

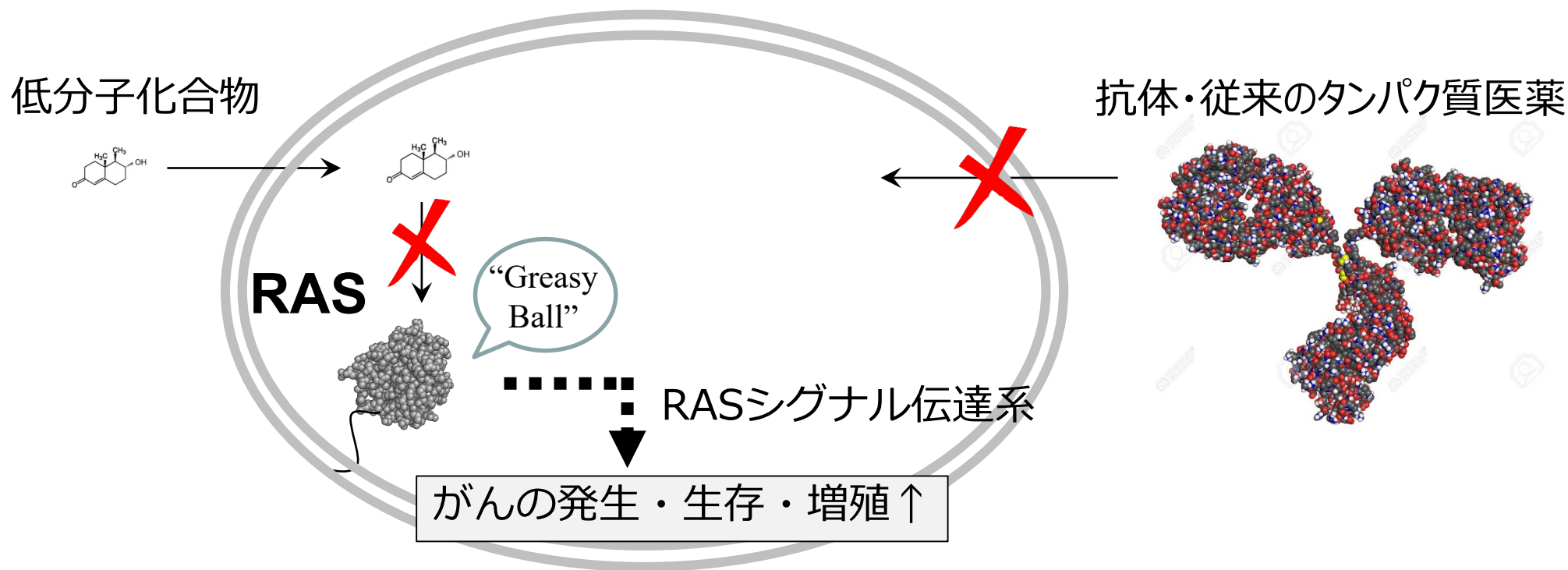
# Rasを標的とする 革新的抗がん剤の開発

岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科  
助教 本田 諒

2021年7月15日

# 研究背景①

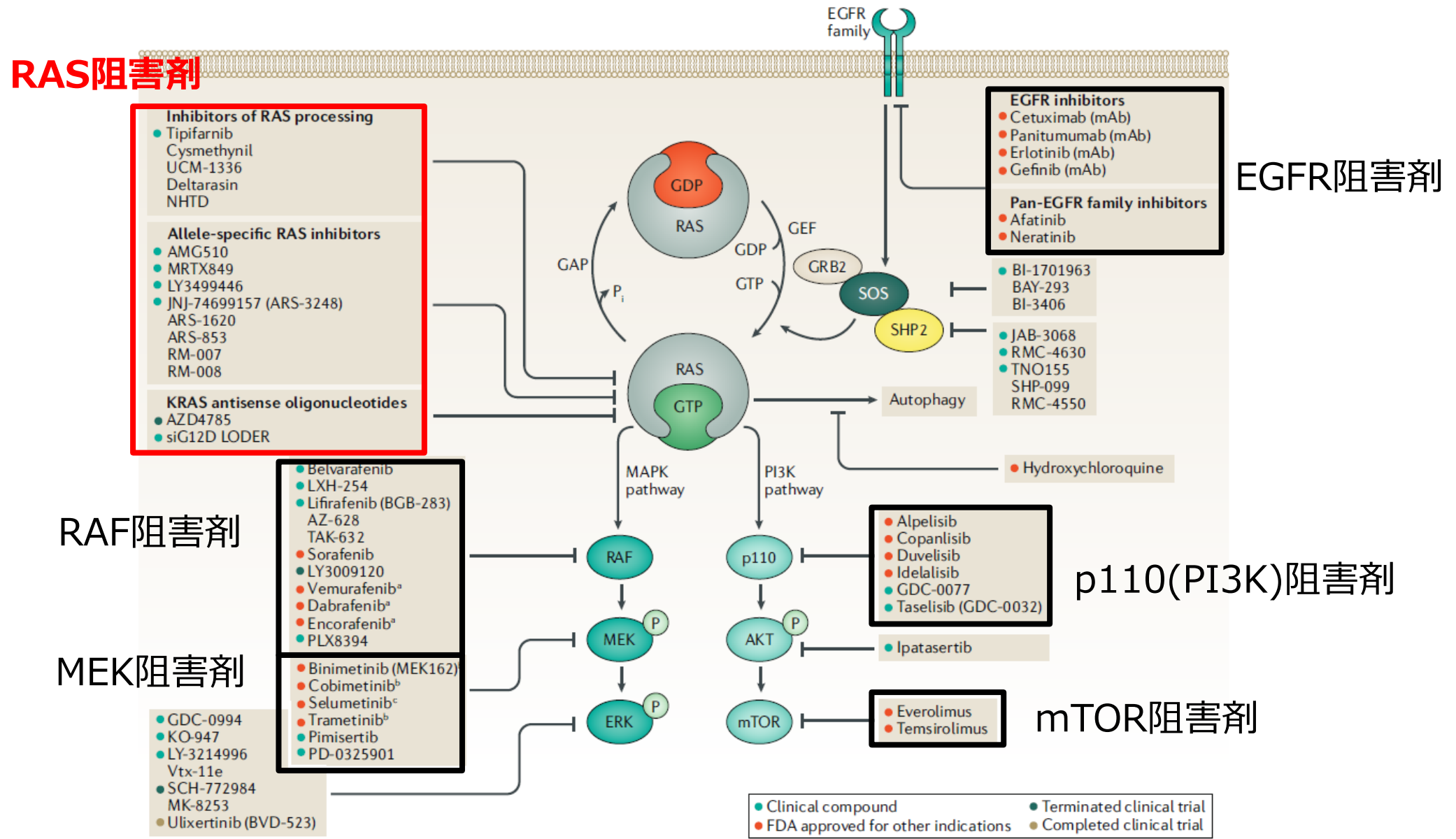
- ❖ 全がんの20～30%がRAS遺伝子（HRAS, KRAS, NRAS）に活性型変異を有している。
- ❖ しかし、RASは**創薬困難な標的**である。



**RAS阻害剤の開発には「RAS結合性」と「細胞膜透過性」の両立が必須**

# 研究背景② RASシグナル伝達系の阻害剤

Nat Rev Drug Discov. 2020: RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged?



## 研究背景③ RAS阻害剤の開発概況

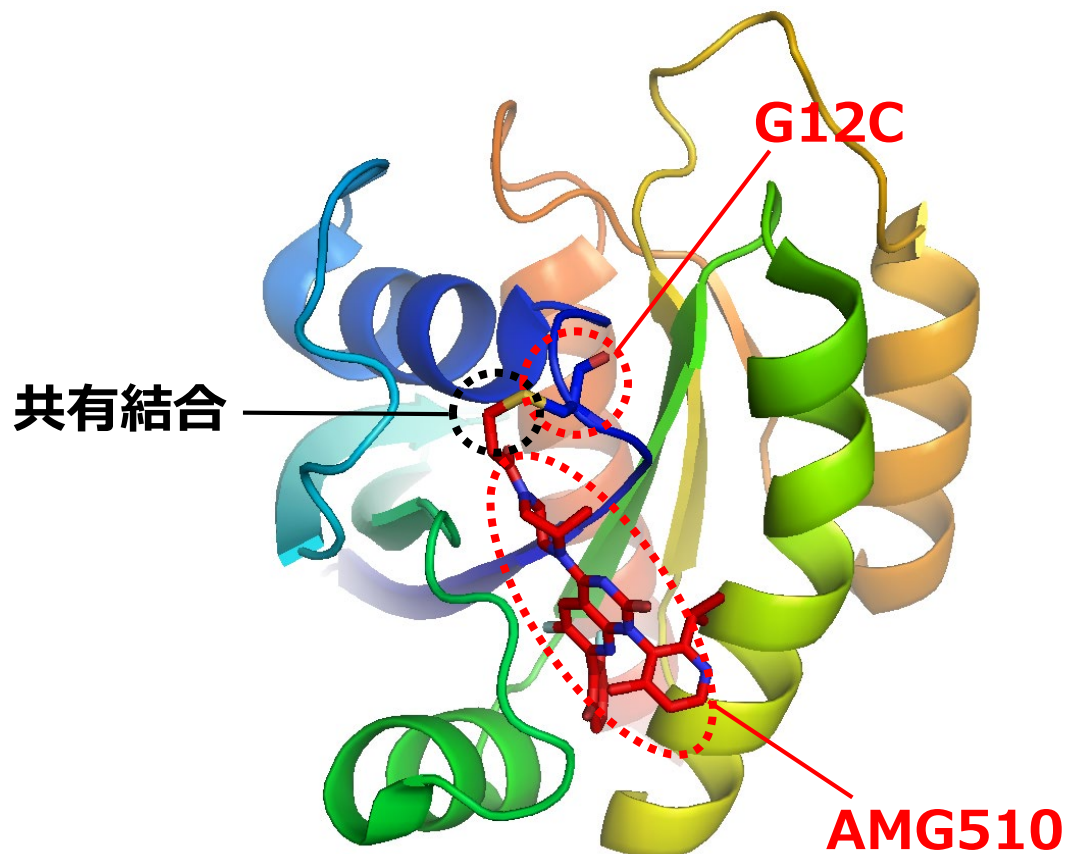
	分類	詳細
RASプロセッシング阻害剤	低分子	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 翻訳後修飾酵素（farnesyltransferase）を阻害するため、RAS以外のタンパク質にも作用する。</li> <li>□ 2000年頃から臨床試験が行われているが、有害事象の発生のため中断したものが多い。</li> </ul>
アレル特異的阻害剤	低分子	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ KRAS-G12C変異型（全体の約10%）のみに作用する薬剤</li> <li>□ 現在最も注目を集めている。2021年5月にルマクラスがFDAで承認。売上高は20億ドルに達すると見込まれる。</li> </ul>
KRASアンチセンス鎖	核酸	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ ドラッグデリバリーシステムに課題があり、埋込型カプセルなどが評価されている。</li> </ul>

現時点で、G12C以外の変異型RAS（**non-G12C**）を阻害する薬剤はない。

（ただし、Mirati社やRevolution Medicine社が non-G12C 阻害剤を開発し、臨床試験申請間近と発表している。）

## 研究背景④ なぜG12C阻害剤は成功したのか？

- KRAS-G12CとAMG510の共結晶構造 (PDB: 6OIM)



G12C阻害剤は、変異したCys残基と共有結合を形成することで、結合ポケットのないRASにも強く結合できる。



低分子化合物の弱点である「RAS結合性」の克服に成功

しかし、共有結合を形成しにくい他の変異型RAS (G12D、G12Vなど) に同じ戦略を使うことは難しい

# 本発明のコンセプト

**RAS結合ドメイン (RBD) と細胞膜透過性ペプチド (CPP) の融合により、RAS結合性と細胞膜透過性の両立を図る。**

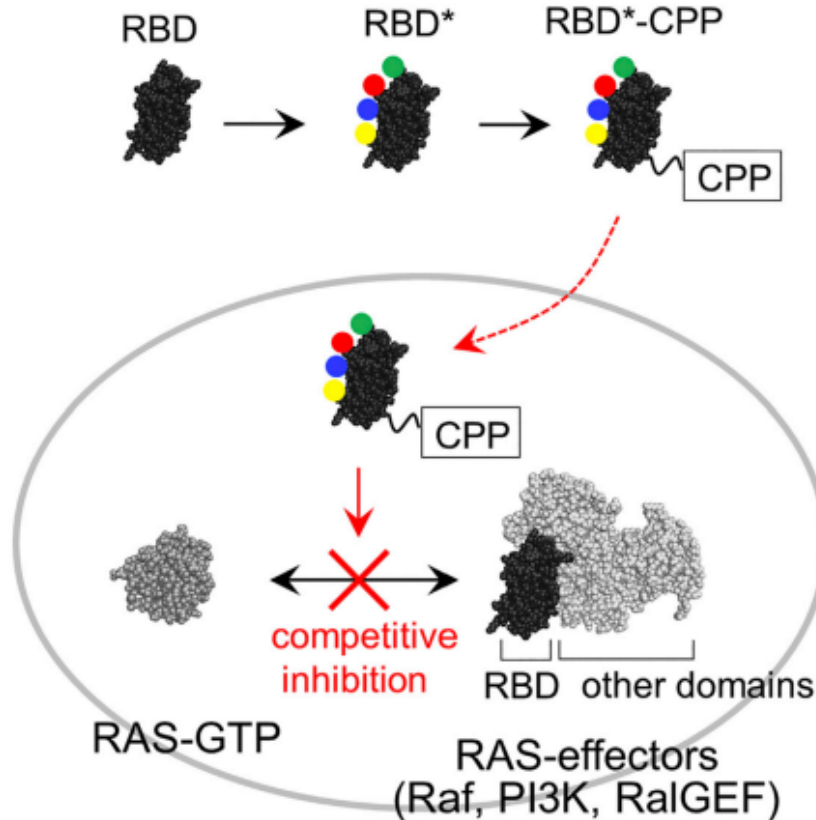
## RBD (RAS-binding domain)

- RAS-effectorタンパク質の一部
- RASに特異的に結合
- ユビキチン様の立体構造をもつ\*

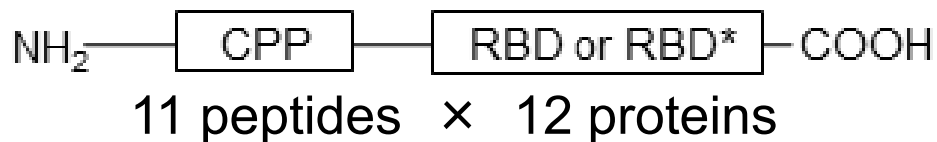
\*Inomata et al., Nature 2009で CPP付きユビキチンが細胞膜を透過するとの報告

## CPP (cell-permeable peptide)

- 高分子の細胞膜透過性を向上させる10アミノ酸程度の短ペプチド
- 数百種類が知られているが、優劣関係は不明



# RBDとCPPの組み合わせ最適化



51個の融合タンパク質を合成

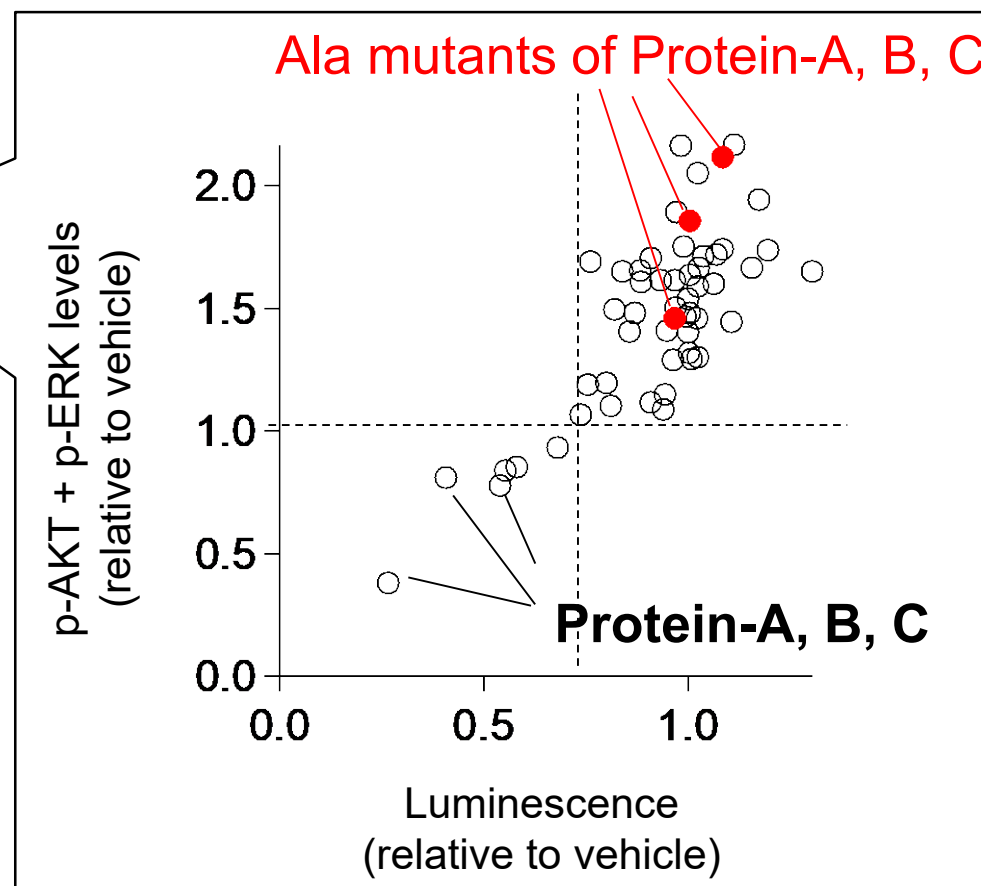
がん細胞に投与して  
RAS阻害活性を評価

3~6 個の融合タンパク質がヒット

アラニン変異解析による特異性・  
非特異的細胞毒性の評価

新規RAS阻害剤の同定  
(Pen-cRaf-v1)

Western blotting (ERK/AKTのリン酸化) と  
NanoBiT luciferase assay の二つで評価



# Pen-cRaf-v1の基本的性質・活性など

## 基本的性質

- [クラス]: リコンビナントタンパク質 (MW $\approx$ 15 kDa)、大腸菌発現系を使用
- [開発ステージ]: リード最適化段階
- [適応症]: すべてのRAS変異型がん

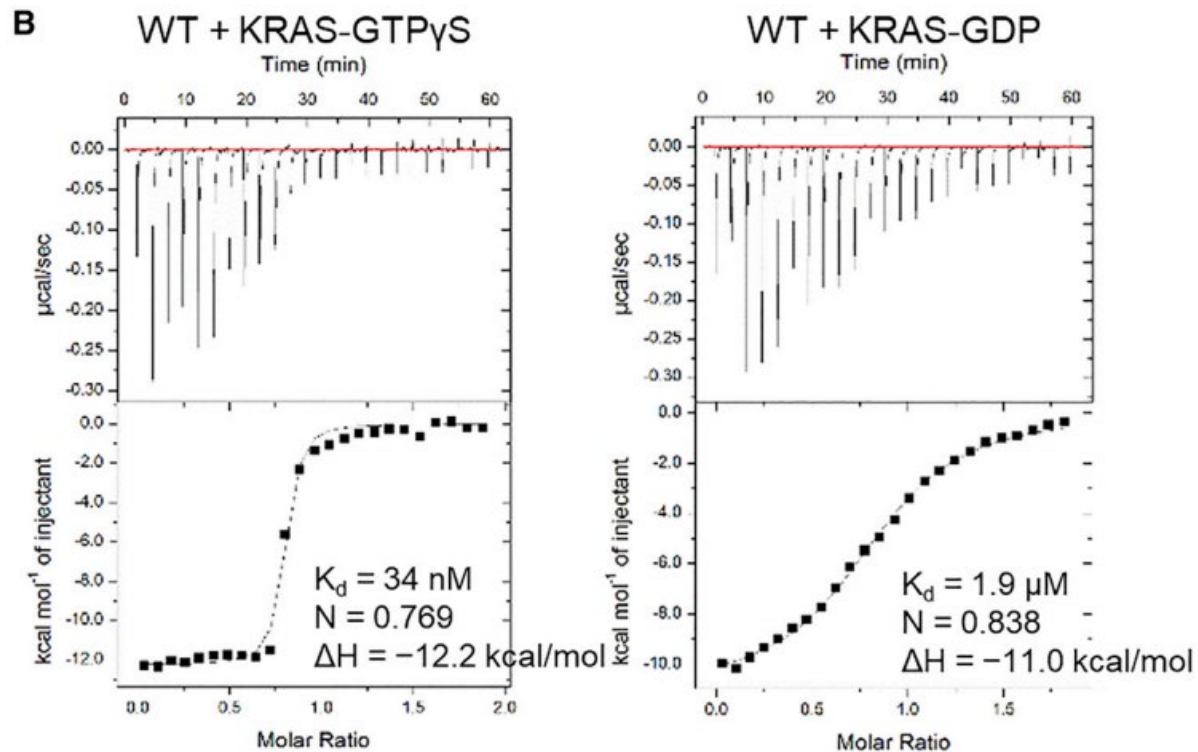
## 活性など

- 培養細胞モデルにおいて、すべての変異型RASをIC<sub>50</sub> $\approx$ 10  $\mu$ Mで阻害する
- 高い標的特異性をもつ (transcriptome解析とアラニン変異解析で証明済み)
- KRAS-GTP型にK<sub>d</sub>=32 nMで結合、KRAS-GDP型にK<sub>d</sub>=1.9  $\mu$ Mで結合
- KRAS-GTP型との共結晶構造が決定済み
- マウスモデルでの活性は確認できていない
- 主要論文をCell姉妹紙で発表 (T Nomura et al., Specific inhibition of oncogenic RAS using cell-permeable RAS-binding domains, **Cell Chemical Biology**, 2021)



# Pen-cRaf-v1のRAS阻害活性 (1)

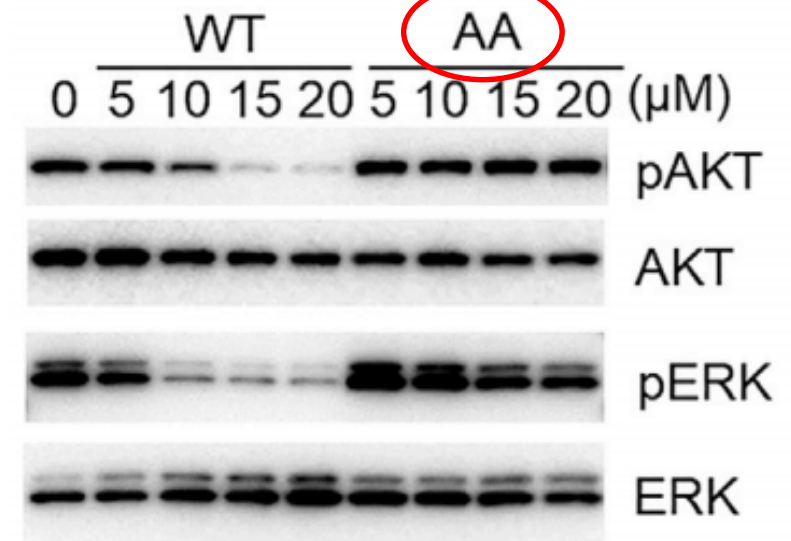
## ● 等温滴定カロリーメトリー (ITC)



活性型KRAS (GTP) に  $K_d = 34 \text{ nM}$  で結合

## ● Western blot

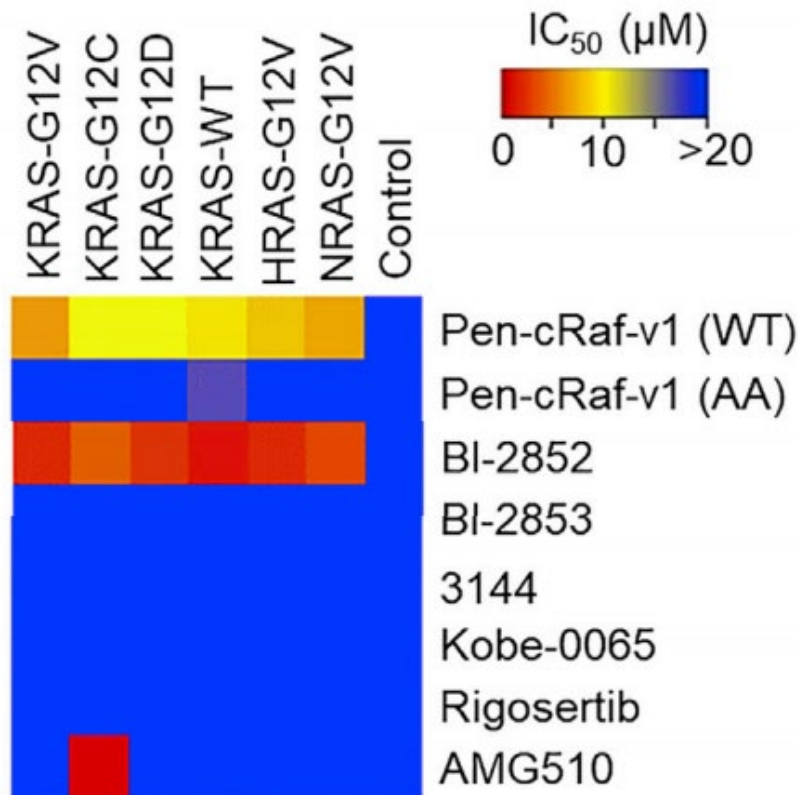
RAS結合に関わる  
2アミノ酸をアラニン  
に置換したネガコン



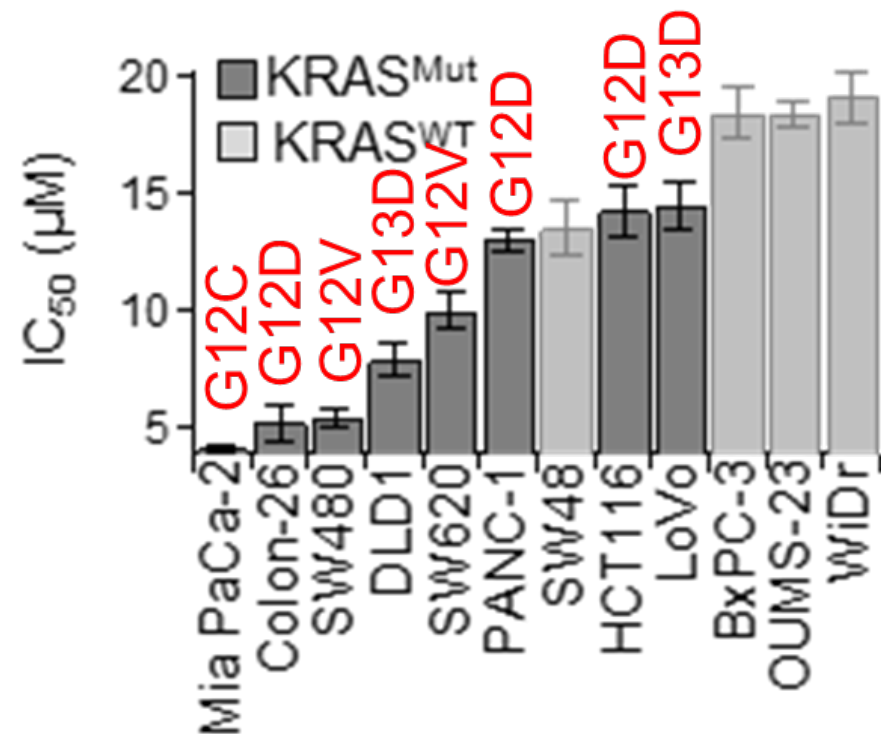
RAS下流分子のリン酸化を  
 $\text{IC}_{50} = 6-11 \mu\text{M}$  で阻害

# Pen-cRaf-v1のRAS阻害活性 (2)

## ● NanoBiT® assay



## ● がん細胞の生存率

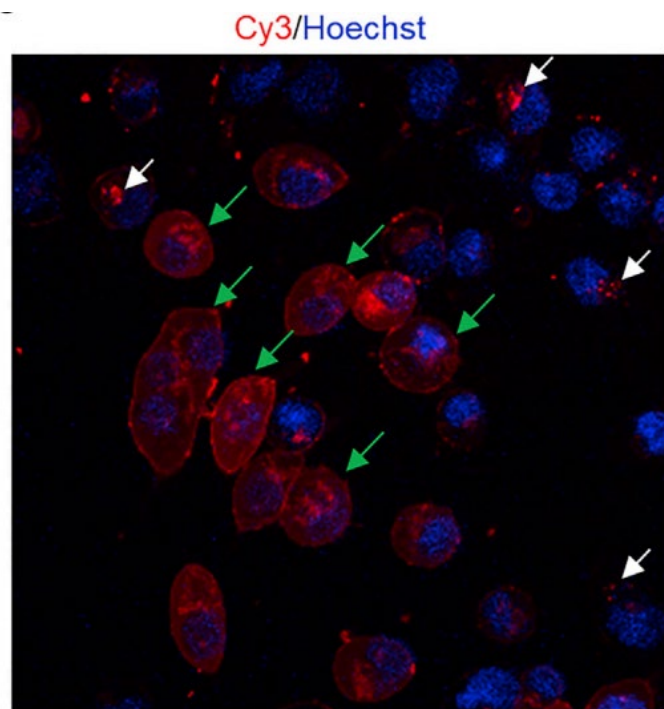


- **non-G12C含めたすべての変異型RASを阻害できる。**
- BI2852 と同程度の活性

すべてのRAS変異がんの生存率を減少

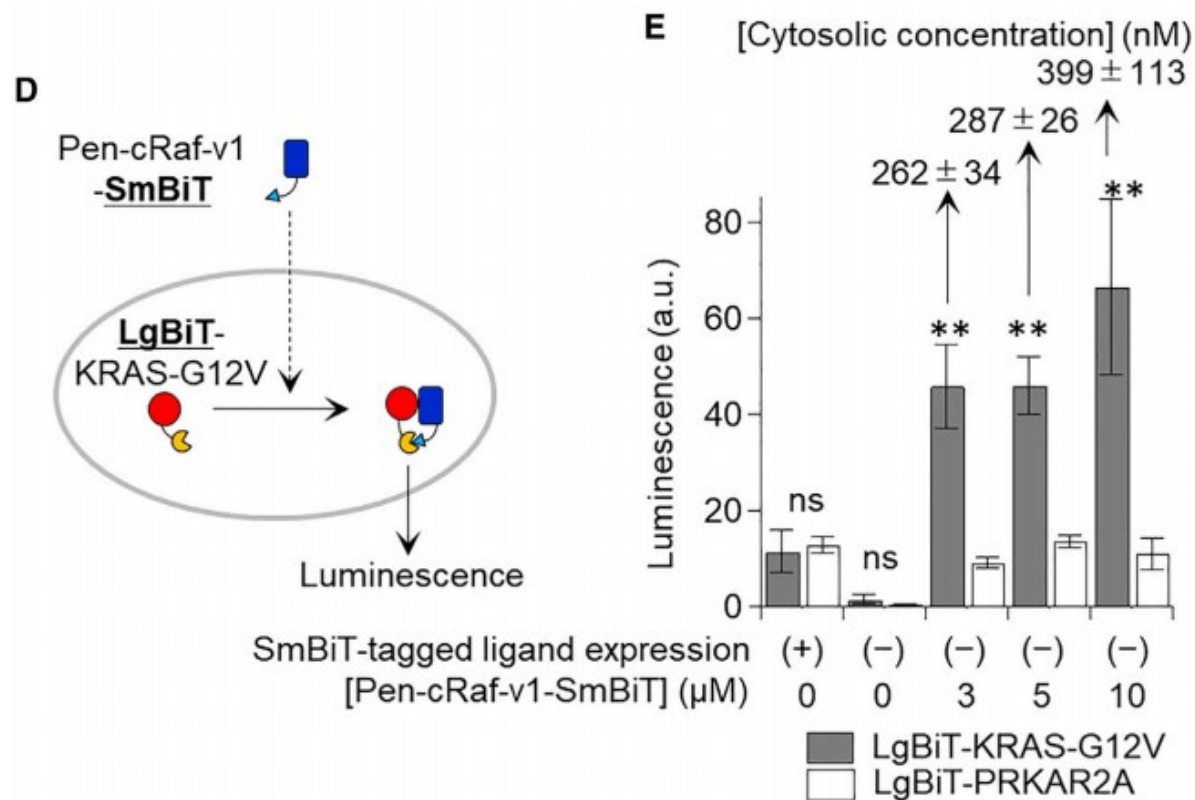
# Pen-cRaf-v1の細胞膜透過性

## ● 共焦点顕微鏡像



Pen-cRaf-v1にCy3蛍光色素を付加して、共焦点顕微鏡で局在を解析

## ● 改変型NanoBiT® assay

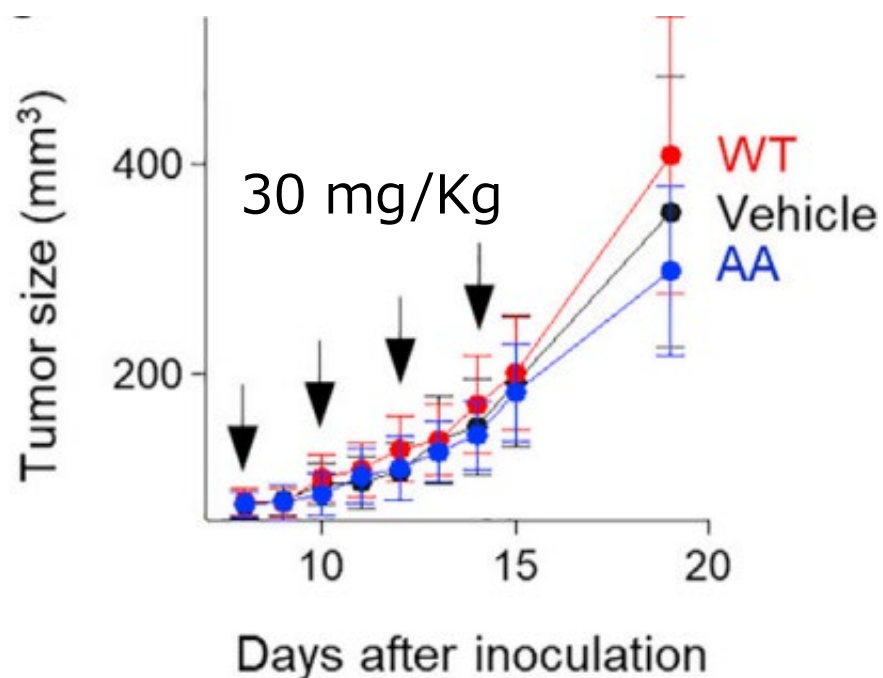


- 細胞質内でLgBiT-KRASを発現させ、SmBiTタグ付きPen-cRaf-v1を投与
- 発光強度から細胞内へのデリバリー効率を推定

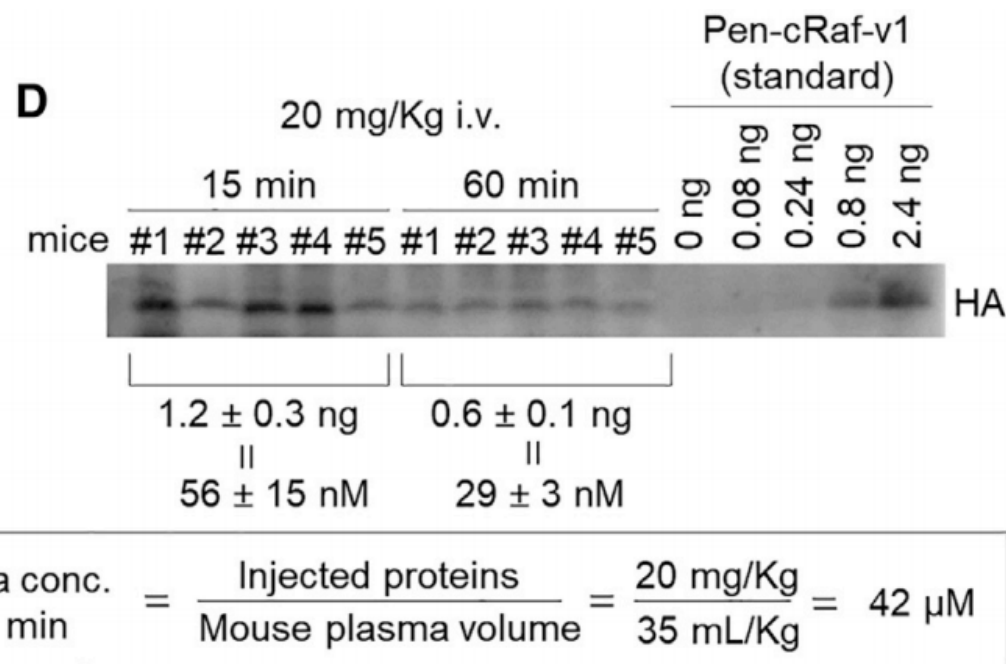
細胞内へのデリバリー効率は4~10%程度

# Pen-cRaf-v1の *in vivo* 活性と血中安定性

- がん細胞移植マウスへの尾静脈投与 (Colon-26)



- 尾静脈投与後の血中安定性



血中安定性を改善し、*in vivo* 活性を示すことが最重要課題

## 新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術では困難であったnon-G12C変異型RASにも有効な阻害剤を開発した。
- 本剤は抗がん剤としてはまだ開発初期段階であるが、あらゆる変異型RASを阻害できるため、全がんの20~30%に適応可能な革新的抗がん剤に発展する可能性がある。

# 想定される用途

- 抗がん剤
- RASシグナル伝達系の研究ツールとして使用

## 実用化に向けた課題

- 現在、培養細胞モデルでRASの特異的阻害と抗がん作用を確認できているが、マウスモデルでは未確認。
- 今後、Pen-cRaf-v1を基本骨格とする誘導体を多数合成し、マウスモデルでの活性の証明を目指す。その後非臨床試験を実施する。

# 具体的な開発計画

Pen-cRaf-v1のアミノ酸配列：

Penetratin (CPP)

MRGSHHHHHHGMASLVPRGSM RQIKIWFQNRRMKWKKGSTMSGYPYD  
VPDYAGSMG PSKTSNTIRVLLPNQEWTVVKVRNGMSLHDSLMKALKRHG  
LQPESSAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFL

cRaf-v1 (RBD)

	開発計画
N末端領域	・最適化
リンカー領域	・最適化
cRaf-v1領域	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>ファージディスプレイによる結合親和性↑</u></li> <li>・-S-S-結合導入による安定性↑</li> </ul>
C末端領域	・第二のCPP付加により細胞膜透過性↑
タンパク質に化学的修飾を加える	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>リポソーム化、PEG化による安定性↑</u></li> <li>・PROTAC化（RAS分解性の付加）</li> </ul>

赤字は発明者側では実施困難なため、共同研究を模索している。



## 企業への期待

- ファージディスプレイ、DDSの技術をもつ企業との共同研究を希望。
- また、抗がん剤・タンパク質製剤・ペプチド製剤を開発中の企業には、本技術＜細胞膜透過性融合タンパク質＞の導入が有効と思われる。

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 人工タンパク質、Ras阻害剤  
及び抗がん剤
- 出願番号 : 特願2020-137653
- 出願人 : 国立大学法人東海国立大学機構
- 発明者 : 本田諒、赤尾幸博

# お問い合わせ先

**岐阜大学**

**学術研究・産学官連携推進本部**

**TEL 058-293-2025**

**FAX 058-293-2022**

**e-mail [chizai@gifu-u.ac.jp](mailto:chizai@gifu-u.ac.jp)**