

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06969

研究課題名（和文）KSP阻害システイン誘導体の抗がん作用を活かす新規抗体薬物複合体の開発

研究課題名（英文）Development of novel antibody-drug conjugates utilizing the KSP inhibition of cysteine derivatives

研究代表者

小郷 尚久（Ogo, Naohisa）

静岡県立大学・薬学研究院・講師

研究者番号：20501307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：KSP阻害システイン誘導体を基にin silicoを活用し更なる高活性化に成功し、リンカーペイロード合成ではアミノ基、カルボキシ基を起点に様々なリンカー導入したライブラリーを構築した。1bのPEGリンカー導入体LP-1bと抗HER2抗体trastuzumabの複合体を合成し、SKOV3細胞評価により、trastuzumabと比べ有意な増殖阻害活性を確認できた。カテプシンB切断ペプチドリンカー導入検討では、誘導体のわずかな構造の違いが切断反応に影響することを見出した。以上、本誘導体はADC開発における新たなペイロードとして有望であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KSP阻害システイン誘導体を有するリンカーペイロードライブラリー構築と抗体との複合化、ADCとしての生物活性評価により、現在開発中のADCを含め抗体に結合させる低分子化合物（ペイロード）に新規作用機序を持つペイロード開発の可能性拡大が示された。また本研究成果から、KSP阻害剤を臨床応用するための学術的な裏付けとなる基礎研究の前進に貢献することができた。

研究成果の概要（英文）：We previously synthesized S-trityl-L-cysteine (STLC) derivatives as potent KSP inhibitors. Clinical trials of KSP inhibitors have been limited by their toxicity to non-cancer cells. The approved antibody-drug conjugates (ADCs) are mainly comprised of payload classes mostly limited to tubulin binders or DNA interacting agents. The development of new payloads with new mode of action is highly desired. In this study, we designed and synthesized linker-STLC derivatives. LP-1b has a PEG linker, and LP-2b has a cleavable linker that can be cleaved by cathepsin B. In addition, we synthesized a new derivative in which S atom was substituted with C. The novel ADC-1 of LP1b and trastuzumab was confirmed to significantly inhibit cell proliferation of HER2-positive SKOV-3 cells compared to trastuzumab. For LP-2b, it was confirmed by LC-MS that the addition of cathepsin B cleaves the linker and releases the drug. These results indicated that STLC derivatives can be applied for novel ADCs.

研究分野：創薬化学

キーワード：抗体薬物複合体 抗がん in silico 構造活性相関 システイン誘導体 KSP Trastuzumab プロドラッグ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

抗体の持つ標的への特異性に低分子化合物由来の殺細胞活性を融合させた抗体薬物複合体 (**antibody-drug conjugate, ADC**) は、**2013年FDA承認**されたトラスツズマブエムタンシンに代表されるように次世代抗体医薬として期待され、現在も多くの **ADC** が開発されている。しかしながら、開発中の **ADC** を含めこれら抗体に結合させる低分子化合物 (ペイロード) のほとんどは微小管もしくは **DNA** を標的とした薬剤に限定されている現状がある。血中で遊離するペイロードによる副作用や耐性出現の観点からも新規作用機序を持つペイロードの開発は重要である。微小管や **DNA** 以外で殺細胞活性を有するペイロード開発の標的候補として、キネシンモータータンパク質が挙げられる。中でも **kinesin spindle protein (KSP/Eg5)** は、細胞周期における **M** 期の進行に重要な機能を担い、タキソールやビンクリスチンなど従来の **M** 期作用薬が持つ微小管への直接作用に起因した骨髄毒性や中枢・末梢神経障害などの副作用を回避できる抗がん剤開発の新たな標的として注目されてきた。実際、**2000年代初めに isipinesib** をはじめ多くの **KSP** 阻害剤が臨床試験に進んだが現在までに上市された薬剤は無い。その理由は白血球や好中球減少など血液系への副作用が原因であることが判明している。しかし抗腫瘍効果 (薬効) があり、かつ末梢神経障害は従来の微小管作用薬よりも改善されていることから、**KSP** 阻害剤のがんへの選択的なデリバリーは、薬効と毒性の分離を可能にする理想的な抗腫瘍効果が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに申請者は、**isipinesib** や **filanesib** など既に臨床入りしている **KSP** 阻害剤とは構造的に全く異なる新規高活性 **KSP** 阻害システイン誘導体を合成展開してきている。本研究課題では、申請者が独自に開発した **KSP** 阻害に基づく殺細胞活性を有するシステイン誘導体をペイロードとした新規リンカーペイロードライブラリーを構築し、その後 **ADC** として既存 (抗 **HER2** 抗体) または新規な抗体に対する複合化を検討し、これまでに前例のない **ADC** の創出を目的とする。特にリンカー構造と抗がん活性相関を明らかにすることにより、様々な抗体に適用可能な新たなリンカーペイロードの開発を目指した基礎研究を行う。

3. 研究の方法

申請者がこれまでに獲得している **KSP** 阻害システイン誘導体を基にシステイン誘導体を有するリンカーペイロードライブラリーを構築する。具体的には、**in silico** ドッキングおよび **MD** シミュレーション計算による **KSP** とシステイン誘導体の複合体構造における相互作用解析、続く誘導体の更なる構造最適化を含めた **MD** 計算結果検証のための誘導体合成と評価、原料となるシステイン誘導体の中量合成を行う。リンカーペイロードライブラリーとしては、システイン誘導体のアミノ基又はカルボキシ基から種々のリンカー導入を検討する。具体的なリンカーとしては、**lysosome** 内酵素により切断される **cleavable** リンカーや単純な **PEG**、メチレン鎖を有する **non-cleavable** リンカーを合成する。その後、**LC-MS** を用いてシステイン等想定される抗体アミノ酸残基との反応性や酵素により切断され、システイン誘導体実際に生成するかを確認する。抗体への複合化に関しては、抗 **HER2** 抗体に対して先に合成したリンカーペイロードを複合化し **ADC** を合成し評価する。

4. 研究成果

(1) **in silico** ドッキング解析と新規システイン誘導体デザイン、合成と評価

システイン誘導体の **in silico** ドッキング解析

これまでに申請者が合成した **KSP** 阻害システイン誘導体を図 1 に示す (**ACS MCL 2015**)、

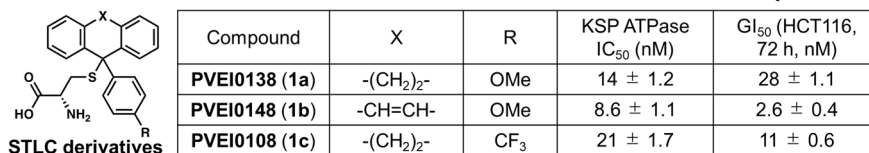


図1. **KSP**阻害システイン誘導体

現在、上記誘導体の中で、**1a (PVEI138)** に関しては **KSP** との複合体結晶構造を明らかにしている (**pdb code: 5zo7, ACS Omega 2018**)。本 **pdb** を鋳型として、化合物 **1a, 1b** について、**MOE** を用い **KSP** との相互作用 (**1a** はリドッキング、**1b** はドッキング) 解析と、続く **MD** 解析を行った (図 2)。

1a のリドック解析ではドッキング前後の複合体構造平均二乗偏差 (**root mean square deviation; RMSD**) は **0.25 Å** を示し、本ドッキングの妥当性が適当であることを確認できた。化合物 **1b** は **1a** と

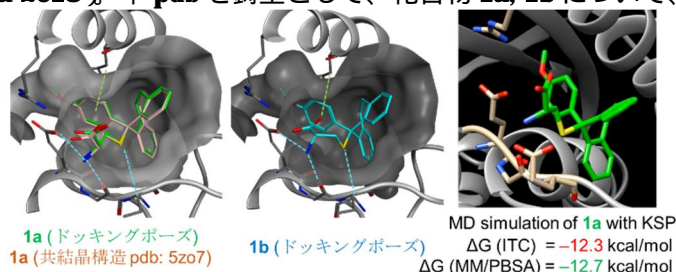
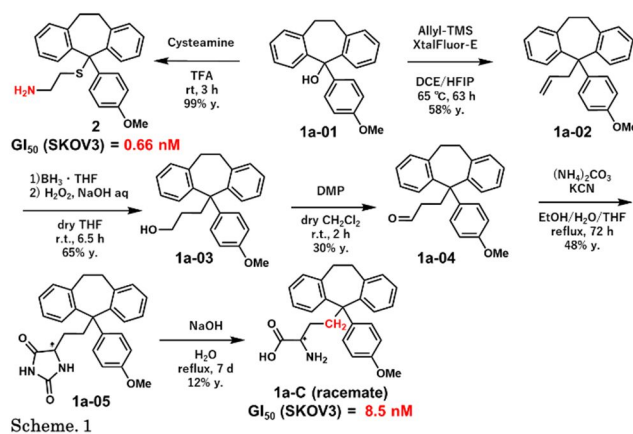


図2. **in silico** 解析

同様のドッキングポーズを示すことも判明した。さらに **GROMACS 2020** を用いた **MD** シミュレーションを実施した。得られたトラジェクトリ解析からそれぞれの **RMSD** の揺らぎが少なくシミュレーション中複合体の安定性を確認した後、**assisted model building with energy refinement (Amber) 20** を用い **MM/PBSA** 法によって **1b** の結合自由エネルギーを計算した結果 **G (300 K) = -12.7 ± 0.59 kcal/mol** であった。本値は、以前実際のリコンビナント **KSP** 用いた等温滴定カロリメトリー実験値 **-12.3 kcal/mol** と近い値であった。これらのドッキング解析から、**KSP** との相互作用に関してシステイン誘導体 (**1a**, **1b**) の各 アミノ基の水素結合形成関与トリチル部での疎水性相互作用関与 カルボキシ基の溶媒側への露出が示された。特にアミノ基は、**KSP** の **Glu116**, **Gly117**, **Glu118** と水素結合を形成することが分かった。

新規システイン誘導体デザイン、合成と評価

上記解析結果を基に、**ADC** のペイロードとして新規誘導体をデザインした。すなわち、**1a** の脱カルボキシ基体 (**2**)、硫黄原子を炭素原子に置換した化合物 (**1a-C**) である (図3)。**2** は、**1a** と比べ極性基削減による細胞膜透過性向上

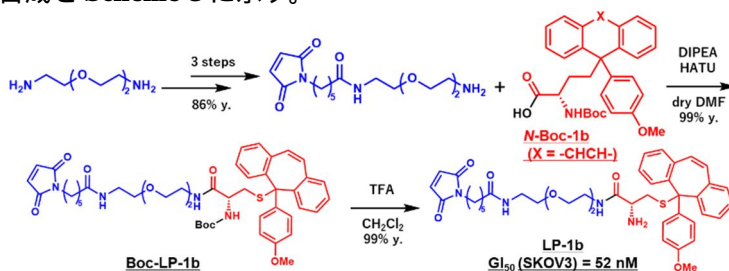


を、また **1a-C** は、化合物自体の安定性向上を期待した。合成スキームを下に示す (**Scheme 1**)。

2 は、**1a** 中間体であるトリチルアルコールにシステアミンを **TFA** 中で反応させることによって得た。**1a-C** は、同トリチルアルコールに **XtalFluor-E** と **Allyl-TMS** を用い **Allyl** 導入体とした後、ヒドロホウ素化、酸化により得たアルデヒド体から **Strecker** 法により合成することができた。ヒト卵巣がん細胞株 **SKOV3** を用い細胞増殖阻害活性を評価したところ、**1a** の **GI₅₀:28 nM** に対し、**2: 0.66 nM**、**1a-C: 8.5 nM** と高い阻害活性を有することが判明した。

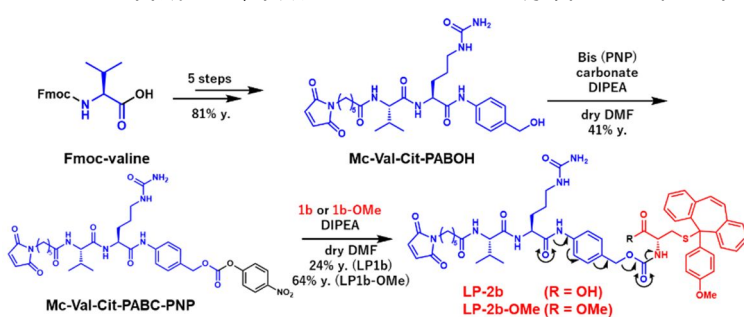
(2) システイン誘導体 **1b** をペイロードとする新規リンカーペイロードライブラリーの構築

これまでの **SARs** および **MD** 計算を含めた *in silico* 解析から、**1b** のカルボキシ基、アミノ基をリンカー導入部位とした。カルボキシ基からは、**non-cleavable PEG** リンカーを介し抗体 **SH** 基との複合化を想定して、末端にマレイミド基を持つ **linker-payload 1b (LP-1b)** を設計した。アミノ基からは、**lysosome** 内酵素により切断される **cleavable** ペプチドリリンカーを設計した。具体的なペプチドリリンカーとして、カテプシン **B** によって切断されるバリン-シトルリン-*p*-アミノベンジルアルコール (**Val-Cit-PABOH**) を採用し、**1b** と **Val-Cit-PABOH** をカルバメート結合でつなげるデザイン **linker-payload 2b (LP-2b)** とした。**LP-1b** の合成を **Scheme 2** に、**LP-2b** の合成を **Scheme 3** に示す。



市販の **PEG** ジアミンを原料に、末端にマレイミド基を有するアミン体を **3** 工程で合成した後、別途合成した **N-Boc** システイン誘導体 (**N-Boc-1b**) と **HATU** を用いて縮合反応を行い、続く酸処理による脱 **Boc** 化により、目的とする **LP-1b** を比較的高収率で得た。

LP-2b の合成では、市販の **Fmoc-valine** を原料に **5** 工程で末端にマレイミド基を持つ **Val-Cit-PABOH** を合成後、**Bis(4-nitrophenyl) carbonate** による活性エステルに **1b** を反応させ所望の化合物 **LP-2b** を得た。



また活性エステルに対して、別途合成した **1b** のカルボキシ基をメチルエステルとした **1b-OMe** を反応させることにより **LP-2b-OMe** を得た。さらに種々の合成検討を行い、**PEG** リンカーを有し末端カル

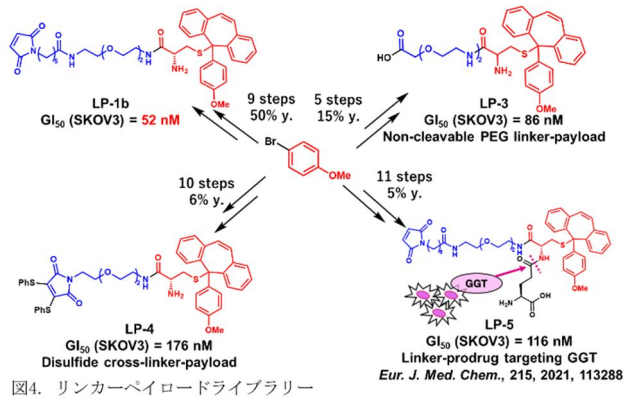


図4. リンカーペイロードライブラリー

ボキシ基の **LP-3** を、ジスルフィド結合によるクロスリンカーを期待した **LP-4** を、ペイロードとして最近報告したプロドラッグタイプのシステイン誘導体 (*Eur JMC 2021*) を導入した **LP-5** を合成した (図 4)。SKOV3 を用い細胞増殖阻害活性を評価したところ、**1a** の GI₅₀:28 nM に対し、**LP-1b**: 52 nM、**LP-3**: 86 nM、**LP-4**: 176 nM、**LP-5**: 116 nM とシステイン誘導体カルボキシ基から比較的大きな置換基を導入しても高い増殖阻害活性を保持することが判明した。

(3) 酵素切断リンカーを有するリンカーペイロード **LP-2b**, **LP-2b-OMe** の評価

合成した酵素切断リンカーの機能を確認するため、実際に *in vitro* にてカテプシン B によりペイロードであるシステイン誘導体が生成するか確認することとした (図 5)。その結果、化合物 **LP-2b** の PBS 溶液に L-システインを添加したところシステイン付加体を、さらにカテプシン B 添加により親化合物 **1b** が生成することを LC-MS により確認することができた。一方、**1b** の Me エステル体 **LP-2b-OMe** では親化合物の生成は確認できなかった。システイン誘導体を持つペプチドリンカーのカテプシン B による切断は、誘導体のわずかな構造の違いにより影響を受けることが判明した。

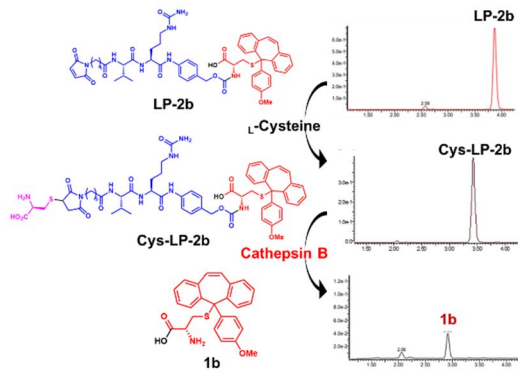


図5. **LP-2b** とシステイン及びカテプシンBとの反応

(4) **LP-1b** と抗 **HER2** 抗体 **Trastuzumab** との複合化

LP-1b については、実際に抗体との ADC 合成を検討した (図 6)。抗 **HER2** 抗体 **trastuzumab** を還元剤処理した後複合化を行い **ADC-1** とした。SKOV3 を用い評価した結果、**ADC-1** は **trastuzumab** と比べ有意に細胞増殖阻害活性を示すことが判明したことから、ADC のペイロードとして本システイン誘導体が適応可能であることが示唆された。

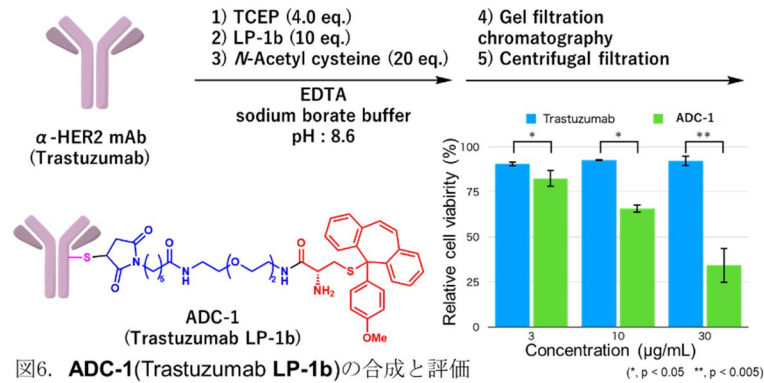


図6. **ADC-1**(Trastuzumab **LP-1b**)の合成と評価

(5) まとめ

申請者がこれまでに合成してきた **KSP** 阻害システイン誘導体を基に、*in silico* ドッキングおよび **MD** シミュレーション計算を活用して **KSP** 阻害に係わる重要ファオマコフォアを同定し、更なる高活性化した誘導体 (デカルボキシ体 **2**, 炭素置換体 **1a-C**) を合成することができた。また本研究課題であるリンカーペイロードライブラリー構築では、誘導体のアミノ基、カルボキシ基を起点として、様々なリンカーを導入したライブラリー構築を達成した。特に **1b** のカルボキシ基から **PEG** リンカー導入した **LP-1b** では、抗 **HER2** 抗体 **trastuzumab** との複合体 (**ADC-1**) を合成し、SKOV3 細胞を用いた評価により、**trastuzumab** と比べ有意に細胞増殖阻害活性を示すことを見出すことができた。さらに酵素カテプシン B により切断されるペプチドリンカーの導入検討では、システイン誘導体のわずかな構造の違いにより酵素切断反応に影響することを見出した。今後、本研究にて合成した **LP** を用いて抗体との ADC 合成と評価を行うことにより、新たな ADC 開発における **KSP** 阻害化合物の実用性を見い出せるものと信じている。

以上本研究成果から、新規システイン誘導体は **KSP** 阻害に基づく ADC 開発における新たなペイロードとして、次世代抗がん剤開発のためのリード化合物として有望であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sawada Jun-ichi, Matsuno Kenji, Ogo Naohisa, Asai Akira	4. 巻 193
2. 論文標題 Various effects of two types of kinesin-5 inhibitors on mitosis and cell proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114789 ~ 114789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2021.114789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukai Ryota, Ogo Naohisa, Ichida Taiki, Yamane Masayoshi, Sawada Jun-ichi, Miyoshi Nao, Murakami Hisashi, Asai Akira	4. 巻 215
2. 論文標題 Design, synthesis, and evaluation of a novel prodrug, a S-trityl--cysteine derivative targeting kinesin spindle protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 113288 ~ 113288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2021.113288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukai Ryota, Ogo Naohisa, Ichida Taiki, Yamane Masayoshi, Sawada Jun-ichi, Miyoshi Nao, Murakami Hisashi, Asai Akira	4. 巻 215
2. 論文標題 Design, synthesis, and evaluation of a novel prodrug, a S-trityl--cysteine derivative targeting kinesin spindle protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 113288 ~ 113288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2021.113288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibuya Asuka, Ogo Naohisa, Sawada Jun-ichi, Asai Akira, Yokoyama Hideshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Structure and comparison of the motor domain of centromere-associated protein E	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 280 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798321000176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shibuya Asuka, Suzuki Akira, Ogo Naohisa, Sawada Jun ichi, Asai Akira, Yokoyama Hideshi	4. 巻 597
2. 論文標題 Crystal structure of the motor domain of centromere associated protein E in complex with a non hydrolysable ATP analogue	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Naohisa Ogo, Hisashi Murakami, Akira Asai
2. 発表標題 Discovery of novel cysteine derivatives to improve selectivity and targeting to cancer cells using in silico modeling
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(横浜)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市田 泰輝、深井 椋太、村上 央、三好 奈央、小郷 尚久、浅井 章良
2. 発表標題 STLC 誘導体を有する新規 ADC の設計と合成
3. 学会等名 日本薬学会第141年会(広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市田泰輝、深井椋太、池田有明香、三好奈央、小郷尚久、浅井章良
2. 発表標題 ADC を指向した STLC 誘導体を有する新規 linker-payload の設計と合成
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市田泰輝、深井棕太、村瀬啓輔、三好奈央、村上央、小郷尚久、浅井章良
2. 発表標題 S-trityl-L-cysteine誘導体を有する新規抗体薬物複合体の合成と薬物リンカーの構造最適化
3. 学会等名 第39回メディシナルケミストリーシンポジウム（オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市田泰輝、深井棕太、村瀬啓輔、三好奈央、村上央、小郷尚久、浅井章良
2. 発表標題 抗体薬物複合体を指向したS-trityl-L-cysteine誘導体を有する薬物リンカーの構造最適化
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学大学院薬学研究院 創薬探索センター https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~tansaku/ 本研究課題成果発表：日本薬学会第141年会で学生優秀発表賞を受賞 https://www.u-shizuoka-ken.ac.jp/news/20210414-1/ 本研究課題成果発表：日本薬学会第143年会で学生優秀発表賞を受賞 https://www.u-shizuoka-ken.ac.jp/news/20230515/ https://confit.atlas.jp/guide/event/pharm143/static/prize

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------