

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) 抗不溶性フィブリン抗体・薬物複合体の開発
(英語) Development of Anti-Insoluble Fibrin Antibody-Drug Conjugate

研究開発実施期間: 令和元年8月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 吉松 賢太郎
(英語) Kentaro Yoshimatsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 株式会社凜研究所 代表取締役社長
(英語) RIN Institute Inc., President

II 研究開発の概要

【研究開発の目的】

早期の段階の固形がんは、がんの発生病所においてがん細胞が増殖しても物理的に周囲の正常組織へ影響を与える程度である。しかし、がんが進行しステージ4という段階に至るとがん細胞は増殖能に加えて運動能や浸潤能を獲得し悪性化した状態となる。固形がんの組織はがん細胞とそれを支える間質と呼ばれる成分から構成されており、間質には線維芽細胞と呼ばれる細胞、腫瘍血管やリンパ管を形成する細胞、炎症をつかさどる細胞などの多種類の細胞、さらにこれらの細胞間に存在するコラーゲンなどの細胞外マトリックスおよびそれに結合する生理活性物質が存在する。

悪性化したがん細胞は間質中を浸潤し間質に存在する腫瘍血管を攻撃することにより、傷害を受けた腫瘍血管から血液が漏出して凝固塊（不溶性フィブリン）が生じる。悪性化したがん細胞により生成された不溶性フィブリンは長期にそのまま存在するわけではなく分解（線溶）も起こっていると考えられるが、がん細胞の腫瘍血管の攻撃による不溶性フィブリンの生成は継続的に起こるため、がんの間質全体として不溶性フィブリンは継続的に存在している。一方、正常においては微小な凝固塊が生成しても速やかに分解されるため継続的に存在することはない。炎症等で血管が傷害を受けた時に生成することはあり、動物モデルにおいて不溶性フィブリンの生成を確認したが、炎症で生じた傷の治癒とともに消失することも示されている。また、がんの間質以外での不溶性フィブリンの生成について、特に無症候性の血栓性疾患をもつ患者に投与された場合のリスクを考慮して、血栓性病態を有する動物モデルにおいて非 GLP 安全性試験も実施した。

本課題においては、既存の抗体薬物複合体 (ADC) 薬とは異なるユニークな ADC の創出を目指し、1) 固形がんの間質に存在する不溶性フィブリンに特異的な抗体の親和性向上の検討を行い、開発抗体を選定しリサーチバンクを樹立、2) 不溶性フィブリン上で活性化される線溶系酵素プラスミンで切断される切断配列を有するユニークなリンカーと固形がんの有効な抗がん剤の組み合わせの検討を行い、開発に用いる ADC の創出、3) その創出された ADC を用いて、間質を有する Patient-Derived Xenograft (PDX) モデルにおける抗腫瘍効果、4) 血栓性病態モデルにおける非 GLP 安全性試験、5) トランスレーショナル試験として不溶性フィブリンを豊富に有するがん組織の診断法の検討、を行うことを目的とした。

【研究開発の成果】

ACT-M 開始前に得ていたヒト化抗不溶性フィブリン抗体 (野生型) の親和性向上の検討を行い、SPR (表面プラズモン共鳴) を用いた結合親和性の検討、in vitro における不溶性フィブリンへの結合活性と選択性、体内動態、ADC 化後の抗腫瘍効果の検討により開発抗体を選定した。次に、その抗体のアミノ酸配列をもとに作製したプラスミドを CHO 細胞に導入し、純度や SDS-PAGE、SE-HPLC、LC-MS、糖鎖プロファイル、電荷バリエーション分析による確認、結合活性、産生量などの問題のない抗不溶性フィブリン抗体を産生するリサーチセルバンク (研究用細胞バンク) を作製した。なお、ACT-M の研究開発期間終了後に研究開発に必要な資金を得た上で、このリサーチセルバンクの細胞を使って GMP 下でマスターセルバンクを作製し、GLP 安全性試験用の被験物質および治験薬の製造を行う予定である。

リンカーと抗がん剤の組み合わせについては複数の抗がん剤を用いて検討を行った。いくつかの抗がん剤とリンカーの組み合わせでは、プラスミン切断による抗がん剤の遊離が十分でなく、あるいは、血漿中での安定性に問題のあることが判った組み合わせも存在した。一方、最終的に選択した抗がん剤ではプラスミンで切断されるリンカーとスペーサーの組み合わせにより、抗がん剤の遊離も安定性も良好なものを見出すことに成功した。これらを抗不溶性フィブリン抗体に結合させた ADC を作製し、優れた抗腫瘍効果を示した ADC を開発用 ADC として決定した。

この開発用 ADC について、抗がん剤と抗体の結合比 (DAR) として 4 の ADC を作製し、ヒト膵がん組織を移植した PDX モデルにおいて検討を行った。PDX モデルという通常の xenograft モデルに比べてより臨床に近く、がんの間質を多く含むために抗腫瘍効果を得にくいと言われているモデルにおいて、腫瘍の縮小効果という期待以上の結果を得ることが出来た。また、ACT-M の研究開発期間終了後に、DAR の検討を行い DAR=8 の ADC も作製可能であること、膵がん PDX モデルおよび GBM (Glioblastoma Multiforme、グレード 4 のグリオブラストーマ) PDX モデルにおける抗腫瘍効果は DAR=4 よりも良好であることが判った。この結果をもとに、評価用 ADC の作製を完了させた。

血栓を有する動物における非 GLP 安全性評価については、ACT-M 研究期間中にはマウス頸動脈に血栓を生じさせるモデル (PIT 法: photochemically induced thrombosis、緑色光と光感受性色素 (ローズベンガル) という光化学反応を利用した血栓作製法) を用いて検討し、この ADC 投与で出血や血栓周囲の正常組織の障害は認められなかった。また、ACT-M 研究開発期間終了後の実施となったが ADC (DAR=8) を用いて、トロンビンを経脈内投与することで全身に生じる血栓のモデルで検討を行い、ADC (DAR=8) においても病理的な評価により出血や組織傷害を起こさないことを確認した。

今後、種々の PDX モデルにおける抗腫瘍効果の検討および開発に問題ない物性であるかの評価 (Developability Assessment) を実施し、次の非臨床開発段階へ進める計画である。

本抗体のターゲット分子はがん組織中でおきる血液凝固産物の不溶性フィブリンであり、血栓症における血栓部位の不溶性フィブリンと異なり、間質中に diffuse に存在する。また、通常のがん細胞膜表面分子の染色と異なり、腫瘍組織の免疫染色によるコンパニオン診断は定量的な判定が必要であり、本プロジェクトでは適さないという結論になった。なお、最初の臨床開発対象の GBM は、ほぼ全例に不溶性フィブリンの沈着が認められていることを確認しておりコンパニオン診断は必要ないと考えている。

がん組織の不溶性フィブリンの染色ではなく、血中のフィブリン分解産物を定量する方法に変更することを検討した。この方法は、一般臨床でも測定が行われており、がん患者血中のフィブリン分解産物の量は健常者よりも有意に高いことは多くのがんで報告されている。ACT-Mの研究期間終了後ではあるが、膵がん等の患者血清の集積のための国立がん研究センター内におけるIRBの承認を得ており検討を進めていく。

【研究開発の成果の意義】

本プロジェクトはユニークな2つの技術を利用しているが、本課題においてはそれらの技術を開発候補ADCの創出に結びつけたという成果をあげており、その意義は大きい。

1つ目の技術としては、がんの悪性化によりがん細胞が獲得した運動能・浸潤能により腫瘍組織中の腫瘍血管が破壊され継続的に生じる不溶性フィブリン上のエピトープを同定し、そのエピトープは不溶性フィブリンにおいてのみ分子の外に露出することを明らかにし、特異性の高い抗体（抗不溶性フィブリン抗体）を作製したことである。既存のADCにおいては、正常細胞とがん細胞の抗原発現の量的な違いを利用しており、正常細胞に発現する抗原に対する傷害作用のために、抗がん剤投与に類似した毒性の発現を避けることは出来ていない。フィブリンの沈着が炎症や心筋梗塞や脳梗塞の急性期に血管内に血栓等として生じるが、これらは生体の恒常性維持のメカニズムにより体内より消失する。一方、がんにおいては継続的に不溶性フィブリンが生成されることから、血栓性の疾患の急性期を避けることにより、がん以外の部位で抗がん剤がリリースされることを避けることは可能である。さらに、血栓を有する病態モデルにおいて、ADCを投与することにより血栓周囲の出血や組織障害は認められないことを確認できている。これは、抗がん剤は細胞の増殖を抑制することで細胞傷害を起こすが、正常血管やその周囲においては血管内皮細胞や組織に存在する細胞はほとんど増殖していないためと考えている。

2つ目の技術としては、がんの治療を目指した既存の抗体薬物複合体（ADC）薬は、がん細胞膜上に発現している分子に対する抗体を用いて、ADCが細胞内のエンドソームに取り込まれライソソームで分解され、細胞内に抗がん剤が放出されることにより、がん細胞を傷害するという機序であり、抗体と抗がん剤を結びつけるリンカーは、ライソソームに存在する酵素（カテプシンなど）により切断される構造を持っている。一方、本技術においては、不溶性フィブリン（血液凝固産物）上でプラスミンがプラスミノゲンから活性化（変換）されることを利用して、リンカーとしてプラスミンで切断されるものを用いていることに特徴があり、抗がん剤は腫瘍組織に存在する不溶性フィブリン上で特異的にリリースされ、がん細胞や腫瘍血管内皮細胞に取り込まれて殺細胞効果を発揮する。従って、がん細胞表面上の抗原を狙ったADCで問題となるがん細胞の抗原発現のheterogeneityの影響を受けることはない。

上記の2つの技術を活用して創出されたADCは、臨床を反映するモデルである膵がんPDXモデルやGBM PDXモデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を示したことより、悪性度の高いがんに対する抗がん剤となることが期待される。本ACT-Mの支援により開発候補ADCの決定を行うことが出来たことは大きな成果であり、この成果は悪性化した難治性のGBMや膵がんなどに対して有効な新しい治療薬の開発が求められていることから考えて意義のある成果と考えている。さらに、本研究開発課題の当初の目的が挑戦的で高いものであったためとACT-M開始直後にCOVID-19感染防止対策により研究室の使用制限があったため、いくつかの研究開発項目（GLP試験用のADCの製造、コンパニオン診断法）は未達であったが、ACT-M研究開発期間終了後に速やかにDARの最適化、評価用のADCの製造、開発用ADCを用いた血栓性病態モデルにおける評価を完了させており、今後、ベンチャーキャピタル・製薬企業との提携・公的な研究資金などが得られれば非臨床開発を進めることが可能である。

Malignant cancer cells (stage 4) acquire motility and invasion ability in addition to proliferation ability. Solid cancer tissue is composed of cancer cells and stroma that supports cancer cells. Malignant cancer cells invade the stroma and attack tumor blood vessels in the stroma, and blood leaks from the injured tumor blood vessels to form insoluble fibrin (blood clot). This insoluble fibrin is continuously produced in advanced cancer, and it is also produced when blood vessels are injured due to trauma, inflammation, etc., but disappears as the wound heals. We planned to conduct a non-clinical study considering the

risks when administered to patients with asymptomatic thrombotic disease. In this project, we aim to create a unique Antibody-Drug Conjugate (ADC) that is different from existing classical ADC. The followings were R&D items, 1) Investigate the affinity improvement of anti-insoluble antibody, select antibody for pre-clinical development, and establish Research Cell Bank (RCB). 2) Creation of ADC for pre-clinical development through optimization of payload, linker and spacer combination, 3) Antitumor effects of ADCs in patient-derived xenograft (PDX) models with stroma containing insoluble fibrin, 4) Non-GLP safety evaluation of ADC in thrombotic model, and 5) Translational study for companion diagnostics.

1) We tried to improve the affinity of the humanized anti-insoluble fibrin antibody (wild type) obtained before ACT-M. Development candidate antibody was selected based on the binding activity and selectivity, pharmacokinetics and antitumor effects of ADC. Next, RCB was established, and the purity, SDS-PAGE, SE-HPLC, LC-MS, glycan profile, charge variant analysis, binding activity, productivity of Ab produced from RCB cells were evaluated. After ACT-M, we plan to create a Master Cell Bank under GMP, and produce test substances for GLP toxicity study and Investigational New Drug for clinical study. 2) Regarding the combination of payload, linker and spacer, we examined several anticancer drugs and our original linker which was specifically cleaved by plasmin. The release of some payloads by plasmin cleavage was not sufficient, and some combinations of payloads, linker and spacer had stability problems. On the other hand, when some anticancer drug with spacers was selected, we could find good efficiency of payload and stability. ADCs were produced by binding to anti-insoluble fibrin antibody, and ADC that showed excellent anti-tumor effects with tumor regression were selected as ADC for development. 3) For development candidate, ADC with drug-antibody ratio (DAR)=4 was prepared, and tested in pancreatic PDX model. PDX model is similar to clinical cancers and contains more abundant tumor stroma compared to the usual xenograft models. It is well-known that PDX is more difficult model to get good antitumor effect than conventional xenograft. After ACT-M, the optimization of DAR has been performed and ADC with DAR = 8 could be produced, and the anti-tumor effect is better than DAR = 4. We plan to conduct Developability Assessment on CMC for DAR=4 and 8 for pre-clinical development. 4) For the non-GLP safety evaluation in animals with thrombus, PIT method (photochemically induced thrombosis with green light and a photosensitive dye (rose bengal)) was used during ACT-M period to induce thrombus in the carotid artery of the mouse). The experiment using ADC with DAR=4 was completed during ACT-M period and no bleeding and no tissue damage were observed pathologically. After ACT-M, ADC with DAR = 8 was tested in model of thrombus that occurs throughout the body by intravenous administration of thrombin, and ADC did not cause bleeding or tissue damage. 5) The target is insoluble fibrin, which is a blood clotting product that occurs in cancer tissue. In addition, unlike usual staining of cancer cell surface molecules, companion diagnosis by immunostaining of tumor tissue, the staining pattern of insoluble fibrin is diffuse and seems to be difficult for quantitative evaluation. As insoluble fibrin deposition is observed in almost all cases of GBM (Glioblastoma Multiforme, grade 4 glioblastoma), which is the first target for clinical development, we consider that a companion diagnosis is not required. Although it could not be completed during the ACT-M research period, we decided to change the method to quantify fibrin degradation products in the blood. It has been reported that the amount of fibrin degradation products in the blood of cancer patients is significantly higher than that of healthy subjects in many cancers. IRB approval has been obtained at the National Cancer Center.

The achievement of creation of development candidate ADC by utilizing two unique technologies is of great significance, 1) technology of the creation of anti-insoluble fibrin Ab which binds the epitope accessible after formation of insoluble fibrin 2) technology of the creation of ADC with the plasmin cleavable linker and payload. The ADC created using two technologies was developed during and optimized just after ACT-M, is expected to be an anticancer drug against highly malignant cancers such as GBM, pancreatic cancer, and other aggressive cancers.

III 事後評価総合所見

リンカーと抗がん剤の最適化を検討して開発用 ADC を決定したこと、選択した ADC は *in vitro* 実験でリンカー&抗がん剤が線溶系のプラスミンにより切断されて抗がん剤がリリースされ効果を示すこと、ヒト膵がん PDX モデル動物において *in vivo* で優れた抗腫瘍効果を示したこと、血栓性病態を有する動物で血栓周囲での出血や正常組織に傷害を与えないことを確認したこと、リサーチセルバンクを樹立して高い産生量と開発に問題のない物性の抗体を産生する株を得たことから、ADC 技術を用いて腫瘍の間質に沈着している不溶性フィブリンを狙った、悪性度の高い固形がんを標的とする新しいがん治療法（間質ターゲティング療法）の実現の推進につながる結果を得たことは高く評価された。

ACT-M 研究開発期間終了後にさらなるデータを取得しており、それらを用いて非臨床試験の実施を目指し、導出先も含めて実用化に期待する。