

氏名（本籍）	まつだ ゆたか 松田 豊（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 373 号
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	抗体薬物複合体の薬物抗体比解析における各種分析法の比較研究
論文審査委員	（主査）教授 袴田 秀樹 教授 林 良雄 教授 柳田 顕郎 教授 根岸 洋一

論文内容の要旨

近年、従来の方法で満足な治療効果が得られない難治性疾患の克服を目的として、創薬の多様化が進んでいる。これまで主流であった低分子や、化学修飾等のない抗体医薬に加え、ペプチド、核酸、改変抗体、細胞、遺伝子（プラスミド DNA 等）などのニューモダリティと呼ばれる分野の研究が盛んに行われている。その中で抗体と低分子の長所を活かした抗体薬物複合体（Antibody-drug conjugates: ADCs）の研究開発が急速に進んでおり、活用の範囲が飛躍的な広がりを見せている。

ADC は、ターゲットとなる細胞に特異的な親和性を持つ抗体に、適切なリンカーを介して高活性な低分子の薬物（payload）を化学結合させることで合成されるバイオ医薬品である。これまでに、9 品目の ADC の臨床使用が米国食品医薬品局（US Food and Drug Administration: FDA）によって承認されており、90 品目以上の ADC が臨床開発のステージにある。現在市販されている主要な ADC は、抗体の複数の異なる部位にランダムに高活性な payload を結合させており、薬物抗体比（Drug antibody ratio: DAR）及び薬物の結合位置が不均一なものとなっている。薬物の不均一な結合が抗体の抗原認識部位で生じると、ADC としての薬効は低下してしまう。また、結合位置によってはその結合が不安定になることが知られており、不安定な位置に結合した payload が血中で ADC から脱落して引き起こす毒性の増加も課題である。これらの結果、治療指数（Therapeutic index: TI）が狭く制限されることが報告されている。

ADC に特有なこの不均一性は、医薬品としての品質低下に加え、レギュラトリーサイエンスの観点からも望ましいものではない。特に ADC の特性評価における重要項目である DAR 解析においては、いまだに理想的な分析法は確立されておらず、多くの分析化学者にとってチャレンジングな課題となっている。これまで、HPLC を用いる分析法を中心に多くの DAR 解析法が報告され、製薬の現場でも使われているが、現状では標準的な DAR 解析法は確立されていない。そのた

め、複数の分析法を組み合わせる分析戦略が望ましいとの見解が報告されている。しかしながら、各分析法の特徴について比較評価した研究はこれまで報告されていなかった。

このような ADC 分野での DAR 解析における潜在的なニーズに応えるため、本論文では ADC の各種 DAR 解析法の特徴を比較評価し、その情報を ADC 製造の工程内管理 (in process control: IPC) 戦略の確立へ応用すること、更に、市販品と同じ分子フォーマットの ADC の DAR 解析へ適用し、分析法を確立するためのガイダンスを提示することを目的とした。

1 章 位置選択的 ADC の各種分析法の比較

前述した従来の ADC の不均一性に起因する問題を克服するために、payload が導入される位置を制御した位置選択的な ADC の開発が進んでいる。味の素株式会社においても、Fc 親和性ペプチドを用いる化学的かつ位置選択的な ADC 合成法 (AJICAP®第一世代法) を開発し、2019 年にそのコンセプトを確認し、論文として報告した。この確認実験において、DAR 解析は逆相液体クロマトグラフィー/四重極飛行時間型質量分析法 (RPLC/QTOF-MS) のみで行われており、複数の分析法を組み合わせる戦略や、分析法の比較は検討されていなかった。

これらの背景から、AJICAP®第一世代法によって得られた、不均一性の低い位置選択的 ADC を測定対象 (モデル化合物) とすれば、DAR 解析法の効果的な比較評価を行うことができると考え、本研究を着想した。

市販の抗体である trastuzumab を原料に、AJICAP®法によって、位置選択的 ADC を合成した。Payload として、monomethyl auristatin E (MMAE) を用いた。合成反応の終了後、精製前の ADC の一部を用いて疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) カラムを使った分取 HPLC 精製を行い、DAR を単一にした AJICAP®-ADC を取得した。これらの精製前/精製後の ADC バッチを用いて、6 種類の分析法によって DAR 解析を行い、それらを比較した (Fig. 1)。

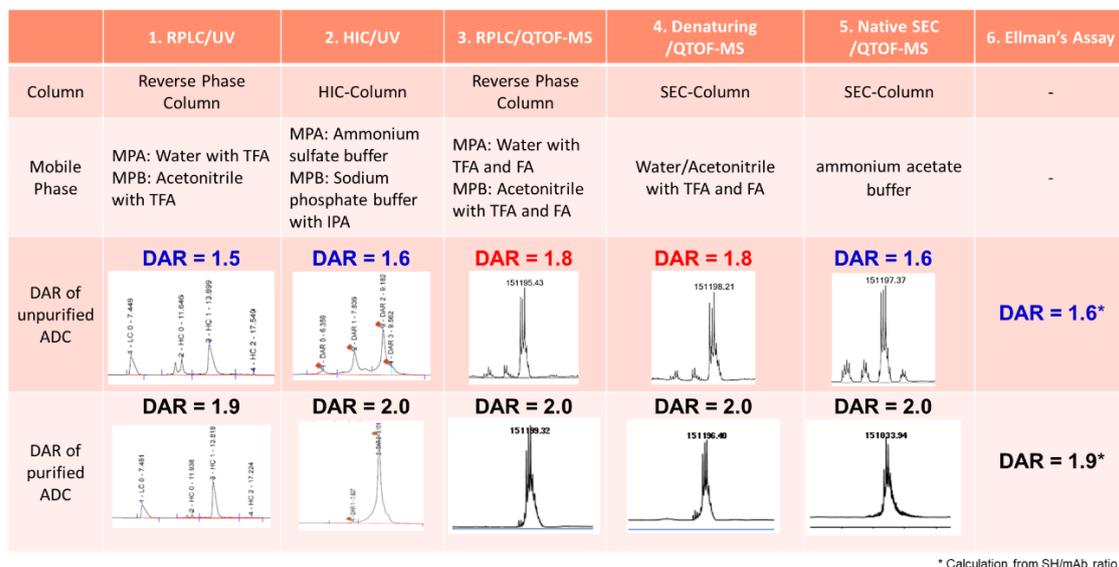


Fig. 1 Comparison of 6 analytical methods for the DAR determination of unpurified and purified AJICAP®-ADC

精製前の ADC は DAR = 1.6, 精製後の ADC は DAR = 2.0 という結果が得られた。精製前の ADC の分析において、解析法によって DAR の結果が異なることが分かり、その原因は溶離液の溶質が ADC のイオン化に与える影響と、ADC の不均一性によるものである可能性が示唆された。また、液体クロマトグラフィー条件を変えた 3 種類の LC/QTOF-MS を比較評価し、それぞれの特性から推奨の用途を見出すことができた。

このように、同一バッチの位置選択的 ADC を用いて、DAR の解析法を比較検討した研究はこれまで報告されておらず、本研究が初の比較検討となった。また、位置選択的 ADC はその不均一性の低さにより、新規解析法を確立するには良いモデル化合物となることが示唆された。

2 章 GMP 戦略に基づいた位置選択的な ADC の調製と工程内分析

将来的に、新規位置選択的 ADC 合成法 (AJICAP®法) によって ADC を製造する場合、ADC 合成のスケールアップと、各合成工程の管理のための解析法の確立が必要である。この目的のために、GLP 前臨床試験用に、位置選択的 ADC を供給するための GMP 戦略を立て、それに従いグラムスケールの ADC 合成を行った。その結果、総収率は 90% であり、1.72 g の trastuzumab-AJICAP®-MMAE が得られた。各合成工程において、その合成中間体を第 1 章で特徴を明らかにした 3 種類の解析法 (reduced RPLC/UV, HIC/UV, Ellman's assay) を用いて比較し、各工程に適した解析法を提案することができた。以上から、位置選択的な ADC 製造における工程内管理 (in process control: IPC) 戦略を確立させることができた (Table 1)。

Table 1 Analytical methods for IPC of each AJICAP®-ADC preparative step

Step	Proposed analytical method
Step-1: peptide conjugation	HIC/UV, reduced RPLC/UV
Step-2: linker cleavage	HIC/UV, Ellman's assay
Step-3: re-oxidation	Ellman's assay
Step-4: payload conjugation	HIC/UV, reduced RPLC/UV

3 章 Cysteine 型 ADC の DAR 解析法比較

FDA が承認している 9 品目の ADC のうち、ランダムに payload が導入されている位置選択的ではない ADC が 7 品目あり、そのうち 4 品目がシステイン型の ADC である。そのため、システイン型 ADC の DAR 解析のための解析法の比較は、市場ニーズに応える情報を提供できると考えた。そこで、市販の ADC と同じ分子フォーマットであるシステイン型の ADC を合成し (Fig. 2), 第 1 章で不均一性の高い ADC にも有用と分かった 3 つの解析法 (reduced RPLC/UV, HIC/UV, Ellman's assay) を用いて、その DAR 解析を行い、解析法間の違いについて考察した。

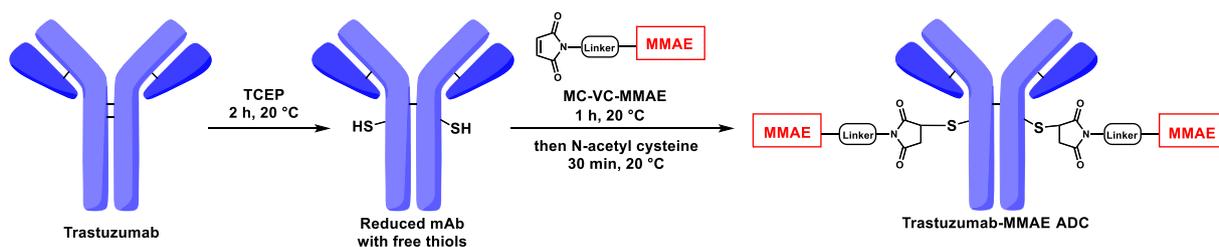


Fig. 2 Cysteine-based ADC synthesis

種々の検討の結果、2-プロパノールを加えた移動相条件の HIC/UV, RP-HPLC/UV 及び Ellman's assay が、システイン型の ADC の DAR 解析に有効であることが分かった。また、これら 3 種の分析法で得られた DAR と、還元剤 TCEP の当量数は相関していることを確認できた。次に、これらの結果がシステイン型 ADC の製造のための工程管理に活用できるかどうかを検討するため、400 mg スケールのシステイン型の ADC の合成を行い、その分析に適用した。その結果、このスケールアップ品は想定よりも高い DAR を示すことが分かり、システイン型の ADC 合成のスケールギャップの発生が示唆された。

総括

近年のモダリティ分野で注目が集まっている ADC であるが、その分析法には課題が多い。特に、その薬効と安全性に関わる DAR を解析するための分析法には、標準的な方法が確立されておらず、分析法間の比較もほとんどなされていなかった。また、ADC 製造の IPC についても、十分な研究は行われていない。本研究では同一バッチの位置選択的又はシステイン型 ADC やその合成中間体を用い、分析法の比較研究を行い、それぞれの分析法の特徴について示した。本研究の成果は、今後 ADC 合成やそのプロセス開発を行う研究者にとって、DAR 解析法を確立するための重要なガイダンスになると考える。

【研究結果の掲載誌】

- 1) Y. Matsuda, *et al.*, *Anal. Chem.*, **91**, 12724–12732 (2019).
- 2) Y. Matsuda, *et al.*, *ACS Omega*, **4**, 20564–20570 (2019).
- 3) Z. Tawfiq[#], Y. Matsuda[#], *et al.*, *Anal. Sci.*, **36**, 871–875 (2020). [#]equally contributed.

論文審査の結果の要旨

本論文は、抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugates: ADCs) の抗体薬物比解析における各種分析法の比較を行い、分析法の問題点並びに分析法を開発する際のガイダンスを提示したものである。ADC は、細胞内で切断される適切なリンカーを介して抗体に低分子薬物 (payload) を結合させたバイオ医薬品であり、一般に薬物抗体比 (drug antibody ratio: DAR) と薬物の結合部位に不均一性を有している。しかし、その不均一性を評価するための分析法が十分に確立されていないことから、レギュラトリーサイエンス及び物性評価の観点から課題となっている。近年になり、位置選択的な ADC 合成法が開発され、位置選択的な ADC の標品の合成が可能となった。こうした背景から、位置選択的な ADC の標品を用いて種々の分析法の比較評価を行い、基礎研究から製造プロセスの開発まで、種々の開発段階で利用できる分析法を確立するための、基本的戦略を提示している。

第 1 章では、AJICAPTM法と呼ばれる新規位置選択的 ADC 合成法を利用し、抗 HER2 抗体のトラスツズマブに payload として MMAE (monomethyl auristatin E) を結合させた位置選択的 ADC を合成し、preparative HPLC 精製によって DAR を単一にした ADC を得ている。精製前後の位置選択的 ADC を 6 種の分析法 (HIC-HPLC, RP-HPLC, RPLC-Q-TOF-MS, denaturing SEC-Q-TOF-MS, native SEC-Q-TOF-MS, Ellman's assay) によって分析し、DAR を求めた。その結果、精製前の ADC に関しては、利用する分析法によって得られる DAR が異なる場合があり、精製が不十分な ADC の解析には複数の分析法を使うべきであることが示された。一方、精製後の ADC は、分析法によらずほぼ同一の DAR を与え、6 つの分析法全てが精製された位置選択的 ADC の解析に有用であることを明らかにした。

第 2 章では、GLP 前臨床試験用の ADC を製造するための GMP 戦略を立て、グラムスケールの位置選択的 ADC の合成に取り組んだ。第 1 章の結果を基にして、各合成工程における合成中間体を分析し、各合成工程を評価するための適切な分析法を提示し、工程内分析戦略を確立できた。最終的に、総収率は 90% で、1.72 g の位置選択的 ADC (トラスツズマブ-AJICAP-MMAE) を得ることができ、製造への応用を可能とした。

第 3 章では、市販の ADC と同じ分子フォーマットであり、payload の結合部位が位置選択的でないシステイン型の ADC の DAR 解析を行った。第 1 章の分析法の比較検討を応用し、HIC-HPLC, RP-HPLC 及び Ellman's assay が、システイン型の ADC の DAR 解析に有効であることを示した。ただし、得られる DAR は分析法毎に同一ではなく、3 つの分析法を組み合わせて総合的に判断することを推奨している。さらに、第 2 章の GMP 戦略をシステイン型 ADC に応用した。スケールアップを行って 400 mg の ADC を合成し、3 種類の分析法によって DAR を求めたところ、予想よりも高値の DAR が得られ、システイン型の ADC 合成のスケールギャップの発生を示唆した。

将来の医療を発展させるニューモダリティの一つとして、ADC は産官学の注目を集めている。前臨床試験段階にある品目数を考慮すると、今後の承認品目数は更に増加すると予想されている。しかし、その承認申請に必要な DAR 解析については、分析法についての基礎的な研究が不足して

いた。新規のハイブリッド分子であるため、クロマトグラフィーにおける保持挙動や、質量分析におけるイオン化の挙動に関して、基礎研究の蓄積は少ない。本研究では、位置選択的な ADC の標品を用いて分析法の特性比較を行い、更に、各開発段階で必要となる分析法の適否を示し、工程内分析戦略を確立している。これらの情報は、今後 ADC 合成やそのプロセス開発を行う研究者と技術者にとって、非常に有用であると考えられる。以上のように本論文は、測定対象としての情報が十分でない ADC の分析にチャレンジし、分析戦略を提示できている点で独創的である。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものであると判断する。