

抗体—薬物複合体開発における有機化学

星薬科大学 機能分子創成化学研究室
東北大学大学院薬学研究科医薬品開発研究センター
創薬理論創成部門

眞鍋 史乃

はじめに

現在、バイオ製剤、特に抗体医薬品が医薬品売り上げにおいて大きな割合を占めるようになっている。抗体に低分子薬物を付加することで、抗体を高機能化することができる抗体—薬物複合体 (antibody-drug conjugate: ADC) は、次世代抗体医薬品として期待されている。認可された ADC の数は 2018 年には 3 例であったが、2021 年 3 月時点では 9 例まで一気に増えた。現在、医薬品開発においては、従来の低分子医薬品から、新たなモダリティへのパラダイムシフトがおきているが、他のモダリティと比較すると、ADC 開発においては有機化学の果たす役割が大きい。

1. ADC とは何か。有機化学は ADC 開発にどのように貢献するのか。

ADC とは、抗体・毒性の高い低分子化合物・およびそれら 2 つを結合するリンカーの 3 つの要素からなる¹。抗がん剤などの低分子医薬品は、短時間で体内に一様に分布することもあり、治療域 (therapeutic window) が小さく、副作用を示す。抗体は、細胞表面に存在する抗原に対して高い選択性で結合するが、細胞内のタンパク質をターゲットにすることが難しい。ADC は、抗体に毒性の高い低分子化合物を結合させて目的部位に送達し、放出することにより細胞内タンパク質もターゲットにすることが可能で、かつ、治療域を大きくすることができる (Fig. 1)。ADC は、ドラッグ・デリバリー・システムの機能を果たすのみならず、構成分子の特長を生かすことができる薬剤である。

搭載薬物する毒性の高い低分子化合物の選択や構造変換は、有機化学の守備範囲内であるが、抗体と搭載薬物を共有結合でコンジュゲートさせるリンカーも、また、有機化学の守備範囲である。リンカーは、1 抗体あたりの搭載薬物の数、結合位置を制御する他、薬物をいつ、どのような機序で切断するのかについても制御する ADC の司令塔の役割を持つ。

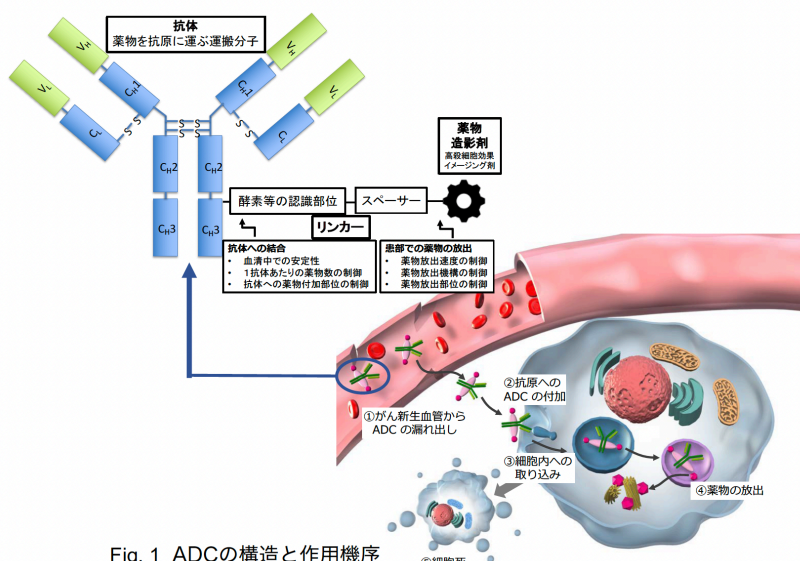


Fig. 1 ADCの構造と作用機序

2. 糖鎖連結均一 ADC の合成

2-1. 古典的な低分子薬物のコンジュゲーション法とその問題点

現時点で臨床で使用されている ADC は、Lys のアミノ基、Cys のスルフヒドリル基を介して搭載薬物を結合している。ADC の体内動態や凝集を防ぐため、1 抗体あたりに結合する薬物の数は 3~4 個程度にとどめられる。1 抗体あたりに Lys は約 90 個、Cys は 8 個含まれているので、それらの中から 3~4 箇所を選ぶとすると、位置選択的な薬物付加がなされない場合には、非常に多数の ADCs が生じることとなる。生じたそれぞれの ADC は、薬効や体内動態などにばらつきがあり、また、可変領域に薬物が結合する結果、抗原への結合能力が落ちる懸念もある。それらの問題点を解決することを目的として、また、治療域の拡大を目指して、均一な ADC を合成するための方法が強く望まれており、様々な手法が開発されている²。

2-2. 抗体の糖鎖構造

抗体は普遍的に Fc 部の Asn297 に 1 対の *N*-結合型糖鎖を持つ。抗体の機能に糖鎖が影響を及ぼすことが知られている。例えば、コアフコースが除去された抗体では、抗体依存性細胞障害 (antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC 活性) が 100 倍上昇し、Poteligeo®として臨床応用されている³。また、抗体は CHO 細胞などで作製されることが多いが、非ヒト型糖鎖を生じてしまう。非ヒト型糖鎖は、例えば、非還元末端のシアル酸 (*N*-アセチルノイラミン酸) がガラクトースや (*N*-グリコリルノイラミン酸) に置換したものであり、免疫原性を持つことから問題となっている (Fig. 2)。また、*N*-結合型糖鎖は、その複雑な生合成経路から構造が均一ではない。

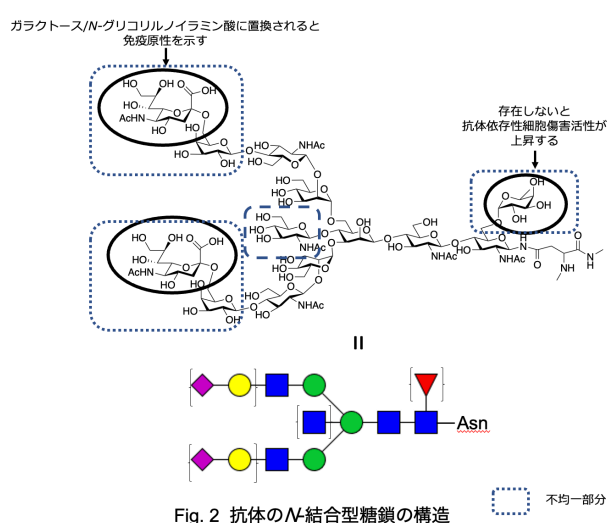


Fig. 2 抗体の *N*-結合型糖鎖の構造

2-3. 糖鎖を「丸ごと」切断する糖加水分解酵素とその改変体を用いた糖鎖改変

Fc 部分の糖鎖部分を改変しつつ、薬物を結合すれば、可変領域への薬物も防ぐことができ、糖鎖部分も含めた均一 ADC の合成が可能となる。私たちは、*N*-結合型糖鎖の還元末端の *N*-アセチルグルコサミン 2 つの間の結合を切断する endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) と呼ばれる酵素とその改変体に着目した⁴。ENGase は、還元末端の *N*-アセチルグルコサミン 1 つを残して、糖鎖を「丸ごと」除去できる糖加水分解酵素である。ここで ENGase の活性中心のアミノ酸を他のアミノ酸に置換すると、加水分解能力を抑えつつ、糖転移能力は保持した酵素へと改変できる。均一構造の糖鎖と ENGase/改変 ENGase の組み合わせにより、抗体の糖鎖を均一化することができる。均一な構造の糖鎖は、有機合成でも合成可能であるが、本研究では、鶏卵黄から単離できるシアル酸を持つヒト型糖鎖を用いた。*N*-結合型糖鎖のシアル酸のカルボキシ基に他の官能基と直交した反応性をもつ官能基 (例えばアジド基) を結合させ、さらにその糖鎖を ENGase/改変 ENGase を用いて

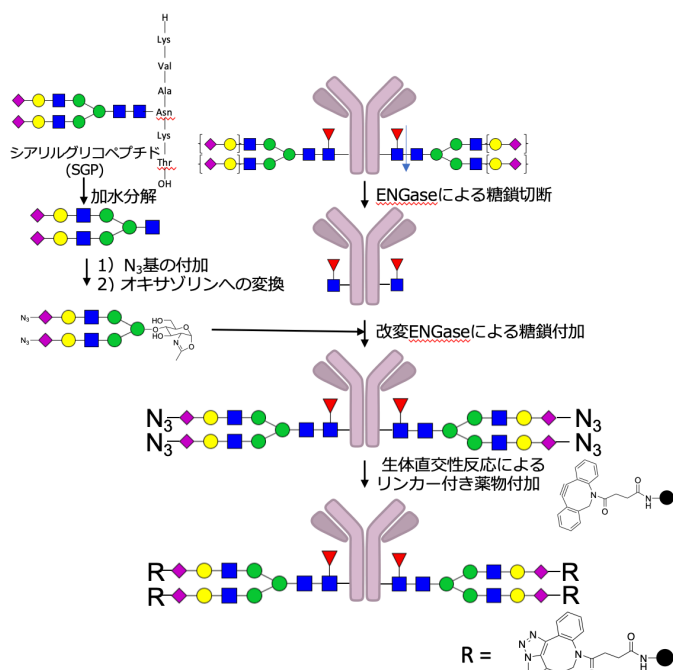


Fig. 3 糖鎖連結均一構造ADC 合成の戦略

2.4 リンカー、搭載薬物 MMAE の構造と作用機序

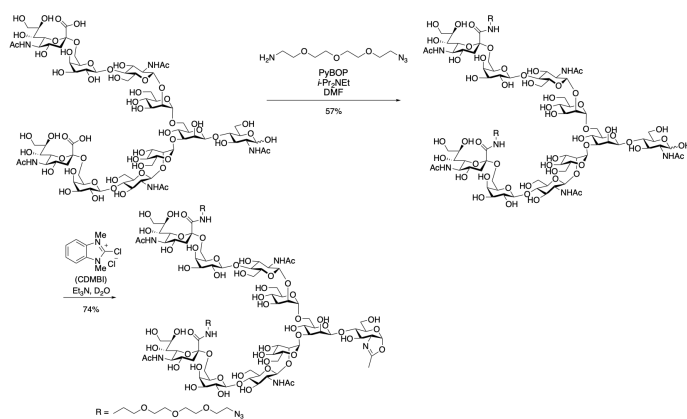


Fig. 4 アジド基付きオキサゾリン糖鎖の合成

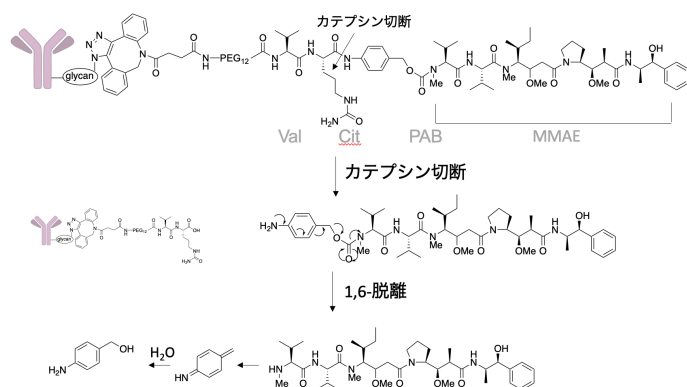


Fig. 5 リンカーと搭載薬物MMAE の構造

抗体に結合させれば、糖鎖部位に薬物を連結した均一構造のADCが合成できる (Fig. 3)。アジド基を持つアミンをシアル酸のカルボン酸にアミド結合を形成して結合した。次に糖鎖の還元末端を改変 ENGase の基質となるようにオキサゾリンとして活性化した。多くの水酸基を持つオリゴ糖であるが、正田により開発された 2-クロロ-1,3-ジメチル-1H-ベンゾイミダゾール-3-イウムクロリド (CDMBI) を用いれば、水中で還元末端の GlcNAc のアセトアミド基とアノマー水酸基のみから脱水反応を起こしてオキサゾリンを形成させることができる (Fig. 4)⁵。

抗体に改変 ENGase によるアジド基付き糖鎖付加の後、アジド基にクリック反応を行うことにより、薬物を結合することができる。細胞内リソソーム内部のタンパク質分解酵素カテプシンで薬物を放出できる Val-Cit (シトルリン) をリンカーとして適用し、*p*-ベンジルアミノカーバメート (PBC) 基を介してチューブリン重合阻害を持つ monomethyl auristatin E (MMAE) を結合した。Cit の C 末端側のアミド結合が切断されると PBC 基が 1,6-脱離反応をおこして、MMAE が放出される⁶。Cit と MMAE を直接結合すると MMAE のかさ高さのため、カテプシン切断ができない。アジド基と反応できるはずんだアルキンと水溶性を向上させるための PEG を Val-Cit-OPAB-MMAE に付加した

(Fig. 5)。最後に糖鎖アジド基とリンカー付き MMAE をクリック反応により結合した。

2.5 構造解析と機能評価

さて、低分子化合物の合成を行うには、反応溶液を TLC で解析し、後処理と精製の後、NMR により構造解析を行うことができる。しかし、巨大な分子量をもつ ADC 合成では、反応追跡をどのように行うか、精製物の構造解析をどのように行うのかについての課題があった。私たちは HIILC (Hydrophilic Interaction Chromatography: 親水性相互作用型カラムクロマトグラフィー) カラムクロマトグラフィーを用いて反応追跡を行う系を開発した。HIILC モードは、生体分子を解析するための水系溶媒を用いる順相カラムクロマトグラフィーモードである。さらに、ESI-MS (エレクトロスプレーイオン化質量分析) により各工程での生成物の MS が均一であることを確認した。

上記の戦略により、がん治療、特に乳がんや胃がんにおいてもっとも汎用されている抗体医薬品の一つであるトラスツズマブを用いて作製した均一 ADC は、トラスツズマブに対する抗原である HER2 が高発現している N-87, OE-19, SK-BR-3 において、*in vitro* で、十分に高い活性を示した一方で、HER2 がほとんど発現していない MKN-45 や MCF-7 に対しては活性を示さない⁷。すなわち、目的の機能を果たしていることが確認された。

3. 固形がん克服のための抗間質抗体を基盤とする ADC のための新規リンカー

in vitro アッセイでは、同一の細胞株のみがターゲットとなるが、実際のがん組織では、さまざまな細胞株が存在しており、がん微小環境を形成している。また、固形がんでは、がん新生血管とがん細胞の間にコラーゲンやフィブリンのような間質が存在しており、がん新生血管から漏れ出た抗体や ADC が、間質に阻まれてがん細胞まで到達できない。そのため、間質が豊富な固形がんの治療は困難である。国立がん研究センターで開発された抗フィブリン抗体を利用して、固形がんの治療を目指している。

一般的な ADC は、細胞内で搭載薬物を放出する作用機序であるため (Fig. 1)、リンカーのバリエーションは、実は少なく、カテプシン切断型 Val-Cit リンカーがほとんどの ADC で使用されている⁸。しかし、抗フィブリン抗体は、細胞の外に存在するため、一般的な細胞内に存在するカテプシンで薬物を放出するリンカーを使用することができない。一方、抗フィブリン抗体に結合した薬物を放出するために、フィブリン上でのみ切断機能を持つプラスミンに着目した。プラスミンは Val-Leu-Lys の C-末端側のアミド基を切断する。さらに、プラスミンはフィブリン上で前駆体であるプラスミノゲンから生成されるが、フィブリンから離れるとプラスミンインヒビターにより速やかに失活する。すなわち、プラスミンはフィブリン上でのみ働く特異的酵素と位置付けることができる (Fig. 6)。プラスミン切断型リンカーを組み入れた抗フィブリン ADC は、間質が多いモデルラットで十分な活性を示し、かつ、明らかな有害現象は観察されなかった⁹。さらに、間質で放出された薬物が、がん細胞のみならず、がん新生血管を攻撃することも明らかになった。

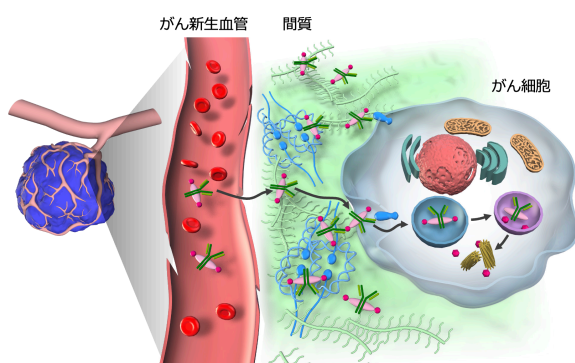


Fig. 6 a) 固形がんにおける通常のADC
がん新生血管と細胞の間の豊富な間質に阻まれる。

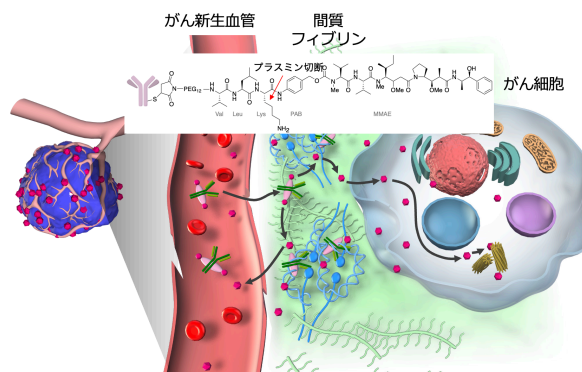


Fig. 6 b) 固形がんにおける抗間質抗体ADC
間質にADCをとどまらせて細胞の外で薬物を切断する。

4. α 線治療に向けた ^{211}At 結合抗体

抗体に搭載する、毒性を持つ物質として、ラジオアイソトープ (RI) も使用されており、 β 線を放出する ^{90}Y や ^{131}I を搭載した抗体は、医療応用されている。 α 線は、 β 線と比較して、その射程距離が短く、細胞 2~3 個程度である一方、その高い線エネルギー付与能力から、副反応を避けるためには、適切にデリバリーさせる必要がある。 α 線を放出する核種のうち、 ^{211}At は、ハロゲン族の元素であり、半減期 7.2 時間程度である。現在、国内で複数の ^{211}At 製造拠点が整備されたことから、その医療応用への期待が高まっている。一方で、 ^{211}At に関連する安定同位体が存在しないため、その化学的性質は十分に理解されていない。

私たちも数年前から ^{211}At 付加抗体についての基礎研究を開始している。まず、あらかじめ、アルキルスズ基を持つ芳香族を抗体のシステイン SH 基とマレイミド基を介して結合させた。その後、理化学研究所仁科センターで製造された ^{211}At を *N*-chlorosuccinimide (NCS) で活性化し、抗体に結合させたスズとの置換反応により、抗体に ^{211}At を導入した。しかしながら、 ^{211}At を導入したトラスツズマブは、破壊されていることが SDS-PAGE により明らかになった。 ^{211}At 結合抗体の破壊は、 ^{211}At からの α 線により水が放射線分解して生じる活性酸素種 (ROS) によるものと推測し、ルミノール反応を用いた ROS の検出系をつくった。その結果、 ^{211}At 水溶液では、ROS が発生しており、ROS は、0.6% 程度のアスコルビン酸ナトリウムの添加により十分に消去できることもわかった。0.6% のアスコルビン酸ナトリウムを含む緩衝液で精製し、保存した ^{211}At 付加トラスツズマブは、1 週間程度十分安定であり、SDS-PAGE で構造が保たれていることやフローサイトメトリーで抗原提示細胞に十分な結合能力を持つことが示された。また、*in vitro* において殺細胞効果を持つことも確認できた¹⁰。アスコルビン酸ナトリウムの他、システインも ROS を消去する力を持つことがルミノール反応により明らかになったが、アスコルビン酸ナトリウムの毒性が小さいことなどから臨床にも応用できると期待している。

おわりに

私の学生時代、サイエンスとしての面白さとともに Food and Drug Administration (FDA) が低分子医薬品を光学活性体で供給するガイドラインを示したこともあり、不斉反応の開発が盛んに行われていた。現在、FDA、厚生省ともに、レギュラトリーサイエンスの見地からバイオ製剤についても可能である限り構造を明らかにし、また、均一化を推奨する指針を提示しており、有機化学の面からのアプローチが必要である¹¹。

毒性が高い搭載化合物、リンカー技術に加えて、生体分子に適用可能なクリック反

応の開発などの有機化学の進展も均一 ADC 合成に寄与していることが明らかである。IR700 などの色素を抗体に結合させ、近赤外蛍光などを照射することによりがんを治療することができる光免疫療法も ADC の一法である¹²。ADC は、がん領域のみならず、感染症領域である抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)¹³や1型糖尿病などの難治性の自己免疫疾患としての開発も進められている¹⁴。ADC は、今後も大きく広がっていくであろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたりご協力いただいた山口芳樹先生 (当時理化学研究所: 現東北医科薬科大学)、安永正浩先生、松村保広先生 (国立がん研究センター)、須田稔博士、木下崇司博士 (株式会社伏見製薬所)、廣瀬賢治博士 (日本ウオーターズ)、理研仁科センター羽場宏光博士はじめ、共同研究者の方々に感謝申し上げます。

Fig. 1, 2, 3, 6 は、有機合成化学協会誌 2020, 78, 485 からの転載許可有。

参考文献

1. (a) Kaplon, H.; Reichert, J. M. *mAbs* **2018**, *10*, 183. (b) Carter, P. J.; Lazar, G. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 197.
2. Manabe, S. "Recent progress in linker technology for antibody-drug conjugates: Methods for connection and release" in "*Cancer Drug Delivery Systems based on the Tumor Microenvironment*", Matsumura Y.; Tarin D. eds. Springer Japan, **2019**, 93.
3. Niwa, R.; Shoji-Hosaka, E.; Sakurada, M.; Shinkawa, T.; Uchida, K.; Matsushima, K.; Ueda, R.; Hanai, N.; Shitara, K. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2127.
4. (a) Fairbanks, A. *J. Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 5128. (b) Kurokuchi, M. *Trends Glycosci. Glycotechol.* **2018**, *30*, J169. (c) Manabe, S.; Yamaguchi, Y.; Abe, J.; Matsumoto, K.; Ito, Y. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, *5*, 171521.
5. Noguchi, M.; Fujieda, T.; Huang, W. C.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95*, 1928.
6. Wu, A. M.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1137.
7. Manabe, S.; Yamaguchi, Y.; Matsumoto, K.; Fuchigami, H.; Kawase, T.; Hirose, K.; Mitani, A.; Sumiyoshi, W.; Kinoshita, T.; Abe, J.; Yasunaga, M.; Matsumura, Y.; Ito, Y. *Bioconj. Chem.* **2019**, *30*, 1343.
8. Chari, V. J.; *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 974.
9. Fuchigami, H.; Manabe, S.; Yasunaga, M.; Y. Matsumura, Y. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14211.
10. Manabe, S.; Takashima, H.; Ohnuki, K.; Yoshikatsu Koga, Y.; Tsumura, R.; Iwata, N.; Wang, Y.; Yokokita, T.; Komori, Y.; Usuda, S.; Mori, D.; Haba, H.; Fujii, H.; Yasunaga, M.; Matsumura, Y. *in revision*.
11. 「抗体医薬品の品質評価のためのガイドンス」厚生労働省: <https://www.pmda.go.jp/files/000206143.pdf>
12. Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosenblum, L. T.; Choyke, P. L.; H. Kobayashi, H. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1685.
13. Lehar, S. M.; Pillow, T.; Xu, M.; Staben, L.; Kajihara, K. K.; Vandlen, R.; DePalatis, L.; Raab, H.; Hazenbos, W. L.; Morisaki, J. H.; Kim, J.; Park, S.; Darwish, M.; Lee, B. C.; Hernandez, H.; Loyet, K. M.; Lupardus, P.; Fong, R.; Yan, D.; Chalouni, C.; Luis, E.; Khalfin, Y.; Plise, E.; Cheong, J.; Lyssikatos, J. P.; Strandh, M.; Koefoed, K.; Andersen, P. S.; Flygare, J. A.; Tan, M. W.; Brown, E. J.; Mariathasan, S. *Nature* **2015**, *527*, 323.
14. Yasunaga, M.; Manabe, S.; Matsumura, Y. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10735.