

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業  
事後評価報告書



## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 抗体薬物複合体の非標的細胞内取込に影響を及ぼす特性の解析  
(英語) Studies on unintended internalization into non-target cells of antibody-drug conjugates

研究開発実施期間：令和元年7月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 青山 道彦  
(英語) Michihiko Aoyama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・研究員  
(英語) Researcher, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

## II 研究開発の概要

抗体医薬品に低分子化合物を結合させた抗体薬物複合体 (ADC) は標的細胞表面の抗原に特異的に結合し、細胞内へ移行後、抗体の分解やリンカーの切断等により低分子化合物 (ペイロード) が放出され、薬理活性を發揮する。そのため、ADC は従来の低分子化合物による化学療法と比べ、抗原特異的な薬物送達による広い治療用量域を持ち、安全性と有効性に優れた次世代型抗体医薬品として期待されている。その一方で、従来の抗体医薬品では薬理作用の延長として、抗原を発現する標的細胞 (標的組織以外の抗原発現細胞を含む) において有害作用が認められるのに対し、ADC の有害反応は非標的細胞における毒性が中心であることが明らかとなりつつある (Donaghy H., mAbs. 2016 等)。この標的抗原の発現に依存しない毒性発現機構の一つとして、非標的細胞への ADC の抗原非依存的な細胞内移行とそれに伴うペイロードの放出が仮説として考察されており、取込経路としてマクロピノサイトーシス等による非特異的取込、Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$  R) などの抗体受容体との相互作用による取込が想定されている。しかし、これまでの ADC に関する研究は、主に標的細胞を対象とした抗腫瘍効果、血中半減期の変動、遊離のペイロードの安全性等が評価されており、ADC の非標的細胞への移行や非標的細胞内でのペイロード放出に着目した研究は少ないのが現状である。そこで、本研究では ADC の品質管理戦略の構築に向け、ADC の非標的細胞移行評価系の構築を構築し、ADC の構造的要素 (修飾数、リンカー特性、ペイロード等) の変化をもたらす ADC 特性の違いが非標的細胞移行に与える影響の評価を試みた。

### 1. 実験に使用するモデル ADC の作成

既に上市されている ADC の抗体部分として使用実績のある抗 HER2 抗体 (トラスツズマブ)、ペイロードとして MMAE を使用したモデル ADC を作成するため、有機合成などにより作成したポリエチレングリコール (PEG) リンカーも含めた種々のリンカー構造を持つ [リンカー]-[ペイロード] 複合体の抗体への修飾を実施した。異なるリンカー構造を有する ADC に関し、それぞれ 3 段階の抗体薬物比 (antibody drug ratio; DAR) の ADC を作製することで、PEG 構造を有するリンカーを含めて 6 種類の異なるリンカー構造を有し、3 段階の修飾数 (DAR) を持つ ADC (6 $\times$ 3=18 種類) を作製した。さらに、トラスツズマブの Fc 部分に変異を加えることで、Fc $\gamma$  R に対する結合性を増強・減弱した改変型抗体を用い、Fc $\gamma$  R 結合能の異なる ADC を作製した。

### 2. 各種モデル ADC の特性解析

作成したモデル ADC に関して、物理化学的特性を含む ADC の特性解析を実施した。解析の結果、今回、モデル ADC の作成に使用した [リンカー]-[ペイロード] 複合体 6 種類においては、PEG 構造を有する ADC では PEG による影響で電荷プロファイルの測定が不可能であったが、ADC の電荷プロファイルや抗原結合能にリンカー構造や DAR の違いによる顕著な影響は認められなかった。一方で、DAR の増加に伴い、ADC の疎水性の向上、熱安定性や Fc 受容体結合性の低下が認められ、その変動の大きさはリンカー毎に異なることが確認された。また、37 $^{\circ}$ C、培地中における ADC からの [リンカー]-[ペイロード] 複合体の遊離 (リンカー安定性) を評価した結果、リンカー構造や DAR を問わず、ADC から経時的に [リンカー]-[ペイロード] 複合体の遊離が認められ、[リンカー]-[ペイロード] 複合体の遊離しやすさにリンカー構造の違いが影響している可能性を見出した。以上のように、いくつかの ADC の特性において DAR 依存的な変化が認められるとともに、リンカー構造の違いに起因すると考えられる変化が認められた。

### 3. リンカー構造や修飾数の異なる ADC の標的細胞移行性

リンカー構造などの違いが標的抗原を発現する細胞に対する ADC の細胞傷害性に与える影響を評価するため、HER2 陽性細胞である SK-BR-3 にリンカー構造が異なる ADC を作用し、細胞傷害性を評価した。その結果、一部の ADC においては DAR に関わらず、ADC 化していないトラスツズマブと同等の細胞傷害性を示した一方で、多くの

ADC は DAR 依存のかつトラスツズマブよりも高い細胞傷害性を示した。さらに、ADC のリンカー構造の違いにより、同程度の DAR を有する ADC であっても標的細胞傷害性が異なることから、ADC の標的細胞移行性はリンカー構造によって異なることが示唆された。

#### 4. リンカー構造や修飾数の異なる ADC の非標的細胞移行性

リンカー構造などの違いが標的抗原を発現しない細胞に対する ADC の細胞傷害性に与える影響を評価するため、様々な非標的細胞に ADC を作用させ、細胞傷害性を評価した。その結果、リンカー構造の違いにより細胞傷害性に差が認められ、いずれの非標的細胞においても同様の傾向が認められた。しかしながら、標的細胞傷害性が高い ADC であっても非標的細胞傷害性は高いとは限らず、ADC のリンカー構造が標的細胞移行性（抗原依存的な細胞内取込）、非標的細胞移行性（抗原非依存的な細胞内取込）に及ぼす影響は異なることが明らかとなった。さらに、従来、ADC の非標的細胞内移行経路の一つとして想定されていた  $Fc\gamma R$  を介した細胞内取込に関しては、強制発現細胞株を含む  $Fc\gamma R$  発現細胞株において細胞傷害性の増強は認められず、さらには  $Fc\gamma R$  の阻害抗体との共培養や  $Fc\gamma R$  結合能を増強/減弱した ADC を作用させた際にも  $Fc\gamma R$  発現細胞における ADC の細胞傷害性に変化がなかったことから、 $Fc\gamma R$  を介した細胞内取込経路は少なくとも単量体の ADC の非標的細胞内移行に対しては寄与が非常に少ない、あるいはないと考えられた。

#### 5. ADC の凝集に伴う影響の評価

ADC は一般に疎水性の高いペイロードの搭載に起因して、しばしば凝集を引き起こすことが知られている。これらの凝集体は薬理作用の低下や体内動態の変動の原因となる可能性が指摘される一方で、凝集した ADC の非標的細胞への影響は殆ど明らかとなっていない。そこで、人為的に凝集させた ADC 凝集体をさまざまな非標的細胞に作用させた際の細胞傷害性を評価した。その結果、一部の非標的細胞において凝集に伴う ADC の非標的細胞傷害性の顕著な増強が認められた。細胞傷害性の増強が認められた細胞の一部は  $Fc\gamma R$  が発現していたことから、我々が独自に作成した  $Fc\gamma R$  強制発現レポーター細胞株を用い、ADC 凝集体の  $Fc\gamma R$  活性化と細胞傷害性を評価した。その結果、ADC 凝集体の  $Fc\gamma R$  活性化能と  $Fc\gamma R$  発現細胞における細胞傷害性が相関することが見出された。そこで、 $Fc\gamma R$  の阻害抗体や  $Fc\gamma R$  結合能を増強/減弱させた ADC を用い、ADC 凝集体の非標的細胞内移行における  $Fc\gamma R$  の寄与を評価した結果、ADC 凝集体による  $Fc\gamma R$  活性化が ADC の細胞傷害性の増強に重要であることを明らかとした。以上の結果から、 $Fc\gamma R$  活性化能を有さない ADC 凝集体や単量体の ADC とは異なり、 $Fc\gamma R$  活性化能を有する ADC 凝集体の非標的細胞内移行に  $Fc\gamma R$  が重要な役割を果たすことを見出した。

本研究課題では、独自に作成したリンカー構造や修飾数、さらに  $Fc\gamma R$  結合能が異なるモデル ADC を用い、ADC の非標的細胞取込機構の一部を明らかとするとともに、ADC の特性及び標的/非標的細胞内移行にリンカー構造や修飾数が大きく影響することを示した。リンカーの構造の違いが ADC の細胞傷害性に及ぼす影響は標的細胞と非標的細胞で異なり、標的細胞傷害性に優れ、非標的細胞傷害性が低い（有効性、安全性に優れる）ADC がある一方で、標的細胞傷害性、非標的細胞傷害性がともに高い（安全性が低い）ADC も認められるなど、ADC の開発において標的細胞に加え、非標的細胞に及ぼす影響を評価することの重要性が示された。今後、ADC の開発時において、標的細胞/非標的細胞に対する細胞傷害性バランスを評価することで、開発初期での安全なリンカー構造の絞り込みが可能になるなど、ADC 開発の促進が期待される。また、抗体医薬品において、今回の ADC 凝集体と同程度の大きさの凝集体（sub-visible particle, SVP; 粒子径 0.1-100  $\mu\text{m}$ ）は免疫原性のリスク要因とされ、現在、規制の範囲外である SVP に関する品質管理の重要性が指摘されている。本研究課題において ADC の SVP が免疫原性のみならず、オフターゲット毒性のリスク要因であることが示唆されたことから、ADC 製剤中に存在する SVP のリスク評価などさらなる検討が必要であるものの、ADC においては従来の抗体医薬品以上に SVP に留意する必要があると考えられる。今後、ADC の非標的細胞移行に着目した研究が更に発展することで、従来よりも

安全性に優れた ADC の開発が進むことを期待する。

なお、本研究課題の成果の一部は、下記の学術論文にて公表した。

Aoyama M, Tada M, Yokoo H, Demizu Y, Ishii-Watabe A., Fcγ Receptor-Dependent Internalization and Off-Target Cytotoxicity of Antibody-Drug Conjugate Aggregates, *Pharm Res.* 2022 Jan;39(1):89-103.

Antibody-drug conjugates (ADCs), which are monoclonal antibodies (mAbs) conjugated with highly toxic payloads, achieve high tumor killing efficacy due to the specific delivery of payloads in accordance with mAbs' function. Therefore, it is expected that ADCs will reduce the systemic exposure of cytotoxic small molecules while providing a wider therapeutic window compared with traditional chemotherapy, and the development and commercial application of ADCs have been progressing in recent years. On the other hand, for many approved or in-clinical development ADCs, the reported toxicities have been mainly independent of the target expression. Some potential mechanisms of off-target toxicity of ADCs were proposed, and target-independent internalization of ADCs into non-target cells is one of the putative mechanisms of off-target toxicity of ADCs. ADCs can be internalized into non-target cells by Fcγ receptors (FcγRs)-mediated cellular uptake and non-specific cellular uptake such as micropinocytosis, and released payloads in non-target cells may cause adverse effects. In addition, it is known that mAbs aggregates have potential risk for immunogenicity because they could activate FcγRs and are internalized into the immune cells. However, the studies focused on internalization of ADCs and ADC aggregates into non-target cells are still limited, and the assays to evaluate them is not enough.

In this project, we developed the assays to evaluate the internalization of ADCs and ADC aggregates into target cells and non-target cells. To identify the characteristics of ADC which affect the internalization into target cell and non-target cells, we generated ADCs with different linkers including polyethylene glycol (PEG) linkers and different antibody drug ratio (DAR) (6 linkers × 3 different DAR) by using TCEP reduction of disulfate bonds and maleimide conjugation to a free thiol group. The generated ADCs had different hydrophilic property, thermal stability, and FcγR-binding activity according to their linker structures and DAR while ADCs showed similar charge and antigen-binding property. The internalization of ADCs into target positive cells and target negative cells was evaluated by cytotoxicity of ADCs, and fluorescent intensity of fluorescent labelled ADC (ADC-FL) treated cells. In HER2-positive cell (SK-BR-3 cell), ADCs showed different cytotoxicity depending on linker structure and DAR. In several target negative cells including FcγR-expressing cells, ADCs and ADC-FL showed different cytotoxicity and internalization property depending on linker structure and DAR but independent from cytotoxicity in target positive cells. These results suggested that linker structures affected the internalization of ADCs, and impact of linker structures on internalization of ADCs were different between target-dependent internalization and -independent internalization. In addition, unexpectedly, the FcγR-expression did not correlate on ADC internalization into non-target cells regardless of linker structures and DAR. We found that Fc-engineered ADCs which had enhanced or silence FcγR-binding property showed similar cytotoxicity compared with wildtype ADCs regardless of FcγR-expression of target-negative cells. However, ADC aggregates with FcγR-activation properties showed dramatically enhanced cytotoxicity in FcγR-expressing cells, and FcγR-blocking or Fc-engineering to silence the Fc-mediated effector functions of ADC was suppressed the enhanced cytotoxicity of ADC aggregates. These results indicated that FcγRs play an important role for target-independent internalization of ADC aggregates but not monomeric ADCs, and the aggregation of ADCs increases the potential risk for off-target toxicity of ADCs.

In this study, we succeeded in unraveling a part of mechanism of cellular uptake of ADC and ADC aggregates into non-target cells and demonstrating the impacts of linker structures and DAR of ADCs on target-independent internalization of ADCs. In addition, our results indicated that aggregation of ADCs should be controlled much more carefully compared with the aggregation of other biopharmaceuticals, including mAbs, from the points of view of off-target toxicity and immunogenicity.