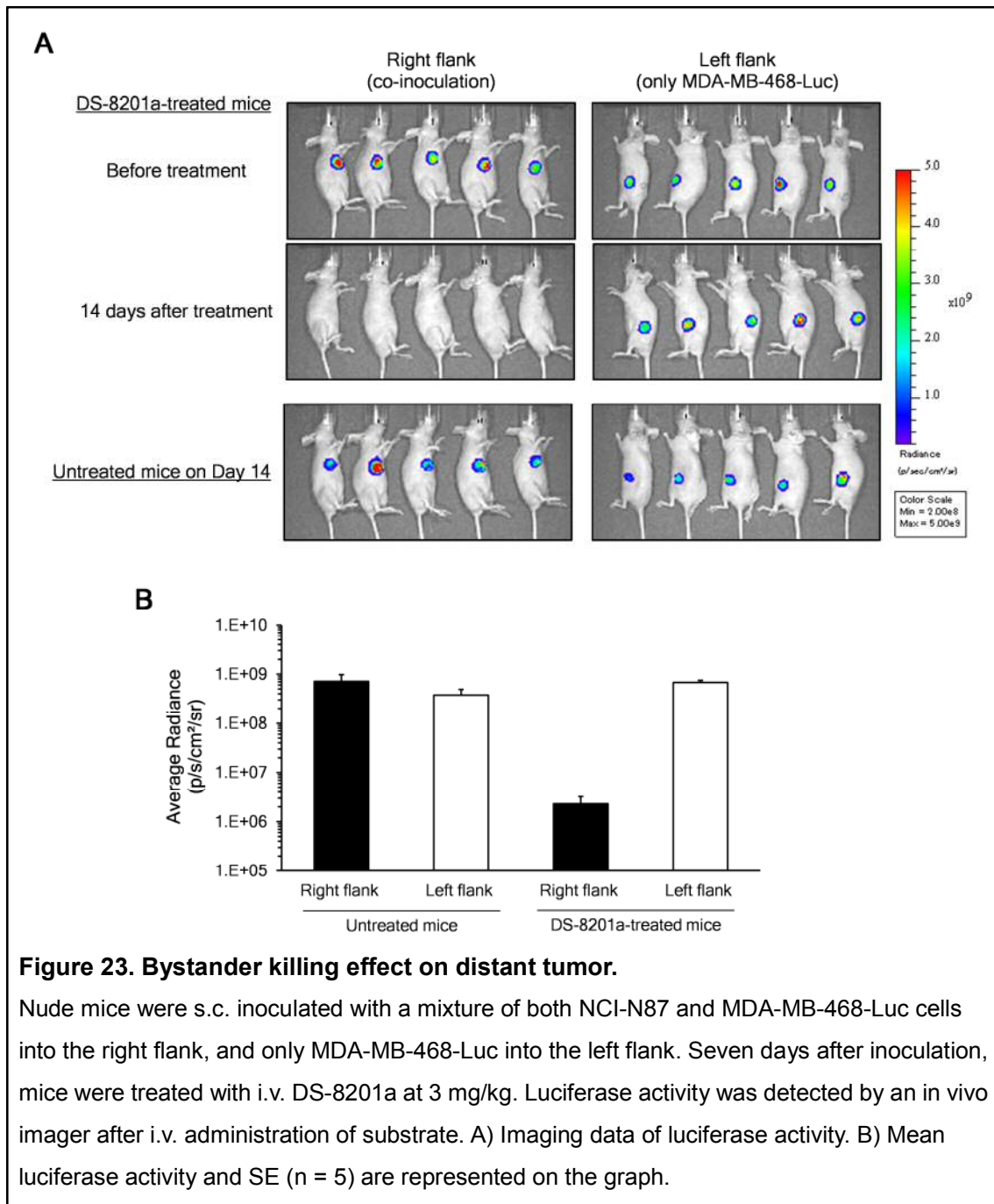


Figure 22. HER2 expression status after ADC treatment

Fourteen days after ADC treatment, each tumor was collected and fixed with 10% neutral buffered formalin. Then, immunohistochemistry of HER2 protein was performed using HercepTest II kit according to manufacturer's instructions. The results of five mice in each group are represented.

しかしながら、これまでの検討では DS-8201a の HER2 陰性細胞に対する効果が本当に HER2 陽性細胞の近傍に存在する場合でのみ生じるのか否かが不明瞭である。そこで、HER2 陽性細胞から離れた部分に存在する HER2 陰性細胞に対する影響を検討した。NCI-N87 と MDA-MB-468-Luc 細胞を右側腹部に、MDA-MB-468-Luc 細胞のみを左側腹部に移植したヌードマウスに対して DS-8201a を投与し、両側腫瘍の luciferase 活性を検出した。その結果、DS-8201a 投与 14 日後の共移植部分の MDA-MB-468-Luc 細胞は減少したのに対し、逆側腹部に存在する MDA-MB-468-Luc 細胞の減少は認められず (Fig. 23)、DS-8201a の HER2 陰性細胞に対する効果は HER2 陽性細胞の近傍にある細胞に対してのみ生じることが確認された。



第5節 小括 (3)

- DS-8201a が抗腫瘍効果増強に寄与する bystander 効果を有することが明らかとなった。
- T-DM1 の bystander 効果は非常に弱く、DS-8201a の明確なメリットとなりうる。
- Bystander 効果有無の原因として遊離薬物の細胞膜透過性の有無が示唆された。
- In vivo イメージングを用いた bystander 効果の新規評価法を構築した。
- HER2 発現の不均一な腫瘍に対して DS-8201a が臨床において有効性を示す可能性が示唆された。

第4章 DXd ADC 技術の汎用性

第3章までに、DS-8201a を題材として既存技術が有する課題の克服または既存技術との差別化ポイントについて解析、考察を進めてきた。本章では、抗 HER2 抗体以外の抗体への本 DX-8951 derivative (DXd) -ADC 技術の汎用性について評価した。評価には、第1章第2節で合成した entry 4 の構造の ADC を用いた。

第1節 実験材料と実験方法

ADC

抗 CD30 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD70 抗体は他社 ADC 品目の特許に記載される抗体のアミノ酸配列を参照し作製した。抗 B7-H3 抗体は第一三共株式会社にて取得した[50]。ADC の合成法は第1章第1節を参照した。

細胞

ヒトリンパ腫細胞株 SR、Daudi、Raji 及び CCRF-CEM、ヒト急性前骨髄性白血病細胞株 HL-60、ヒト膠芽腫細胞株 U251、ヒト非小細胞肺癌細胞株 Calu-6、ヒトメラノーマ細胞株 A375 は全て ATCC から購入した。培地には各細胞の推奨培地を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

細胞障害活性評価

第1章第1節と同様の方法にて評価を行った。

各細胞は 1000-2500 cells/well となるように 96 well マイクロプレートに播種した。

抗腫瘍試験

第1章第1節と同様の方法にて評価を行った。Calu-6は 5×10^6 cellsの細胞を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し、11日後に群分けを実施した。A375は 8×10^6 cellsの細胞を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し、11日後に群分けを実施した。

第2節 既存 ADC 抗体への適用

本ADC技術の抗HER2抗体以外への適用を検討するため、非臨床及び臨床にて既存ADC技術の適用が報告されている抗CD30抗体[51,52]、抗CD33抗体[9,53]及び抗CD70抗体[54]を用いてDXd (2)を遊離するlinker-payload (Table 1, entry 4)を結合させた。各抗原の陽性細胞及び陰性細胞に対する各ADCの細胞障害活性を評価した。抗CD30 ADC

(anti-CD30-DXd)はCD30陽性SR細胞に対し活性を示したが、CD30陰性Daudi細胞に対しては活性を示さなかった (Fig. 24A)。同様に、抗CD33 ADC及び抗CD70 ADCでも抗原発現に依存した活性が認められた (Fig. 24B, C)。抗体のみでは細胞障害活性は観察されないことから、これらADCの活性は結合薬物DXd (2)の遊離によるものであると考えられた。このような抗原特異的なADCの有効性は抗HER2抗体を用いた場合と同等であった。従ってDXd-ADC技術は複数の抗体に適用可能であり、汎用性の高い技術であることが示唆された。

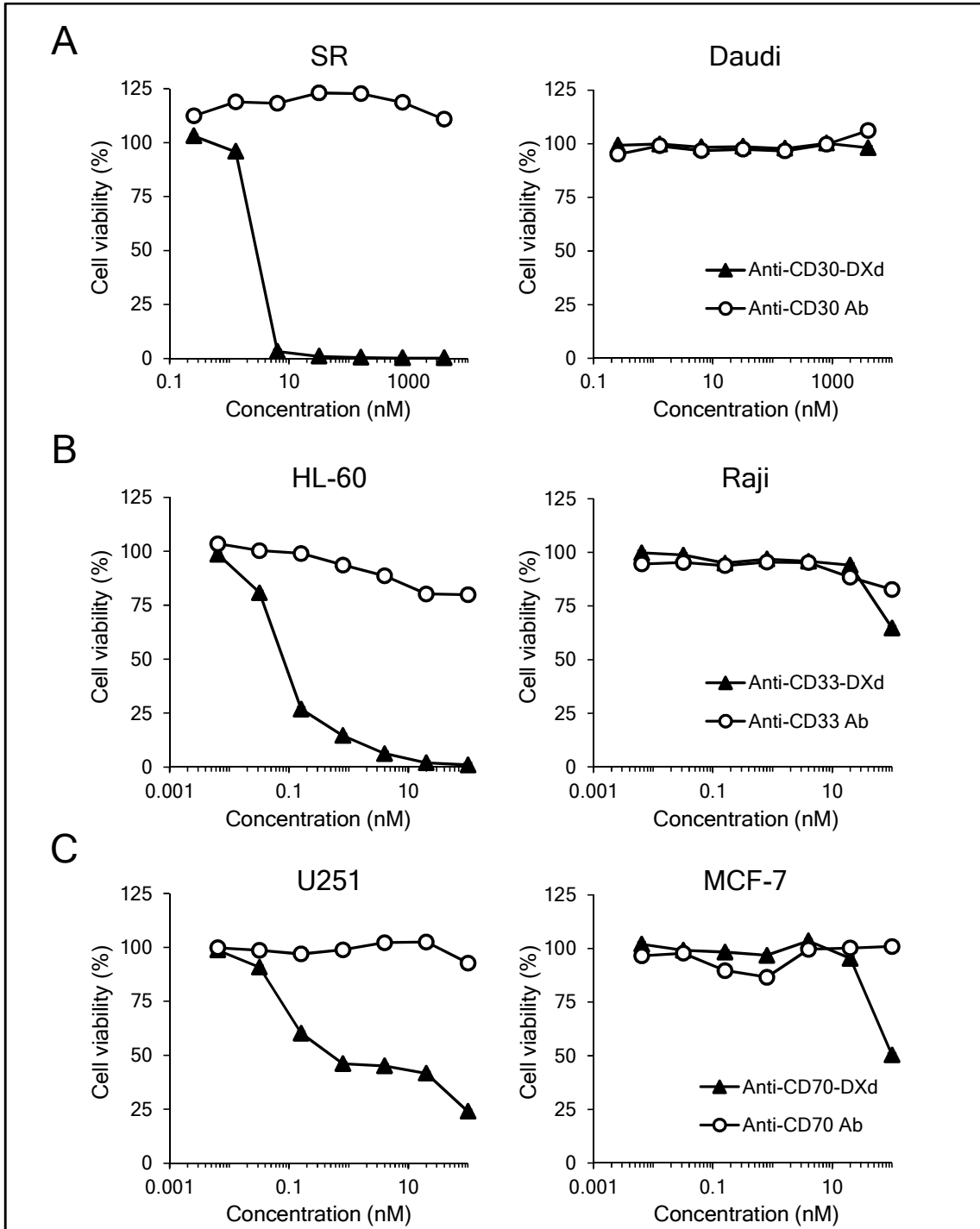
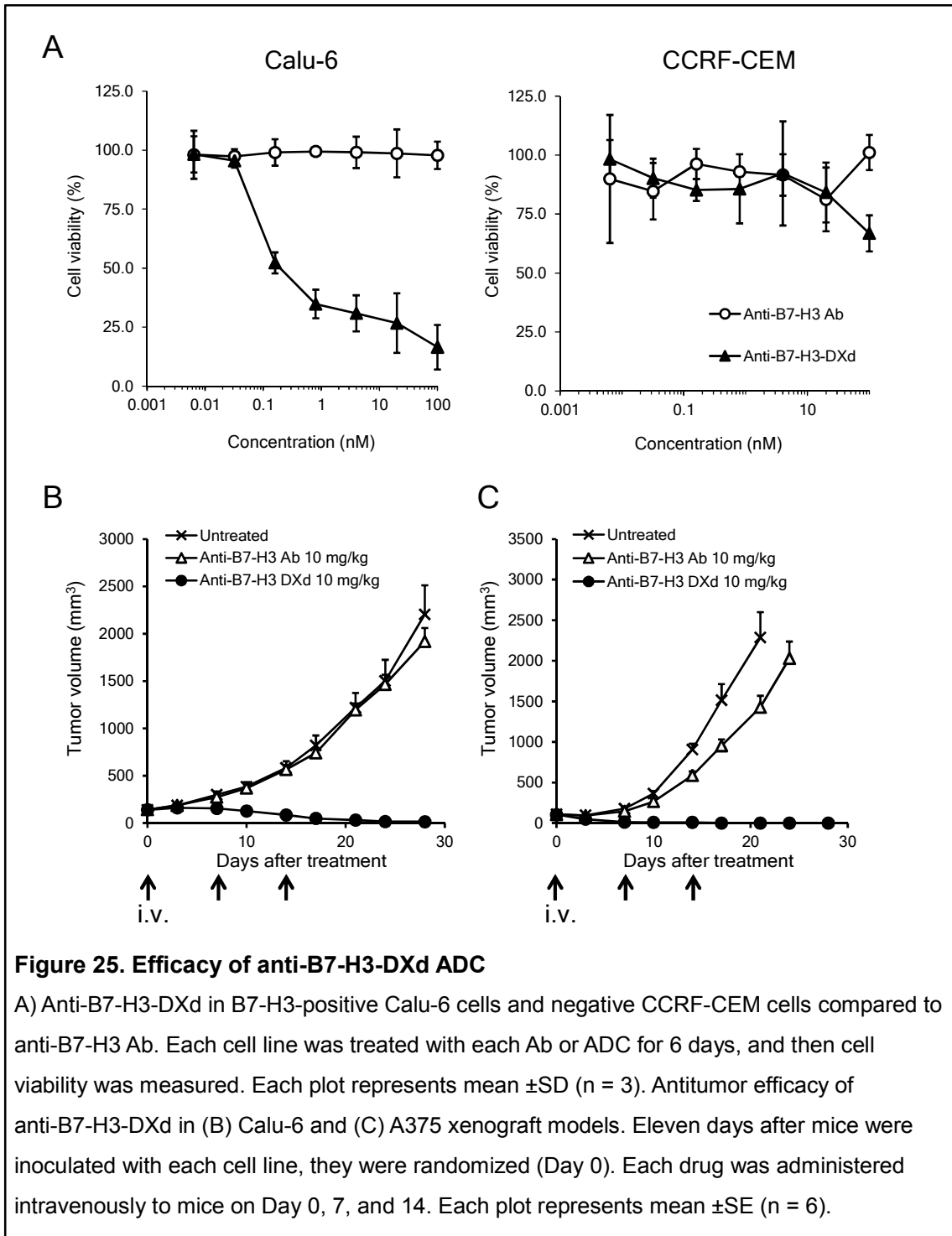


Figure 24. Target specific cell growth inhibitory activity of several DXd-ADCs

Cytotoxicity of (A) anti-CD30-DXd in CD30-positive SR cells and negative Daudi cells compared to anti-CD30 Ab, (B) anti-CD33-DXd in CD33-positive HL-60 cells and negative Raji cells compared to anti-CD33 Ab, (C) anti-CD70-DXd in CD70-positive U251 cells and negative MCF-7 cells compared to anti-CD70 Ab. Each cell line was treated with each Ab or ADC for 6 days, and then cell viability was measured. Each plot represents mean (n = 2).

第3節 抗 B7-H3 ADC の活性

さらに、DXd-ADC 技術の抗 B7-H3 抗体への適用を検討した。新規 ADC 標的である B7-H3 は B7 ファミリー分子の 1 つであり[55]、様々な癌での過剰発現及び発現と予後との相関が報告されている[56,57,58]。ADC 標的選定の指標として、1 細胞辺り 10^5 分子以上という高い発現量であることが重要な要素の 1 つであるとの報告もあり[1]、B7-H3 はそのクライテリアを満たした分子である。我々は抗体 B7-H3 抗体を取得し[50]、ADC (Anti-B7-H3 DXd) を合成した。Anti-B7-H3 DXd は B7-H3 陽性 Calu-6 細胞に対して有効であり、B7-H3 陰性 CCRF-CEM 細胞に対しては無効であった (Fig. 25A)。In vitro での検討に加え anti-B7-H3 DXd の in vivo 抗腫瘍活性を B7-H3 陽性 Calu-6 及び A375 xenograft model を用いて評価した。In vitro の検討結果と同様に抗体のみの投与では抗腫瘍活性は認められなかったのに対し、ADC は非常に強い抗腫瘍活性を示した (Fig. 25B)。特に A375 xenograft model では腫瘍の完全退縮例が全個体で観察された (Fig. 25C)。以上より、B7-H3 は魅力的な ADC 標的であること、DXd-ADC 技術の適用による強い活性を示すことが確認された。



第4節 小括 (4)

- DXd-ADC 技術は既存 ADC の抗体に適用可能であり、抗原発現に依存した細胞障害活性を示した。

- 新規 ADC 標的 B7-H3 に対する DXd-ADC の in vitro 及び in vivo 有効性を確認した。

- ADC 領域において、本 DXd-ADC 技術が汎用性の高い技術として活用されることが期待される。

総括

第1章、第2章では、topoisomerase I 阻害剤を用いた新規 ADC 技術の構築及び本技術を抗 HER2 抗体に適用した DS-8201a の有効性、安全性、薬物動態について触れた。また、既存技術を適用した ADC の代表格である T-DM1 との比較、差別化を実施した。

SGN-35 や T-DM1 のように、世の中の多くの ADC はチューブリン重合阻害剤を結合させた ADC である。我々は薬物部分に異なる作用機作を有する topoisomerase I 阻害剤を用い、リンカー部分には自己解離型のアミノメチレン構造を有する切断型リンカーを用いた新規 ADC 技術を樹立した。SGN-35 やその他 ADC に適用されている切断型リンカーは N 末にアミノ基を有する薬物を遊離するが、アミノメチレン構造を有する切断型リンカーは N 末に水酸基を有する薬物を遊離可能であり、ADC 全体の疎水性の低減、それによる DAR の増加が可能になる。T-DM1 では抗体のリジン残基を介した薬物導入と、非切断型リンカーを用いており、本 ADC 技術とは明確な構造上の違いがある。

DS-8201a は *in vitro* 及び *in vivo* の双方で強い活性を示し、T-DM1 と同様に薬物結合によって抗体が有する活性を減弱させないことが確認された[29]。またラット及びカニクイザルでの安全性評価では DS-8201a の高い認容性が示された。このような良好なプロファイルは高 DAR にも関わらず非常に高い血中安定性を有することに起因すると考えられる。一般的に DAR6 や DAR8 のような高 DAR の ADC はその高いクリアランス故に活性の低下及び毒性の増強が認められると報告されているが[14]、DS-8201a は先に述べた構造上の独自性により高 DAR での良好な薬物動態を可能にしている。DS-8201a の PKPD 解析によりヒトに対し有効性が期待できる最小有効用量は 0.8 mg/kg であると予測され、サルにおける HNSTD が 30 mg/kg であることを考慮すると、DS-8201a は非常に広い治療域を有する ADC

であることが示唆された。

この DS-8201a の高 DAR 化は HER2 低発現腫瘍に対する有効性発揮に貢献している。DS-8201a は十分な薬物を腫瘍に送達可能であるため、DAR がおよそ 4 の抗 HER2 DXd ADC では活性を見出すことは出来ない HER2 低発現腫瘍に対して抗腫瘍活性を示した。T-DM1 は HER2 低発現腫瘍に対して効果を示さなかったが、T-DM1 の DAR は 3.5 であることがその原因の 1 つであると推察された。これら結果は DS-8201a の治療対象の拡大を示唆するものである。既存の抗 HER2 治療薬の対象は免疫組織学 (IHC) 3+ 及び IHC 2+/蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 陽性である患者に限定される。例えば乳癌患者の 70% 弱で HER2 発現が認められるにも関わらず、治療対象となるのは全体の 12% 程度であり、全体の 50% を超える IHC 2+/FISH 陰性及び IHC 1+ で定義される HER2 弱陽性患者に対する有効な抗 HER2 治療薬は存在しない状況である。DS-8201a はこのような HER2 低発現癌患者において有効性を示す可能性がある。

DS-8201a は T-DM1 非感受性の PDX モデルに対し強い抗腫瘍活性を示した。ビンクリスチンやパクリタキセルのようなチューブリン阻害剤の耐性メカニズムの 1 つに ABC トランスポーターの 1 つとして知られる MDR1 による薬剤排出が報告されている[59,60]。同様に、Lys-SMCC-DM1 や DM1 が MDR1 の基質になることが報告されており[61]、T-DM1 と同じリンカー薬物を結合させた抗 EpCAM-SMCC-DM1 が MDR1 発現腫瘍に対し抗腫瘍活性を示さない[49]。一方で exatecan (DX-8951) は MDR1 の発現に関わらず複数の xenograft model に対し抗腫瘍活性を示す[23]。また我々は MDR1 発現細胞に対して DXd (1) が細胞障害活性を示すことも予備的に確認している。これら事実、DS-8201a が MDR1 の基質にはならないこと、そして T-DM1 の初期耐性を克服する可能性を示唆するものである。しかし、T-DM1 の第 2 相試験 (TMD4558g) では、T-DM1 の初期耐性例は約 20% と低頻度であ

ること[5]、T-DM1 投与後の患者の多くは一定期間奏効後に T-DM1 に対する耐性を獲得することが示された[62]。T-DM1 獲得耐性メカニズムとしては DM1 感受性の低下や HER2 蛋白の減少等が非臨床の検討で報告されている[63,64]。その報告の中では、T-DM1 に類似した trastuzumab-maytansinoid conjugate に耐性を獲得した MDA-MB-436 細胞では、DM1 への感受性が 3 から 4 倍低下したのに対し、イリノテカンへの感受性は変化しなかった[63]。従って、DS-8201a は T-DM1 獲得耐性腫瘍に対し有効を示すことが、HER2 が細胞膜上から完全に消失しない限りは大いに期待できる。なぜなら DS-8201a は HER2 が低発現になっても効果を示すためである。今後は T-DM1 投与後に耐性になった患者由来の腫瘍サンプルを用いた耐性メカニズム解析ならびにその PDX モデルに対する DS-8201a の有効性を評価する予定であり、それにより DS-8201a の T-DM1 獲得耐性腫瘍に対する効果をより正確に精査可能になると考える。

遊離薬物の作用機作がその ADC の安全性プロファイルに大きく影響することが知られている[11]。臨床では、T-DM1 の重篤な副作用として血小板減少及び末梢神経障害が認められる[12]、これらはチューブリン重合阻害剤を結合させた ADC に共通する副作用である。T-DM1 のサル毒性試験では血小板の減少及び神経軸索の変性が認められ[13]、臨床での副作用とよく相関する。DS-8201a のサル毒性試験では、このような血小板減少及び末梢神経障害は最高投与量においても認められなかった。サル試験において 30 mg/kg 以上の投与量で肺に対する毒性が観察されたが、T-DM1 でも肺間質細胞の炎症といった DS-8201a と類似の毒性がカニクイザル 10 mg/kg の投与で認められている。ヒト肺組織において HER2 が発現しているという報告もあり、非交差種のラットでは肺における毒性所見は無かったことから、この肺毒性は HER2 依存的なものであると推察される。このように、非臨床での安全性プロファイルが良好であったことから、2015 年 8 月より DS-8201a の第 1 相臨床試験が開始されている。

第 1 章及び第 2 章では DS-8201a の HER2 特異的な活性について証明してきたが、第 3 章では HER2 陽性細胞共存下における HER2 陰性細胞に対する活性について評価を行った。高膜透過性の薬物を遊離する DS-8201a は低膜透過性薬物を遊離する anti-HER2 DXd(2)及び T-DM1 と比較して強い bystander 効果を示し、HER2 陰性細胞に対する有効性が認められた。これまでに ADC の bystander 効果についての報告は複数あるが、本研究は細胞膜透過性との関連を検討した初めての研究である。

最近 Roche から T-DM1 の適用拡大のために実施中であった HER2 陽性胃癌の 2 次治療を対象にした第 2/3 相試験（Gatsby 試験）において主要評価項目を満たさなかったと報告された。胃癌では HER2 発現の不均一性が報告されており [65]、これが未達の原因である可能性がある。Bystander 効果はこの課題の解決案の 1 つとして挙げられ、DS-8201a は臨床において胃癌患者に対し有意な有効性を発揮する可能性が本研究により示唆された。また、T-DM1 が承認を受けている乳癌でも HER2 発現の不均一性は報告されており [66]、DS-8201a のより高い奏効率も期待できる。このように、DS-8201a が有する bystander 効果は T-DM1 との魅力的で明確な差別化ポイントであると言える。

また、実験方法の観点では、報告されている bystander 効果の評価の多くは主に *in vitro* で実施されている場合が多い。しかし *in vitro* 評価は閉鎖系であり、遊離薬物が培養上清中に蓄積可能であるため、正確な bystander 効果の評価、すなわち隣接細胞への遊離薬物移行の評価は行えていないと考える。加えて *in vivo* にて bystander 効果进行评估している報告は抗原発現陰性細胞の検出が困難であるためほぼ存在しなかった。本研究では *in vivo* イメージング技術を用いて、抗原発現陰性細胞を共移植条件下で経時的に観察可能な新規評価系の構築に初めて成功した。また、本イメージング法と IHC による HER2 発現解析を複合することで、腫瘍中の HER2 陽性細胞と陰性細胞を同時に検出することを可能にした。これ

により、anti-HER2 DXd (2)及び T-DM1 は HER2 陽性細胞のみに作用することが確認できた。しかしながら、*in vitro* 及び *in vivo* の双方において、HER2 の不均一性を制御することは非常に難しく、*in vitro* と *in vivo* で用いる HER2 陽性細胞株を変える必要が生じた。様々な ADC の bystander 効果を評価するためには、評価系の改善が未だ求められる。

さらに、HER2 陽性細胞の近傍細胞ではなく、離れた部位にある細胞に対する、ADC から遊離した薬物の効果についての検討は革新的であった。Bystander 効果による安全性懸念は有効性増強に加え重要視すべき点であるが、これまでの報告では評価されていなかった。今回、我々は DS-8201a の bystander 効果は HER2 陽性細胞に近接する細胞に対してのみ生じる効果であることを明確に証明し、全身性の毒性及び腫瘍部から離れたところにある正常組織に対する毒性懸念は低いことが示唆された。しかしながら腫瘍に近接した正常組織に対する毒性は未だ不明である。我々は topoisomerase I 阻害剤は癌細胞のような増殖性の細胞に対して作用するため、骨髄細胞や血液細胞以外の正常組織に対しては毒性懸念が低いと仮説を立てている。実際にイリノテカンの重篤な毒性所見としては好中球減少のような血液毒性が認められている[21]。

今回、低膜透過性薬物を遊離する anti-HER2 DXd (2)は bystander 効果を有さないことが確認されたが、逆にこのような ADC は抗原陽性細胞中に遊離薬剤を蓄積しやすく、血液癌のような細胞が集合しない癌に対しては強い有効性を示す可能性が考えられる。実際に、Figure 17 にあるように、anti-HER2 DXd (2)の *in vitro* 細胞障害活性は DS-8201a よりも強かった。従って、我々は標的とする癌腫により、適切な遊離薬物を選択する必要があるのかもしれない。今後 DXd (2)を遊離する ADC の血液癌に対する有効性を評価する予定である。

第4章では本 DXd-linker 技術の汎用性について触れた。前述の通り現在多くの ADC の臨床試験が行われているが、用いられる ADC 技術は限られている。切断型リンカーと MMAE、非切断型リンカーと DM1、切断型リンカーと DM4 の組み合わせが大部分を占める[8]。今回 DXd を結合させた ADC 技術が複数の抗体に適用可能であることを確認した。更に新規標的 B7-H3 に対する有効性も確認した。カニクイザルを用いた評価では抗 B7-H3 ADC は 30 mg/kg まで重篤な副作用が認められないという preliminary なデータも取得しており、DS-8201a のみならず、他標的においても高い治療域が確認されつつある。すなわち既存の ADC 技術に加え新しい選択肢を提供することが可能になると期待する。Topoisomerase I 阻害剤を用いた ADC として、sacituzumab govitecan (抗 TROP2- ADC) が現在臨床試験進行中であるが、結合薬物として SN-38 を用いている[67,68]。第1章で記載したとおり DXd よりも 10 倍程度低活性である。またヒト及びサル血清中では結合した SN-38 の約半分が 24 時間以内に遊離してしまう、すなわちリンカーの不安定性が報告されている。従って、臨床試験では下痢や好中球減少のようなイリノテカンの副作用と関連する毒性が高頻度で観察されていること[68]は不思議ではない。DXd-ADC 技術は癌細胞で高発現が報告されるカテプシン B や L のようなリソソーム酵素により切断される GGFG リンカーを採用しており[25,69,70]、腫瘍細胞内での効率的な薬物遊離が期待される。従って、結合薬物の活性及びリンカーの安定性という 2 点が SN-38 ADC 技術を凌駕する点と考える。

その他の作用機作の薬物として、最近 pyrrolobenzodiazepine (PBD) と呼ばれる DNA クロスリンクを誘導する薬物を用いた ADC として SGN-CD33A[71]及び SGN-CD70A[72] が臨床試験を開始し、さらに他抗体への適用可能性が示唆されている。しかし、これら 2 つの ADC は結合薬物 PBD の高活性かつ高毒性により薬物結合数を最大 2 となるように厳密に制御する必要があり、毒性懸念が未だ存在する。その点、本 DXd-ADC 技術は高い安全性が確認されており、汎用性、使いやすさという観点からは PBD-ADC よりも高価値であ

ると考える。PBD-ADC の臨床試験状況を注視しながら考察を加えていきたい。

しかしながら本検討は DXd (2) を遊離するタイプの ADC を用いたものであり、DS-8201a、つまりリンカー部分には自己解離型のアミノメチレン構造を有する切断型リンカーを用いた DXd (1) を遊離する ADC 技術の汎用性は確認できていない。現在複数の抗体に対して DS-8201a のリンカー薬物を適用した ADC の評価を進めている。これら結果が出揃うことで、今回我々が樹立した topoisomerase I 阻害剤を用いた新規 ADC 技術の有用性をより確かに示すことが可能になる。また、現在進行中の DS-8201a の臨床試験の結果は本技術の臨床応用への自信、期待を後押しするものと確信しており、その結果が待たれる。

今後は本技術の適用拡大、ADC 領域でのプレゼンスの確立を目指し、研究を進める必要がある。他 ADC と更なる差別化を目指すべく、本技術の高い安全性を活かした標準治療薬との併用効果について検討を進めたいと考える。特に最近では ADC 薬物が癌免疫を惹起する報告もあり興味深い[73,74]。ミサイル療法という概念が提唱されて約 30 年経った今、ADC の更なる価値が求められる時が来ている。そのパイオニアとして道を切り拓けるよう、多角的に ADC を見つめ研究を進めたい。

結論

➤ Topoisomerase I 阻害剤を用いて以下の特徴を有する独自の ADC 技術を樹立した。

- ✓ 物性が良好で、血中で安定
- ✓ 薬物分布が均一で高い薬物結合数
- ✓ 既存技術より安全で高活性な広い治療域
- ✓ 複数抗体に適用可能な高い汎用性

➤ 抗 HER2 ADC DS-8201a は臨床において、

- ✓ T-DM1 非感受性腫瘍
- ✓ 既存の抗 HER2 治療の適用外である HER2 低発現腫瘍
- ✓ HER2 発現が不均一な腫瘍

に対し強い抗腫瘍活性を示す可能性が示唆され、T-DM1 と差別化可能な治療薬になりうる。

謝辭

参考文献

- [1] R.V. Chari, M.L. Miller, W.C. Widdison, Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy, *Angew Chem Int Ed Engl* 53 (2014) 3796-3827.
- [2] A.K. Gopal, R. Ramchandren, O.A. O'Connor, R.B. Berryman, R.H. Advani, R. Chen, S.E. Smith, M. Cooper, A. Rothe, J.V. Matous, L.E. Grove, J. Zain, Safety and efficacy of brentuximab vedotin for Hodgkin lymphoma recurring after allogeneic stem cell transplantation, *Blood* 120 (2012) 560-568.
- [3] A. Younes, A.K. Gopal, S.E. Smith, S.M. Ansell, J.D. Rosenblatt, K.J. Savage, R. Ramchandren, N.L. Bartlett, B.D. Cheson, S. de Vos, A. Forero-Torres, C.H. Moskowitz, J.M. Connors, A. Engert, E.K. Larsen, D.A. Kennedy, E.L. Sievers, R. Chen, Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma, *J Clin Oncol* 30 (2012) 2183-2189.
- [4] M. Ogura, K. Tobinai, K. Hatake, K. Ishizawa, N. Uike, T. Uchida, T. Suzuki, T. Aoki, T. Watanabe, D. Maruyama, M. Yokoyama, T. Takubo, H. Kagehara, T. Matsushima, Phase I / II study of brentuximab vedotin in Japanese patients with relapsed or refractory CD30-positive Hodgkin's lymphoma or systemic anaplastic large-cell lymphoma, *Cancer Sci* 105 (2014) 840-846.
- [5] H.A. Burris, 3rd, H.S. Rugo, S.J. Vukelja, C.L. Vogel, R.A. Borson, S. Limentani, E. Tan-Chiu, I.E. Krop, R.A. Michaelson, S. Girish, L. Amler, M. Zheng, Y.W. Chu, B. Klenske, J.A. O'Shaughnessy, Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy, *J Clin Oncol* 29 (2011) 398-405.
- [6] S. Verma, D. Miles, L. Gianni, I.E. Krop, M. Welslau, J. Baselga, M. Pegram, D.Y. Oh, V. Dieras, E. Guardino, L. Fang, M.W. Lu, S. Olsen, K. Blackwell, Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer, *N Engl J Med* 367 (2012) 1783-1791.
- [7] I.E. Krop, S.B. Kim, A. Gonzalez-Martin, P.M. LoRusso, J.M. Ferrero, M. Smitt, R. Yu, A.C. Leung, H. Wildiers, Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's

- choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial, *Lancet Oncol* 15 (2014) 689-699.
- [8] G.S. Hamilton, Antibody-drug conjugates for cancer therapy: The technological and regulatory challenges of developing drug-biologic hybrids, *Biologicals* 43 (2015) 318-332.
- [9] P.F. Bross, J. Beitz, G. Chen, X.H. Chen, E. Duffy, L. Kieffer, S. Roy, R. Sridhara, A. Rahman, G. Williams, R. Pazdur, Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia, *Clin Cancer Res* 7 (2001) 1490-1496.
- [10] S.H. Petersdorf, K.J. Kopecky, M. Slovak, C. Willman, T. Nevill, J. Brandwein, R.A. Larson, H.P. Erba, P.J. Stiff, R.K. Stuart, R.B. Walter, M.S. Tallman, L. Stenke, F.R. Appelbaum, A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia, *Blood* 121 (2013) 4854-4860.
- [11] M.J. Hinrichs, R. Dixit, Antibody Drug Conjugates: Nonclinical Safety Considerations, *AAPS J* 17 (2015) 1055-1064.
- [12] I.E. Krop, M. Beeram, S. Modi, S.F. Jones, S.N. Holden, W. Yu, S. Girish, J. Tibbitts, J.H. Yi, M.X. Sliwkowski, F. Jacobson, S.G. Lutzker, H.A. Burris, Phase I study of trastuzumab-DM1, an HER2 antibody-drug conjugate, given every 3 weeks to patients with HER2-positive metastatic breast cancer, *J Clin Oncol* 28 (2010) 2698-2704.
- [13] K.A. Poon, K. Flagella, J. Beyer, J. Tibbitts, S. Kaur, O. Saad, J.H. Yi, S. Girish, N. Dybdal, T. Reynolds, Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DM1): mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability, *Toxicol Appl Pharmacol* 273 (2013) 298-313.
- [14] K.J. Hamblett, P.D. Senter, D.F. Chace, M.M. Sun, J. Lenox, C.G. Cerveny, K.M. Kissler, S.X. Bernhardt, A.K. Kopcha, R.F. Zabinski, D.L. Meyer, J.A. Francisco, Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate, *Clin Cancer Res* 10 (2004) 7063-7070.
- [15] C. Peters, S. Brown, Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics, *Biosci Rep* 35 (2015).
- [16] S. Stintzing, Management of colorectal cancer, *F1000Prime Rep* 6 (2014) 108.

- [17] K. Sudo, Y. Yamada, Advancing pharmacological treatment options for advanced gastric cancer, *Expert Opin Pharmacother* 16 (2015) 2293-2305.
- [18] G.Y. Ku, D.H. Ilson, Chemotherapeutic options for gastroesophageal junction tumors, *Semin Radiat Oncol* 23 (2013) 24-30.
- [19] A. Kim, Y. Ueda, T. Naka, T. Enomoto, Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer, *J Exp Clin Cancer Res* 31 (2012) 14.
- [20] G.P. Kalemkerian, Advances in pharmacotherapy of small cell lung cancer, *Expert Opin Pharmacother* 15 (2014) 2385-2396.
- [21] Y. Pommier, Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond, *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 789-802.
- [22] I. Mitsui, E. Kumazawa, Y. Hirota, M. Aonuma, M. Sugimori, S. Ohsuki, K. Uoto, A. Ejima, H. Terasawa, K. Sato, A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors in vitro and in vivo, *Jpn J Cancer Res* 86 (1995) 776-782.
- [23] E. Kumazawa, T. Jimbo, Y. Ochi, A. Tohgo, Potent and broad antitumor effects of DX-8951f, a water-soluble camptothecin derivative, against various human tumors xenografted in nude mice, *Cancer Chemother Pharmacol* 42 (1998) 210-220.
- [24] G.K. Abou-Alfa, R. Letourneau, G. Harker, M. Modiano, H. Hurwitz, N.S. Tchekmedyian, K. Feit, J. Ackerman, R.L. De Jager, S.G. Eckhardt, E.M. O'Reilly, Randomized phase III study of exatecan and gemcitabine compared with gemcitabine alone in untreated advanced pancreatic cancer, *J Clin Oncol* 24 (2006) 4441-4447.
- [25] Y. Shiose, Y. Ochi, H. Kuga, F. Yamashita, M. Hashida, Relationship between drug release of DE-310, macromolecular prodrug of DX-8951f, and cathepsins activity in several tumors, *Biol Pharm Bull* 30 (2007) 2365-2370.
- [26] G.D. Lewis, I. Figari, B. Fendly, W.L. Wong, P. Carter, C. Gorman, H.M. Shepard, Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies, *Cancer Immunol Immunother* 37 (1993) 255-263.
- [27] R.A. Clynes, T.L. Towers, L.G. Presta, J.V. Ravetch, Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets, *Nat Med* 6 (2000) 443-446.
- [28] F.M. Yakes, W. Chinratanalab, C.A. Ritter, W. King, S. Seelig, C.L. Arteaga, Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for

- antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action, *Cancer Res* 62 (2002) 4132-4141.
- [29] T.T. Junttila, G. Li, K. Parsons, G.L. Phillips, M.X. Sliwkowski, Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer, *Breast Cancer Res Treat* 128 (2011) 347-356.
- [30] Z. Xiao, Z. Chen, A.H. Gunasekera, T.J. Sowin, S.H. Rosenberg, S. Fesik, H. Zhang, Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents, *J Biol Chem* 278 (2003) 21767-21773.
- [31] T. Furuta, H. Takemura, Z.Y. Liao, G.J. Aune, C. Redon, O.A. Sedelnikova, D.R. Pilch, E.P. Rogakou, A. Celeste, H.T. Chen, A. Nussenzweig, M.I. Aladjem, W.M. Bonner, Y. Pommier, Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes, *J Biol Chem* 278 (2003) 20303-20312.
- [32] S.H. Kaufmann, S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N.E. Davidson, G.G. Poirier, Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res* 53 (1993) 3976-3985.
- [33] L. Coussens, T.L. Yang-Feng, Y.C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P.H. Seeburg, T.A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke, et al., Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene, *Science* 230 (1985) 1132-1139.
- [34] M. Yan, B.A. Parker, R. Schwab, R. Kurzrock, HER2 aberrations in cancer: implications for therapy, *Cancer Treat Rev* 40 (2014) 770-780.
- [35] M. Yan, M. Schwaederle, D. Arguello, S.Z. Millis, Z. Gatalica, R. Kurzrock, HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients, *Cancer Metastasis Rev* 34 (2015) 157-164.
- [36] D.J. Slamon, G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, W.L. McGuire, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science* 235 (1987) 177-182.
- [37] D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin,

- S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, et al., Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science* 244 (1989) 707-712.
- [38] D.J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, L. Norton, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2, *N Engl J Med* 344 (2001) 783-792.
- [39] Y.J. Bang, E. Van Cutsem, A. Feyereislova, H.C. Chung, L. Shen, A. Sawaki, F. Lordick, A. Ohtsu, Y. Omuro, T. Satoh, G. Aprile, E. Kulikov, J. Hill, M. Lehle, J. Ruschoff, Y.K. Kang, Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial, *Lancet* 376 (2010) 687-697.
- [40] C.E. Geyer, J. Forster, D. Lindquist, S. Chan, C.G. Romieu, T. Pienkowski, A. Jagiello-Gruszfeld, J. Crown, A. Chan, B. Kaufman, D. Skarlos, M. Campone, N. Davidson, M. Berger, C. Oliva, S.D. Rubin, S. Stein, D. Cameron, Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer, *N Engl J Med* 355 (2006) 2733-2743.
- [41] J. Baselga, J. Cortes, S.B. Kim, S.A. Im, R. Hegg, Y.H. Im, L. Roman, J.L. Pedrini, T. Pienkowski, A. Knott, E. Clark, M.C. Benyunes, G. Ross, S.M. Swain, Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer, *N Engl J Med* 366 (2012) 109-119.
- [42] G.D. Lewis Phillips, G. Li, D.L. Dugger, L.M. Crocker, K.L. Parsons, E. Mai, W.A. Blattler, J.M. Lambert, R.V. Chari, R.J. Lutz, W.L. Wong, F.S. Jacobson, H. Koeppen, R.H. Schwall, S.R. Kenkare-Mitra, S.D. Spencer, M.X. Sliwkowski, Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate, *Cancer Res* 68 (2008) 9280-9290.
- [43] Y.V. Kovtun, C.A. Audette, Y. Ye, H. Xie, M.F. Ruberti, S.J. Phinney, B.A. Leece, T. Chittenden, W.A. Blattler, V.S. Goldmacher, Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen, *Cancer Res* 66 (2006) 3214-3221.
- [44] S. Golfier, C. Kopitz, A. Kahnert, I. Heisler, C.A. Schatz, B. Stelte-Ludwig, A.

- Mayer-Bartschmid, K. Unterschemmann, S. Bruder, L. Linden, A. Harrenga, P. Hauff, F.D. Scholle, B. Muller-Tiemann, B. Kreft, K. Ziegelbauer, Anetumab ravtansine: a novel mesothelin-targeting antibody-drug conjugate cures tumors with heterogeneous target expression favored by bystander effect, *Mol Cancer Ther* 13 (2014) 1537-1548.
- [45] M.M. van der Lee, P.G. Groothuis, R. Ubink, M.A. van der Vleuten, T.A. van Achterberg, E.M. Loosveld, D. Damming, D.C. Jacobs, M. Rouwette, D.F. Egging, D. van den Dobbelen, P.H. Beusker, P. Goedings, G.F. Verheijden, J.M. Lemmens, M. Timmers, W.H. Dokter, The Preclinical Profile of the Duocarmycin-Based HER2-Targeting ADC SYD985 Predicts for Clinical Benefit in Low HER2-Expressing Breast Cancers, *Mol Cancer Ther* 14 (2015) 692-703.
- [46] J.Y. Li, S.R. Perry, V. Muniz-Medina, X. Wang, L.K. Wetzel, M.C. Rebelatto, M.J. Hinrichs, B.Z. Bezabeh, R.L. Fleming, N. Dimasi, H. Feng, D. Toader, A.Q. Yuan, L. Xu, J. Lin, C. Gao, H. Wu, R. Dixit, J.K. Osbourn, S.R. Coats, A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy, *Cancer Cell* 29 (2016) 117-129.
- [47] X. Sun, W. Widdison, M. Mayo, S. Wilhelm, B. Leece, R. Chari, R. Singh, H. Erickson, Design of antibody-maytansinoid conjugates allows for efficient detoxification via liver metabolism, *Bioconjug Chem* 22 (2011) 728-735.
- [48] H.K. Erickson, G.D. Lewis Phillips, D.D. Leipold, C.A. Provenzano, E. Mai, H.A. Johnson, B. Gunter, C.A. Audette, M. Gupta, J. Pinkas, J. Tibbitts, The effect of different linkers on target cell catabolism and pharmacokinetics/pharmacodynamics of trastuzumab maytansinoid conjugates, *Mol Cancer Ther* 11 (2012) 1133-1142.
- [49] Y.V. Kovtun, C.A. Audette, M.F. Mayo, G.E. Jones, H. Doherty, E.K. Maloney, H.K. Erickson, X. Sun, S. Wilhelm, O. Ab, K.C. Lai, W.C. Widdison, B. Kellogg, H. Johnson, J. Pinkas, R.J. Lutz, R. Singh, V.S. Goldmacher, R.V. Chari, Antibody-maytansinoid conjugates designed to bypass multidrug resistance, *Cancer Res* 70 (2010) 2528-2537.
- [50] A. Nagase-Zembutsu, K. Hirotsu, M. Yamato, J. Yamaguchi, T. Takata, M. Yoshida, K. Fukuchi, M. Yazawa, S. Takahashi, T. Agatsuma, Development of DS-5573a: A

- novel afucosylated mAb directed at B7-H3 with potent antitumor activity, *Cancer Sci* 107 (2016) 674-681.
- [51] J.A. Francisco, C.G. Cervený, D.L. Meyer, B.J. Mixan, K. Klussman, D.F. Chace, S.X. Rejniak, K.A. Gordon, R. DeBlanc, B.E. Toki, C.L. Law, S.O. Doronina, C.B. Siegall, P.D. Senter, A.F. Wahl, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity, *Blood* 102 (2003) 1458-1465.
- [52] A. Younes, N.L. Bartlett, J.P. Leonard, D.A. Kennedy, C.M. Lynch, E.L. Sievers, A. Forero-Torres, Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas, *N Engl J Med* 363 (2010) 1812-1821.
- [53] P.R. Hamann, L.M. Hinman, C.F. Beyer, D. Lindh, J. Upešlaciš, D.A. Flowers, I. Bernstein, An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker, *Bioconjug Chem* 13 (2002) 40-46.
- [54] E. Oflazoglu, I.J. Stone, K. Gordon, C.G. Wood, E.A. Repasky, I.S. Grewal, C.L. Law, H.P. Gerber, Potent anticarcinoma activity of the humanized anti-CD70 antibody h1F6 conjugated to the tubulin inhibitor auristatin via an uncleavable linker, *Clin Cancer Res* 14 (2008) 6171-6180.
- [55] A.I. Chapoval, J. Ni, J.S. Lau, R.A. Wilcox, D.B. Flies, D. Liu, H. Dong, G.L. Sica, G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production, *Nat Immunol* 2 (2001) 269-274.
- [56] Y. Sun, Y. Wang, J. Zhao, M. Gu, R. Giscombe, A.K. Lefvert, X. Wang, B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer, *Lung Cancer* 53 (2006) 143-151.
- [57] T.J. Roth, Y. Sheinin, C.M. Lohse, S.M. Kuntz, X. Frigola, B.A. Inman, A.E. Krambeck, M.E. McKenney, R.J. Karnes, M.L. Blute, J.C. Cheville, T.J. Sebo, E.D. Kwon, B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy, *Cancer Res* 67 (2007) 7893-7900.
- [58] J. Sun, L.J. Chen, G.B. Zhang, J.T. Jiang, M. Zhu, Y. Tan, H.T. Wang, B.F. Lu, X.G. Zhang, Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma, *Cancer Immunol Immunother* 59 (2010) 1163-1171.
- [59] T. Fojo, M. Menefee, Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents, *Ann Oncol* 18 Suppl 5 (2007) v3-8.
- [60] K. Takara, T. Sakaeda, K. Okumura, An update on overcoming MDR1-mediated

- multidrug resistance in cancer chemotherapy, *Curr Pharm Des* 12 (2006) 273-286.
- [61] F.a.D. Administration, Kadclya Biologic License Application (125427Orig1s000), Pharmacology review (2013).
- [62] M. Barok, H. Joensuu, J. Isola, Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance, *Breast Cancer Res* 16 (2014) 209.
- [63] F. Loganzo, X. Tan, M. Sung, G. Jin, J.S. Myers, E. Melamud, F. Wang, V. Diesl, M.T. Follettie, S. Musto, M.H. Lam, W. Hu, M.B. Charati, K. Khandke, K.S. Kim, M. Cinque, J. Lucas, E. Graziani, A. Maderna, C.J. O'Donnell, K.T. Arndt, H.P. Gerber, Tumor cells chronically treated with a trastuzumab-maytansinoid antibody-drug conjugate develop varied resistance mechanisms but respond to alternate treatments, *Mol Cancer Ther* 14 (2015) 952-963.
- [64] G. Li, C. Fields, K. Parsons, J. Guo, G.L. Phillips, Trastuzumab-DM1: Mechanisms of Action and Mechanisms of Resistance, AACR meeting Abstract No. 223 (2010).
- [65] H.E. Lee, K.U. Park, S.B. Yoo, S.K. Nam, J. Park do, H.H. Kim, H.S. Lee, Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity in gastric cancer, *Eur J Cancer* 49 (2013) 1448-1457.
- [66] G.C. Bethune, J.B. Mullen, M.C. Chang, Detecting intratumoral heterogeneity in routine breast-HER2 testing: low yield of testing multiple blocks, *Ann Diagn Pathol* 19 (2015) 385-390.
- [67] T.M. Cardillo, S.V. Govindan, R.M. Sharkey, P. Trisal, D.M. Goldenberg, Humanized anti-Trop-2 IgG-SN-38 conjugate for effective treatment of diverse epithelial cancers: preclinical studies in human cancer xenograft models and monkeys, *Clin Cancer Res* 17 (2011) 3157-3169.
- [68] A.N. Starodub, A.J. Ocean, M.A. Shah, M.J. Guarino, V.J. Picozzi, Jr., L.T. Vahdat, S.S. Thomas, S.V. Govindan, P.P. Maliakal, W.A. Wegener, S.A. Hamburger, R.M. Sharkey, D.M. Goldenberg, First-in-Human Trial of a Novel Anti-Trop-2 Antibody-SN-38 Conjugate, Sacituzumab Govitecan, for the Treatment of Diverse Metastatic Solid Tumors, *Clin Cancer Res* 21 (2015) 3870-3878.
- [69] M. Niedergethmann, B. Wostbrock, J.W. Sturm, F. Willeke, S. Post, R. Hildenbrand, Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma, *Pancreas* 29 (2004) 204-211.

- [70] N. Aggarwal, B.F. Sloane, Cathepsin B: multiple roles in cancer, *Proteomics Clin Appl* 8 (2014) 427-437.
- [71] M.S. Kung Sutherland, R.B. Walter, S.C. Jeffrey, P.J. Burke, C. Yu, H. Kostner, I. Stone, M.C. Ryan, D. Sussman, R.P. Lyon, W. Zeng, K.H. Harrington, K. Klussman, L. Westendorf, D. Meyer, I.D. Bernstein, P.D. Senter, D.R. Benjamin, J.G. Drachman, J.A. McEarchern, SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML, *Blood* 122 (2013) 1455-1463.
- [72] S.C. Jeffrey, P.J. Burke, R.P. Lyon, D.W. Meyer, D. Sussman, M. Anderson, J.H. Hunter, C.I. Leiske, J.B. Miyamoto, N.D. Nicholas, N.M. Okeley, R.J. Sanderson, I.J. Stone, W. Zeng, S.J. Gregson, L. Masterson, A.C. Tiberghien, P.W. Howard, D.E. Thurston, C.L. Law, P.D. Senter, A potent anti-CD70 antibody-drug conjugate combining a dimeric pyrrolobenzodiazepine drug with site-specific conjugation technology, *Bioconjug Chem* 24 (2013) 1256-1263.
- [73] H.P. Gerber, P. Sapra, F. Loganzo, C. May, Combining antibody-drug conjugates and immune-mediated cancer therapy: What to expect?, *Biochem Pharmacol* 102 (2016) 1-6.
- [74] P. Muller, M. Kreuzaler, T. Khan, D.S. Thommen, K. Martin, K. Glatz, S. Savic, N. Harbeck, U. Nitz, O. Gluz, M. von Bergwelt-Baildon, H. Kreipe, S. Reddy, M. Christgen, A. Zippelius, Trastuzumab emtansine (T-DM1) renders HER2+ breast cancer highly susceptible to CTLA-4/PD-1 blockade, *Sci Transl Med* 7 (2015) 315ra188.