トポイソメラーゼ I 阻害剤を搭載した新規 ADC 技術開発

我妻利紀[†]

Development of New ADC Technology with Topoisomerase I Inhibitor

Toshinori Agatsuma[†]*Biologics Pharmacology Research Laboratories, R&D Division, Daiichi Sankyo Co., Ltd.;
1-2-58 Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710, Japan.*

(Received October 24, 2016)

Antibody–drug conjugates (ADCs) selectively deliver large amounts of antitumor drugs to tumor tissue and show significant antitumor effects with a wide therapeutic window. We developed a new linker–drug technology platform with an exatecan derivative, which is a highly potent topoisomerase I inhibitor. The major advantages of the technology are: 1) high and homogeneous drug-to-antibody ratio (DAR) availability; 2) potent antitumor activity in conjunction with bystander killing; 3) few safety concerns because of the stable linker limiting release of free drug; and 4) a wide application to therapeutic antibodies. Using this linker–drug technology, we generated an anti-HER2 ADC, namely DS-8201a. DS-8201a, in which almost all eight cysteine residues of the antibody are bound to drug, was effective against trastuzumab DM1 (T-DM1)-insensitive patient-derived xenograft (PDX) models with high HER2 expression and also demonstrated antitumor efficacy against several breast cancer PDX models with low HER2 expression. DS-8201a was well tolerated in rats and monkeys following repeated administration. These results suggest that DS-8201a may be efficacious in a broader population of HER2-positive cancer patients and also confirm the importance of this new class of novel topoisomerase I inhibitor-based ADC technology.

Key words—antibody–drug conjugate; DS-8201a; HER2

1. はじめに

抗体医薬品の過去 10 年間の市場への浸透拡大は目覚しく、ブロックバスター医薬品の約半数を占めるに至っている。これらは、基本的にキメラ IgG、ヒト化 IgG あるいはヒト IgG などのリコンビナント IgG 抗体であり、現在、同じく IgG 抗体医薬を目指したアプローチとして、新たな標的を狙った新薬の研究開発や、生産技術の改善により安価な提供を可能とするバイオシミラー抗体の開発も活発化している。一方で、従来の IgG 抗体では十分な治療パフォーマンスが示せないケースや、また、さらに強力な治療パフォーマンスへのニーズに対応するものとして、抗体の殺細胞活性を強化した武装化抗体

が次世代型の抗体医薬品として注目されている。アミノ酸改変や糖鎖修飾により抗体依存性細胞障害 (antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 活性を高めた抗体や、CD3 抗体フラグメントを含むバイスペシフィック抗体、さらに、抗がん剤を抗体に結合させた抗体薬物複合体 (antibody–drug conjugate; ADC) などがこれにあたる。これまでがん薬剤治療においては、化学療法とがんの増殖や生存に必須のシグナル経路に係わるリン酸化酵素を標的とした低分子化合物あるいは IgG 抗体などの分子標的薬による治療が中心であったが、これら既存抗がん剤では太刀打ちできないがん患者に対し、優れた有効性を示す武装化抗体が出現している。特に ADC においては、CD30 を標的とした ADC, brentuximomab vedotin (ADECTIS[®])^{1,2)} が 2011 年に、HER2 を標的とした ADC, trastuzumab emtansine (KADCYLA[®])^{3,4)} が 2013 年に上市を果たしていることから、医薬品市場の新たな牽引役となり得る薬剤カテゴリーとして期待されている。

これら ADC の基本的な概念、すなわち、抗がん

第一三共株式会社研究開発本部バイオ創薬研究所
(〒140-8710 東京都品川区広町 1-2-58)

現所属：[†]第一三共株式会社研究開発本部バイオ・癌免疫ラボラトリー (〒140-8710 東京都品川区広町 1-2-58)

e-mail: agatsuma.toshinori.v7@daiichisankyo.co.jp

本総説は、日本薬学会第 136 年会シンポジウム S09 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Structure of Drug-linker

剤を抗体に結合させるという概念は、30年以上前から存在していたものの、目ぼしい臨床での結果がない状態が長く続いていた。ADCに向く適切な薬剤の選択、薬剤の最適化技術、血液中でも安定なリンカーのデザインに加え、抗体取得技術レベルの向上や薬剤送達能の高い抗体を選択する技術の熟成に時間を要したことがその原因と考えられている。筆者らは、将来、これら各要素の更なる改善により、より多くのがんに応用できる新たな薬剤の開発が可能になると考え、この新ADC技術開発をバイオ研究開発戦略における重点研究領域の1つとして位置づけ、自社技術開発に取り組んできた。今回その活動の1つとして、トポイソメラーゼI阻害剤エキサテカン誘導体を用いたADC技術とその実用例について紹介する。

2. トポイソメラーゼI阻害剤を搭載した新規ADC技術の開発とその特徴

臨床試験段階にある有望なADC品目のほとんどはチューブリン阻害剤を搭載したものである。⁵⁾ 筆者らはその不応答患者でも効果が期待できるADCの創製を念頭におき、チューブリン阻害剤とは別の異なる作用機序を有する抗がん化合物の搭載を検討することを計画した。社内化合物ライブラリーの活用、化合物誘導体合成とともに、抗腫瘍薬理、動態、安全性評価の一連の研究プロセスを構築し、様々な候補化合物の中から、リード化合物として、自社にて研究開発実績のある水溶性カンプトテシン誘導体エキサテカン（化学名：(1*S*,9*S*)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-1,2,3,9,12,15-ヘキサヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10*H*,13*H*-ベンゾ[*de*]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-*b*]キノリン-10,13-ジオン)^{6,7)}を選択、その誘導体展開とリンカーの組み合わせセットの最適化を試みた。最適化のポイントは、ADCとしての基本物性（凝集性、薬物結合数など）、薬効、体内動態、及び、安全性の各観点それぞれにおいて

既存技術と同等以上の特性を示すものを実験的に見出すことと定め、最終的に200以上の薬剤リンカーの合成、抗体のシステイン残基を介する抗体複合体を作製し、上記ポイントを踏まえた評価プロセスを展開することで、新規DNAトポイソメラーゼI阻害化合物（化学名：*N*-[(1*S*,9*S*)-9-エチル-5-フルオロ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-1*H*,12*H*-ベンゾ[*de*]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-*b*]キノリン-1-イル]-2-ヒドロキシアセトアミド)とGGFGペプチドスパーサーを含むリンカーからなる薬剤リンカーセットを最適薬剤リンカーとして選択した（Fig. 1）。このDNAトポイソメラーゼI阻害化合物は、イリノテカンの薬効本体であるSN-38や同じく臨床で用いられているトポテカンよりも強力な酵素阻害活性を有し、*in vitro*で種々のがん細胞に対して、より強い殺細胞活性を示すものであるとともに、血液中からのクリアランスが非常に高い性質を持つ。また、リンカーは切断タイプと非切断タイプの双方を比較検討した上で切断タイプを選択、採用したGGFGペプチドスパーサーは、がん細胞内のエンドリゾーム酵素により切断し、薬剤を遊離するようにデザインしているものである。薬剤リンカーの結合様式は、抗体の鎖間システイン残基、あるいは、抗体のリシン残基とを比較の上、鎖間システイン残基への結合を採択した。

本薬剤リンカーは、抗体の4対の鎖間ジスルフィド結合を還元して生成する8個のシステイン残基に

我妻利紀

東北大学大学院薬学科衛生化学教室 博士課程前期修了（1991年）、薬学博士（1998年）、1991年三共（株）入社、MRC CC, UK（1994–1995年）、東京大学医科学研究所感染症研究部（1995–1996年）出向を経て、2013年第一三共（株）バイオ創薬研究所長、2015年よりバイオ・癌免疫ラボラトリー長。

Fig. 2. Characterization of Anti-HER2 ADC (DS-8201a)

(a) Number of conjugated drugs analyzed by reverse phase chromatography, (b) distribution of conjugated drug analyzed by hydrophobic interaction chromatography. Modified from Ref. 8).

チオエーテル結合することにより、平均約 8 個結合させることが可能で、従来技術では困難であった高 DAR ADC を作製することが可能である。ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 型関連がん遺伝子産物 (HER2) を標的とする抗 HER2 ADC 体である DS-8201a の事例を Fig. 2 に示す。

また、サルにおける単回投与時の ADC 体、総抗体 (ADC+遊離抗体)、遊離薬剤の血漿中濃度の推移を Fig. 3 に示すが、その ADC 体は総抗体と同程度の生体内安定性を示しており、安定性が極めて高く、遊離薬剤の血漿中レベルも低く抑えられていた。

3. 抗 HER2 ADC (DS-8201a) の前臨床薬理研究

抗 HER2 抗体であるトラスツズマブは、HER2 の細胞外ドメイン IV に特異的に結合し、ADCC の誘導や HER2 からのシグナル伝達阻害を介して抗がん効果を発揮する。^{5,6)} トラスツズマブは HER2 を過剰発現した腫瘍に対して高い効果を示すことから、⁷⁾ HER2 を過剰発現している転移性乳がん患者での治療薬として、米国で 1999 年、わが国において 2001 年に上市された。乳がんにおけるトラスツズマブの治療効果は十分に証明されている一方、いまだトラスツズマブが薬効を示さない、又は投与初期に薬効を示しても後に耐性化する患者が多数存在する。したがって、トラスツズマブが十分な薬効を示さない HER2 を過剰発現するがん患者のために、トラスツズマブにリンカー構造を介して抗腫瘍性薬物を結合した T-DM1, KADCYLA[®] 2,3) や HER2 の細胞外ドメイン II を標的とし、ヘテロダイマー形成を阻害するよう設計された pertuzumab, PERJETA[®] が開発された。しかしながら、応答性や活性の強さ、並びに適応範囲はいまだ十分ではなく、HER2 を標的とする治療にも多くの未充足ニーズが存在する。

Fig. 3. Pharmacokinetics of DS-8201a in Cynomolgus Monkeys

DS-8201a was intravenously administered to cynomolgus monkeys at the dose of 3 mg/kg ($n=3$). Modified from Ref. 8).

抗 HER2 抗体に筆者らの薬剤リンカーを搭載した HER2 ADC (DS-8201a) は、その HER2 依存的シグナルに対する阻害活性、ADCC 活性ともに非修飾 (親) 抗体と同等であった。また DS-8201a の *in vitro* 抗腫瘍効果を評価したところ、HER2 ADC は、HER2 陰性株 MDA-MB-468 (乳がん) に対しては、殺細胞活性を示さなかった一方、HER2 陽性非修飾抗体応答性株 NCI-N87 (胃がん)、SKBR-3 (乳がん)、HER2 陽性非修飾抗体不応性株 Calu-3 (肺がん)、KPL-4 (乳がん) いずれに対しても顕著な殺細胞活性を示し、陽性株に対して選択的な抗腫瘍活性を示した (Fig. 4)。同様に HER2 陽性がん細胞に対する抗腫瘍効果は、免疫不全マウスにヒト由来がん細胞株を移植して作製したマウスがんモデルのみならずがん患者由来がん組織を移植して作製したマウスがんモデルでも確認された。後者のモデルの事例を Fig. 5 に示す。DS-8201a は T-DM1 に低感受性である、HER2 3+ (現ガイドラインの基

Fig. 4. Inhibitory Activity of Cell Growth in Various Tumor Cell Lines by DS-8201a

The tumor cell lines were cultured with DS-8201a and control IgG-ADC for 6 d. Each point represents the mean and S.D. ($n=3$). Modified from Ref. 8).

Fig. 5. Effect of DS-8201a and T-DM1 on Tumor Growth in Several Patient-derived Xenograft (PDX) Models

(A) Gastric cancer PDX model with HER2 IHC 3+/FISH positive. (B) Breast cancer PDX models with HER2 IHC 1+/FISH negative. Each point represents the mean and S.E. ($n=6$). Modified from Ref. 8).

づく免疫組織染色の HER2 テスト¹⁰⁾にて評価) のモデル, 発現の低い HER2 1+ のモデルのいずれにおいても抗腫瘍効果を示すことが確認され (Fig. 5), T-DM1 低感受性である HER2 陽性がんに対して有効な治療法を提供し得ることが示唆された。

筆者らの ADC 薬剤リンカーは, 細胞に内在化された後, 疎水性の高い薬剤, すなわち高い細胞膜透過性を有する薬剤が遊離する。その遊離薬剤は, 標的発現がん細胞を殺傷するのみならず, その近傍にあるがん細胞にも作用し殺傷する, いわゆる Bystander 効果を発揮する可能性がある。筆者らは,

DS-8201a の Bystander 効果を確認すべく, *in vivo* モデルでその検証を試みた。DS-8201a を HER2 陰性がん細胞株 MDA-MB-468-Luc 単独あるいは HER2 陽性がん細胞株 NCI-N87 と混合して免疫不全マウスに皮下移植し, DS-8201a の HER2 陰性がん細胞の増殖に対する効果をルシフェラーゼ依存的な化学発光を指標に評価した (Fig. 6)。その結果, DS-8201a は HER2 陰性株単独移植群では, HER2 陰性株の増殖を全く阻害しない一方, HER2 陽性株との共移植群では HER2 陰性株の顕著な増殖抑制が確認され, HER2 陽性細胞内に遊離された薬剤が

Fig. 6. Bystander Killing Effect of DS-8201a

Nude mice were s.c. inoculated with a mixture of both NCI-N87 and MDA-MB-468-Luc cells into the right flank, or only MDA-MB-468-Luc into the left flank. Seven days after inoculation, mice were treated with i.v. DS-8201a at 3 mg/kg. Luciferase activity was detected at 14 d after injection with DS-8201a by an *in vivo* imager after i.v. administration of substrate. Modified from Ref. 11).

近傍の HER2 陰性細胞に対して作用する Bystander 効果によって抗腫瘍効果が発揮されていることが強く示唆された。実際の患者さんのがん組織においては、標的抗原の発現は、かならずしも均一ではなく、陽性細胞と陰性細胞の共存組織となっていることもしばしば観察される。ADC の作用発現が、高発現細胞のみに対するものだけではなく、周囲のがん細胞にも誘発し得る性質は、薬理活性上の大きなベネフィットと思われる。DS-8201a は、現在第一相臨床試験を実施中である。

4. おわりに

筆者らの開発した新規 ADC 技術は、抗 HER2 抗体以外にも活用が可能で、高い汎用性があることが各種データから示唆されている。また、抗 HER2 ADC の前臨床評価の結果から、チューブリン阻害剤を搭載した ADC に不応のがんを含む広いスペクトラムで抗腫瘍効果を示すことが示唆されており、ベストインクラス、ファーストインクラスの ADC 薬の創製に寄与する技術として期待される。

謝辞 本稿の研究は第一三共株式会社及び第一三共ノバーレ株式会社において、ADC ワーキンググループ及び DS-8201a 研究プロジェクトチームのメンバーほか、多くの研究者の協力の下実施されたものであります。ここにすべての関係者に深謝申し上げます。

利益相反 我妻利紀は第一三共株式会社の社員である。

REFERENCES

- 1) Senter P. D., Seivers E. L., *Nat. Biotechnol.*, **30**, 631–637 (2012).
- 2) de Claro R. A., McGinn K., Kwitkowski V., Bullock J., Khandelwal A., Habtemariam B., Ouyang Y., Saber H., Lee K., Koti K., Rothmann M., Shapiro M., Borrego F., Clouse K., Chen X. H., Brown J., Akinsanya L., Kane R., Kaminskas E., Farrell A., Pazdur R., *Clin. Cancer Res.*, **18**, 5845–5849 (2012).
- 3) Lewis P. G. D., Li G., Dugger D. L., Crocker L. M., Parsons K. L., Mai E., Blättler W. A., Lambert J. M., Chari R. V., Lutz R. J., Wong W. L., Jacobson F. S., Koeppen H., Schwall R. H., Kenkare-Mitra S. R., Spencer S. D., Sliwkowski M. X., *Cancer Res.*, **68**, 9280–9290 (2008).
- 4) Verma S., Miles D., Gianni L., Krop I. E., Welslau M., Baselga J., Pegram M., Oh D. Y., Diéras V., Guardino E., Fang L., Lu M. W., Olsen S., Blackwell K., EMILIA Study Group, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 1783–1791 (2012).
- 5) Hamilton G. S., *Biologicals*, **43**, 318–332 (2015).
- 6) Kumazawa E., Jimbo T., Ochi Y., Tohgo A., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **42**, 210–220

- (1998).
- 7) Abou-Alfa G. K., Letourneau R., Harker G., Modiano M., Hurwitz H., Tchekmedyian N. S., Feit K., Ackerman J., De Jager R. L., Eckhardt S. G., O'Reilly E. M., *J. Clin. Oncol.*, **24**, 4441–4447 (2006).
- 8) Ogitani Y., Aida T., Hagihara K., Yamaguchi J., Ishii C., Harada N., Soma M., Okamoto H., Oitate M., Arakawa S., Hirai T., Atsumi R., Nakada T., Hayakawa I., Abe Y., Agatsuma T., *Clin. Cancer Res.*, **22**, 5097–5108 (2016).
- 9) Geyer C. E., Forster J., Lindquist D., Chan S., Romieu C. G., Pienkowski T., Jagiello-Gruszfeld A., Crown J., Chan A., Kaufman B., Skarlos D., Campone M., Davidson N., Berger M., Oliva C., Rubin S. D., Stein S., Cameron D., *N. Engl. J. Med.*, **355**, 2733–2743 (2006).
- 10) Wolff A. C., Hammond M. E., Hicks D. G., Dowsett M., McShane L. M., Allison K. H., Allred D. C., Bartlett J. M., Bilous M., Fitzgibbons P., Hanna W., Jenkins R. B., Mangu P. B., Paik S., Perez E. A., Press M. F., Spears P. A., Vance G. H., Viale G., Hayes D. F., *J. Clin. Oncol.*, **31**, 3997–4013 (2013).
- 11) Ogitani Y., Hagihara K., Oitate M., Naito H., Agatsuma T., *Cancer Sci.*, **107**, 1039–1046 (2016).