

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 希少がん標的型のポドプラニン抗体薬実用化
(英語) Practical Application of Anti-Podoplanin Antibody Targeting Rare Cancers

研究開発実施期間: 平成30年9月18日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 高山 和江
(英語) TAKAYAMA, KAZUE

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) アピ株式会社 医薬事業本部 バイオ開発部 課長代理
(英語) Assistant Manager, Bio Development Dept. Pharmaceutical Div. API Co., Ltd.

II 研究開発の概要

1. 研究開発の目的

がん研究会の藤田らは、2003年に世界で初めて血小板凝集促進活性物質であるポドプラニンを発見し、ポドプラニンを起点とする血小板凝集が様々ながんの増殖・転移に関与していることを明らかにしてきた。さらに、藤田らは、このポドプラニンと血小板に発現している CLEC-2 との結合に、これまでに同定していたポドプラニン上の PLAG3 ドメインだけでなく、2016年に新たに同定した PLAG4 ドメインが強く関与していることを明らかにし、PLAG4 ドメインを標的とする中和抗体ががんの治療薬になり得ることを見出した。平成27年11月から、本抗体の医薬品化を目指してアピ株式会社(岐阜市)と共同研究契約を締結し、AMED「平成28～29年度産学連携医療イノベーション創出プログラム イノベーションセットアップ事業 (ACT-MS)」の研究費支援のもとで抗ポドプラニン中和抗体のヒト化(以下「ヒト化中和抗体 AP201」)に成功し、ポドプラニンの発現が亢進している骨肉腫 SJS-1 細胞株を移植したマウス肺転移モデルにおいて、この抗体が転移を抑制することを確認した。

希少がんの一つである骨肉腫は、AYA世代(15～29歳)を好発年齢とし、約50～100万人に1人という割合で発生し、従来型の抗がん剤と手術療法が治療の基本となっている。このため、AYA世代における妊孕性、晩期合併症、発育や教育等への影響が懸念されており、新しい治療法が望まれている。本開発では、日本のアカデミア発の研究成果を基にしてAYA世代の希少がんである骨肉腫を対象とした抗体医薬を、サルコーマセンターを併設するがん専門病院を擁す公益財団法人がん研究会とアピ株式会社の共同体で開発し、治

験準備を進めることを目的とし、アピ株式会社ではヒト化中和抗体 AP201 原薬の製造及びコンパニオン診断薬開発を、がん研究会では病態モデルを使用したヒト化中和抗体の効果・安全性の検証、診断システムの確立を行った。

2. 研究開発の成果

ACT-MS より継続して開発を進めていたヒト化抗体 AP201-I5 は、ポドプラニンへの結合活性を有するが、ポドプラニン-CLEC-2 の結合阻害活性は完全ではなく、がん研究会のシーズ（マウス抗ポドプラニン抗体 PG4D2）と比較し転移抑制作用が弱いことが判明した。そこで、ACT-M では、再選抜を行い、PG4D2 と同等の結合阻害活性を有するヒト化中和抗体 AP201 の取得に成功し、「抗ポドプラニン抗体」特許 6737482 (2020. 7. 20) として特許登録を完了した。

ヒト化中和抗体 AP201 を製造するため、高発現ベクタープラットフォームを開発し、ヒト化中和抗体 AP201 発現 CHO 細胞株を樹立し、培養及び精製工程を確立した。この工程において製造されたヒト化中和抗体 AP201 は、純度 98%以上の抗体分子で、結合阻害活性は PG4D2 と同等であり、その不純物プロファイルは、宿主由来タンパク質 22.8ppm（規格 100 ppm 未満）及び宿主由来 DNA 0.9 pg/mg protein（規格 10 ng/dose）、エンドトキシンは定量限界以下であり、高品質の抗体であることが確認された。また、このヒト化中和抗体 AP201 原薬の製剤処方での予備安定性試験を実施し、25℃での保管で 3 箇月間安定であることを確認した。

コンパニオン診断薬の開発において、血液中のポドプラニンを測定するための世界最高感度の ELISA 系を組み上げ、がん患者由来の血液検体におけるポドプラニンを定量的に検出することを可能にした。この ELISA 測定法をがん研究会及び臨床検査会社に技術移管し、真度及び精度（室内・室間再現精度）などの基準を満たしていること（試験法の妥当性）を確認した。さらに、がん研有明病院に設置されているサルコーマセンター及び整形外科と連携し、検体提供の同意が得られた骨軟部腫瘍患者からの血液検体を収集し、開発した診断薬を用いて血中ポドプラニン濃度の測定を行った。その結果、血中ポドプラニン濃度と悪性度が正の相関を示すこと及び骨肉腫以外に脂肪肉腫や未分化多形肉腫などにおいても高い血中ポドプラニン値を示すことが判明した。さらに、検体提供の同意が得られた骨肉腫患者の手術検体を包埋したパラフィン包ブロックを被験試料として、マウス抗体 PG4D2 を用いた免疫組織染色 (IHC) システムを確立し、病理組織検査を行った。その結果、骨肉腫の約 40%でポドプラニン陽性であることが確認され、ポドプラニン陽性症例における予後や再発/転移との相関を検証したところ、強陽性腫瘍では予後が不良であることが明らかとなった。これらのことから、ポドプラニン発現骨肉腫の予後は不良であり、PG4D2 抗体を用いた IHC によるポドプラニン発現の確認は、将来的なヒト化中和抗体 AP201 による治療対象患者の選別に有用であることが示唆された。

一方、*in vivo*における作用を評価するために病態モデルの作製に取り組み、公的細胞バンクから入手したポドプラニンの過剰発現が確認された骨肉腫細胞株 SJSA-1 を用い、マウス肺転移モデルと皮下移植モデルを構築し、ヒト化中和抗体 AP201 投与により腫瘍増殖と肺転移が有意に抑制されることを確認した。さらに、ポドプラニン陽性の骨肉腫 PDX モデル 10 系統とポドプラニン陽性の骨肉腫及び肺扁平上皮がん PDC 17 株の樹立などに成功した。

非臨床安全性試験において、ポドプラニンは種差があり、抗体分子自体の安全性の評価は可能であるが、実験動物としてサルを用いた生物学的な安全性の評価を行うことは困難である。そこで、予備検討として、ヒト化中和抗体 AP201 のサル配列に対する結合性を調べたところ、定量的にヒト配列に対する結合性の約 3.68% (EC50 ヒト配列/EC50 サル配列) であり、定性的には非特異的な結合は見られないことが明らかとなった。この種差の問題を解決するために、ヒト化中和抗体 AP201 が認識するヒトポドプラニンノックインマウスを作成し、ヒト化中和抗体 AP201 の安全性を評価したところ、血液中では一般の抗体医薬品と同等レベルの安定性を持つこと、さらに、一般状態観察、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び器官重量測定

において毒性を示唆する兆候は全く認められず、極めて高い安全性が確認された。

3. 研究開発の意義等

本研究開発は、がん研究会シーズである抗ポドプラニン抗体を社会実装するために実施された。アピ株式会社では、非臨床用のヒト化中和抗体 AP201 の原薬製造まで行い、がん研究会ではポドプラニン抗体の薬効薬理エビデンスを取得した。さらに、世界最高感度のコンパニオン診断薬用 ELISA 系を開発し、ポドプラニンと骨肉腫・骨軟部腫瘍の予後との関連性を明らかにした。さらに、IHC においてもポドプラニンの強陽性腫瘍で予後が不良であることが明らかとなった。本研究開発により、AYA 世代の希少がんの治療・診断に大きく貢献するファーストインヒューマン抗体医薬品の治験準備を完了した。最近では、ポドプラニンが深部静脈血栓症や肺血栓塞栓症などの原因である可能性も示唆されており、1 兆円超の規模を誇る血栓症治療薬の市場にも抗ヒトポドプラニン中和抗体が新規作用機序の治療薬として応用できる可能性がある。このように、本研究開発事業で開発されたヒト化抗体である抗ヒトポドプラニン中和抗体は新たな創薬トレンドや新産業の創出を生み出していく可能性がある。

Podoplanin is a platelet aggregation-promoting active substance discovered by Fujita *et al.* in 2003, and it has been shown that platelet aggregation with podoplanin is involved in the growth and metastasis of various cancers. Fujita *et al.* found that a neutralizing antibody targeting podoplanin could be a potential therapeutic agent for cancer. In order to demonstrate this finding, we established a humanized anti-podoplanin antibody (AP201) under the research grant support of AMED ACT-MS in 2016-2017. We have confirmed that this antibody suppresses metastasis in a mouse lung metastasis model in which the SJSA-1 cell line, an osteosarcoma cell line with elevated podoplanin expression, was transplanted. Osteosarcoma, one of the rare cancers, has a high incidence in the AYA generation (15-29 years old). Conventional cancer therapy and surgery are used as basic treatments, thus a new treatment method is desired. The purpose of this project is to develop an antibody drug for treating osteosarcoma based on the results of research originating in Japanese academia, in collaboration with the Japanese Foundation for Cancer Research, home of the Sarcoma Center, and API Co., Ltd.

We succeeded in establishing AP201, possessing a complete binding inhibition of podoplanin-CLEC-2 in ACT-M. In order to establish a cell line for the production of AP201, we developed a high expression vector platform, established the CHO cell line expressing AP201, and conducted a culture and purification process. This antibody was confirmed to be a high-quality antibody molecule with purity of more than 98%, binding inhibition activity equivalent to PG4D2, an impurity profile (host-derived protein and host-derived DNA) within the specifications, and endotoxin below the limit of quantification. Furthermore, we conducted a preliminary stability test on the drug formulation of AP201 and confirmed that it was stable for at least three months in storage at 25°C.

In the development of companion diagnostics, we were able to assemble the highly sensitive ELISA system for measuring podoplanin in blood samples from cancer patients. In collaboration with the Sarcoma Center and the Department of Orthopedic Surgery at the Cancer Institute Hospital, we measured the concentration of podoplanin in blood collected from donor patients with bone and soft tissue tumors. The results showed a positive correlation between the blood podoplanin concentrations and malignancy. Not only in osteosarcoma, but high blood podoplanin levels were also found in liposarcoma and undifferentiated pleomorphic sarcoma. Furthermore, using paraffin-embedded blocks of surgical specimens from donor osteosarcoma patients, we established an immunohistochemical staining system using the mouse antibody PG4D2, and confirmed that about 40% of osteosarcomas are positive for podoplanin. These results showed that the prognosis of podoplanin-expressing osteosarcoma is poor and that the diagnostic systems are useful for selecting patients for future treatment with AP201.

To establish a pathological model, we constructed a mouse lung metastasis model and a subcutaneous transplantation model using SJSA-1 and confirmed that tumor growth and lung metastasis were significantly suppressed by administration of AP201. In addition, we confirmed that AP201 significantly suppressed tumor growth and lung metastasis. We also succeeded in establishing 10 podoplanin-positive osteosarcoma PDX model lines and 17 podoplanin-positive osteosarcoma and lung squamous cell carcinoma PDC lines. Podoplanin varies between species, and thus, it is probably difficult to evaluate the biological safety using monkeys. In a preliminary study, we examined the binding of AP201 to monkey sequences and found that quantitatively, the binding to human sequences was about 3.68% (EC50 human sequence/EC50 monkey sequence), and qualitatively, no non-specific binding was observed. In human podoplanin knock-in mice recognized by AP201, which was established to solve the problem of species differences, AP201 was confirmed to have the same level of stability in the blood as general antibody drugs *in vivo*, as well as extremely high hematological and histological safety.

Lastly, the humanized anti-human podoplanin-neutralizing antibodies developed in this research and development project have the potential to create novel therapies for cancer and generate a new industry.

III 事後評価総合所見

独創性の高いがん治療薬の開発研究であり、アピ株式会社とがん研究会がそれぞれの強みを発揮した産学連携体制により課題を推進し、当初の目標を基本的に達成していること、対象疾患としての骨肉腫に対する有用性、臨床的意義も明確に示していることが高く評価された。

一方で、非臨床の段階までは順調に進捗してきたが、課題の終了時点でアピ株式会社との連携がやむを得ない事情により解消されてしまい、さらに今後の臨床実装に不可欠な導出企業が決まっていないため、GMP管理下での製造が懸念される。今後、導出に向けた製薬企業との提携が必須となるが、希少がんのみならず、発生頻度の高い癌種でもポドプランニン発現腫瘍への応用が可能であり、がん治療における新たな選択肢となることも期待されることから、今後の発展を大いに期待する。