

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：72690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06467

研究課題名(和文) ENGaseを利用したDual Warhead型ADCの開発

研究課題名(英文) Synthetic study of dual warhead ADCs using ENGase

研究代表者

後藤 浩太郎 (Goto, Kohtarō)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：30321673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、新しい抗体薬物複合体(ADC)として、抗体1分子に2種類の薬物を搭載した「Dual warhead型ADC」が注目されている。我々は、抗体中に1対存在する糖鎖に注目し、糖鎖部分を選択的に修飾することによりその合成が可能であると考えた。まず、2種類のクリック二官基を有する二糖オキサゾリンを合成した後、このオキサゾリンと抗体を加水分解酵素であるEndo-S2を用いて縮合し、二官能性抗体を合成した。次いでこの二官能性抗体に対して対応する2種類のクリックケミストリーを行うモデル基質として、異なる蛍光基を連続して導入させることで抗体1分子中に2種類の蛍光基を有する蛍光化抗体の合成を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回合成にモデルとして合成を達成した「Dual蛍光化抗体」は、蛍光基部分を実際のがん治療に用いられている薬物分子に置き換えればそのまま「Dual warhead型ADC」の合成に直結する。このため今回の成果は今後のがん治療の発展の一助として貢献できるものである確信しており、その学術的意義や社会的意義は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Site specific dual click-functionalization of antibody for dual warhead ADCs was studied. PEGylated disaccharide oxazoline having two types of functional groups for click chemistry was prepared as a key compound. Conjugation reaction of the oxazoline and antibody was achieved using Endo-S2. Finally, as a model of dual click reaction, two types of fluorescent reagents containing corresponding click functional group gave the dual fluorescent antibody.

研究分野：有機合成化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：抗体薬物複合体 オキサゾリン 二官能性 Endo-S2

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、新しいがん治療薬として抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate : ADC) が注目されている。その構造は immunoglobulin G (IgG) に代表される抗体分子にリンカーと呼ばれる部分を介して化学療法剤であるペイロード (抗がん剤など) を共有結合させた化合物であり、現在までに既に 10 種類以上の ADC が上市されている。さらに現時点で 80 種類以上も ADC が臨床試験で評価されており、次世代抗体医薬品として注目を集めている。一般的にこれら ADC は通常抗体 1 分子に複数薬剤を搭載しているが、搭載している薬剤の種類としては 1 種類の薬剤を導入した ADC のみである。

ところで近年、抗体 1 分子に異なる薬剤分子を搭載した「Dual Warhead 型 ADC」が従来の ADC では効果の薄いがんに対しても高い殺傷効果を有することが報告されており、次世代型 ADC として期待されている。しかしこの Dual Warhead 型 ADC は概念としては提唱されているが、未だ十分な合成法が確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では抗体 (IgG1) 分子が 297 番目の Asn 残基に N 結合型糖鎖 1 対を持つ糖タンパク質であることに注目し、申請者らが開発した「糖鎖リモデリング反応を用いるタンパク質の位置選択的 PEG 化法」を組み合わせることで、抗体中の糖分子を足がかりとしたこれまでにない Dual Warhead 型 ADC の合成を目指すことを目的としている。

3. 研究の方法

図 1 に示したようにまず、糖鎖リモデリング反応に使用する分子内に二種類のクリック官能基を有する二官能性オキサゾリン誘導体の合成を行う。次いでこの合成したオキサゾリンを用いて ENGase による糖鎖リモデリング反応を介して抗体を位置選択的に修飾した二官能性抗体の合成を検討する。最終的にこの二官能性抗体に対して 2 種類のクリックケミストリーを組み合わせた「Dual click 反応」を行うことで抗体に分子に対して位置選択的に 2 種類の異なる薬剤分子を導入することで Dual warhead 型 ADC を目指す。

鍵となる 2 種類のクリックケミストリーについてはとテトラジン (Tet) と *trans*-シクロオクテン (TCO) との間で進行する歪み促進逆電子要請型 Diels-Alder 反応とアジド (N_3) とジベンゾシクロオクテン (DBCO) を用いる Huisgen 環化付加反応を利用する。すなわち、「薬物 A」の結合した TCO 誘導体を加えることで Tet 残基との間に歪み促進逆電子要請型 Diels-Alder 反応が進行する。この際、TCO 基は N_3 基とは反応しない。次いで精製することなく one-pot で第二段階目のクリック反応である Huisgen 環化付加反応を行うための「薬物 B」の結合した DBCO 誘導体を添加することで残った N_3 との間に反応が進行し、その結果 2 種類の異なる薬剤が導入された抗体の合成が可能になる。

いずれの反応も基質同士を室温で混合するだけで自発的に速やかに進行する反応であり、既に生体高分子の修飾に幅広く使用されている。

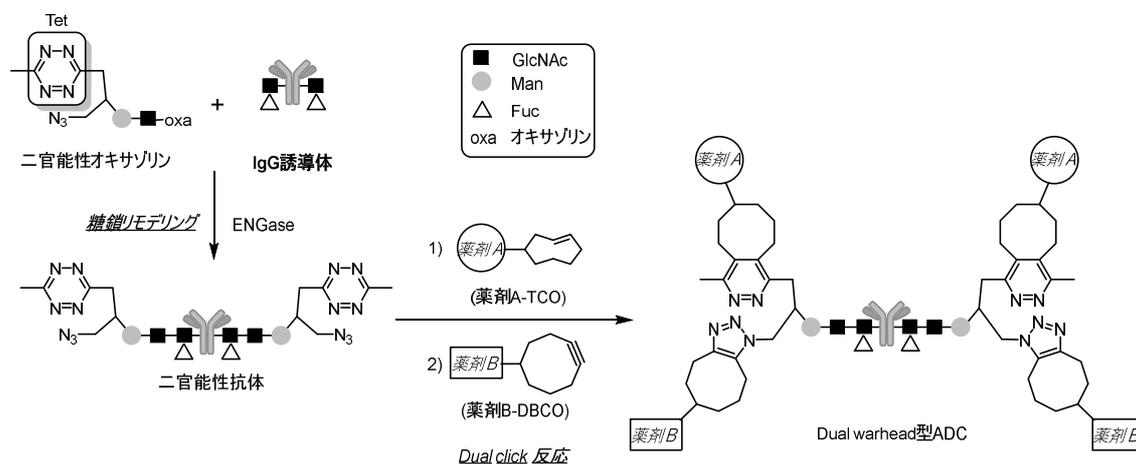


図1

4. 研究成果

前述したように我々の目的とする「Dual Warhead 型 ADC」の合成には、薬物導入の際に Tet と TCO による逆電子要請型 Diels-Alder 反応と N_3 と DBCO 間の Huisgen 環化付加反応を連続的に行う Dual click 反応を行うことを計画している。このためにはこの前段階である糖鎖リモデリング反応の基質として分子内に Tet と N_3 をそれぞれ有する二糖オキサゾリンが必要不可欠である。しかしながら、合成を進めていく中で最終工程であるオキサゾリン骨格の構築およびその後のオキサゾリンの保存条件下で必須となる塩基性条件下において Tet 基が分解することが明らかとなった。そこでまず、Tet 基の安定な反応条件や保存条件に使用する塩基の種類を種々検討した。その結果、これらの問題を克服することができ、Tet 含有オキサゾリン体（この段階では N_3 基は含まない）の合成および保存条件の確立に成功した。さらにこの Tet 含有オキサゾリンは ENGase の基質として認識されることも明らかにすることができた。

これら結果を踏まえ、糖鎖リモデリング反応の鍵となる分子内に 2 種類のクリックケミストリーに対応可能なクリック官能基 (Tet 基および N_3 基) を有する二官能性の二糖オキサゾリンの合成について検討を行った。種々検討した結果、図 2 に示したように目的の二官能性オキサゾリン 1 の合成を達成した。

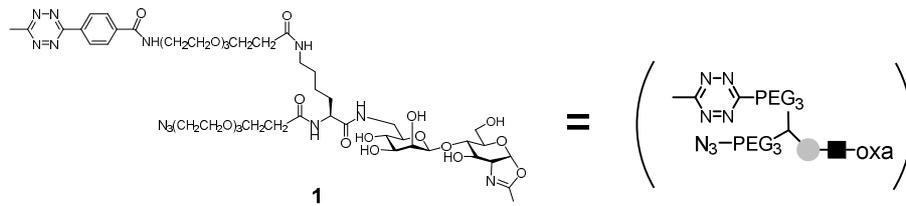


図2

次に合成したオキサゾリン 1 を用いて抗体との糖鎖リモデリング反応について検討した。その際、生成物を詳細に解析した結果、従来の一般的な反応条件ではオキサゾリンの抗体への非特異的な副反応 (Lys 残基側鎖への化学的な反応) が併発していたことが新たに明らかとなった。しかし、この副反応については反応条件を種々検討し、反応温度とオキサゾリンの当量などを適切にコントロールすることで大幅に抑制できることを明らかにすることができた。そこでこの反応条件を用いて実際にオキサゾリン 1 を用いた糖鎖リモデリング反応を検討した。すなわち、抗体として実際に医薬品として上市されているトラスツズマブの誘導体 2 を使用し、また ENGase としては Endo-S2 (WT) を用いることで 1 抗体中に Tet 基と N_3 基を有する二官能性トラスツズマブ 3 を得ることができた。

最後に Dual クリック反応についての検討を行った。そのためのモデル基質として、異なる蛍光基の結合した TCO 誘導体 (TCO-FITC) および DBCO 誘導体 (DBCO-TAMRA) を用いて検討を行った。その結果、2 種類のクリック反応は同一の反応条件下でそれぞれ速やかに進行することが明らかとなり、1 抗体中に異なる蛍光基を導入した Dual 蛍光化トラスツズマブ 4 を合成することに成功した。

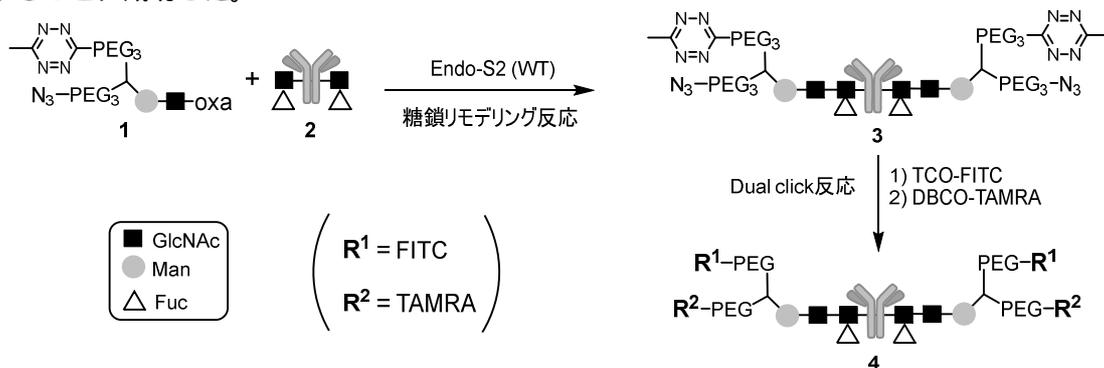


図3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 筒井正斗、後藤浩太郎、二木祐樹、弘瀬友理子、森昌子、八須和子、水野真盛
2. 発表標題 歪み促進逆電子要請型Diels-Alder反応に適用可能な 新規ADC前駆体の合成
3. 学会等名 GlycoTOKYO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 筒井正斗、後藤浩太郎、二木祐樹、弘瀬友理子、森昌子、八須和子、水野真盛
2. 発表標題 SPIEDAC官能基を有するADC前駆体の合成
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 筒井正斗、月村亘、三浦晴香、黒河内政樹、森昌子、弘瀬友理子、橋井則貴、石井明子、杉智和、高田美生、水野真盛、後藤浩太郎
2. 発表標題 非天然型PEG化糖オキサゾリンを用いた位置特異的ADCの合成とその特性評価
3. 学会等名 Glyco TOKYO 2023シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水野真盛、後藤浩太郎、月村亘、橋井則貴、高田美生、石井明子、杉智和
2. 発表標題 糖鎖リモデリング法で合成した部位特異的薬物搭載ADCの特性解析
3. 学会等名 第2回日本抗体学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 筒井正斗、後藤浩太郎、月村 亘、黒河内政樹、森 昌子、八須和子、弘瀬友理子、関川寧音、高田美生、杉 智和、水野真盛
2. 発表標題 非天然型糖鎖オキサゾリンを用いた位置選択的ADCの合成と機能評価
3. 学会等名 第7回FCCAシンポジウム・グライコサイエンス若手フォーラム2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ポリエチレングリコール鎖を有する党化合物、および抗体薬物複合体の前駆体	発明者 後藤浩太郎、水野真盛、松田昭生、月村 亘	権利者 公益財団法人野口研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7144643号	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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
研究分担者	高島 晶 (Takashima Shou) (00300880)	公益財団法人野口研究所・研究部・研究員 (72690)	
研究分担者	月村 亘 (Tsukimura Wataru) (90635830)	公益財団法人野口研究所・研究部・研究員 (72690)	

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
---------	---------