

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) 緑内障のカルパイン活性化の生体内イメージングシステムの開発
(英語) Development of an *in vivo* imaging system for calpain activation in glaucoma

研究開発実施期間：令和元年8月8日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 中澤 徹
(英語) Toru Nakazawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 東北大学 大学院医学系研究科 眼科学分野 教授
(英語) Professor and Chairman, Department of Ophthalmology, Tohoku University Graduate School of
Medicine

II 研究開発の概要

緑内障は網膜神経節細胞の細胞死が生じ、視野障害を来す疾患である。既存の眼圧下降治療を行っても視野障害が進行し失明に至る緑内障症例が存在し、緑内障は本邦の中途失明原因の第1位である。そのため、網膜神経節細胞死を抑制し緑内障の進行を抑制する神経保護治療が革新的治療として期待されている。

カルパインは、様々な刺激によって細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すると活性化し、細胞死を誘導する。緑内障などの動物モデルにおいて、カルパインの活性化が網膜神経節細胞死を誘導することから、網膜神経保護治療の有力な標的分子の1つである。そして、カルパイン阻害薬は、網膜神経節細胞死を抑制し神経保護作用を示すことから、神経保護治療薬として開発が進められている。

緑内障は多因子疾患であり、カルパイン以外の要因も存在すること、治療効果の判定に必要な鋭敏な評価系が存在しないことから、カルパイン阻害薬による神経保護治療を確立するためには、コンパニオン診断薬の開発による精密医療の導入が重要と考え、本開発に着手した。

本研究開発では、カルパイン活性検出蛍光プローブの硝子体投与により、細胞死を誘導するカルパインが活性化している網膜神経節細胞をヒトで検出可能な生体内イメージングシステムを構築し、失明原因の第1位である緑内障の治療薬として開発中のカルパイン阻害薬のコンパニオン診断薬としての実用化を目指すために、ヒト初回投与試験に向けて必要な非臨床試験を実施するとともに、臨床試験の実施に向けた体制整備を行った。

1. 硝子体注射合剤としての最適化研究

開発当初の化合物であるカルパイン検出蛍光プローブ (Ac-LM-HMRG) をシード化合物として、硝子体注射剤として製剤化が可能なレベルの溶解性及び臨床現場での生体内イメージングに適した反応性の確保を目的とし、Ac-LM-HMRG の誘導体化による構造の最適化検討を実施した。総計 76 種類の誘導体を化学合成し、ペプチド配列やキャップ構造のバリエーションに富んだ化合物群を得た。誘導体の溶解性と酵素反応性を評価し、さらに培養細胞、ヒト iPS 細胞由来の立体網膜組織、緑内障動物モデルを用いたカルパイン活性化の *in vivo* イメージングにおける性能を評価し、硝子体注射剤としての最適な化合物 (以下本薬とする) を創出した。

2. 非臨床薬効薬理試験

本薬の非臨床薬効薬理試験として、ラットに N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) を投与し、網膜神経節細胞のカルパイン活性化を誘導する緑内障動物モデルにおいて、本薬を硝子体注射し、臨床用機器である共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡で生体内イメージングを行った。その結果、本薬のカルパイン活性化に対する良好な反応性が明らかになり、またカルパイン阻害薬のカルパイン活性抑制効果も明らかにした。

また、ヒト iPS 細胞から分化させた網膜神経節細胞及び樹立した立体網膜組織において、グルタミン酸を投与しカルパインを活性化させて、本薬を投与し蛍光顕微鏡で評価した。その結果、本薬は低濃度から、ヒトの網膜神経節細胞でカルパインの活性化を評価できること、グルタミン酸による障害レベルに応じて用量依存的な反応性を示すことを明らかにした。

さらに、眼球のサイズがよりヒトに近いウサギの NMDA 障害モデルを用いた本薬の投与条件の検討により、本薬はシード化合物である Ac-LM-HMRG よりも低用量で良好な反応性が得られることを明らかにした。また、本薬のウサギにおける最適な投与条件を明らかにした。ウサギの硝子体容積を基にヒトにおける投与条件を検討した結果、実臨床でも投与可能な条件であることが明らかになった。

以上のように、非臨床薬効薬理試験の結果、本薬が生体内でカルパイン活性化を検出可能であり、カルパイン阻害薬のコンパニオン診断薬として有用性を示すことを検証した。

3. GLP 対応の原薬の製造及び製剤化

本薬の GLP 対応の原薬の製造及び製剤化として、原薬中の不純物の管理や製造性を焦点に合成法を検討し、合成法を確立した。製造した原薬は GLP 試験用の原薬として後述の非臨床安全性試験に用いた。

また、本薬の製剤化として剤形検討を実施し、製造および保管の条件の最適条件を見出し、治験薬製造のための処方設計を完了した。

4. 非臨床安全性試験

本薬の非臨床安全性試験として、PMDA の RS 戦略相談にて決定した非臨床安全性試験パッケージを実施した。計画した非臨床安全性試験を全て完了し、いずれの試験においても本薬による一般毒性および遺伝毒性は認められず、実施した非臨床安全性試験の範囲では本薬の安全性に懸念は認められなかった。

5. 臨床試験計画及び準備

実施済みの非臨床データパッケージの結果に基づき、臨床試験デザインの検討を行った。被検者の安全性を十分に保ちながら、本薬とカルパイン阻害薬を併用した際の安全性及び有効性について評価が可能な試験デザインの骨子を考案し、PMDA 相談を進めている。さらに、臨床試験の準備として、緑内障神経保護治療開発に活用可能な緑内障レジストリ研究を行い、多数例の緑内障症例の長期臨床データ及び治験参加候補者の収集を進めている。

6. 知財確保

非臨床薬効薬理試験から得られた本薬の特性に基づいて、本薬の特許出願を完了した。

一般的に緑内障の薬物療法としては、眼圧下降薬による治療が行われているが、特に本邦では、正常眼圧緑内障が大半を占め、眼圧に依存しない病態の関与が指摘されており、眼圧下降薬に依存しない治療が求められている。眼圧以外の緑内障の病態の1つとしてカルパインの活性化による網膜神経節細胞障害が注目され、カルパインを標的とした治療の開発が進められている。本研究開発は、活性化したカルパインの検出を目的とした体内診断用医薬品を実用化することにより、カルパイン阻害薬のコンパニオン診断薬として、カルパインを標的とした精密医療の確立に寄与することで、的確な対象患者の選択や医療費の削減に貢献することが期待される。

そして、本研究開発は実施可能な項目を適切に完了し、本薬の実用化を加速させる成果を得ることが出来た。今後、非げっ歯類の反復投与毒性試験を実施することで、本薬のヒト初回投与試験までに必要な非臨床安全性試験を完遂することとなり、本薬の臨床試験を開始することが可能になる。

最終的に、本研究開発の成果は、既存治療でも効果不十分の緑内障患者に対して、視機能障害の進行を抑制し失明を防止することで、社会的にも大きく貢献することが期待される。また、通常ではヒトの網膜組織は生検が困難であり、緑内障を含む様々な網膜疾患のヒトでの病態解明が十分ではない。本薬のような分子の活性や細胞の状態を評価可能な蛍光プローブを活用することで、生体内で網膜の分子・細胞レベルの評価が可能になり、ヒトの網膜疾患の病態解明が進展し、眼科領域の治療の発展に大きなブレイクスルーをもたらす可能性がある。

Glaucoma is the number one cause of blindness in Japan. Neuroprotective treatments to suppress retinal ganglion cell death and slow the progression of glaucoma are hoped for as innovative treatments.

Calpain is activated when the concentration of intracellular calcium ions increases and induces retinal ganglion cell death. Calpain is a potential target molecule for neuroprotective glaucoma therapy. Calpain inhibitors are being developed as neuroprotective drugs, because they suppress retinal ganglion cell death and exhibit neuroprotective effects.

Glaucoma is a multifactorial disease with factors other than calpain, and there is no evaluation system sensitive enough to judge therapeutic effects. We began the development of this treatment because we thought it was important to introduce precision medicine via drug development.

In this research and development project, we constructed an *in vivo* imaging system that can detect human retinal ganglion cells in which calpain, which induces cell death, has been activated by administering a fluorescent probe into the vitreous. We aimed to develop a companion diagnostic tool for practical use, and we thus conducted necessary non-clinical tests.

The system was optimized based on the calpain-detecting fluorescent probe Ac-LM-HMRG, which was used as a seed compound at the beginning of development. We were able to optimize the solubility of the compound to a sufficient degree to use it for vitreous injection, and optimized its reactivity enough to make it suitable for *in vivo* imaging in clinical practice.

We performed a non-clinical pharmacological study by injecting the optimized compound into the vitreous of rats and performing *in vivo* imaging with an N-methyl-D-aspartate (NMDA) model of glaucoma; we also used a rabbit NMDA glaucoma model. The results revealed that the optimized compound had good responsiveness to calpain activation. We also clarified the inhibitory effect of calpain inhibitors on calpain activity. Furthermore, we used retinal ganglion cells differentiated from human iPS cells to establish a 3D retinal tissue model, which let us confirm that the

optimized compound had good reactivity to calpain.

The non-clinical pharmacological study verified that the optimized compound could detect calpain activation in human-derived tissues *in vivo*, and that it was useful as a companion diagnostic agent for calpain inhibitors.

We have established a high-quality manufacturing method for synthesizing the optimized compound at a sufficient scale, and have formulated a design for manufacturing it as an investigational drug.

We also conducted a non-clinical safety study, as decided by consultation with Japan's Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. No general toxicity or genotoxicity was observed in any of the studies conducted.

We outlined a study design that will allow us to evaluate the safety and efficacy of the concomitant use of this drug with a calpain inhibitor while maintaining the safety of the study's subjects. In addition, we are conducting research with a glaucoma registry that will allow us to develop neuroprotective treatments for glaucoma, and we are collecting long-term clinical data from a large number of glaucoma cases and candidates for clinical trials.

We have completed a patent application for the optimized compound developed in this research and development project.

The optimized compound discovered through this research and development project will contribute to the establishment of precision medicine targeting calpain as a companion diagnostic tool for calpain inhibitors. In addition, we expect that this work will greatly contribute to society by suppressing the progression of visual dysfunction and preventing blindness in glaucoma patients who are refractory to existing treatments.

III 事後評価総合所見

コンパニオン診断薬としての酵素反応性に優れる新規カルパイン検出蛍光プローブを創出した。関連する投与方法、評価法、GLP 製造、ICH に準拠した非臨床試験は一部未達であるものの、毒性・安全性試験などもほぼ終了し、特許出願も完了しており課題の目標はほぼ達成したことは評価された。

一方で本課題に関してはカルパインと緑内障を関連付けるためのさらなる論文、口頭発表等による成果の発信が重要であることが指摘された。また臨床試験に関しては試験の計画策定、IRB 申請がやや遅れている。臨床試験を実施する前の段階から薬事専門家を交えて計画を立案し、PMDA 相談を活用して実施内容を確定することが有益と考えられる。製造販売企業にて、国内外の市場の分析、戦略（知財、薬事、事業化）も実施しながら着実に実用化に向けて計画を進めて行くことを期待する。