

# 学位論文内容要旨

氏名： 河合 翔太

題目：

新規テルアリアル型およびクロメノピリジン型リードスルー誘導薬の創製研究

要旨：

## 1. 研究の背景

患者数が極めて少ない希少疾患においては治療法が充足していない疾患が多く、治療薬開発が世界的な課題となっている。希少疾患の約 10%が遺伝子のナンセンス変異と呼ばれる点突然変異により、アミノ酸をコードするコドンが終止コドンに変化することが原因で発症し、ムコ多糖症Ⅰ型の場合においてはナンセンス変異が病原性変異の約 70%を占めている。ムコ多糖症Ⅰ型は、グリコサミノグリカン(GAG)を分解するライソゾーム酵素の1つである  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) の欠損により、GAG が細胞内に蓄積することで全身性の症状を呈する疾患であり、Hurler 症候群と呼ばれる重症型の場合には、ナンセンス変異により酵素活性が健常人の 1%以下まで低下していることが多い。現在、ムコ多糖症Ⅰ型の治療法として、酵素補充療法と造血幹細胞移植が存在するが、新たな治療法として低分子治療薬の開発が望まれている。

## 2. リードスルー誘導薬

疾患の原因遺伝子にナンセンス変異が起こると、正常な終止コドンの上流に未熟終止コドン (PTC) と呼ばれる異常な終止コドンが形成され、正常な機能を有するタンパク質の発現が妨げられる。リードスルー誘導薬は、そのような PTC を他のアミノ酸残基に読み代えて、本来の終止コドンの位置まで翻訳を続行させることで、欠損したタンパク質機能を回復させることができるため、ナンセ

ンス変異性疾患の治療法として期待されている。リードスルー誘導作用を有する化合物として、アミノグリコシド誘導体が古くから研究されている他、唯一、**ataluren** がデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の適応で欧州にて条件付き承認されている。しかし、**ataluren** は DMD 治療薬として米国では承認されておらず、また嚢胞性繊維症、ムコ多糖症などの疾患に対する開発も中断している。この理由の一つとして、**ataluren** のリードスルー誘導活性が十分でなかったことが考えられる。また、リードスルーの効率は PTC を有する変異遺伝子の配列の影響を受けることが知られており、リードスルー誘導薬と各疾患遺伝子のナンセンス変異部位周辺の配列特異性が存在する可能性も推察される。そこで、本研究では、先行化合物より強力なリードスルー誘導作用を有する化合物を見出し、構造系ごとの配列特異性を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 3. 新規リードスルー誘導薬の設計

これまでに報告されている **ataluren** を含めた非アミノグリコシド型リードスルー誘導薬は、その構造的特徴として、複数の芳香族環から成る疎水性部位と、その末端にカルボキシ基やアミノ基などの極性基を有している (図 1)。これらの化合物の生体内標的は明らかになっていないが、ある程度共通した構造的特徴を有している。本研究では、これら既報のファーマコフォアを参考に構造設計を試みた。具体的には、**ataluren** のテルアリアル構造および特許公開されているノバルティス社のピリミドキノリン誘導体を基にそれぞれ構造展開を行い、独自構造の取得を目指した。

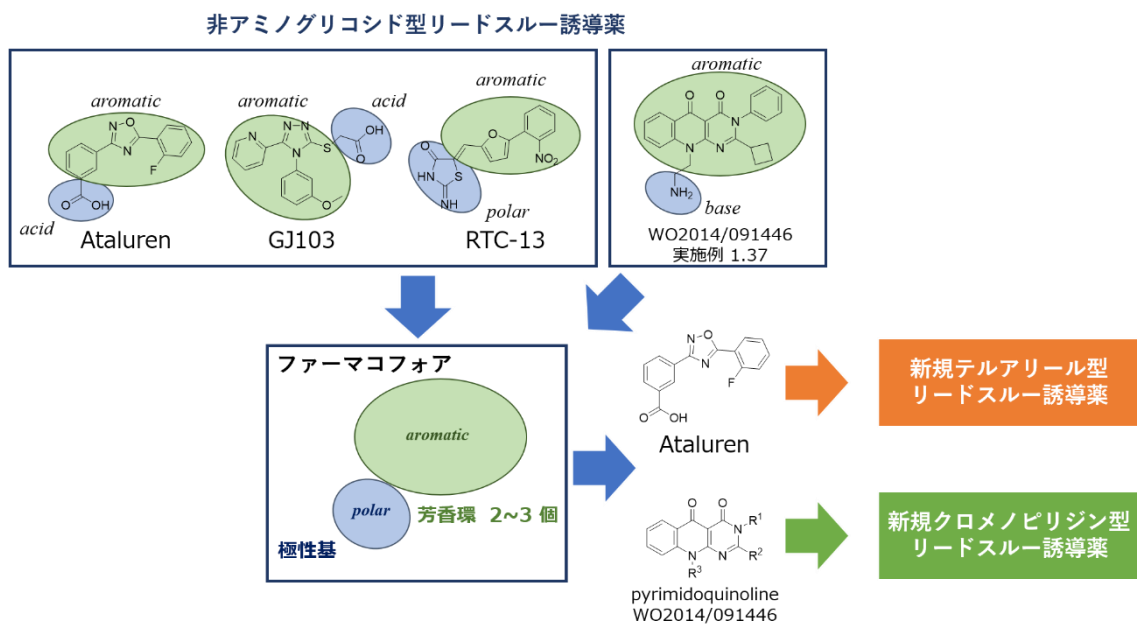


図 1. 化合物設計

#### 4. 新規テルアリール型リードスルー誘導薬

リードスルー誘導薬として唯一、臨床使用されている ataluren の構造を基に、各フラグメントの構造変換を行い、リードスルー誘導活性の増強を目指した (図 2) . 評価はムコ多糖症 I 型 Hurler 症の原因遺伝子変異の 1 つである Q70X ナンセンス変異を含む *IDUA* 部分配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイを用い、ルシフェラーゼ活性が化合物無処置時の 200%となる 200%有効濃度 ( $EC_{200}$ ) を算出した.

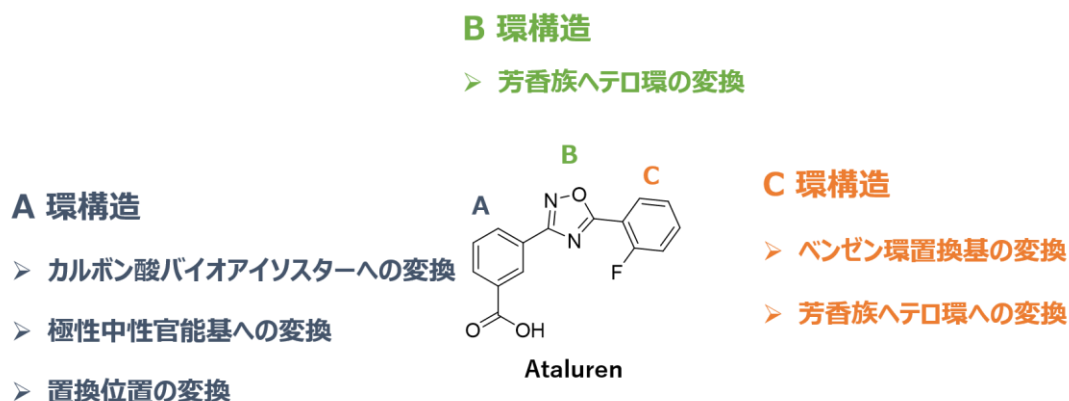


図 2. テルアリール型リードスルー薬の合成展開

まず, **ataluren** の A 環構造にあるカルボキシ基の変換を試みた. その中で, メタ位カルボキシ基をパラ位スルファモイルアミノ基とした化合物 **12h** が **ataluren** の約 59 倍のリードスルー誘導活性 ( $EC_{200} = 0.39 \mu M$ ) を示した (表 1). 続いて B 環構造であるオキサジアゾール環の変換を行い, **2H-1,2,3-トリアゾール** (**26d**) およびオキサゾール環 (**26f** および **26g**) への変換で活性がさらに 3~8 倍向上した. そこで, トリアゾール誘導体 **26d** およびオキサゾール誘導体 **26g** を基に C 環構造の最適化を行い, トリアゾール誘導体で C 環構造のフルオロベンゼン環をシアノベンゼン環とすることで, 良好な活性 ( $EC_{200} = 0.05 \mu M$ ) と経口吸収性 ( $C_{max} = 5.44 \mu M$ ) を併せ持つ化合物 **80e** (KY-516) を見出した.

表 1. テルアリール型誘導体の構造式,  $EC_{200}$  値, 最大活性およびラットにおける最大血漿中濃度

Compound	A	B	C	$EC_{200}$ ( $\mu M$ )	Max (%) <sup>a)</sup>	Rat PK <sup>b)</sup> $C_{max}$ ( $\mu M$ )
<b>Ataluren (1)</b>				22.9	360	21.4
<b>12h</b>				0.39	426	4.16
<b>26d</b>				0.15	405	
<b>26f</b>				0.08	428	0.18
<b>26g</b>				0.05	394	0.33
<b>80e (KY-516)</b>				0.05	374	5.44

a) 化合物無処置の細胞の活性を 100% とした. b) 化合物 10 mg/kg 経口投与.

KY-516 は Q70X ナンセンス変異を含む *IDUA* 部分配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、濃度依存的なリードスルー誘導活性を示し、その活性は *ataluren* の約 460 倍であった。また、全長配列の Q70X 変異 *IDUA* 遺伝子を導入した細胞において、*ataluren* は 100  $\mu\text{M}$  で有効であったのに対し、KY-516 は 0.1  $\mu\text{M}$  で *IDUA* 酵素活性を有意に増加させた。一方、Q70X と同様に Hurler 症に一般的な変異である W402X ナンセンス変異に対してはルシフェラーゼおよび *IDUA* 全長配列の両評価系で効果が認められなかった。2 種類の変異における KY-516 の効果の差異は、KY-516 のリードスルー誘導作用における配列特異性の存在を示唆しており、その原因として PTC 周辺配列の影響が考えられた。

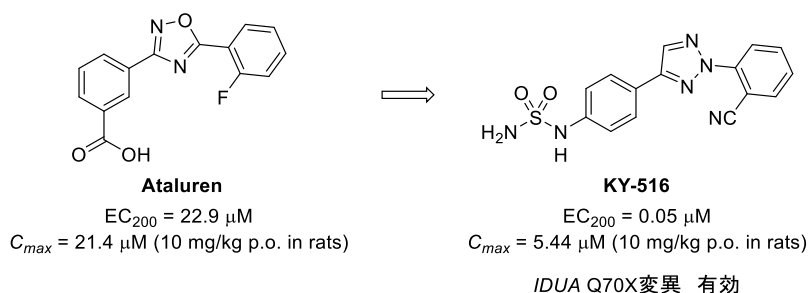


図 3. 新規テルアリール型リードスルー誘導薬

## 5. 新規クロメノピリジン型リードスルー誘導薬

ムコ多糖症 I 型は Q70X と W402X の 2 種類のナンセンス変異が同程度の割合で、原因変異の併せて約 7 割を占めるため、W402X ナンセンス変異に対しても有効な治療薬の創製は重要である。そこで、KY-516 とは異なる配列特異性を有する化合物を取得できるか検討するため、異なる構造系としてノバルティス社が特許公開しているピリミドキノリン誘導体からの構造展開を行った（図 4）。実施例化合物は数  $\mu\text{M}$  からリードスルー誘導活性を示し、陽性対照として用いている *paromomycin* の 2–4 倍の *IDUA* 酵素活性の増加を示すことが報告されており、良好なリードスルー誘導作用を有する可能性が考えられた。このピリミドキノリン誘導体から着想を得て、様々な骨格変換を行い、リードスルー誘導活性を保持した独自の新規骨格であるクロメノピリジン誘導体を得た。このクロメノピリジン誘導体を基に更に誘導体展開を行うことで、KY-516 とは特性の異

なるリードスルー誘導薬の創製を目指した。化合物の評価は IDUA W402X ナンセンス変異を有する Hurler 症患者由来繊維芽細胞を用いて行い、コントロールと化合物処置後の IDUA 酵素活性の比を求めた。

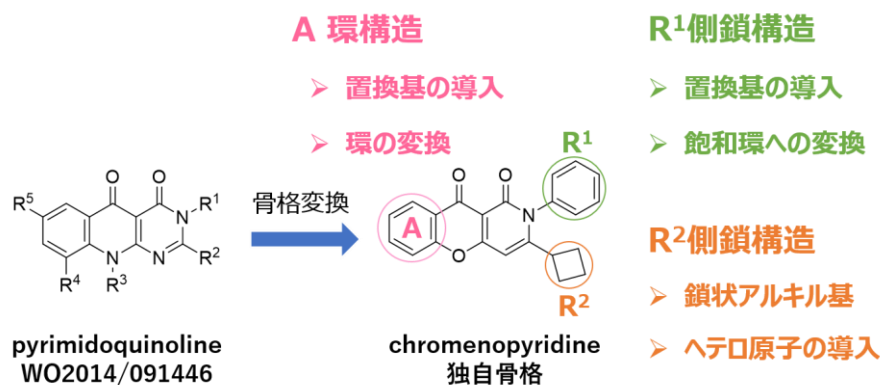


図 4. クロメノピリジン型リードスルー誘導薬の合成展開

化合物設計にあたり、リード化合物の高い平面性に由来する低水溶性や毒性を懸念し、ヘテロ原子の導入や飽和環への変換等を試みた。しかしながら、化合物 **91a** の R<sup>1</sup> 側鎖フェニル基のヘテロ原子を含むテトラヒドロピラン環やピリジン環への変換はすべて活性が消失した。R<sup>1</sup> 側鎖のフェニル基へのフッ素の導入を検討したところ、*o,m*-ジフルオロフェニル基を有する化合物 **91i** で活性の向上が見られ、IDUA 酵素活性は 1  $\mu\text{M}$  でコントロールの 6.7 倍、3  $\mu\text{M}$  で 10.2 倍であった（表 2）。続いて、A 環構造の構造変換を行った結果、塩基性側鎖の導入により活性が向上することを見出した（化合物 **114**, **116**）。この時点で、より実際の生体に近い条件下で化合物を評価するため、使用する培地をより細胞増殖が遅い 10% FBS 含有 MEM 培地に変更した（表 3）。化合物 **114** および **116** はこれまでの培地と同様に MEM 培地中でも良好な活性を示し、クロメノピリジン骨格 5 位または 6 位から適切な位置に塩基性窒素原子を配置することで活性の向上が見られた。そこで 5 位と 6 位を環化し、窒素原子の位置を固定したテトラヒドロイソキノリン誘導体 **118** を合成した結果、0.3  $\mu\text{M}$  からコントロールの 3.2 倍と良好な活性を示した。また、化合物 **118** はラットにおいて良好な経口吸収性（ $C_{\text{max}} = 8.82 \mu\text{M}$ ）を示したことから、KY-640 と命名し、さらなる生物学的

評価を行った。

表 2. クロメノピリジン型誘導体の構造式，リードスルー誘導活性およびマウスにおける最大血漿中濃度

Compound	A	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Ratio vs. control <sup>a)</sup>			mouse PK <sup>b)</sup> <i>C</i> <sub>max</sub> (μM)
				0.3 μM	1 μM	3 μM	
<b>91a</b>					×1.6	×7.4	
<b>91i</b>					×6.7	×10.2	
<b>114</b>					×14.1	×10.8	4.97
<b>116</b>					×12.5	×11.2	

表 3. クロメノピリジン型誘導体の構造式，リードスルー誘導活性およびマウスにおける最大血漿中濃度（MEM 培地）

Compound	A	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Ratio vs. control <sup>a)</sup>			mouse PK <sup>b)</sup> <i>C</i> <sub>max</sub> (μM)
				0.3 μM	1 μM	3 μM	
<b>114</b>				×2.5	×3.7		4.97
<b>116</b>				×1.8	×4.0		
<b>117</b>				×2.8	×3.8		2.95
<b>118 (KY-640)</b>				×3.2	×4.1		8.82

a) 患者由来細胞におけるコントロールに対するリードスルー誘導活性比. b) 化合物 30 mg/kg 経口投与.

KY-640 は *IDUA* W402X 変異を有する Hurler 症患者由来線維芽細胞において *IDUA* 活性を、0.3 および 1  $\mu\text{M}$  で濃度依存的に有意に上昇させ、6 日間処置により濃度依存的に GAG 量を有意に低下させた。一方、ataluren は 100  $\mu\text{M}$  処置でも酵素活性を増加させなかった。ルシフェラーゼアッセイ系を用いて、KY-640 のリードスルー誘導活性の配列特異性を検討した結果、KY-640 のリードスルー誘導活性は Q70X 変異よりも W402X 変異に対して強く、KY-516 とは対照的であった。また、KY-640 はヒトの *IDUA* W402X 変異のホモログである *Idua* W392X 変異を有するノックインモデルマウスにおいて、100 mg/kg 1 日 2 回経口投与により、肝臓、脾臓および脳の *IDUA* 活性を有意に増加させた。

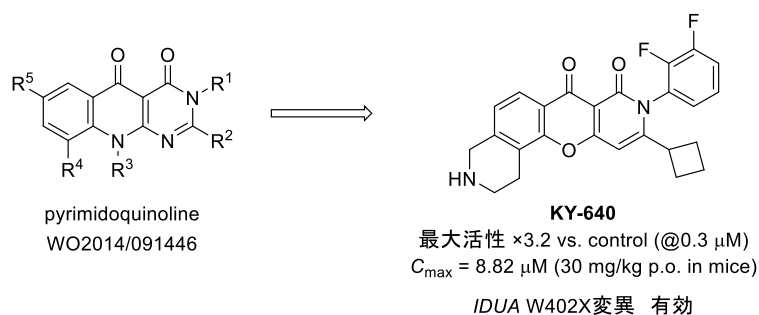


図 5. 新規クロメノピリジン型リードスルー誘導薬

## 6. 結論

本研究において、テルアリール型誘導体 KY-516 およびクロメノピリジン型誘導体 KY-640 が強力なリードスルー誘導作用を有することを明らかにし、ムコ多糖症 I 型の細胞評価系およびモデルマウスにおける有効性を確認した。また、KY-516 は *IDUA* Q70X ナンセンス変異に、KY-640 は W402X ナンセンス変異に対してそれぞれ特異的なリードスルー誘導活性を示すことを明らかにした。これら 2 種類の相補的なリードスルー誘導薬に関する更なる研究により、新規ムコ多糖症 I 型治療薬としての可能性、未だ不明な部分が多いリードスルーメカニズムを解明するツールとしての利用が期待される。

以上