

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論 文 内 容 の 概 要

博 士 論 文 題 名

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

学位申請者 扇 谷 祐 輔

➤ 主論文リスト

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. 2016. 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, in press*.

Yusuke Ogitani, Katsunobu Hagihara, Masataka Oitate, Hiroyuki Naito and Toshinori Agatsuma. 2016. 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, in press*.

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. 2016. Wide application of a novel topoisomerase I inhibitor-based drug conjugation technology. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, submitted*.

➤ 参考論文リスト

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*.

Norihisa Mikami, Kaori Sueda, Yusuke Ogitani, Ippei Otani, Miku Takatsuji, Yasuko Wada, Keiko Watanabe, Rintaro Yoshikawa, Satoshi Nishioka, Nagisa Hashimoto, Yayoi Miyagi, Soichiro Fukada, Hiroshi Yamamoto, Kazutake Tsujikawa. 2014. Calcitonin Gene-Related Peptide Regulates Type IV Hypersensitivity through Dendritic Cell Functions. *PLoS One. 2014 Jan 21;9(1) e86367*.

Norihisa Mikami, Hiroaki Matsushita, Tetsuya Kato, Rumi Kawasaki, Taichi Sawazaki, Taeko Kishimoto, Yusuke Ogitani, Keiko Watanabe, Yayoi Miyagi, Kaori Sueda, So-ichiro Fukada, Hiroshi Yamamoto and Kazutake Tsujikawa. 2011. Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell functions. *Journal of Immunology. 2011 Jun 15;186(12):6886-93*.

Kazutake Tsujikawa, Katsutoshi Yayama, Tamon Hayashi, Hiroaki Matsushita, Taijiro Yamaguchi, Tomomi Shigeno, Yusuke Ogitani, Megumi Hirayama, Tetsuya Kato, So-ichiro Fukada, Shingo Takatori, Hiromu Kawasaki, Hiroshi Okamoto, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, and Hiroshi Yamamoto. 2007. Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007 Oct 16;104(42):16702-7*.

➤ 背景

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發揮するというものである。現在 2 品目の ADC が上市されている。抗 CD30 抗体に 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 2011 年に承認され、また、抗 HER2 抗体である trastuzumab 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。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 (平均薬物結合数 : DAR 3-4)、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。

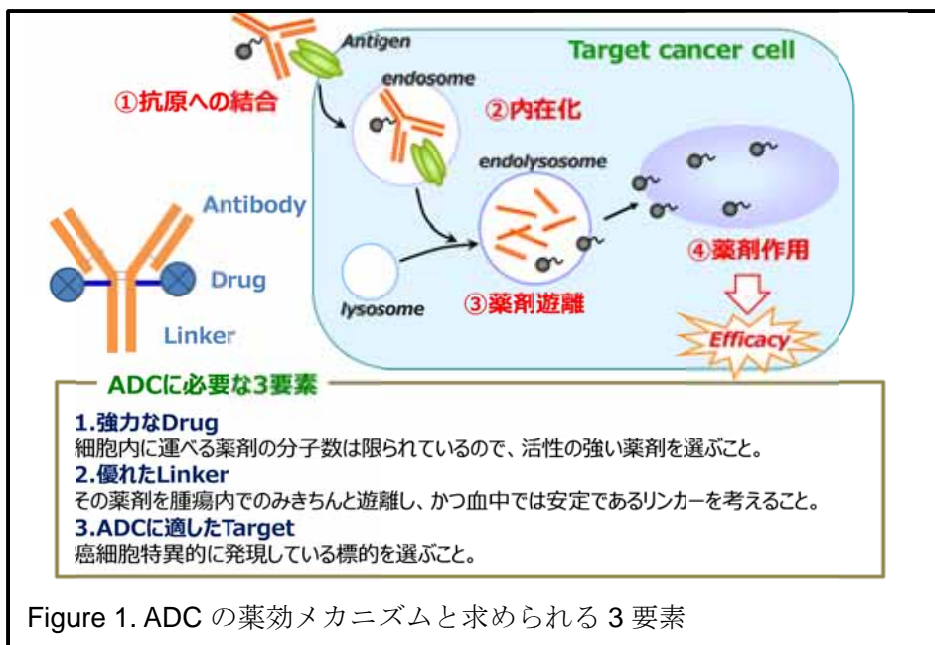


Figure 1. ADC の薬効メカニズムと求められる 3 要素

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。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、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 Figure 2 に示す通り既存の 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、高い薬物結合数（DAR）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。

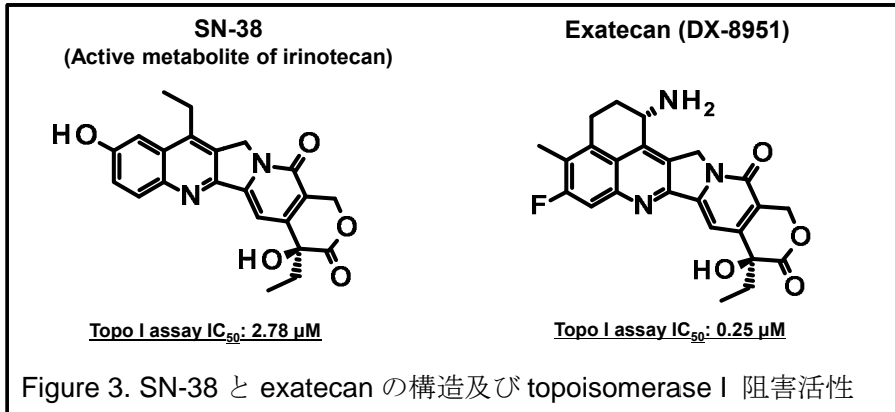
- **Limited payload type**
 - ✓ Tubulin重合阻害剤を用いたADCが大多数
 - ✓ 既存ADCに耐性化した腫瘍に対する治療法が無い
 - ✓ 薬剤排出ポンプMDR1発現によるtubulin-ADCの耐性化
- **Linker instability**
 - ✓ 血中薬物遊離による毒性発現
 - ✓ 血中ADC濃度低下による有効性低下
- **Limited drug loading number**
 - ✓ 平均薬物結合数（DAR）の限度が4個程度（凝集化、PK悪化）
 - ✓ 有効性の限界
- **Heterogeneity of drug distribution**
 - ✓ 薬物結合数の異なるADCの混合物
 - ✓ ロット間差、製剤規格化の懸念

Figure 2. 既存 ADC 技術の現状の課題

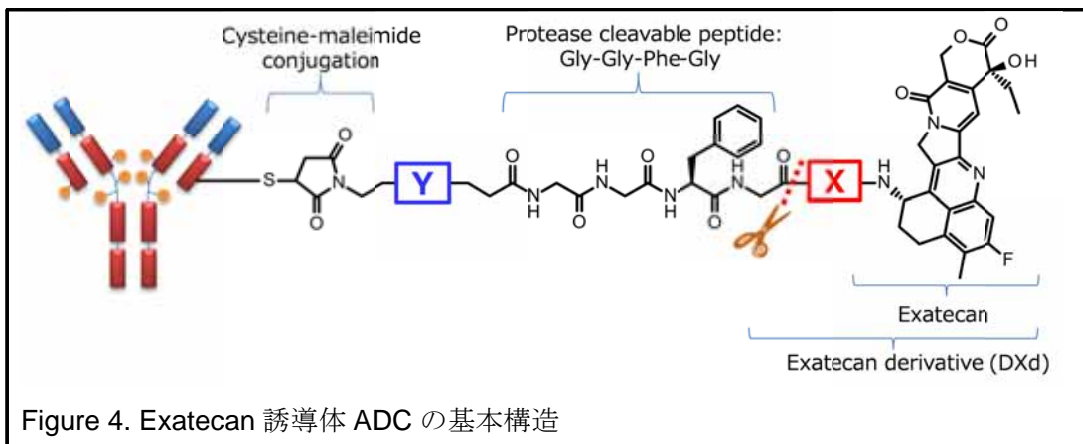
➤ Topoisomerase I 阻害剤を用いた ADC 技術の確立

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、胃癌など幅広い癌腫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。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 (Fig. 3)、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。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、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。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。



複数のリンカー構造を検討し、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 と抗体を鎖間システイン残基を介して結合させた ADC を基本構造とした。この ADC は HER2 陽性 KPL-4 細胞に対し 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。Figure 4 の X 及び Y 部分に複数のスペーサーを挿入し、凝集体含有率の低減を目的に研究を進めた。その中で構造を Figure 5 に示す高 DAR でありながら低凝集性である anti-HER2 DXd(1) (後に DS-8201a と命名) を見出した。この ADC は薬物結合数がおよそ 8 であり、結合薬物分布も DAR8 の画分がほぼ全てを占める均一性の非常に高い ADC であることが確認された。



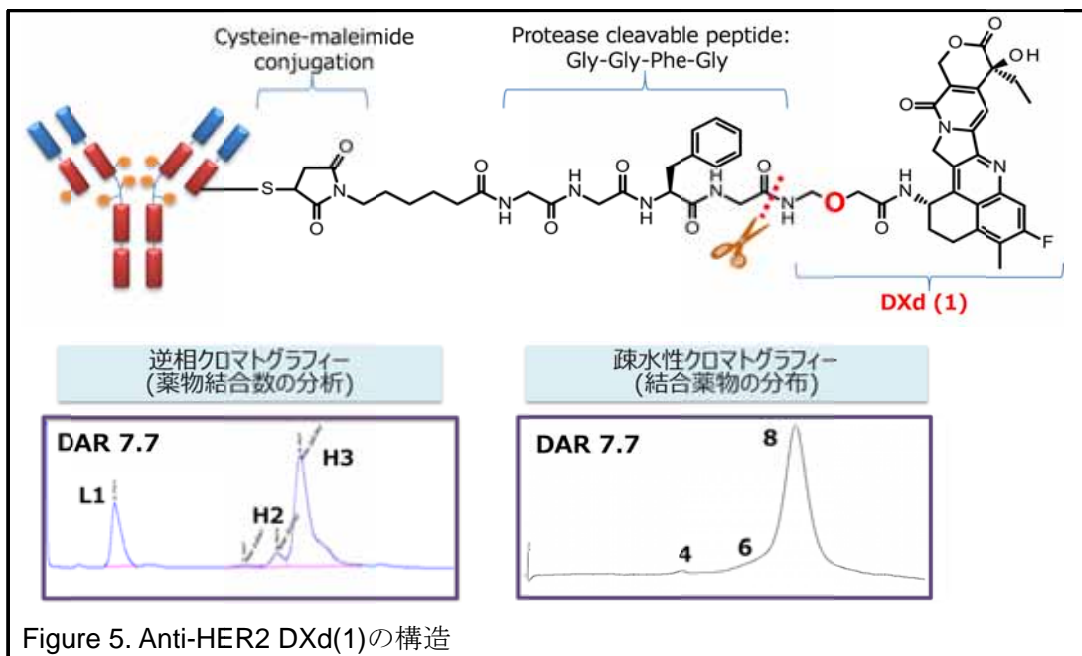


Figure 5. Anti-HER2 DXd(1)の構造

この anti-HER2 DXD(1)の有効性を評価したところ、*in vitro*において HER2 発現に依存した強い細胞障害活性を示し、また *in vivo*においても薬物結合に起因する腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍活性を示した。メカニズム解析においても薬物結合による抗体由来の活性、HER2 への結合性の減弱は認められなかった。

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。DAR8 である anti-HER2 DXd(1)の薬物動態を評価し、既存 ADC との優位性について検討したところ、ADC 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、この ADC 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 (Fig. 6)。それに関連して遊離薬物 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。

また安全性に関する評価を、SD ラット及びカニクイザルを用いて行ったところ、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は 30 mg/kg と判断され、既存 ADC の安全性と比較しても同等、もしくはそれ以上の安全性プロファイルを有することが明らかとなった。

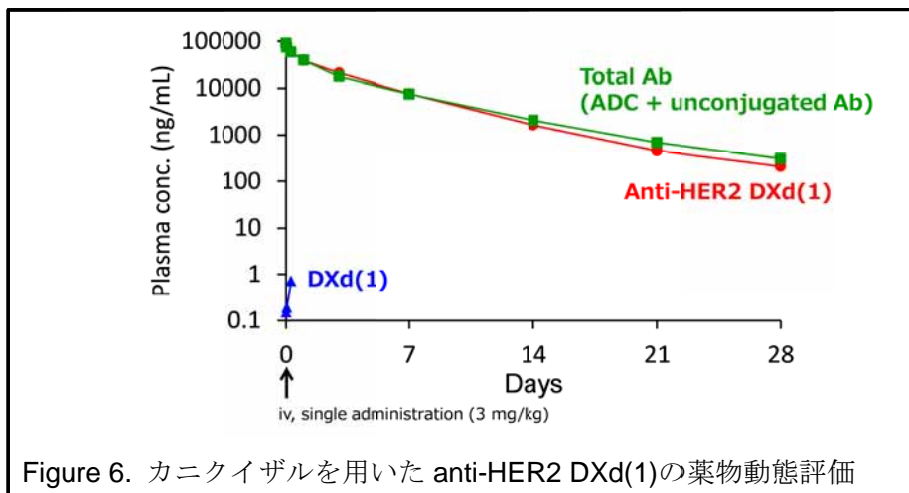


Figure 6. カニクイザルを用いた anti-HER2 DXd(1)の薬物動態評価

以上より、我々はこの anti-HER2 DXd(1)が既存 ADC 技術の課題（血中安定性、DAR の制限、不均一性）を全て克服した高活性で安全性高いADCであると判断し、臨床開発候補品 DS-8201a と命名し先の研究に進めた。

➤ DS-8201a と T-DM1 の差別化

抗 HER2 治療薬の中で、T-DM1 は trastuzumab にチューブリン重合阻害剤 DM1 を結合させた ADC であり DS-8201a の競合品である。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た。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。

DS-8201a 及び T-DM1 の in vivo 抗腫瘍活性、13 種の癌細胞株由来担癌マウスモデル及び 21 種の癌患者由来の腫瘍を移植した担癌マウスモデルを用いて評価したところ、Figure 7 に示すように全 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 は多様な癌腫及び IHC 0 から 3+の広い HER2 発現レベルのモデルに対して抗腫瘍活性を示した一方で、T-DM1 は HER2 3+の強陽性モデルに対して有効であった。また、DS-8201a は IHC3+の HER2 強陽性で T-DM1 が無効であるモデルに対して

も有効性を示したことから、結合薬物の作用機作の違いによる抗腫瘍活性が示唆された。DS-8201a の HER2 低発現腫瘍に対する有効性についても、DAR がおよそ 4 である ADC を用いた評価から、高 DAR に起因するものであることが示された。以上より T-DM1 との構造的な違い（薬物の作用機作、DAR）が T-DM1 が無効な癌及び HER2 低発現腫瘍に対する効果を支持し、Figure 7 のような明確な有効性の差を見出したものと推察された。

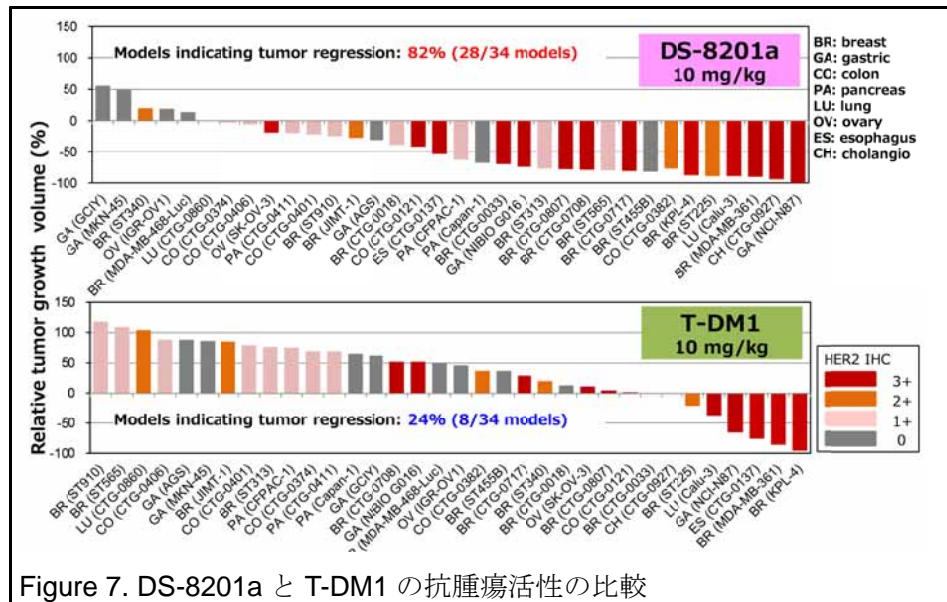


Figure 7. DS-8201a と T-DM1 の抗腫瘍活性の比較

➤ DS-8201a の bystander 効果

近年「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。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。

DS-8201a の遊離薬物 DXd(1)は T-DM1 の遊離薬物 Lys-SMCC-DM1 と比較して膜透過性が高く、細胞障害活性も 7 倍ほど高かった。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、低膜透過性である薬物 DXd(2)を遊離する ADC である anti-HER2 DXd(2)を評価に加えた (Fig. 8)。

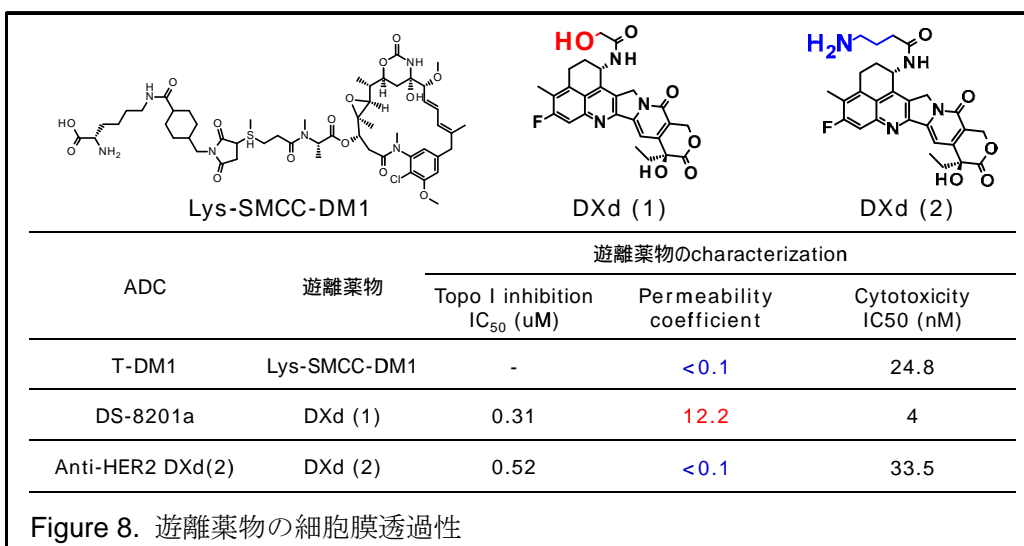


Figure 8. 遊離薬物の細胞膜透過性

DS-8201a の bystander 効果を検証するために、HER2 陽性 KPL-4 細胞と陰性 MDA-MB-468 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。共培養系に各 ADC を添加した 5 日目の各細胞の数と割合を求めた。その結果 DS-8201a は HER2 陽性、HER2 陰性両方の細胞に対し殺細胞活性を示したのに対し、膜透過性の悪い薬物を遊離する ADC である anti-HER2 DXd(2)及び T-DM1 は HER2 陽性細胞選択的に殺細胞活性を示した (Fig. 9)。すなわち DS-8201a の高い bystander 効果が in vitro において示唆された。

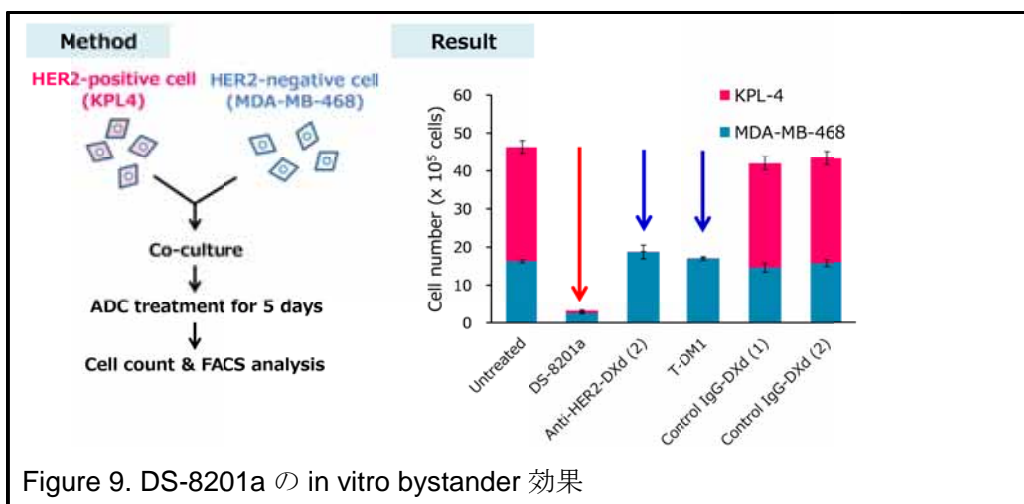


Figure 9. DS-8201a の in vitro bystander 効果

次に 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系を樹立した。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。この両細胞を共移植したマウスに対し各 ADC を投与し、経時的に Luciferase シ

グナルを測定した。その結果 DS-8201a 投与により Luciferase シグナルの明確な減弱、すなわち Luc 遺伝子を導入した HER2 陰性 MDA-MB-468-Luc 細胞の消失が認められた (Fig. 10)。

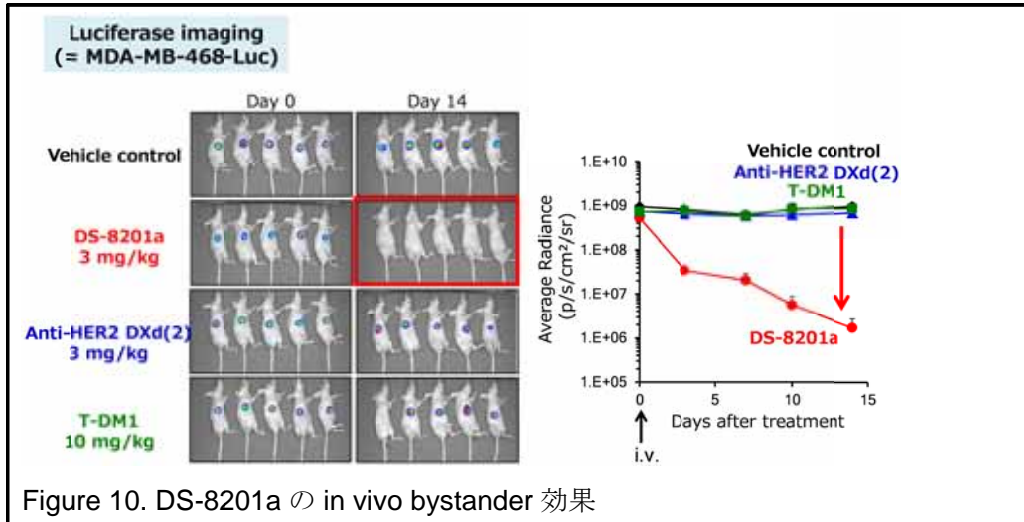


Figure 10. DS-8201a の in vivo bystander 効果

このように in vivo においても DS-8201a の強い bystander 効果が観察され、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。

➤ 総括

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

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。

➤ 結論

現状の課題を克服した新規 ADC 技術を、DNA topoisomerase I 阻害剤を用いて確立し、画期的かつ既存薬と差別化可能な抗 HER2-ADC 薬、「DS-8201a」の創出に成功した。