

性ホルモン依存性疾患治療薬を指向した短鎖型 KISS1R アゴニスト

TAK-683 および TAK-448 の創製

2017 年

西澤 直城

目次

略語表	1
序論	
1. 諸言	4
2. リード化合物 KiSS1-305 の創出	6
3. 研究の目的	11
第一章 KiSS1-305 の化学的安定性および薬理活性向上を目指した合成検討と生物活性評価 : TAK-683 の創製	
1. 諸言	12
2. 合成および化合物評価	14
3. 化学的安定性と薬理活性向上を指向した 48 - 49 位および 54 位の置換	17
4. 薬理活性向上を指向したアミノ酸置換	23
5. 結論	32
第二章 TAK-683 の溶解性改善および水溶液のゲル化回避を目指した合成検討と生物活性評価 : TAK-448 の創製	
1. 諸言	33
2. 合成および化合物評価	33
3. アミノ酸置換戦略	35
4. TAK-683 構成アミノ酸の置換許容性評価	36
5. 物性変換を目的とした 47 位アミノ酸の置換	37
6. 結論	48

第三章	新規サンドイッチ ELISA 系による TAK-683 および TAK-448 の高感度検出系構築	
1.	諸言	49
2.	研究方針	50
3.	免疫原ペプチドデザインとサンドイッチ ELISA 系の構築	52
4.	サンドイッチ ELISA 系の特異性評価	58
5.	アッセイの検証	59
6.	結論	63
	総括	64
	実験項	66
	引用文献	83
	本論文に関わる研究業績	90
	謝辞	91

略語表

Abu	2-aminobutyric acid
Abz(2)	2-aminobenzoic acid
AcOEt	ethyl acetate
Acp	6-aminocaproic acid
Aib	2-aminoisobutyric acid
β -Ala	β -alanine
Arg(Boc ₂ ,Me)	<i>N</i> ^{ω} , ω' -bis(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)- <i>N</i> ^{ω} -methylarginine740
Arg(Me)	<i>N</i> ^{ω} -methylarginine
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	area under the blood concentration-time curve
azaGly	azaglycine
Aze(2)	azetidine-2-carboxylic acid
Aze(3)	azetidine-3-carboxylic acid
BA	bioavailability
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BSA	bovine serum albumin
bTG	bovine thyrogloblin
C _{5min}	plasma concentration at 5 min after administration
CD	circular dichroism
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
cEIA	competitive enzyme immunoassay
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHO	chinese hamster ovary
CL _{total}	total body clearance
C _{max}	maximum plasma concentration
CV	coefficient of variation
DCM	dichloromethane
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DIPCDI	diisopropylcarbodiimide
DMA	dimethylacetamide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EC ₅₀	half maximal effective concentration
EDT	1,2-ethanedithiol
EDTA · 2Na	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraaceticacid disodiumsalt dihydrate

EIA	enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	fetal bovine serum
FLIPR	fluorometric imaging plate reader
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
FSH	follicle stimulating hormone
GMBS	<i>N</i> -(4-Maleimidobutyryloxy)succinimide
GnRH	gonadotropin releasing hormone
HANKS/HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	hydrochloric acid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOSu	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
HPG	hypothalamic–pituitary–gonadal
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
Hyp	trans-4-hydroxyproline
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
KISS1R	KISS1 receptor
KLH	keyhole-limpet hemocyanin
LC/MS	liquid chromatography–mass spectrometry
LC/MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LH	luteinizing hormone
LHRH	luteinizing hormone-releasing hormone
mAb	monoclonal antibody
MALDI TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry
MBHA resin	4-methylbenzhydramine resin
MeAla	<i>N</i> -methylalanine
MeCN	acetonitrile
MEM	Eagle's minimal essentialmedium
MRT	mean residence time
Mtt	4-methyltrityl
NaOH	sodium hydroxide
Orn	ornithine
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphate buffered saline
Phe(2F)	2-fluorophenylalanine
Phe(3F)	3-fluorophenylalanine

Phe(4Cl)	4-chlorophenylalanine
Phe(4F)	4-fluorophenylalanine
Phg	phenylglycine
Pic(2)	piperidine-2-carboxylic acid
Pic(3)	piperidine-3-carboxylic acid
Py(4)	4-pyridylalanine
RE	relative error
RIA	radioimmunoassay
Sar	sarcosine
SPDP	<i>N</i> -Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate
SPPS	solid-phase peptide synthesis
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
TFA	trifluoroacetic acid
TFE	2,2,2-trifluoroethanol
THF	tetrahydrofuran
Thz	thiazolidine-4-carboxylic acid
Tic	1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid
TIS	triisopropylsilane
Tle	<i>tert</i> -leucine
T_{\max}	time to maximum plasma concentration
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
Trt	triphenylmethyl (trityl)
$V_{d(ss)}$	volume of distribution at steady state
WSCD·HCl	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

アミノ酸およびペプチドの略語は、IUPAC-IUB 生化学命名法 (*J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 977-983)に従って明記した。特に明記しない限り、アミノ酸記号はL-立体配置を示す。

序論

1. 諸言

哺乳動物の生殖機能は、視床下部、下垂体、および性腺の 3 つの重要な器官によって調節される。発情周期および排卵を含む性機能が視床下部および下垂体によって調節されることは古くから知られていたが、その正確なメカニズムは解明されていなかった。視床下部から脳下垂体または生殖腺への直接的な神経支配が提唱されていたが、Harris らは視床下部神経末端から放出された物質が視床下部と下垂体との間の門脈を通じて下垂体に効率的に伝達されることを実証した¹。視床下部から放出される物質については、1970 年代初期まで同定されていなかったが、Schally らと Guillemin らそれぞれによって下垂体からの卵胞刺激ホルモン (FSH) および黄体形成ホルモン (LH) 放出を促す重要なペプチドとして、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) (別名 黄体形成ホルモン放出ホルモン、LHRH) が同定された²。視床下部から放出された GnRH は下垂体に存在する GnRH 受容体に働きかけ、FSH と LH の合成と分泌を促す。分泌された LH/FSH は性ステロイドホルモンの分泌を介し、精子形成、卵胞成熟を促進する。これらの一連の流れは視床下部-下垂体-性腺軸 (hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG 軸) と呼ばれている (Fig.1 左)。

高活性 GnRH 誘導体として、広く臨床で用いられているリュープロレリン酢酸塩はマイクロカプセル型徐放製剤として皮下投与後、常時血中に放出される。連続的に刺激された GnRH 受容体は反応性低下状態 (desensitization、脱感作状態) となり、その結果、HPG 軸の機能が低下し、テストステロン及びエストラジオール産生能が低下する。リュープロレリン徐放製剤はその血中性ホルモン濃度低下作用により性ホルモン濃度依存的に増殖する前立腺癌、乳癌などの治療薬として用いられている³。

メタスチン/キスペプチンはオーファン受容体 KISS1 受容体 (KISS1R) の内因性リガンドとして発見された 54 残基のペプチドである。また、KISS1R はメタスチン/キスペプチン発見当時は GPR54/hOT7T175/AXOR12 と呼ばれていたが、現在は KISS1R に統一されている⁴⁻⁹。なお、リガンドについても現在はキスペプチンの名称が一般的ではあるが、本論文中では研究を実施した際に用いたメタスチンの名称で記載する。また本論文中でメタスチンと記載した場合は全長メタスチン [metastin(1-54)] を指し、メタスチン部分ペプチドは metastin(45-54) など IUPAC-IUB 命名法に従って記載した。

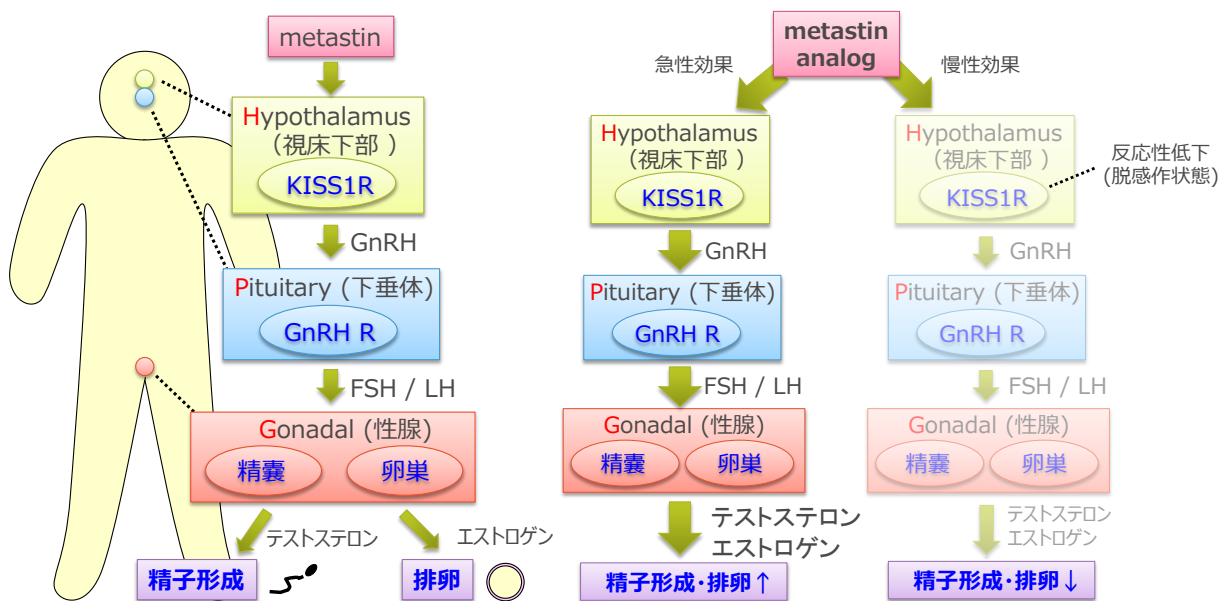
メタスチンをエンコードする KISS1 遺伝子はヒト、ラットの胎盤と脳で強く発現しており、その発現分布は KISS1R と同様である。神経系においては KISS1R は視床下部組織で最も強く発現しており、脳内の他の部位でも弱い発現が認められる⁷⁻¹⁴。メタスチンは発見当初、癌転移に関与すると考えられていたが、いくつかの研究によって、メタスチンが、視床下部の GnRH ニューロンからの GnRH 放出の重要な調節物質であることが新たに報告されている。2003 年に 2 つの独立したグループから KISS1R の欠損がヒト、マウスにおける家族性性腺機能低下症 (IHH, idiopathic hypogonadotropic hypogonadism) の原因であることが報告された^{12,13}。彼らの報告によって、メタスチン/KISS1R が HPG 軸の調節に関与し、生殖において主要な役割を担うことが

見出された。さらなる検討によりメタスチンは中枢および末梢への急性投与によって、GnRH およびゴナドトロピンの分泌を強力に引き起こすことがヒトを含むいくつかの種において示された¹⁵⁻¹⁹。

このようにメタスチンの急性投与は、GnRH およびゴナドトロピンレベルを増加させ、生殖系を活性化する。対照的に、いくつかのグループは、メタスチンの持続的投与（慢性投与）が、ラット、サルおよびヒト女性において下垂体機能または性腺機能の減弱をもたらすことを報告している²⁰⁻²³。

これらの知見は KISS1R アゴニストを適当量投与することで HPG 軸の活性化、あるいは抑制が可能であることを示している。著者はメタスチン- KISS1R 系が性ホルモン濃度低下による性腺機能低下症または性ホルモン依存的に増殖する前立腺癌などの性ホルモン依存性疾患の合理的な治療標的と考え、合成研究に着手した (Fig.1 右)。本論文では KISS1R アゴニストの持続的投与による HPG 軸抑制性作用に基づいた前立腺癌、乳癌治療薬の創製を目的とした合成研究について記述する。

Figure 1. メタスチンおよびメタスチン誘導体の視床下部-下垂体-性腺軸（HPG 軸）に対する作用（左）とメタスチン誘導体の治療標的としての HPG 軸（右）



2. リード化合物 KiSS1-305 の創出

メタスチンは KiSS-1 遺伝子産物として同定された 54 残基からなる C 末端アミド化ペプチドである。化学的に合成した C 末端カルボン酸型ペプチドである C 末端フリー型メタスチンの受容体親和性は非常に弱いことから、C 末端アミド構造は受容体との結合に必須と考えられる⁴ (Table 1)。また、N 末端欠損体である metastin(40-54), metastin(45-54) はメタスチン全長ペプチドと比較して 3-10 倍程度良好な *in vitro* 活性を示す。一方、さらに N 末端を欠損させた metastin(46-54) の受容体親和性は大きく低下し、メタスチンを下回る。血中から検出されるメタスチンの活性種は 54 残基の全長ペプチド [metastin(1-54)] の他に metastin(41-54), metastin(42-54), metastin(45-54) といずれも C 末端残基を含んだ形で検出されている。これらの知見から、活性発現に重要なアミノ酸残基は C 末端部 45-54 位に存在していると考えられる⁸。

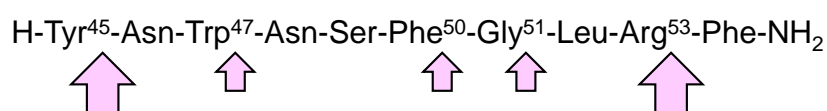
Table 1. 100 pM [¹²⁵I-Tyr⁴⁵] metastin (40-54) を放射性リガンドとして用いた、競合的結合アッセイにおけるメタスチン短鎖化誘導体の結合活性 (Ki 値)⁴

	配列	Ki値 (nM)
metastin	GTSLSPPPPESSGSRQQPGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREKDLPNYNWNSFGLRF-NH ₂	0.34
metastin(40-54)	KDLPNYNWNSFGLRF-NH ₂	0.10
metastin(45-54)	YNWNSFGLRF-NH ₂	0.042
metastin(46-54)	NWNSFGLRF-NH ₂	1.5
metastin free form	GTSLSPPPPESSGSRQQPGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREKDLPNYNWNSFGLRF-OH	640

(出典) Ohtaki et al. *Nature* 2001, 411, 613-617. Fig. 2

これらの知見に基づき、著者は metastin(45-54) を基本とした置換検討を行い、優れた薬効を示すペプチド誘導体を取得することを計画した。metastin(45-54) は優れた *in vitro* 活性を有する一方で、血中プロテアーゼに対する代謝安定性が乏しく、マウス血漿中では数分間で原体の大半が消失した²⁴。新規性ホルモン依存性疾患治療薬の創製を目指した合成検討を行う上で、プロテアーゼ耐性の向上が第一の課題と考えられた。そこで、metastin(45-54) をマウス血漿中、37°C 5 分間処理後、生成したペプチド断片を LC/MS/MS を用いて同定し、切断部位を解析した。その結果、45-46 位 Tyr-Asn 間および 53-54 位 Arg-Phe 間での切断が速やかに起こり、その他に 47-48 位 Trp-Asn、50-51 位 Phe-Gly、51-52 位 Gly-Leu 間の切断も認められた^{24, 25} (Fig.2)。

Figure 2. metastin(45-54) マウス血漿処理後の切断点



これらの情報に基づき、プロテアーゼ耐性の向上を目的として metastin(45-54)を基本としたアミノ酸置換検討を実施した。N末端アミノ酸残基である45位 Tyr を D-Tyr に置換し、C末端から2残基目、53位 Arg を *N*^ω-methylarginine [Arg(Me)] に置換した [D-Tyr⁴⁵,Arg(Me)⁵³]metastin(45-54)は metastin(45-54)と同等の活性を保持しながら、代謝安定性の向上を認めた。それぞれの置換が45-46位間、53-54位間のプロテアーゼ切断回避に有効に機能したと考えられる²⁵ (Table 2, 化合物1)。続いて、50-52位間の切断を回避すべく、ペプチドボンドアイソスター導入検討を実施した結果、51位アザグリシン (azaGly) 置換体が良好な活性と安定性を示した (化合物2)。残る切断点である47-48位間切断回避を指向し、47位 Trp を D-Trp へと置換した結果、マウス血漿中37°C 1hr処理後の残存率は50%以上に向上した (化合物3)。最適化検討の結果、46位を欠損し、親水性アミノ酸 D-Pya(4)で47位を置換した、*in vitro* 活性、血漿中安定性、水溶性に優れた化合物4 (KiSS1-305, Fig. 3)を見出した²⁶。

Table 2. metastin(45-54)を基本としたアミノ酸置換検討²⁴⁻²⁶

Compound	H-AA ⁴⁵ -AA ⁴⁶ -AA ⁴⁷ -Asn-Ser-Phe-AA ⁵¹ -Leu-AA ⁵³ -Phe-NH ₂					agonistic activity		affinity Ki nM ^b		stability in
	AA ⁴⁵	AA ⁴⁶	AA ⁴⁷	AA ⁵¹	AA ⁵³	EC ₅₀ ratio ^a				mouse serum
						human		human	rat	残存率(%) ^c
metastin(45-54)	Tyr	Asn	Trp	Gly	Arg	1.0		0.039	0.057	ND
1	D-Tyr	Asn	Trp	Gly	Arg(Me)	0.93		0.046	0.11	18.1
2	D-Tyr	Asn	Trp	azaGly	Arg(Me)	2.8		0.051	0.068	39.5
3	D-Tyr	Asn	D-Trp	azaGly	Arg(Me)	3.7		0.19	0.22	56.4
4 (KiSS1-305)	-	D-Tyr	D-Pya(4)	azaGly	Arg(Me)	4.8		0.089	0.10	54.9

^a各誘導体のアゴニスト活性をmetastin(45-54)に対する比活性として記載した。EC₅₀ ratio = EC₅₀[化合物] / EC₅₀ [metastin(45-54)]、

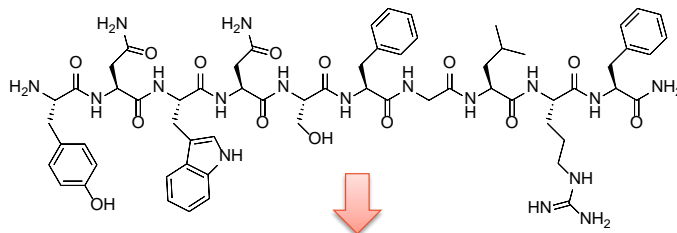
^b競合的結合アッセイにおける各誘導体の結合活性 (Ki値)、^cマウス血漿中37°C 1hr処理後の化合物残存率

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8298-8307. Table 1, 2

Figure 3. metastin(45-54)と KiSS1-305 の構造

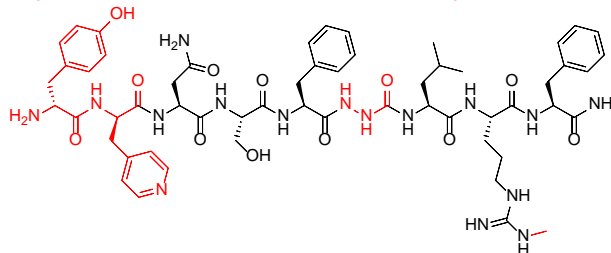
metastin(45-54):

H-Tyr⁴⁵-Asn⁴⁶-Trp⁴⁷-Asn⁴⁸-Ser⁴⁹-Phe⁵⁰-Gly⁵¹-Leu⁵²-Arg⁵³-Phe⁵⁴-NH₂



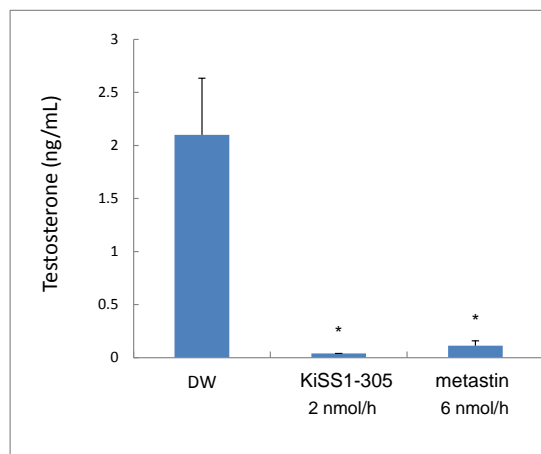
KiSS1-305:

H-D-Tyr⁴⁶-D-Pya(4)⁴⁷-Asn⁴⁸-Ser⁴⁹-Phe⁵⁰-azaGly⁵¹-Leu⁵²-Arg(Me)⁵³-Phe⁵⁴-NH₂



前述のようにメタスチンを慢性投与することにより、性腺機能が減弱されることが報告されている²⁰⁻²³。著者の検討においてもメタスチン全長ペプチドを浸透圧ポンプに封入後、雄ラット皮下に埋め込む持続投与試験において、6 nmol/h の投与速度で血中テストステロンがほぼ検出限界以下に消失することを確認している。一方、血漿中安定性に乏しい短鎖型 metastin(45-54)は抑制作用を示さない。KiSS1-305 はラットでの持続投与試験でテストステロン抑制活性を示した最初の短鎖誘導体であり、その活性はメタスチンより強力で、低用量(2 nmol/h)でより強力な抑制作用を示した²⁶ (Fig. 4)。

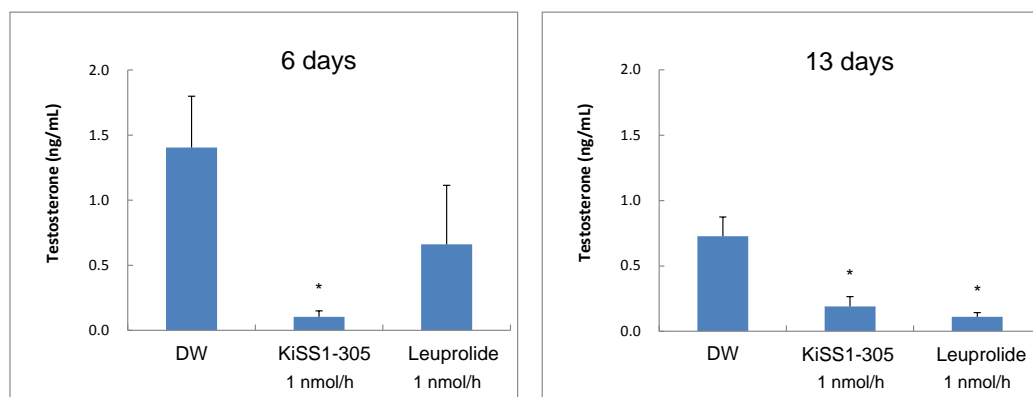
Figure 4. KiSS1-305 (2 nmol/h) およびメタスチン (6 nmol/h) の雄ラット 6 日間持続投与試験後の血漿中テストステロン濃度. 対照群：蒸留水(DW) [グラフ中*は対照群 (蒸留水投与群) に対し、有意に抑制作用が認められたことを示す(P< 0.05, nonparametric Steel 検定)]



(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8298-8307. Fig. 4

KiSS1-305 およびリュープロレリン酢酸塩を同用量(1 nmol/h)で雄ラットに持続投与し、投与開始 6 日後、13 日後の血漿中テストステロン濃度を比較した結果、KiSS1-305 はリュープロレリン酢酸塩より、速やかに血漿中テストステロン濃度を低下させることが明らかとなった(Fig. 5)。両化合物とも 13 日後には全個体でテストステロンを有意に抑制したが、KiSS1-305 は投与開始 6 日後時点で 5 匹中 2 匹の血漿中テストステロン濃度を検出限界(0.04 ng/mL)以下に低下させた。これらの知見は、血漿中テストステロンを減少させる作用メカニズムが、メタスチンと GnRH アゴニストとで異なることを示唆する。

Figure 5. KiSS1-305 およびリュープロレリン酢酸塩（それぞれ 1nmol/h）の雄ラット持続投与試験における試験開始 6 日後、13 日後の血漿中テストステロン濃度. 対照群：蒸留水(DW). [グラフ中*は対照群（蒸留水投与群）に対し、有意に抑制作用が認められたことを示す(P< 0.05, nonparametric Steel 検定)]



(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8298-8307. Fig. 4

Matsui らは KiSS1-305 および第 2 章に記載する新規メタスチン誘導体 TAK-448 を用いた詳細な検討により、メタスチン誘導体の持続的投与が、視床下部 KISS1R の反応性を低下させた結果、内因性 GnRH パルスを抑制し、下垂体-性腺機能の下流を抑制することを示した²⁷。同検討において、TAK-448 の持続的投与が、リュープロレリン持続投与群と比較し、雄ラットにおける血漿テストステロンの濃度をより低い濃度に維持することが示された。GnRH アナログによる前立腺癌アンドロゲン遮断療法 (androgen deprivation therapy, ADT) は広く用いられているが、投与開始後、最初の週に観察されるテストステロンの一時的な上昇 (フレア) は治療効果、副作用の点で好ましくないとされている²⁷。また、治療効果の点で ADT における血中テストステロン値が低いほど全生存率を含む良好な予後をもたらすことが報告されている²⁸。

視床下部 KISS1R を標的とするメタスチン誘導体は下垂体 GnRH 受容体を標的とする GnRH アゴニストとは治療標的と作用メカニズムが異なり、血中テストステロンを急速に、かつ著しく低下させる能力を有することから、GnRH アナログによる前立腺癌療法より有望である可能性がある。以上の点から、リュープロレリンとの差別化が可能と考えられる。

3. 研究の目的

優れた薬理活性を示すリード化合物 KiSS1-305 を用いた様々な検討によって、作用メカニズム解析が進められ²⁷、著者はメタスチン誘導体が前立腺癌などの性ホルモン依存性疾患治療薬として十分な可能性を有していることを確信した。

一方、臨床試験用化合物選択を見据えた検討において、KiSS1-305 は化学的安定性が不足していることが明らかとなった。また、治療薬として長期投与製剤化を見据えた場合、さらなる活性向上が必要であることが明らかとなった。著者はこれらの問題を解決し、医薬品として開発可能なプロファイルを有するメタスチン誘導体を創製するべく、最適化研究を開始した。

第一章では KiSS1-305 の化学的安定性向上を目的とした置換検討および薬理活性向上を指向した置換検討について記述する。分解機構の推定ならびに分解過程の反応機構に基いた安定性向上のためのデザイン、置換検討を実施した。また、薬理活性向上を目的とし、薬物動態パラメーターに基づいた論理的デザイン、置換検討を実施した。これらの検討に基づいて、化学的安定性が向上し、優れた薬理活性を有する新薬候補化合物 TAK-683 を創製した過程について記述する。

TAK-683 は良好な水溶性を有しており、20 mg/mL の濃度で蒸留水に溶解可能である。一方で 20 mg/mL 水溶液を室温で放置した際に経時的にゲル化することが明らかとなった。製造工程、製剤化工程でゲル化の性質が問題となった場合、もしくは高濃度溶液調製が必要となった場合に備え、溶解性がさらに改善し、ゲル化が回避された誘導体を取得することが必要と考えた。第二章ではペプチドの溶解性改善に取り組み、溶解性に優れ、かつ TAK-683 を上回る薬理活性を有する新薬候補化合物 TAK-448 を創製した過程について記述する。

第一章、第二章で取得した TAK-683 および TAK-448 は非常に強力な作用を有しており、0.1 nmol/h [50 nmol/(kg·week)]以下の低用量でも薬効を示した。ラット持続投与試験での最低有効血中濃度は 10 fmol/mL 以下と LC/MS/MS による定量法の下限を下回る可能性があったことから、前臨床、臨床試験を進める上で、さらなる高感度検出系の構築が必要と考えた。2 種の抗体で 1 分子を認識するサンドイッチ ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 法が感度、特異性、操作性の面から最適と考えたが、9 残基のペプチドを感度よく検出するサンドイッチ ELISA 系は過去に例がなく、従来法では抗体同士の干渉による低感度化が観察された。抗体同士の干渉を回避し、ペプチド末端を精度よく認識する抗体の取得を可能とした新しい手法を考案することで、問題を回避し、高感度化を達成した過程について、第三章に記述する。

第一章 KiSS1-305 の化学的安定性および薬理活性向上を目指した合成検討と生物活性評価 : TAK-683 の創製

1. 諸言

序論に記載の通り、metastin(45-54)をリード化合物とした合成研究の結果、ラット持続投与試験において、優れたテストステロン抑制活性を示すノナペプチドアナログ KiSS1-305: [D-Tyr⁴⁶,D-Pya(4)⁴⁷,azaGly⁵¹,Arg(Me)⁵³]metastin(46-54)を見出した。メタスチン誘導体の臨床試験は、まず注射液による単回投与、反復投与試験にて進める計画が立てられた。注射液による試験結果を確認後、慢性投与剤として、徐放製剤での試験が行われる計画である。KiSS1-305 が注射液として臨床試験で使用可能であるか確認することを目的とし、物理化学試験を実施した。同時に KiSS1-305 の薬効が治療薬として十分であるかを検討した。

KiSS1-305 溶液安定性試験

KiSS1-305 の溶液安定性を調べることを目的として、4 種の pH 緩衝液を用いた安定性試験を実施した³⁰。KiSS1-305 を約 50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で 10% MeCN を含む JP1 溶液(日本薬局方崩壊試験第 1 液、pH 1.2)および pH 3, 5, 7 緩衝溶液に溶解後、37°C で暗所保存した。経時的にサンプリングした溶液を HPLC 分析し、イニシャル (0 時間) に対する残存率を求めた (Table 3)。

Table 3. KiSS1-305 の溶液安定性

time	残存率 (%)			
	pH 1.2 (JP1)	pH 3	pH 5	pH 7
initial	100	100	100	100
1 week	60.3	99.4	94.8	54.9
2 week	32.8	100.5	91.2	28.0

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 6105-6115. Table 3

その結果、KiSS1-305 の 37°C 2 週間までの溶液安定性は pH 3 では安定、pH 5 では残存率が 90%以上であったが、JP1(pH 1.2)及び pH 7 では約 30%と不安定であった。一般にペプチドは強酸性条件、強アルカリ条件ではペプチド結合の加水分解が起こる。JP1 中での分解は想定内であり、強酸性での取り扱いを避けることで回避できる。しかし、pH 7 緩衝液中での化学的不安定性は注射剤の安定性を低下させ、製剤化工程においても問題となる可能性があるため、新薬候補化合物としては適さないと判断した。HPLC, LC/MS/MS による解析から、pH 5 および pH 7 緩衝液中で原体の消失に伴い生成した分解物が 48 位 Asn 側鎖のデアミノ体、すなわち 48 位 Asp およ

び β -Asp 体とであると推定した^{31, 32}。推定分解経路については後述する。これらの分解を抑制することを目的とした検討を実施することとした。

KiSS1-305 の薬理活性について

序論にて、雄ラットにおける KiSS1-305 とリュープロレリン酢酸塩の持続投与試験結果 (1 nmol/kg/day) について記載した。KiSS1-305 はリュープロレリンと比較して、速やかなテストステロン抑制作用を示し、投与開始 6 日後には 5 個体中 2 個体の血漿中テストステロン濃度を検出限界以下に低下させた (Fig. 5)。投与開始 13 日後においても、抑制作用は対照群と比較して有意であったが、血漿中テストステロン濃度の平均値は投与開始 6 日後時点より上昇し、その値はリュープロレリン投与群を上回った。本結果から著者は KiSS1-305 の薬理活性がリュープロレリンと比較し、同等以下であり、臨床候補化合物としては十分ではないと判断した。徐放製剤化を検討する上で、薬効量低下に伴う封入薬物量の減少は長期製剤化検討の点でも有利となることから、薬理活性向上を目指した検討が必要と考えた。

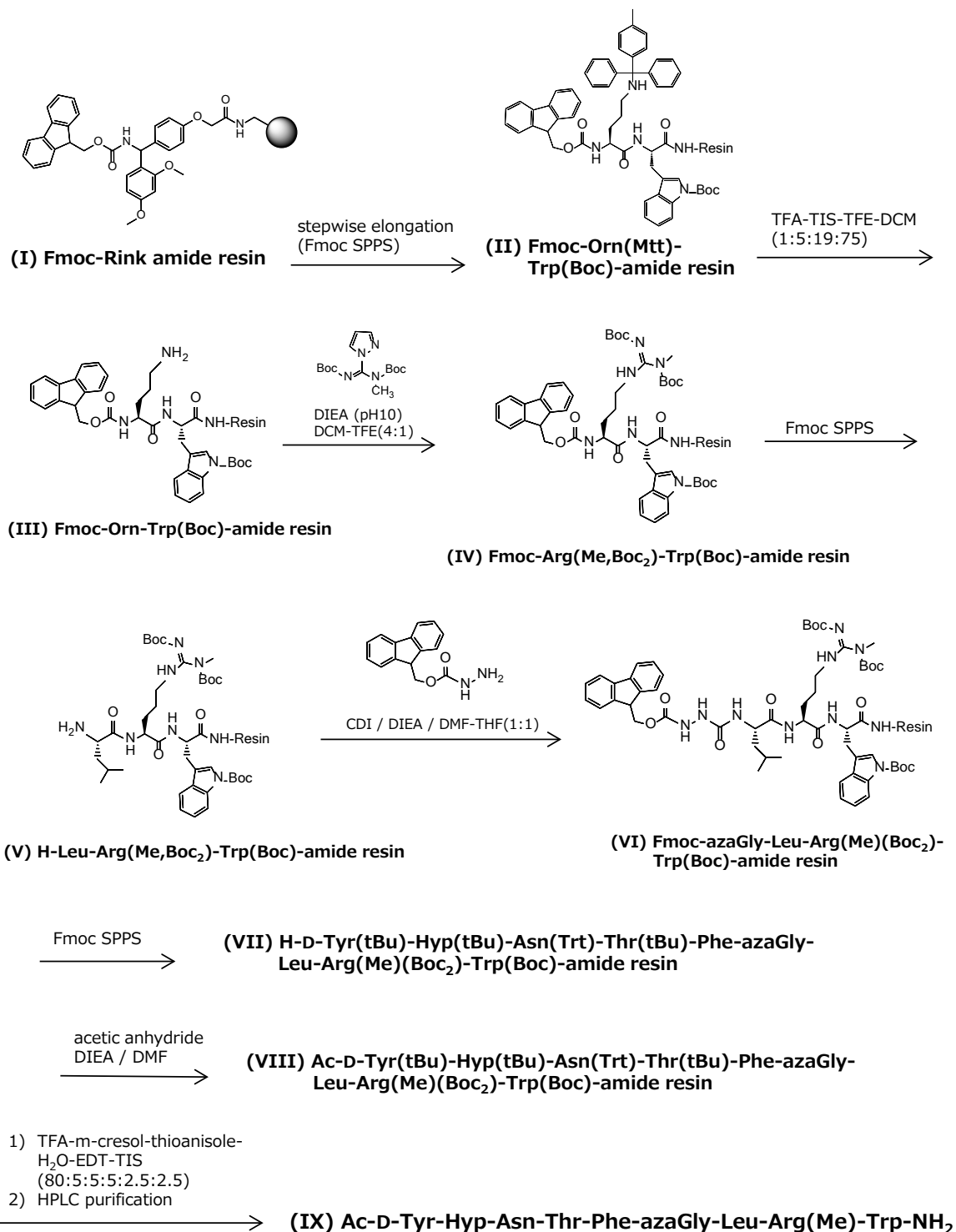
本章では新薬候補化合物として適切な化学的安定性を有し、リュープロレリンを上回る薬理活性を有する誘導体取得を目指した合成研究について記述する。

2. 合成および化合物評価

本論文で評価に用いた全てのペプチドは Scheme 1 記載の TAK-448 合成スキームに準じて合成した。以下に各段階の説明を記述する。詳しい等量数などは実験項に記載した。

1. 1% TFA 処理には安定で、95% TFA 処理にて脱保護可能な Rink amide リンカーが導入された Rink amide resin (I)を出発物質とし、Fmoc 固相合成法にて、54 位 Trp(Boc)、53 位 Orn(Mtt)を導入し、Fmoc-Orn(Mtt)-Trp(Boc)-NH-amide resin (II)を合成した。
2. Rink amide resin は 1%TFA 処理には安定で、Orn 保護基の Mtt 基は 1%TFA 処理にて脱保護可能であることを利用し、TFA-TIS-TFE-DCM (1:5:19:75)処理にて、Orn(Mtt)の選択的脱保護を実施した。
3. 得られた Fmoc-Orn-Trp(Boc)-NH-amide resin (III)を DIEA にて pH を 10 に調整した DCM-TFE(4:1)中 *N*-methyl-*N,N'*-bis-Boc-1-guanylpiperazine で室温、終夜処理することで Orn 残基を Arg(Me,Boc₂)に変換、Fmoc-Arg(Me,Boc₂)-Trp(Boc)-NH-amide resin (IV)を取得した。
4. 固相合成法にて Leu を導入、脱 Fmoc し、H-Leu-Arg(Me,Boc₂)-Trp(Boc)-NH-amide resin を得た (V)。別容器にて Fmoc-NHNH₂・HCl と CDI および DIEA を DMF-THF (1:1)中で混合し、1 時間反応した溶液を樹脂に加え、終夜攪拌することでアザグリシン(azaGly)部分を構築、Fmoc-azaGly-Leu-Arg(Me,Boc₂)-Trp(Boc)-NH-amide (VI)を取得した。
5. (VI)を共通原料とし、各誘導体の 46-49 位を通常の Fmoc 固相合成法にて構築し(VII)、N 末端がアセチル化された誘導体は無水酢酸にてアセチル化し、N 末端アシル化サンプルは対応するカルボン酸を Fmoc アミノ酸縮合同条件で導入した(VIII)。
6. 得られた保護ペプチド樹脂(VIII)を各種スカベンジャーを含む、脱保護用 TFA カクテルにて処理することで、樹脂からの脱離と側鎖保護基の脱保護を同時に実施し、粗ペプチドを取得した。
7. 得られた粗ペプチドを分取 HPLC によって精製後、凍結乾燥によって、目的物(IX)を非晶質粉末として取得した。得られた精製ペプチドは HPLC 純度 95%以上であることを確認し、MALDI TOF MS 分析によって同定した。

Scheme 1. TAK-448 の合成スキーム



合成ペプチドのアゴニスト活性はヒト KISS1R 発現 CHO 細胞での細胞内 Ca イオン濃度上昇を FLIPR によって測定することで評価し、EC₅₀ 値として記した。また、結合活性は放射性リガンド [¹²⁵I-Tyr⁴⁵] metastin (40-54) とヒト KISS1R 発現 CHO 細胞膜画分を用いた KISS1R 結合阻害アッセイによって評価し、K_i 値を算出した。

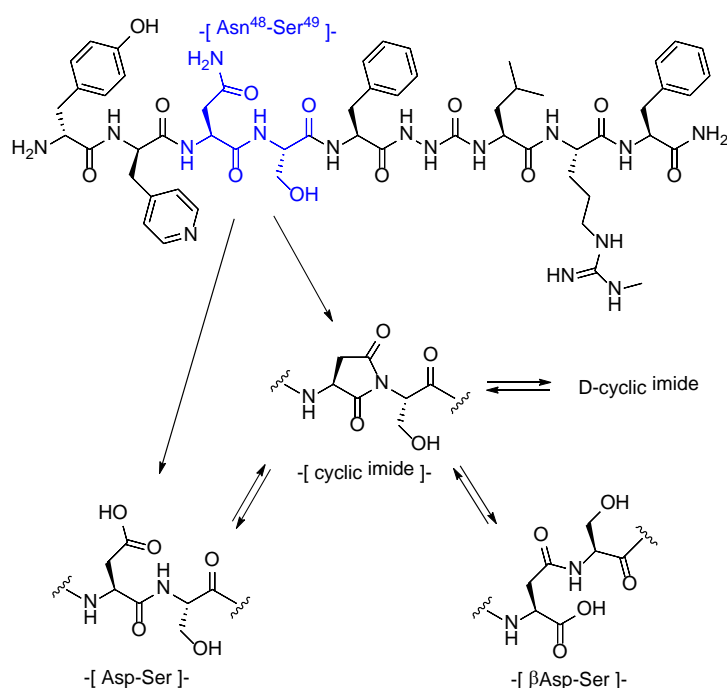
In vitro 評価にて良好な活性を示した誘導体については、雄ラット皮下持続投与試験によって、

テストステロン抑制活性を評価した。試験には、動物の体内に埋め込むことで、封入した溶液を一定流量で放出するアルゼット型浸透圧ポンプを用いた。化合物溶液を封入した浸透圧ポンプをラットの皮下に埋め込み、6日後、採血、血漿中テストステロン濃度をラジオイムノアッセイ(RIA)にて測定した。5個体中検出限界以下 (<0.04 ng/mL) の個体数が4個体以上の場合を有効と定義し、最小有効投与量、もしくは同用量投与時の検出限界以下の個体数によって化合物の薬効を比較した。

3. 化学的安定性向上と薬理活性向上を指向した 48 - 49 位および 54 位の置換検討

諸言に示した KiSS1-305 溶液安定性試験において、pH 5 及び pH 7 緩衝液中の分解物は HPLC 分析で類似のプロファイルを示したが、JP1 (pH 1.2) 中では他の分解物が認められた。pH 5 および pH 7 緩衝液中で原体の消失に伴い生成した分解物は LC/MS/MS による解析の結果、48 位 Asn 側鎖のデアミノ体、すなわち 48 位 Asp および β -Asp 体とであると推定した。このような Asn 残基のデアミノ化による非酵素的、不可逆な分解はペプチドやタンパク質の製造工程(固相合成、液相合成、精製)ならびに保存時に起こり、純度低下の原因となることが報告されている^{33,34}。推定分解経路について Fig.6 に記載する。

Figure 6. KiSS1-305 の溶液安定性試験における推定分解経路



(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 6105-6115. Fig. 1

反応の第一段階に、スクシンイミド化とよばれる分子内環化が起こり、続いてデアミノ化を伴う環開裂反応が進行し、Asn 残基が Asp あるいは β Asp に変換されたペプチドが生成する経路を主分解経路と推定した。Asn 側鎖の脱アミド化反応速度は pH 依存的であり、pH3 付近が最も安定であり、pH の低下、あるいは上昇に伴い分解速度が向上する³⁵。pH 1-2 の範囲では環状構造が安定であり、開環反応が起こらないこと、デアミノ化にエピメリ化を伴わないことから、pH 1-2 のデアミノ化は環形成を介さずに Asn 側鎖のカルボキサミドが直接加水分解されることによると考えられている。なお、pH 1.2 の JP1 中での分解物は未同定であるが、pH 5, pH 7 緩衝溶液中での分解物とは HPLC の保持時間が異なることから、Asn 側鎖のデアミノ体以外の分解物であると想定される。

pH 5 以上では開環反応は非常に早く起こり、分解速度は分子内環化反応に依存する。Table 3

に記載した通り、KiSS1-305 は pH 3 緩衝液中では安定であり、pH 5 ではわずかに分解し、pH 7 において、分解が多く観察されている。本結果はこれらの報告と一致していることから、pH 7 での分解はスクシンイミド環形成反応によるものと判断した。

スクシンイミド化の機構として 48-49 位 Asn-Ser 間のアミド結合の窒素が Asn 側鎖のカルボニル炭素を求核攻撃すると考えられる。本反応による分解速度は前述の pH の他に、アミノ酸配列、温度、pH、緩衝溶液の組成、サンプル濃度に依存する。配列については、Asn 近傍の自由度が高い場合、特に Asn-Gly や Asn-Ser などの配列では起こりやすい³⁵⁻⁴¹。

Asn 残基のデアミノ化の反応機構とペプチド鎖の自由度が高い場合にスクシンイミド形成が速く進行するとの知見より、

- (1) 49 位 Ser 残基を β 分岐鎖アミノ酸などの立体障害が大きく、嵩高いアミノ酸に置換する。
- (2) 48 位 Asn 残基をカルボキサミドを有さない、他のアミノ酸に置換する。
- (3) 求核攻撃抑制を指向し、49 位 Ser 残基を環状アミノ酸へ置換する。

計画を立てた。(2),(3)の置換はスクシンイミド形成を完全に抑制可能であり、(1)は反応速度低下による分解抑制効果が得られるとの仮説に基づく計画である。

研究初期段階の metastatin(45-54)をリード化合物とした置換検討において、54 位 Phe の Trp 置換がアゴニスト活性、受容体親和性を向上させることを見出している(化合物 5, Table 4)。KiSS1-305 の活性向上を指向し、同置換を適用したところ、ヒト KISS1R での評価において、3 倍程度のアゴニスト活性向上効果を認めた(化合物 6)。54 位を Phe から Trp に置換することによる疎水性の向上が、受容体-リガンド間の相互作用を強化したと考えられる。また、ラット KISS1R においては KiSS1-305 と化合物 6 は同程度の *in vitro* 活性値であった。ラット持続投与試験において、KiSS1-305 0.3 nmol/h 投与群では血漿中テストステロン濃度を検出限界以下(0.04 ng/mL)に抑制した個体は認められなかったが、化合物 6 投与群では 5 個体中 2 個体が検出限界以下であった(Table 5)。同等の *in vitro* 活性でありながら、KiSS1-305 を上回る *in vivo* 活性を示したことは、54 位 Trp 置換が全身クリアランス値などの薬物動態を改善する効果があることを示唆すると考察した。

これらの結果より、KiSS1-305 の 54 位 Trp 置換体化合物 6 をリード化合物として選択し、以下の検討に用いた。

Table 4. metastin(45-54) / KiSS1-305 54 位 Trp 置換体の *in vitro* 活性

metastin(45-54), 5: H-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-AA⁵⁴-NH₂

4, 6: H-D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-AA⁵⁴-NH₂

Compound	AA ⁵⁴	agonistic activity		affinity	
		EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		Ki ^b , nM (95%信頼区間)	
		human	rat	human	rat
metastin(45-54)	Phe	0.96 (0.55–1.7)	4.2 (3.0–6.1)	0.035 (0.029–0.044)	0.088 (0.073–0.11)
5	Trp	0.44 (0.25–0.77)	1.3 (0.88–1.9)	0.026 (0.020–0.033)	ND ^c
4 (KiSS1-305)	Phe	2.6 (1.9–3.5)	10 (8.0–12)	0.11 (0.092–0.12)	0.14 (0.12–0.17)
6	Trp	0.87 (0.64–1.2)	6.0 (5.6–6.5)	0.074 (0.059–0.093)	0.13 (0.10–0.17)

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b Ki値は放射性リガンドの結合を50%阻害するのに必要な化合物濃度として算出した。

^c ND: not determined

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 6105-6115. Table 1

Table 5. KiSS1-305 54 位 Trp 置換体の *in vivo* 活性

4, 6: H-D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-AA⁵⁴-NH₂

Compound	AA ⁵⁴	テストステロン抑制活性 ^a			
		血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数[n/5 (%)]			
		2 nmol/h	0.5 nmol/h	0.3 nmol/h	0.1 nmol/h
4 (KiSS1-305)	Phe	5 (100)	3 (60)	0	0
6	Trp	4 (80)	3 (60)	2 (40)	0

^a 投与速度 2, 0.5, 0.3, 0.1 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性: 各誘導体を2, 0.5, 0.3, 0.1 mMで蒸留水に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1: CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合(%)として記載した。

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 6105-6115. Table 2

前述の計画(1)に基づき、化合物**6**の49位Ser残基をβ分岐鎖アミノ酸、β置換アミノ酸 Thr (**7**), Val (**8**), Phg (**9**), Tle (**10**)へと置換した(Table 6 上段)。また、嵩高いアミノ酸の代表として Trp への置換(**11**)を行った。また計画(3)の環状アミノ酸への置換として、49位 Pro(**12**), Hyp (**13**)置換体を合成した。*In vitro* 評価の結果、**7** から **13** 全ての置換体に比較的良好なヒト KISS1R に対するアゴニスト活性が認められた(Table 6 上段)。β分岐鎖アミノ酸の中では Thr(**7**)および Val(**8**)が優れており、環状アミノ酸の中では Pro (**12**)が優れた活性を示した。Trp 体 (**11**)は良好な *in vitro* 活性を示したものの、水溶性が低く、同置換を含む合成展開に懸念が認められたため、これ以上の検討を中止した。

リード化合物 KiSS-305 を創出する過程において、47 位 D-Trp 置換体は良好な受容体親和性を示すとの知見を得ている²⁶。同置換を化合物**6**に適用した結果、アゴニスト活性、受容体親和性の向上が認められた(化合物**14**)。54位PheからTrpへの置換と同様に、疎水性向上効果により、受容体-リガンド間の相互作用が強化されたと考えられる。47位D-Trp置換を49位Ser, Thr,

Val置換と組み合わせた場合、全ての誘導体において(14, 15, 16)、47位D-Pya(4)体(6, 7, 8)より強力なアゴニスト活性がヒト/ラット KISS1Rにおいて認められた。

ラット6日間持続投与試験でのテストステロン抑制活性評価において、[D-Pya(4)⁴⁷,Val⁴⁹]体(8)および[D-Trp⁴⁷,Val⁴⁹]体(16)は0.5 nmol/hの投与量で検出限界以下の個体がなく、Ser⁴⁹体と比較し、活性が低下した(Table 6 下段)。また、Pro⁴⁹置換体(12)についても0.5 nmol/hでの活性低下が認められた。一方、49位Thr置換体15はSer体14と同等以上のテストステロン抑制活性を示した。Val⁴⁹体16と15は水酸基の有無のみの違いであるが、*in vivo*活性に大きな差が認められたことから、水酸基が薬物動態、受容体脱感作に重要な役割を果たしていると予想される。

計画(2)に基づいたスクシンイミド形成を完全に抑制する置換として、48位Asnをカルボキサミドを有さないアミノ酸に置換する検討を実施した。化合物6のAsnをAla(17)、Thr(18)へと置換した誘導体を合成したところ、Thr置換体18はラット KISS1Rアゴニスト活性が大きく低下した。一方、Ala置換体17はヒト、ラット KISS1Rとも化合物6と同等のアゴニスト活性を示した。しかしながら、化合物17はラット持続投与試験において2 nmol/hの投与速度でテストステロン抑制作用を示さなかった。47位D-Trpと48位置換を組み合わせた[D-Trp⁴⁷,Ala⁴⁸,Ser⁴⁹](19)、[D-Trp⁴⁷,Ala⁴⁸,Thr⁴⁹](20)、[D-Trp⁴⁷,Abu⁴⁸,Ser⁴⁹](21)はいずれも強力なアゴニスト活性を示した。しかし、最も強力な*in vitro*活性を示した化合物21も化合物17と同様に2 nmol/hでテストステロン抑制作用を示さなかった。これらの結果から48位Asnはテストステロン抑制に重要な役割を果たしていると考えられる。

Table 6. 47-49 位置換体の *in vitro* 活性 (上段)および *in vivo* 活性 (下段)

H-D-Tyr-AA⁴⁷-AA⁴⁸-AA⁴⁹-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp- NH₂

Compound	AA ⁴⁷	AA ⁴⁸	AA ⁴⁹	agonistic activity		affinity	
				EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		K _i ^b , nM(95%信頼区間)	
				human	rat	human	rat
6	D-Pya(4)	Asn	Ser	0.87 (0.64–1.2)	6.0 (5.6–6.5)	0.074 (0.059–0.093)	0.13 (0.10–0.17)
7	D-Pya(4)	Asn	Thr	1.6 (1.3–1.9)	5.7 (4.4–7.2)	0.086 (0.069–0.11)	ND
8	D-Pya(4)	Asn	Val	1.8 (1.1–2.7)	12 (7.5–18)	0.052 (0.039–0.069)	ND
9	D-Pya(4)	Asn	Phg	4.4 (3.7–5.2)	110 (85–130)	ND	ND
10	D-Pya(4)	Asn	Tle	1.5 (1.2–1.9)	22 (17–27)	ND	ND
11	D-Pya(4)	Asn	Trp	0.59 (0.39–0.88)	7.4 (5.9–9.2)	ND	ND
12	D-Pya(4)	Asn	Pro	1.2 (0.89–1.6)	13 (9.2–17)	0.096 (0.080–0.12)	ND
13	D-Pya(4)	Asn	Hyp	2.8 (2.1–3.9)	95 (68–130)	ND	ND
14	D-Trp	Asn	Ser	0.51 (0.43–0.62)	2.3 (1.2–4.4)	0.037 (0.030–0.045)	0.077 (0.062–0.095)
15	D-Trp	Asn	Thr	1.0 (0.77–1.3)	4.1 (2.9–5.8)	0.036 (0.029–0.046)	ND
16	D-Trp	Asn	Val	0.31 (0.17–0.56)	2.2 (0.56–8.7)	0.028 (0.022–0.035)	ND
17	D-Pya(4)	Ala	Ser	0.7 (0.48–1.0)	9.3 (7.3–12)	0.20 (0.17–0.25)	3.6 (2.7–4.6)
18	D-Pya(4)	Thr	Ser	1.3 (1.0–1.8)	32 (19–54)	ND	ND
19	D-Trp	Ala	Ser	0.49 (0.28–0.85)	6.8 (5.1–9.2)	ND	ND
20	D-Trp	Ala	Thr	0.63 (0.40–1.0)	13 (8.5–19)	ND	ND
21	D-Trp	Abu	Ser	0.64 (0.37–1.1)	2.8 (1.8–4.2)	0.12 (0.10–0.13)	0.83 (0.64–1.1)

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

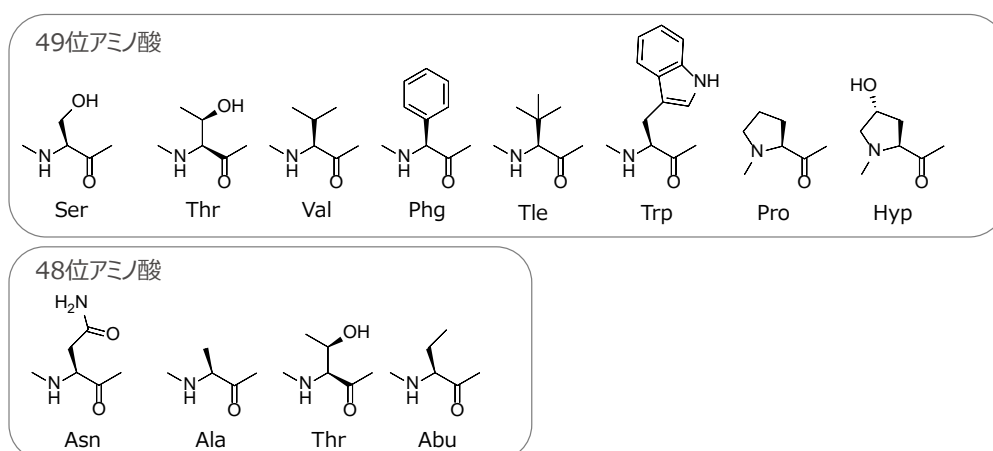
^b K_i値は放射性リガンドの結合を50%阻害するのに必要な化合物濃度として算出した。

Abbreviations: Abu, 2-aminobutyric acid; Hyp, trans-4-hydroxyproline; ND, not determined; Phg, phenylglycine; Pya(4), 4-pyridylalanine; Tle, tert-leucine

Compound	AA ⁴⁷	AA ⁴⁸	AA ⁴⁹	テストステロン抑制活性 ^c			
				血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5 (%)]			
				2 nmol/h	0.5 nmol/h	0.3 nmol/h	0.1 nmol/h
6	D-Pya(4)	Asn	Ser	4 (80)	3 (60)	2 (40)	0
8	D-Pya(4)	Asn	Val	4 (80)	0	ND	ND
12	D-Pya(4)	Asn	Pro	ND	1 (20)	ND	ND
14	D-Trp	Asn	Ser	ND	4 (80)	2 (40)	0
15	D-Trp	Asn	Thr	5 (100)	3 (60)	3 (60)	0
16	D-Trp	Asn	Val	ND	0	ND	ND
17	D-Pya(4)	Ala	Ser	0	ND	ND	ND
21	D-Trp	Abu	Ser	0	ND	ND	ND

^c投与速度 2, 0.5, 0.3, 0.1 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性: 各誘導体を2, 0.5, 0.3, 0.1 mMで蒸留水に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1: CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合(%)として記載した。

Abbreviations: Abu, 2-aminobutyric acid; ND, not determined; Pya(4), 4-pyridylalanine



(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 6105-6115. Table 1, 2

最も優れた *in vivo* 活性を示した 49 位 Thr 置換が実際に溶液安定性向上に効果的であるかを確認するために、49 位 Ser/Thr のみ構造が異なる化合物 **14**、**15** の溶液安定性試験を Table 3 と同条件で実施した (Table 7)。その結果、JP1 溶液 (pH 1.2) および pH 3、pH 5 緩衝溶液中の安定性は両化合物とも同等であったが、pH 7 緩衝溶液中での 2 週間後残存率は化合物 **14** の 28.0% に対し、化合物 **15** は 72.8% と明らかな改善が認められた。なお、化合物 **14** の溶液安定性は全ての pH において KiSS1-305 と同等であった。仮説通り Ser から Thr への置換による立体障害の増加が、スクシンイミド形成反応の速度を低下させ、中性溶液中の安定性向上をもたらしたと考えられる。以上の結果より、化学的安定性と *in vivo* 活性の面から 47-49 位は D-Trp-Asn-Thr の組み合わせが最も良好と結論づけた。

Table 7. 化合物 14、15 の溶液安定性^a

H-D-Tyr-D-Trp-Asn-AA ⁴⁹ -Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH ₂						
Compd	AA ⁴⁹	time	残存率 (%)			
			pH 1.2 (JP1)	pH 3	pH 5	pH 7
14	Ser	initial	100	100	100	100
		1 week	60.8	98.2	96.0	56.5
		2 week	33.4	97.1	90.8	28.0
15	Thr	initial	100	100	100	100
		1 week	64.9	98.7	98.8	84.9
		2 week	39.1	98.2	96.5	72.8

^a各化合物を約 50 µg/mL の濃度で 10% MeCN を含む JP1 溶液 (pH 1.2) および pH 3, 5, 7 緩衝溶液に溶解後、37°C で暗所保存した。経時的にサンプリングした溶液を HPLC 分析し、イニシャル (0 時間) に対する残存率を求めた。

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 6105-6115. Table 2

4. 薬理活性向上を指向したアミノ酸置換

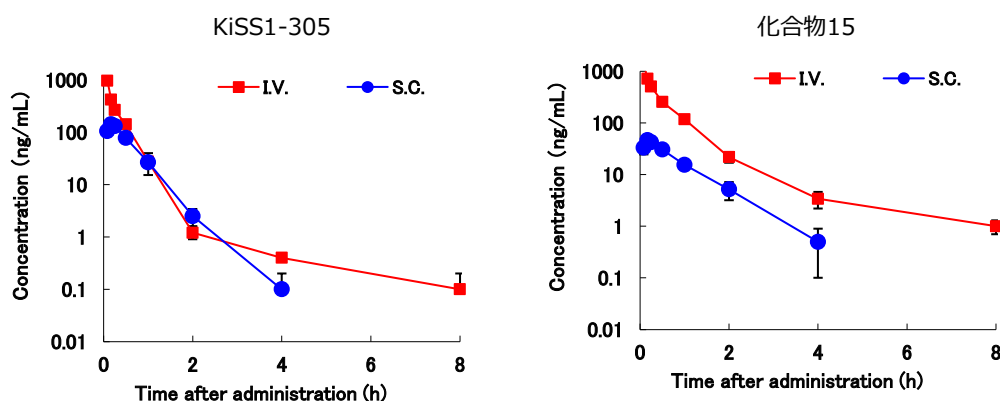
ノナペプチド誘導体の *in vivo* 活性向上を指向した置換検討を実施するにあたり、化合物の薬物動態プロファイルを解析し、デザインの方向付けを行うことを計画した。KiSS1-305 と溶液安定性改善体 15 のラット薬物動態試験結果を Table 8 に記載する。

Table 8. KiSS1-305 および化合物 15 のラットにおける薬物動態パラメータおよび静脈内投与後、皮下投与後血漿中濃度推移^a

KiSS1-305: H-D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂
化合物 15: H-D-Tyr-D-Trp-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

compound	KiSS1-305	15
intravenous administration		
C _{5min} (ng/mL)	969 ± 88	1443 ± 86
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	239 ± 9	503 ± 39
MRT (h)	0.38 ± 0	0.73 ± 0.1
V _{d(ss)} (mL/kg)	1577 ± 110	1455 ± 227
CL _{total} (mL/h/kg)	4196 ± 164	1997 ± 157
subcutaneous administration		
C _{max} (ng/mL)	145 ± 20	47 ± 5
T _{max} (h)	0.14 ± 0.1	0.19 ± 0.05
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	96 ± 11	46 ± 9
MRT (h)	0.61 ± 0.1	0.88 ± 0.1
BA (%)	40.4 ± 4.9	9.2 ± 2.0

^aペプチドをSDラット(n=3)に1 mg/kgの用量で静脈内または皮下投与後5, 10, 15, 30分および1, 2, 4, 8, 24時間後に採血、除タンパク処理後、LC/MSによりペプチドの血漿中濃度を測定し、各パラメータを算出した。AUC:血中濃度曲線下面積, CL_{total}:全身クリアランス, MRT:平均滞留時間, V_{d(ss)}:定常状態分布容積, C_{5min}:投与5分後血中濃度, C_{max}:最高血中濃度, T_{max}:最高血中濃度到達時間, BA:生物学的利用率



*検出限界値(0.1 ng/mL)以下を0として計算、記載した。

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 6105-6115. Table 7

KiSS1-305 の静脈内投与後の血漿中薬物濃度推移を確認した結果、投与 5 分後と比較して、投与 2 時間後には 1/1000 程度まで血漿中濃度が低下することが確認された。また、KiSS1-305 の薬物動態パラメーターにおいて、全身クリアランス値(CL_{tot})が 4196 mL/h/kg と非常に大きい値であった。酢酸リュープロレリンの全身クリアランス値は 935.5 mL/h/kg (0.1 mg/kg 投与時)と報告されている⁴²。Copenhagen ラットに浸透圧ポンプによって、酢酸リュープロレリンを投与速度 5 nmol/h で 6 日間持続投与後の血中濃度を測定したところ、32.6 ng/mL であったが、KiSS1-305 を 2 nmol/h で持続投与後の血漿中濃度は 1.1 ng/mL と低値であった。点滴静注時の定常状態の血中濃度 C_{ss} は薬物の注入速度を全身クリアランス値で除した値となる。皮下持続投与では皮下での分解を考慮する必要があるものの、皮下から血中への移行速度は一定と考えられる。すなわち、点滴静注と同様に全身クリアランスを低下させることで薬物血中濃度を向上させ、強力な薬効発現が可能となると考えた。全身クリアランス値は平均滞留時間(MRT)の逆数と分布容積[$V_{d(ss)}$]の積から算出される値であり、すなわち MRT の延長と分布容積の低下が全身クリアランス低下の鍵となる。

KiSS1-305 の血漿中での安定性を確認した結果、37°C 4 時間後の原体残存率が 54.9%と比較的安定であった²⁶。また、ヒト肝 S-9 分画(肝臓組織のホモジネート由来の上清画分)を用いた定性的代謝安定性試験において、強い反応条件(4 mg protein/mL, 60min)を用いた場合も未変化体は十分に検出され、代謝的に極めて不安定ではなかった (data not shown)。KiSS1-305 と化合物 **15** の分布容積は約 1500mL/kg と大きいこと、血中プロテアーゼによる速やかなペプチド鎖の切断、あるいは肝臓での速やかな代謝が起こっている可能性が低いことから、全身クリアランス値が高値である主たる原因は分布容積の大きさによると仮定した。

分布容積が大きいことは薬物の体内分布が広範囲に及んでいる場合、組織への取り込みが大きい場合、およびその両方が起こっている場合が考えられる。薬物の疎水性が高い場合に組織移行性が高くなり、高分布となる例が多いが、ペプチドの場合、一般の薬物より親水性が高い。KiSS1-305 投与後、速やかに血中濃度が低下することは、親水性の高さから、腎臓などへの集積が起こるためと考察した。また、化合物 **15** の MRT は KiSS1-305 より延長されており、代謝安定性改善が示唆された。一方、化合物 **15** の構成アミノ酸は KiSS1-305 より疎水性が高いが、分布容積はわずかに低下するのみであった。そこで、化合物 **15** の N 末端フリーアミノ基をデアミノ化、もしくはアシル化することで、より親水性を低下させる計画を立てた(Table 9)。アミノ基のアセチル化によって、プロテアーゼ耐性が向上することが報告されており⁴³、物性変換による低分布化との相加的、相乗的な動態改善効果を期待した。

Table 9. 化合物 15 の N 末端デアミノ体、アシル化体の *in vitro* 活性 (上段) および *in vivo* 活性 (下段)

R-AA⁴⁶-D-Trp-Asn -Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂

Cmpd	R	AA ⁴⁶	agonistic activity		affinity	
			EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		K _i ^b , nM(95%信頼区間)	
			human	rat	human	rat
15		D-Tyr	1.0 (0.77–1.3)	4.1(2.9–5.8)	0.036 (0.029–0.046)	ND
22		deaminoTyr	0.30 (0.18–0.50)	1.1 (0.66–1.9)	0.039 (0.027–0.055)	ND
23	Ac	D-Tyr	0.33 (0.25–0.44)	1.3 (1.1–1.6)	0.036 (0.026–0.051)	0.069 (0.056–0.084)
24	butyryl	D-Tyr	0.80 (0.53–1.2)	3.7 (1.7–8.1)	ND	0.11 (0.090–0.14)
25	cyclopropylcarbonyl	D-Tyr	0.82 (0.61–1.1)	4.2 (2.3–7.5)	0.034 (0.025–0.046)	0.087 (0.071–0.11)
26	benzoyl	D-Tyr	0.44 (0.30–0.63)	1.7 (1.2–2.6)	0.027 (0.018–0.040)	ND

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b K_i値は放射性リガンドの結合を50%阻害するのに必要な化合物濃度として算出した。

Abbreviations: ND, not determined; Pya(4), 4-pyridylalanine

Cmpd	R	AA ⁴⁶	テストステロン抑制活性 ^c			
			血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5 (%)]			
			0.1 nmol/h	0.05 nmol/h	0.03 nmol/h	0.01 nmol/h
15		D-Tyr	0	ND	ND	ND
22		deaminoTyr	5 (100)	ND	0	ND
23	Ac	D-Tyr	4 (80)	5 (100)	5 (100)	3 (60)
24	butyryl	D-Tyr	3 (60)	ND	0	0
25	cyclopropylcarbonyl	D-Tyr	ND	ND	0	ND
26	benzoyl	D-Tyr	ND	ND	0	ND

^c投与速度 0.1, 0.05, 0.03, 0.01 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性: 各誘導体を 0.1, 0.05, 0.03, 0.01 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1: CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合(%)として記載した。

Abbreviations: Abu, 2-aminobutyric acid; ND, not determined; Pya(4), 4-pyridylalanine

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 6105-6115. Table 4, 5

46位 D-Tyr のデアミノ体(**22**)とともに脂肪族、脂肪族環状、芳香族アシル基として、アセチル体(**23**)、ブチリル(ブタノイル)体(**24**)、シクロプロピルカルボニル体(**25**)、ベンゾイル体(**26**)をそれぞれ合成し、*in vitro/in vivo* 評価を実施した(Table 9 上段)。その結果、全ての化合物のアゴニスト活性が化合物 **15** より向上し、metastin(45-54)を上回る良好なアゴニスト活性を示した。

これらの誘導体のラット 6日間持続投与試験において、アセチル体である化合物 **23** が非常に強力なテストステロン抑制活性を示した (Table 9 下段)。化合物 **23** は 0.03 nmol/h の投与速度で全個体の血漿中テストステロン濃度を検出限界以下に低下させるとともに、0.01 nmol/h においても5個体中3個体のテストステロンを抑制した。化合物 **6** は 0.3 nmol/h で5個体中2個体を抑制したため (data not shown)、化合物 **6** と比較し、約 30 倍の活性向上が達成されたといえる。

デアミノ体および他のアシル化体については、デアミノ体 **22** およびブチリル体 **24** が 0.1 nmol/h の投与速度で N 末端フリー体 **15** に比べ、良好な *in vivo* 活性を示した。しかしながら、0.03 nmol/h

での比較において、全ての誘導体で検出限界以下の個体を認めず、Ac 体より弱い活性であった。N 末端アシル部分の疎水性の増加により、皮下組織から血中への移行速度が低下し、バイオアベイラビリティ (BA) が低下したと考察している。

N 末端アセチル体 **23** はリード化合物 KiSS1-305 の N 末端アセチル、47 位 D-Trp、49 位 Thr、54 位 Trp の 4 か所を置換した誘導体である。N 末端アセチル化は顕著な *in vivo* 活性向上効果を示し、49 位 Thr は溶液安定性向上効果を示したが、これらの置換と 47 位 D-Trp、54 位 Trp 置換の組み合わせが適切であるかは確認できていない。そこで、化合物 **23** の 47 位、54 位を KiSS1-305 の D-Pya(4)、Phe へとそれぞれ再置換した誘導体 **27**, **28** をそれぞれ合成した (Table 10)。

Table 10. KiSS1-305 および化合物 23, 27, 18 の *in vitro* 活性 (上段) および *in vivo* 活性 (下段)

Cmpd	R	AA ⁴⁷	AA ⁴⁹	AA ⁵⁴	agonistic activity		affinity	
					EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		Ki ^b , nM(95%信頼区間)	
					human	rat	human	rat
KiSS1-305		D-Pya(4)	Ser	Phe	2.6 (1.9–3.5)	10 (8.0–12)	0.11 (0.092–0.12)	0.14 (0.12–0.17)
23	Ac	D-Trp	Thr	Trp	0.33 (0.25–0.44)	1.3 (1.1–1.6)	0.036 (0.026–0.051)	0.069 (0.056–0.084)
27	Ac	D-Pya(4)	Thr	Trp	0.75 (0.54–1.0)	4.1 (2.8–6.1)	0.089 (0.070–0.11)	0.17 (0.13–0.23)
28	Ac	D-Trp	Thr	Phe	0.94 (0.72–1.2)	3.9 (2.5–6.2)	0.038 (0.030–0.049)	0.087 (0.069–0.11)

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b Ki値は放射性リガンドの結合を50%阻害するのに必要な化合物濃度として算出した。

Abbreviations: Ac, acetyl; ND, not determined; Pya(4), 4-pyridylalanine

Cmpd	AA ⁴⁷	AA ⁵⁴	テストステロン抑制活性 ^c		
			血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5 (%)]		
			0.05 nmol/h	0.03 nmol/h	0.01 nmol/h
23	D-Trp	Trp	5 (100)	5 (100)	3 (60)
27	D-Pya(4)	Trp	5 (100)	5 (100)	2 (40)
28	D-Trp	Phe	5 (100)	5 (100)	0

^c投与速度 0.05, 0.03, 0.01 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性: 各誘導体を 0.05, 0.03, 0.01 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1: CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合 (%)として記載した。

Abbreviations: Ac, acetyl; ND, not determined; Pya(4), 4-pyridylalanine

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 6105-6115. Table 4, 5

化合物 **27**, **28** はそれぞれ *in vitro* 活性が化合物 **23** に比べ低下し、47 位 D-Trp、54 位 Trp 置換が受容体との相互作用を強化したことが改めて確認された。またラット 6 日間持続投与試験においては 3 化合物とも 0.03 nmol/kg の低用量で全個体を抑制し、0.01 nmol/kg の用量では化合物 **28** には検出限界以下の個体は観察されなかった。静脈内投与後の薬物動態パラメータを化合物 **15** と比較すると (Table 11)、N 末端フリー体化合物 **15** と比較し、分布容積が 3 化合物とも大きく低下しており、N 末端アセチル化が低分布化に効果的であることが確認された。一方、化合物 **23** と比較し、化合物 **28** は MRT が短く、全身クリアランス値が高かった。54 位 Trp 置換が血中での代謝安定性向上に寄与していることを示唆するものである。

化合物 **15** と **28** は全身クリアランス値に大きく違いがないものの、化合物 **28** は **15** と比較して、強力なテストステロン抑制活性を示した。化合物 **28** は皮下投与後のバイオアベイラビリティ (BA) が他の化合物の 3 倍程度高く、血中への化合物曝露が多いことが高活性に寄与したと思われる。54 位 Phe 体である KiSS1-305 の BA は 40.4% と化合物 **28** と同様に高かった (Table 8)。54 位 Phe から Trp への置換は血中での代謝安定性を向上させた一方で、皮下プロテアーゼに対する抵抗性は低下したと予想される。

化合物 **23** と **27** を比較した場合、静脈内投与後のプロファイルはほぼ同様であるが、皮下投与後の AUC が化合物 **27** が高く、BA も優れていた。47 位インドール環とピリジン環の違いにより、皮下での安定性および皮下から血中への移行効率に差が生まれたと考えられる。

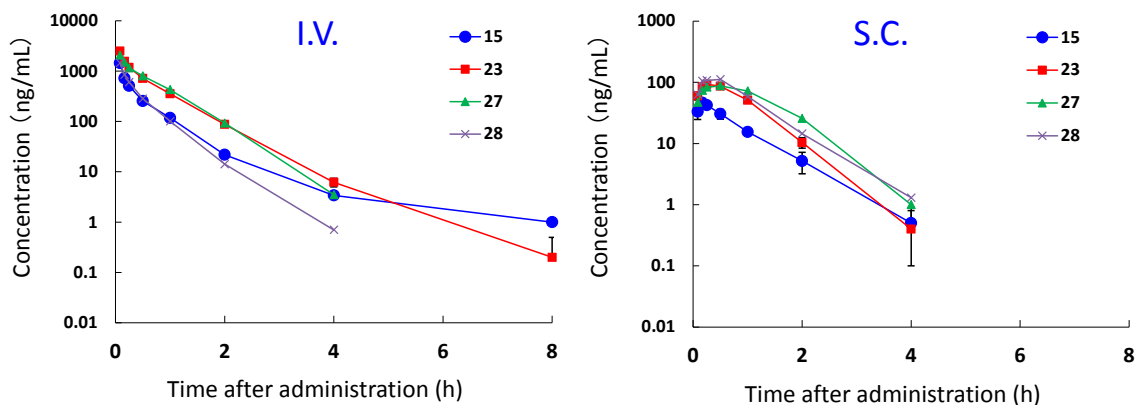
これらの化合物について化合物 **15** (Table 7) と同様に 4 種の pH 溶液中での安定性を確認した結果、pH 1.2 の JP1 溶液中での安定性がわずかに低下した (Table 12)。強酸性条件での分解はペプチド鎖の解裂によるものと想定され、アセチル化による等電点の変化によって酸性溶液中でのイオン化度が変化し、安定性に影響した可能性や立体構造変化により加水分解を受けやすくなった可能性などが考えられる。また、pH 3, 5, 7 緩衝溶液中での安定性は化合物 **15** と同等で、N 末端アセチル化による疎水性向上や 47 位、54 位のアミノ酸置換の影響は認められなかった。

Table 11. 化合物 15, 23, 27, 28 のラットにおける薬物動態パラメータおよび静脈内投与後、皮下投与後血漿中濃度推移^a

- 15 **H-D-Tyr-D-Trp-Asn -Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂**
 23 **Ac-D-Tyr-D-Trp-Asn -Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂**
 27 **Ac-D-Tyr -D-Pya(4)-Asn -Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂**
 28 **Ac-D-Tyr -D-Trp-Asn -Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Phe -NH₂**

compound	15	23	27	28
intravenous administration				
C _{5min} (ng/mL)	1443 ± 86	2509 ± 287	2072 ± 142	1449 ± 171
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	503 ± 39	1225 ± 79	1262 ± 73	497 ± 98
MRT (h)	0.73 ± 0.1	0.69 ± 0	0.69 ± 0.1	0.44 ± 0.1
V _{d(ss)} (mL/kg)	1455 ± 227	562 ± 37	547 ± 37	896 ± 33
CL _{total} (mL/h/kg)	1997 ± 157	819 ± 52	794 ± 45	2067 ± 423
subcutaneous administration				
C _{max} (ng/mL)	47 ± 5	100 ± 44	90 ± 19	114 ± 13
T _{max} (h)	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.10	0.42 ± 0.14	0.42 ± 0.1
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	46 ± 9	115 ± 44	152 ± 36	144 ± 41
MRT (h)	0.88 ± 0.1	0.86 ± 0.2	1.07 ± 0.1	0.88 ± 0.2
BA (%)	9.2 ± 2.0	9.4 ± 3.6	12.1 ± 3.0	28.9 ± 10.1

^aペプチドをSDラット (n = 3) に1 mg/kgの用量で静脈内または皮下投与後5,10,15,30分および1,2,4,8,24時間後に採血、除タンパク処理後、LC/MSによりペプチドの血漿濃度を測定し、各パラメータを算出した。AUC:血中濃度曲線下面積, CL_{total}:全身クリアランス, MRT:平均滞留時間, V_{d(ss)}: 定常状態分布容積, C_{5min}: 投与5分後血中濃度, C_{max}: 最高血中濃度, T_{max}: 最高血中濃度到達時間, BA: 生物学的利用率



*検出限界値(0.1 ng/mL)以下を0として計算、記載した。

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 6105-6115. Table 7

Table 12. 化合物 23, 27, 28 の溶液安定性

Compd	time	残存率 (%)			
		pH 1.2 (JP1)	pH 3	pH 5	pH 7
23	initial	100	100	100	100
	1 week	55.6	97.7	95.9	79.7
	2 week	28.8	95.6	93.6	66.4
27	initial	100	100	100	100
	1 week	58.3	98.7	98.5	82.6
	2 week	33.0	96.8	97.0	69.8
28	initial	100	100	100	100
	1 week	50.6	97.5	98.1	84.5
	2 week	22.3	95.0	96.3	67.6

^a各化合物を約50 µg/mLの濃度で10% MeCNを含むJP1溶液(pH 1.2)およびpH 3, 5, 7緩衝溶液に溶解後、37°Cで暗所保存した。経時的にサンプリングした溶液をHPLC分析し、イニシャル(0時間)に対する残存率を求めた。

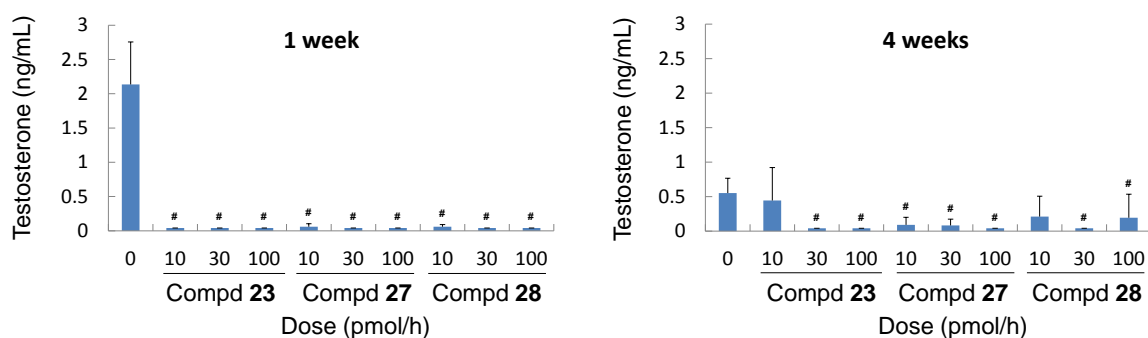
(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 6105-6115. Table 6

化合物 **23**, **27**, **28** のラット 6 日間持続投与試験ではわずかに **23** が良好な活性を示したものの、薬物動態学的パラメータ比較ではそれぞれ異なったプロファイルを有していることが明らかとなった。薬物投与後、定常状態でのテストステロン濃度にて *in vivo* 活性強度を比較することを目的とし、雄ラット 4 週間持続投与試験にて比較を行うこととした。

10, 30, 100 pmol/h (0.05, 0.16, 0.5 μ mol/kg/week) の投与速度での、投与開始後 1 週間、および 4 週間時点での各個体での血漿中テストステロン濃度の平均を Fig.7 に示した。投与後 1 週間時点では全化合物とも 30, 100 pmol/h 投与群で全ての個体のテストステロンを検出限界以下に抑制した。化合物 **23** は投与開始 4 週間後においても 30, 100 pmol/h 投与群で継続して全ての個体で検出限界以下の抑制作用を示したが、化合物 **27** の 30, 100 pmol/h 投与群、化合物 **28** の 100 pmol/h 投与群では一部の個体でテストステロンの上昇が観察された。

本試験での最小有効投与量は化合物 **23** で 30 nmol/h、化合物 **27**, **28** で 100 nmol/h となることから、化合物 **23** が最も薬効が強い化合物と結論付けた。

Figure 7. 化合物 **23**, **27**, **28** の投与速度 10, 30, 100 pmol/h における雄ラット 4 週間持続投与試験^a



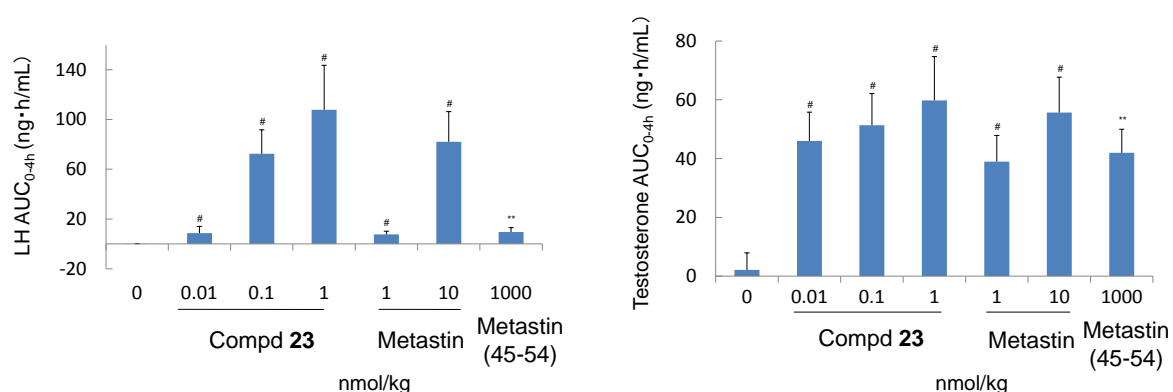
^a各誘導体を10, 30, 100 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1 : CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、1週間後および4週間後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04ng/mL) 未満の場合は0.04として扱った。グラフは各個体の血漿中テストステロン濃度の平均値±標準偏差値を縦軸に記載した。グラフは各個体の血漿中テストステロン濃度の平均値±標準偏差値を縦軸に記載した。グラフ中 # は対照群 (0 pmol/h) に対し、有意に抑制作用が認められたことを示す (one-tailed Shirley-Williams 検定)。

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 6105-6115. Fig. 2

ラット単回投与試験

化合物 **23** の薬効強度を全長メタスチン(metastin)および metastin(45-54)と比較することを目的とし、ラット単回投与試験を実施した。化合物 **23** を 0.01, 0.1, 1 nmol/kg で、メタスチンを 1 または 10 nmol/kg で、metastin(45-54)を 1000 nmol/kg で皮下単回投与後、血漿中の LH およびテストステロンの AUC を算出し、Fig.8 のグラフに記載した。その結果、化合物 **23** はメタスチンの 1/100 の用量で同程度の LH 放出活性を示した。また、metastin(45-54)は 1000 nmol/kg の高用量においても十分な LH 放出活性を示さなかった。テストステロン放出活性については LH 放出より感受性が高く、全化合物とも全用量で有意な LH 放出が観察された。3 化合物間の活性強度を比較すると化合物 **23** の 0.01 nmol/kg 投与時の活性とメタスチン 1 nmol/kg 投与群、metastin(45-54) 1000 nmol/kg 投与群が両アッセイで同程度の活性を示した。アゴニスト活性向上と動態改善を指向した検討により、メタスチンの 100 倍、metastin(45-54)の 10 万倍程度の *in vivo* 活性向上が達成されたといえる。

Figure 8. 化合物 **23** およびメタスチン、metastin(45-54)のラット単回投与試験^a



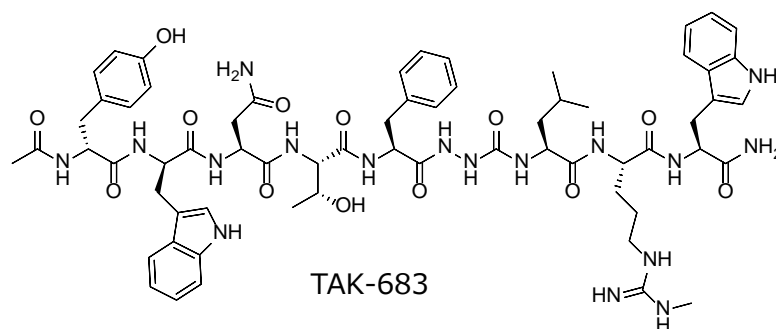
化合物23およびメタスチン、metastin(45-54)を50% DMSO水溶液に溶解し、雄ラットに0, 0.01, 0.1, 1 nmol/kg (化合物23), 1, 10 nmol/kg (metastin), 1000 nmol/kg [metastin(45-54)]の用量で皮下投与後、0, 0.5, 1, 2, 4, 8 hにそれぞれ尾静脈より採血を行った。LHおよびテストステロン濃度を測定し、0-4hのAUCを算出し、平均値±標準偏差値を縦軸としてグラフに記載した。グラフ中 * は対照群(0 nmol/kg)に対し、有意に抑制作用が認められたことを示す (Aspin-Welch *t* 検定, $p \leq 0.01$)。

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 6105-6115. Fig. 3, 4

結論

本章ではノナペプチドメタスチン誘導体である KiSS1-305: [D-Tyr⁴⁶,D-Pya(4)⁴⁷,azaGly⁵¹, Arg(Me)⁵³]metastin(46-54)をリード化合物とした、溶液安定性の向上および薬理活性向上を目的とした変換検討について記述した。中性緩衝溶液中での分解メカニズムに基づいて、Ser 残基を Thr 置換することにより、スクシンイミド形成反応における立体障害を増加し、分解速度の低下と安定性向上を達成した。また、KiSS1-305および化合物 **15** の薬物動態学的パラメータを解析し、N 末端アミノ基を Ac 化することで、分布容積を低下し、全身クリアランスを改善しうることを見出した。N 末端 Ac 化、47 位 D-Trp 置換、49 位 Thr 置換、54 位 Trp 置換を行った化合物 **23** は強力な *in vitro* 活性と優れた動態プロファイルを有し、4 週間ラット持続投与試験における最小有効投与量 30 pmol/h (0.16 μ mol/kg/week) と非常に強力な活性を示した。化合物 **23** はラットおよびイヌでの 4 週間持続投与試験毒性試験において、安全マージン 1000 倍以上と優れた安全性を示したことから、化合物 **23** を臨床開発化合物 TAK-683 として選択した。

健常人男性を対象とした臨床試験において、TAK-683 は優れた動態プロファイルを示し、皮下単回投与において、血漿中テストステロン、LH および FSH レベルを上昇させた⁴⁴。また皮下持続投与試験における強力なテストステロン抑制作用についても確認され、去勢抵抗性前立腺癌をはじめとした性ホルモン依存性疾患治療薬への展開の可能性が示唆された。



第二章 TAK-683 の溶解性改善および水溶液のゲル化回避を目指した合成検討と生物活性評価 : TAK-448 の創製

1. 諸言

前章ではリード化合物 KiSS1-305: [D-Tyr⁴⁶,D-Pya(4)⁴⁷,azaGly⁵¹,Arg(Me)⁵³]metastatin(46-54)の化学的安定性と薬理活性向上を指向した合成検討により、臨床開発化合物 TAK-683 を創出した過程について記述した。TAK-683 は健常人を対象とした臨床試験において、皮下持続投与にて強力なテストステロン抑制作用を示したことから、持続投与製剤を開発することで、去勢抵抗性前立腺癌治療薬として開発することが計画されている⁴⁴。

TAK-683 注射剤の投与液処方検討において、TAK-683 の溶解性検討が実施された。その結果、TAK-683 は 20 mg/mL の濃度で蒸留水に溶解可能であり、一般の低分子化合物と比較して良好な水溶性を示した。一方、TAK-683 20 mg/mL 水溶液を室温放置した結果、24 時間以内にゲル化が進行することが確認された。ペプチド性薬剤リユープロレリン酢酸塩のマイクロカプセル型徐放性製剤は生体内分解性ポリマーである乳酸とグリコール酸のランダム共重合体(PLGA) を壁化合物としたマイクロカプセルに薬剤が封入されたものである。1g/mL と極めて高い親水性を有するリユープロレリン酢酸塩は、まず原薬をゼラチン水溶液に高濃度に溶解し、ポリマーのジクロロメタン溶液に加えて油中水滴(W/O)エマルジョンを形成後、ポリビニールアルコール水溶液中に分散し、W/O/W 型複合エマルジョンを作製する工程によりマイクロカプセル化を行う⁴⁵。同様の手法にて長期投与製剤化を行う場合、少しでも溶解性が向上した誘導体が望ましい。また水溶性が低い場合は薬剤を有機溶媒に溶解し、水中油滴(O/W)型マイクロカプセルを作製する手法も可能であるが、良好な放出特性を有するマイクロカプセルが取得できないことも想定された。ゲル化および低水溶性は製造工程、および注射剤の製剤化工程で問題となる可能性も懸念される。TAK-683 は first in class 薬剤として臨床試験が進められることが計画されていたが、これらの性質が問題となった場合、速やかに代替化合物が必要となる。そこで、TAK-683 の臨床試験のための検討を進めると同時にバックアップ化合物の設計、合成検討を実施することとした。バックアップ化合物に求められるプロファイルとして、TAK-683 と同等以上の薬理活性を示し、TAK-683 と物性が異なり、優れた水溶性と、20 mg/mL 水溶液がゲル化しない性質を有する化合物と設定した。

2. 合成および化合物評価

化合物合成は全て第一章第二節に記載した方法と同様に実施した。

合成ペプチドの化合物評価については第一スクリーニングとして、第一章と同様の手法にてヒト KISS1R 発現 CHO 細胞を用いた FLIPR アッセイによる評価を行い、EC₅₀ 値を算出した。良好なアゴニスト活性を示した誘導体については第二スクリーニングとして、雄ラット 6 日間持続皮下投与試験[0.1 nmol/h, 50 nmol/kg・(week)]にてテストステロン抑制活性を評価した。第二スク

リーニングで良好な活性を示した誘導体は同試験にて低用量試験を実施した。5 個体中血漿中テストステロン濃度が検出限界以下 (<0.04 ng/mL) の個体数が 4 個体以上の場合を有効と定義し、最小有効投与量、もしくは同用量投与時の検出限界以下の個体数によって化合物の薬効を比較した。

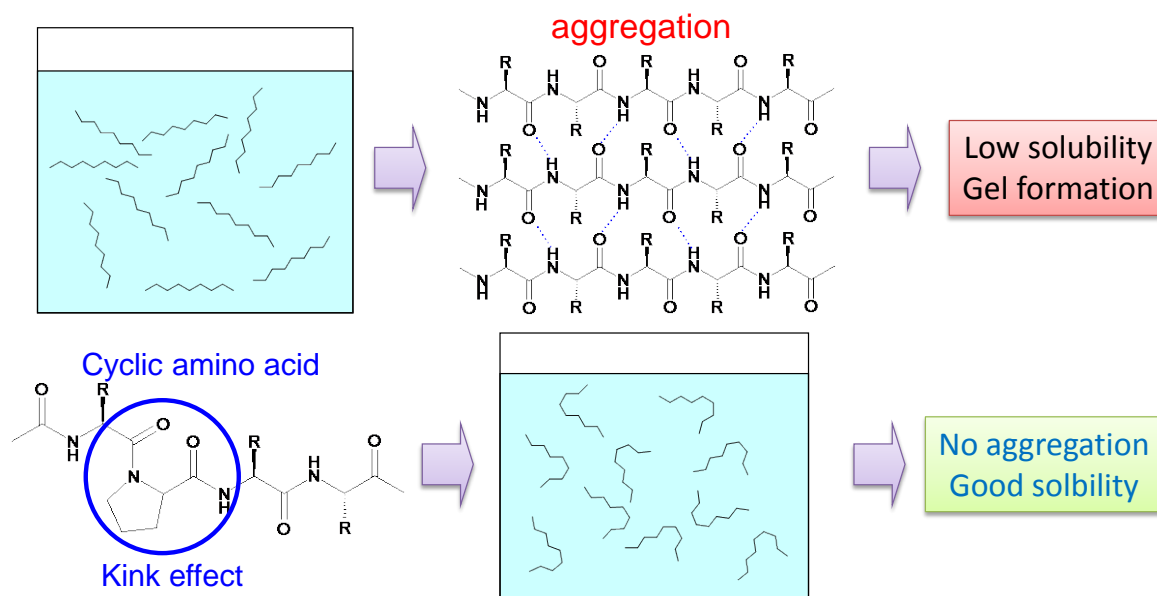
3. アミノ酸の置換戦略

TAK-683 の物性改善を達成するためには構成アミノ酸を異なった性質のアミノ酸に置換する必要がある。論理的に置換検討を進めるために、以下の戦略に基づいた置換検討を計画した。

1. TAK-683 の各構成アミノ酸を脂肪族アミノ酸(Ala および Leu)、芳香族アミノ酸(Phe)、塩基性アミノ酸(Lys)、酸性アミノ酸(Asp もしくは Glu)などの異なる性質を有したアミノ酸セットで置換し、各部位のアミノ酸置換に対する許容度を見極め、置換部位を決定する。
2. 1. で決定した置換部位にてアミノ酸置換検討を行うことで、物性改善を達成する。この際、想定される置換には以下の2系統が考えられる。
 - (A) 酸性アミノ酸 (Asp, Glu など)、塩基性アミノ酸(Lys, Arg など)、親水性アミノ酸(Ser, Thr など)への置換により、ペプチド全体の極性を高め、親水性を改善する。
 - (B) D-アミノ酸、N-置換アミノ酸 (*N*-methylAla など)、 β -アミノ酸 (β -Ala など)、環状アミノ酸(Pro など)、アキラルアミノ酸(Gly, Aib など)に置換することでペプチドの立体構造に変化を与える。

(B) のアプローチについて、Fig.9 に図示した。ペプチドが低溶解性を示す場合は、側鎖同士および主鎖-側鎖間の水素結合やアミノ酸側鎖の疎水性、芳香族性によるファンデルワールス力などによってペプチド分子間での結合が起こり、凝集が起こると考えられる⁴⁶。 α -ヘリックス構造や β -シート構造といった特定の二次構造を形成した際に特に凝集が起こりやすいと考えられるが、(B)に記載したアミノ酸の導入によって、'くさび効果'によりペプチド立体構造に変化を与え、分子間の凝集を回避しようと考えた。

Figure 9. くさび効果(kink effect)によるペプチドの溶解性改善効果



4. TAK-683 構成アミノ酸の置換許容性評価

第3節に記述した合成戦略に従い、TAK-683 構成アミノ酸を脂肪族中性、芳香族、酸性、塩基性アミノ酸にてそれぞれ置換し、活性への影響を確認した。その結果、48-54 位アミノ酸は近い性質を有したアミノ酸のみ活性が維持され、構成アミノ酸と異なる性質のアミノ酸への置換は *in vitro* 活性もしくは *in vivo* 活性を低下させた (data not shown)。これらの部位は物性変換を目的とした置換検討部位としては不適であることが分かった。

N 末端から 47 位アミノ酸については、性質が異なるアミノ酸 (官能基) への置換でも *in vitro* 活性が維持された。しかしながら、N 末端 Ac 基および 46 位において、親水性を向上させる置換を導入した場合は *in vitro* 活性が維持された場合も *in vivo* 活性が低下することが分かった。また、N 末端である 46 位に立体構造を変換しうるアミノ酸を導入しても、その効果は低いと考えられた。一方、47 位 D-Trp のアミノ酸置換検討においては側鎖が小さいアミノ酸である D-Ala、脂肪族 D-Leu、塩基性 D-Lys、酸性 D-Glu、および立体異性体 Trp と様々なアミノ酸置換において、比較的良好な *in vitro* / *in vivo* 活性が得られた (Table 13)。本結果は 47 位の側鎖が KISS1R との相互作用に重要ではないことを示しており、TAK-683 の物理化学的性質の改善に 47 位置換が有効であると示唆するものであった。したがって、47 位置換に焦点を当て、検討を実施することとした。

Table 13. TAK-683 47 位アミノ酸置換体の *in vitro* 活性および *in vivo* 活性

Ac-D-Tyr-AA⁴⁷-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂

Cmpd	AA ⁴⁷	agonistic activity EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		テストステロン抑制活性 ^b 血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5 (%)]		
		human	rat	0.1 nmol/h	0.03 nmol/h	0.01 nmol/h
matastin(45-54)		0.96 (0.55–1.7)	4.2 (3.0–6.1)	ND	ND	ND
TAK-683	D-Trp	0.33 (0.25–0.44)	1.3 (1.1–1.6)	5 (100)	5 (100)	3 (60)
29	D-Ala	2.7 (0.92–8.1)	16 (7.9–33)	3	ND	ND
30	D-Leu	2.0 (0.71–5.9)	12 (5.7–26)	ND	5 (100)	0
31	D-Lys	3.6 (1.1–11)	18 (6.5–50)	5 (100)	0	ND
32	D-Glu	22 (9.7–52)	40 (21–79)	5 (100)	2 (40)	ND
33	Trp	0.61 (0.25–1.5)	4.8 (2.5–9.3)	ND	5 (100)	5 (100)

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b 投与速度 0.1, 0.03, 0.01 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性: 各誘導体を 0.1, 0.03, 0.01 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1: CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合(%)として記載した。

Abbreviations: ND, not determined

(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8804-8811. Table 1

5. 物性変換を目的とした47位アミノ酸の置換

TAK-683 47位置換検討にて許容されたアミノ酸置換体の中で、D-Lys および D-Glu への置換体（化合物 **31**, **32**）は *in vivo* 活性が数倍低下したものの D-Trp とは全く異なる物性を有することから、物性変換には有効と考えられた。また、D-Trp の立体を反転させた L-Trp 置換体 **33** はラット持続投与試験において、0.01 nmol/h で全個体のテストステロンを検出限界に抑制し、TAK-683 を上回る活性を示した。一般的には D-アミノ酸への置換はプロテアーゼ切断への抵抗性を増すと考えられ、47位 D-アミノ酸置換も代謝安定性向上に寄与していると考えられていた。しかしながら、47位を L-Trp に置換した化合物 **33** は TAK-683 より *in vivo* 活性が向上した。*In vitro* 活性は TAK-683 より弱いことから、動態が改善していると予想される。Table 13 に示したアミノ酸置換検討では D-アミノ酸を中心として実施したが、本結果から、L-アミノ酸での置換検討により、より良好な活性を有し、かつ物性が改善した誘導体が取得できると考え、前述の物性変換に有用な D-Lys, D-Glu 置換体の立体を反転した L-Lys, L-Glu 置換体 **34**, **35** を合成した (Table 14)。

Table 14. 47位 L-Lys, L-Glu 置換体の *in vitro* 活性および *in vivo* 活性

Ac-D-Tyr-AA⁴⁷-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

Cmpd	AA ⁴⁷	agonistic activity EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		テストステロン抑制活性 ^b 血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5 (%)]		
		human	rat	0.1 nmol/h	0.03 nmol/h	0.01 nmol/h
TAK-683	D-Trp	0.33 (0.25–0.44)	1.3 (1.1–1.6)	5 (100)	5 (100)	3 (60)
33	Trp	0.61 (0.25–1.5)	4.8 (2.5–9.3)	ND	5 (100)	5 (100)
31	D-Lys	3.6 (1.1–11)	18 (6.5–50)	5 (100)	0	ND
32	D-Glu	22 (9.7–52)	40 (21–79)	5 (100)	2 (40)	ND
34	Lys	1.6 (1.1–2.3)	6.8 (3.3–14)	ND	5 (100)	4 (80)
35	Glu	2.8 (2.1–3.6)	11 (5.9–21)	ND	5 (100)	4 (80)

^a 細胞内Ca²⁺濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b 投与速度 0.1, 0.03, 0.01 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性：各誘導体を 0.1, 0.03, 0.01 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1 : CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合 (%)として記載した。

Abbreviations: ND, not determined

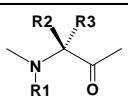
(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8804-8811. Table 1

In vitro 評価の結果、L体へと変換することで、Glu, Lys とも大きくアゴニスト活性が向上した、特に Glu⁴⁷体化合物 **35** は D-Glu⁴⁷体 **32** と比較して、ヒト KISS1R アゴニスト活性が8倍近く向上した。また、ラット持続投与試験においても、L置換体である **34**, **35** は TAK-683 と同等以上の強力な活性を示した。目標として設定した「TAK-683 と同等以上の活性を有し、物性が改善された誘導体」を満たすことが期待できた。

続いて、ペプチドの立体構造に変化を与えるアミノ酸置換を実施することとした。47位に側鎖が小さいアミノ酸である Ala, D-Ala, アキラルアミノ酸(Gly, Aib)、N-メチルアミノ酸(MeAla, D-MeAla, Sar)を導入した結果を Table 15 に示す。これらのアミノ酸置換は立体構造への影響のみではなく、インドール基を除去したことによる疎水性低下効果も溶解性改善に貢献すると期待できた。評価の結果、Ala (**37**)は Table 14 での検討と同様に D-Ala (**29**)より良好な *in vitro* 活性、テストステロン抑制活性を示し、その活性強度は TAK-683 と同程度であった。一方 N-メチルアミノ酸である MeAla (**40**), D-MeAla (**41**), Sar (**39**)置換体はいずれも *in vivo* 活性が低下した。アキラルアミノ酸である Gly (**36**), Aib (**38**)置換体は TAK-683 と同等、もしくは同等近い *in vivo* 活性を示した。Gly は α -ヘリックス、 β -シートといった二次構造中の存在率が低いことが知られており⁴⁷、フレキシビリティを向上させることによる溶解性向上が期待された。また、Aib は β -ターン構造を惹起することが報告されており⁴⁸、'くさび効果'による凝集阻害が期待された。

Table 15. 47位アキラル、N-メチル、 α -メチルアミノ酸置換体の *in vitro* 活性および *in vivo* 活性

Ac-D-Tyr-AA⁴⁷-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

Cmpd	AA ⁴⁷				agonistic activity		テストステロン抑制活性 ^b		
		R ₁	R ₂	R ₃	EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の 個体数 [n/5 (%)]		
					human	rat	0.03 nmol/h	0.01 nmol/h	0.003 nmol/h
TAK-683	D-Trp	H	H	Indolyl-CH ₂ -	0.33 (0.25–0.44)	1.3 (1.1–1.6)	5 (100)	3 (60)	ND
36	Gly	H	H	H	5.2 (2.3–12)	46 (10–200)	5 (100)	0	ND
37	Ala	H	CH ₃ -	H	1.2 (0.76–2.0)	6.0 (3.2–11)	ND	3 (60)	ND
29	D-Ala	H	H	CH ₃ -	2.7 (0.92–8.1)	16 (7.9–33)	3 (60)	ND	ND
38	Aib	H	CH ₃ -	CH ₃ -	2.4 (1.6–3.6)	17 (6.4–47)	5 (100)	3 (60)	0
39	Sar	CH ₃ -	H	H	4.9 (3.0–8.1)	20 (15–30)	ND	ND	ND
40	MeAla	CH ₃ -	CH ₃ -	H	4.4 (1.5–13)	43 (15–130)	0	ND	ND
41	D-MeAla	CH ₃ -	H	CH ₃ -	1.8 (1.4–2.4)	7.3 (5.9–9.0)	3 (60)	0	ND

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b 投与速度 0.03, 0.01, 0.003 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性：各誘導体を 0.03, 0.01, 0.003 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1 : CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合(%)として記載した。

Abbreviations: ND, not determined

(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8804-8811. Table 1

Table 16. 47位環状アミノ酸置換体の *in vitro* 活性および *in vivo* 活性 (1)

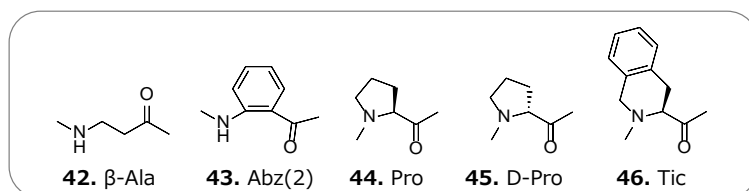
Ac-D-Tyr-AA⁴⁷-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂

Cmpd	AA ⁴⁷	agonistic activity		テストステロン抑制活性 ^b			
		EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5 (%)]			
		human	rat	1 nmol/h	0.1 nmol/h	0.03 nmol/h	0.01 nmol/h
TAK-683	D-Trp	0.33 (0.25–0.44)	1.3 (1.1–1.6)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	3 (60)
42	β-Ala	3.3 (2.0–5.4)	11 (6.4–18)	ND	ND	0	ND
43	Abz(2)	5.2 (2.5–11)	47 (11–200)	ND	ND	0	ND
44	Pro	0.48 (0.20–1.2)	9.3 (7.6–11)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
45	D-Pro	5.8 (3.0–11)	110 (96–130)	0	ND	ND	ND
46	Tic	0.49 (0.20–1.2)	7.0 (4.0–12)	5 (100)	ND	4 (80)	0

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b 投与速度 1, 0.1, 0.03, 0.01 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性: 各誘導体を 1, 0.1, 0.03, 0.01 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1: CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合 (%)として記載した。

Abbreviations: Abz(2), 2-aminobenzoic acid; β-Ala, β-alanine; ND, not determined; Tic, 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid



(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8804-8811. Table 1

同様に立体構造に影響する置換として、β-アミノ酸、環状アミノ酸類での置換を検討した (Table 16)。その結果、β-アミノ酸であるβ-Ala (**42**), Abz(2) (**43**)は良好な結果を示さなかったが、環状L-アミノ酸であるPro (**44**), Tic (**46**)はヒト KISS1R に対し、強いアゴニスト活性を示すとともにラット持続投与試験でも良好な作用を示した。特に Pro 置換体 **44** は 0.01 nmol/h の投与速度で全個体を抑制する強いテストステロン抑制活性を示し、かつ Pro は'くさび効果'による溶解性改善が最も期待される構造であった。そこで、最適化検討として、他の環状アミノ酸類での置換検討を実施した (Table 17)。

Table 17. 47 位環状アミノ酸置換体の *in vitro* 活性および *in vivo* 活性 (2)

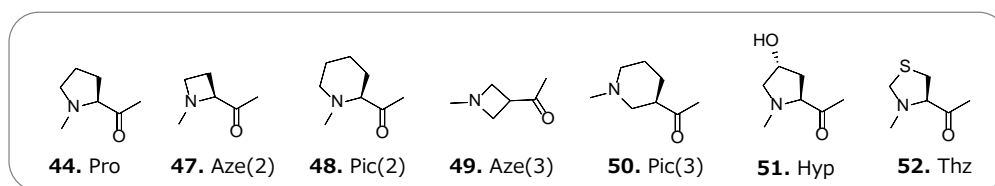
Ac-D-Tyr-AA⁴⁷-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂

Cmpd	AA ⁴⁷	agonistic activity EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		テストステロン抑制活性 ^b 血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5 (%)]		
		human	rat	0.03 nmol/h	0.01 nmol/h	0.003 nmol/h
TAK-683	D-Trp	0.33 (0.25–0.44)	1.3 (1.1–1.6)	5 (100)	3 (60)	0
44	Pro	0.48 (0.20–1.2)	9.3 (7.6–11)	5 (100)	5 (100)	0
47	Aze(2)	1.9 (1.1–3.4)	16 (9.7–26)	5 (100)	1 (20)	ND
48	Pic(2)	2.8 (1.5–5.3)	17 (11–28)	3 (60)	ND	ND
49	Aze(3)	2.3 (1.3–4.3)	15 (10–21)	ND	ND	ND
50	Pic(3)	5.5 (4.3–7.0)	45 (23–85)	0	ND	ND
51	Hyp	5.2 (2.3–12)	36 (15–81)	5 (100)	5 (100)	4 (80)
52	Thz	2.3 (1.3–4.3)	23 (10–54)	1 (20)	ND	ND

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b 投与速度 0.03, 0.01, 0.003 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性: 各誘導体を 0.03, 0.01, 0.003 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1 : CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合(%)として記載した。

Abbreviations: Aze(2), azetidine-2-carboxylic acid; Aze(3), azetidine-3-carboxylic acid; Hyp, trans-4-hydroxyproline, ND, not determined; Pic(2), piperidine-2-carboxylic acid; Pic(3), piperidine-3-carboxylic acid; Thz, thiazolidine-4-carboxylic acid



(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8804-8811. Table 1

他の環状アミノ酸での置換検討を進めた結果、以下の知見を得た。

- (1) 環状 α イミノ酸[Pro (**44**), Aze(2) (**47**), Pic(2) (**48**)]は環状 β イミノ酸[Aze(3) (**49**), Pic(3) (**50**)] より優れた活性を示した。
- (2) 5員環 [Pro (**44**), Hyp (**51**), Thz (**52**)]は4員環 [Aze(2) (**47**)], 6員環 [Pic(2) (**48**)]より優れた活性を示した。
- (3) 5員環の中ではチアゾリジン環[Thz (**52**)]よりピロリジン環[Pro (**44**), Hyp (**51**)]が優れた活性を示した。

結果として、Hyp 置換体、化合物 **51** が最も優れた活性を示し、ラット持続投与試験において、0.003 nmol/h の低用量においても 5 例中 4 例のテストステロンを検出限界以下に抑制する非常に強力な活性を示した。TAK-683 はその約 3 倍の用量の 0.001 nmmol/h で 5 例中 3 例を抑制することから、化合物 **51** は TAK-683 の 3 倍以上強力な活性強度を有するといえる。

47 位置換検討を進めることによって、TAK-683 とは異なる物性を示すと予想される化合物を数種取得した。次に、得られた 47 位置換体の活性向上を指向した置換を行った。ペプチドにハロゲン原子を導入することにより、組織分布の向上および代謝安定性の向上が得られた例が報告

されている⁴⁹⁻⁵³。そこで、ハロゲン置換の適用を計画した。ハロゲンを導入する位置として 50 位 Phe のベンゼン環を選択し、検討を行った。

Table 18. 50 位 Phe へのハロゲン原子導入検討:*in vitro* 活性および *in vivo* 活性

Ac-D-Tyr-AA⁴⁷-Asn-Thr-AA⁵⁰-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂

Cmpd	AA ⁴⁷	AA ⁵⁰	agonistic activity		テストステロン抑制活性 ^b		
			EC ₅₀ ^a , nM (95%信頼区間)		血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5 (%)]		
			human	rat	0.03 nmol/h	0.01 nmol/h	0.003 nmol/h
TAK-683	D-Trp	D-Trp	0.33 (0.25–0.44)	1.3 (1.1–1.6)	5 (100)	3 (60)	0
53	D-Trp	Phe(2F)	0.65 (0.31–1.4)	1.8 (0.91–3.6)	ND	0	ND
54	D-Trp	Phe(3F)	1.4 (1.1–1.8)	4.8 (3.3–7.1)	ND	4 (80)	0
55	D-Trp	Phe(4F)	1.9 (0.62–6.0)	4.7 (1.8–13)	5 (100)	0	ND
56	D-Trp	Phe(4Cl)	0.56 (0.27–1.1)	2.8 (1.7–4.8)	ND	0	ND
33	Trp	Phe	0.61 (0.25–1.5)	4.8 (2.5–9.3)	5 (100)	5 (100)	0
57	Trp	Phe(3F)	0.073 (0.043–0.12)	1.2 (0.80–1.9)	ND	1 (20)	0
34	Lys	Phe	1.6 (1.1–2.3)	6.8 (3.3–14)	5 (100)	4 (80)	0
58	Lys	Phe(3F)	0.43 (0.16–1.1)	7.1 (5.8–8.6)	ND	4 (80)	0
35	Glu	Phe	2.8 (2.1–3.6)	11 (5.9–21)	5 (100)	4 (80)	0
59	Glu	Phe(3F)	0.47 (0.27–0.84)	20 (14–28)	ND	5 (100)	0
36	Gly	Phe	5.2 (2.3–12)	46 (10–200)	5 (100)	0	ND
60	Gly	Phe(3F)	1.1 (0.81–1.6)	7.4 (7.0–8.0)	ND	ND	0
38	Aib	Phe	2.4 (1.6–3.6)	17 (6.4–47)	5 (100)	3 (60)	0
61	Aib	Phe(3F)	1.2 (0.81–1.7)	7.0 (4.7–11)	ND	ND	0
51	Hyp	Phe	5.2 (2.3–12)	36 (15–81)	5 (100)	5 (100)	4 (80)
62	Hyp	Phe(3F)	0.75 (0.36–1.6)	8.5 (6.5–11)	ND	5 (100)	0

^a 細胞内Caイオン濃度上昇測定による各化合物のアゴニスト活性のEC₅₀値

^b 投与速度 0.03, 0.01, 0.003 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性: 各誘導体を 0.03, 0.01, 0.003 mMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1: CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、6日後、RIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数および割合 (%)として記載した。

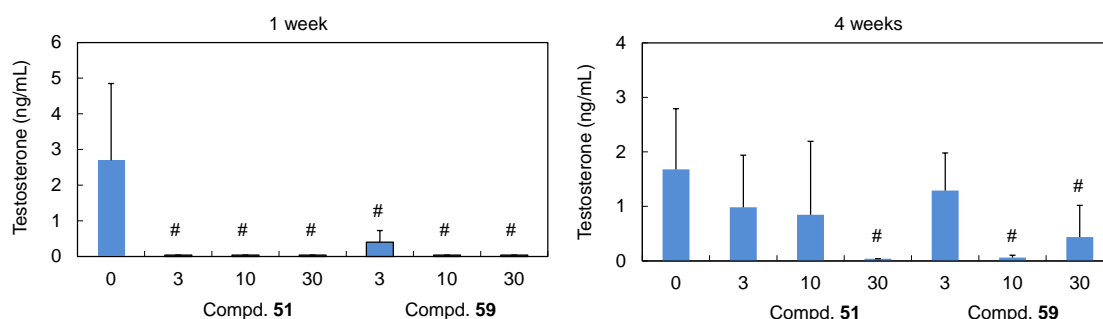
Abbreviations: Aib, 2-aminoisobutyric acid; Hyp, trans-4-hydroxyproline, ND, not determined; Phe(4Cl), 4-chlorophenylalanine; Phe(2F), 2-fluorophenylalanine; Phe(3F), 3-fluorophenylalanine; Phe(4F), 4-fluorophenylalanine

(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8804-8811. Table 1

まず初めに、TAK-683 の 50 位 Phe を Phe(2F), Phe(3F), Phe(4F)および Phe(4Cl)で置換し、活性比較を行った(Table 18)(化合物 **53-56**)。その結果、Phe(3F)置換体 **54** は TAK-683 と同等以上のテストステロン抑制活性を示したが、その他の化合物は全て活性が低下した。そこで、これまで合成した 47 位置換体から Trp, Lys, Glu, Gly, Aib, Hyp 体を選択し、それぞれ Phe(3F)⁵⁰置換との組み合わせ検討を実施した。その結果、全ての Phe(3F)⁵⁰置換体でヒト KISS1R アゴニスト活性の向上が認められた。また、Glu⁴⁷,Phe(3F)⁵⁰体 **59** は Phe⁵⁰体 **35** と比較し、*in vivo* 活性が向上した。化合物 **59** のラット KISS1R アゴニスト活性は化合物 **35** に比べ弱かったが、*in vivo* 活性は向上したことから、Phe(3F)置換により、代謝安定性、組織分布などが向上し、薬物動態が改善したと予想される。一方、Trp⁴⁷体(**57**)および Hyp⁴⁷体(**62**)ではラット *in vitro* 活性向上に反して、*in vivo* 活性低下が認められた。ペプチドへのハロゲン付加は普遍的に動態改善効果を示すことはなかったが、化合物の物性によっては効果的と考えられた。

Table 18 に記載した化合物の中で[Hyp⁴⁷]-TAK-683 である化合物 **51** はラット 6 日間持続投与試験において、0.003 nmol/h で 5 例中 4 例を抑制と最も強い活性を示した。また Trp⁴⁷ 体 **33**、Glu⁴⁷,Phe(3F)⁵⁰ 体 **59** は 0.01 nmol/h で全個体を抑制し、化合物 **51** に次ぐ活性を示した。化合物 **59** はヒト/ラット KISS1R 間でアゴニスト活性の乖離が大きく、ヒト KISS1R の方が 40 倍程度強い。ラット KISS1R 活性が弱い化合物 **59** がラット *in vivo* 試験において良好な活性を示していることは、ヒトに投与した場合、非常に高い薬効を示す可能性を示唆している。また、物性面では Glu はペプチドの極性に影響し、Hyp は立体に影響を与えると予想され、それぞれ異なるプロファイルを有している。以上の点から、TAK-683 代替候補化合物の代表として、**51** と **59** を選択し、ラット 4 週間持続投与試験にて、活性比較を行った (Fig. 10, Table 19)。

Figure 10. 化合物 **51**, **59** の投与速度 3, 10, 30 pmol/h における雄ラット 4 週間持続投与試験結果^a



^a各誘導体を 3, 10, 30 μ M で 50% DMSO 水溶液に溶解後、ALZET 浸透圧ポンプに封入、Cr1 : CD (SD) 雄ラット 5 匹に皮下移植し、1 週間後および 4 週間後、RIA により血漿中テストステロンレベルを測定した。血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満の場合は 0.04 として扱った。グラフは各個体の血漿中テストステロン濃度の平均値 \pm 標準偏差値を縦軸に記載した。グラフ中 # は対照群 (0 pmol/h) に対し、有意に抑制作用が認められたことを示す (one-tailed Shirley-Williams 検定)。

(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, 2016, 59, 8804-8811. Fig. 1

評価の結果、化合物 **51** は投与開始後、1 週間の時点で 3, 10, 30 pmol/h の全ての用量において、全個体の血漿中テストステロンを検出限界以下に抑制した。一方、化合物 **59** の 3 pmol/h 投与群には検出限界以下の個体は認められなかった。4 週目の時点では化合物 **51** の 30 pmol/h 投与群では全個体で抑制が観察されたが、化合物 **51** の 3, 10 pmol/h 投与群と **59** の全投与群において抑制作用の減弱が認められ、血漿中テストステロン値の上昇が確認された。TAK-683 4 週間持続投与の結果と比較すると (Table 19)、10 pmol/h の用量では化合物 **51**, **59** とも TAK-683 を上回る抑制作用を示した。化合物 **51** は TAK-683 の約 1/3 の用量で同程度の抑制作用を示したことから、3 倍程度の活性向上が達成されたといえる。

Table 19. TAK-683, 化合物 51, 59 の投与速度 3, 10, 30, 100 pmol/h における雄ラット 4 週間持続投与試験結果

Ac-D-Tyr-AA⁴⁷-Asn-Thr-AA⁵⁰-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

		テストステロン抑制活性 ^a 血漿中テストステロン濃度 0.04 ng/mL以下の個体数 [n/5]								
		3 pmol/h		10 pmol/h		30 pmol/h		100 pmol/h		
compound		1 wk	4 wk	1 wk	4 wk	1 wk	4 wk	1 wk	4 wk	
TAK-683	D-Trp	Phe	0	0	3	2	5	4	5	5
51	Hyp	Phe	5	1	5	3	5	5	ND	ND
59	Glu	Phe(3F)	0	0	5	4	5	3	ND	ND

^a投与速度 3, 10, 30, 100 nmol/hにおける各誘導体のテストステロン抑制活性：各誘導体を 3, 10, 30, 100 μMで50% DMSO水溶液に溶解後、ALZET浸透圧ポンプに封入、Cr1：CD (SD) 雄ラット5匹に皮下移植し、1週間および4週後にRIAにより血漿中テストステロンレベルを測定した。テストステロン抑制活性は、血漿中テストステロン濃度が検出限界 (0.04 ng/mL) 未満のラットの数 (n/5)として記載した。
Abbreviations: Hyp, trans-4-hydroxyproline, ND, not determined; Phe(3F), 3-fluorophenylalanine

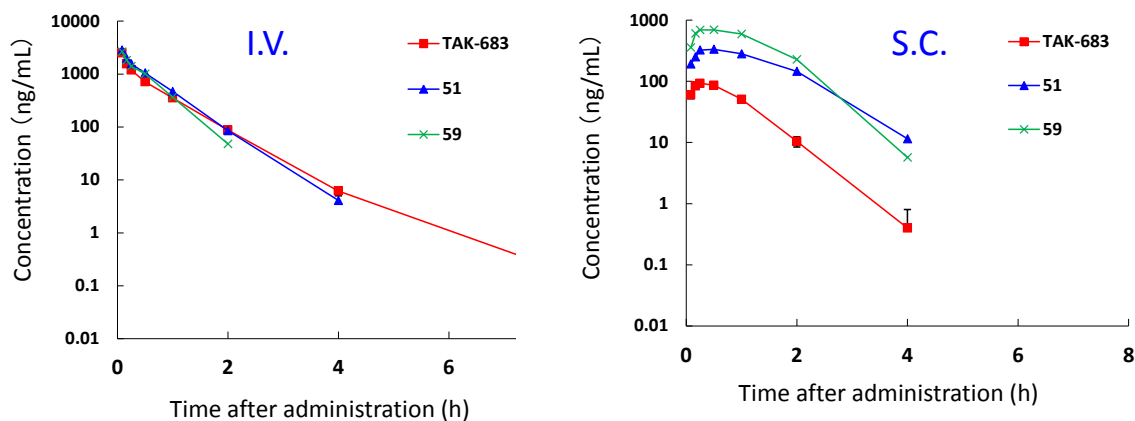
(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8804-8811. Table 2

TAK-683 および化合物 **51, 59** のラット薬物動態パラメータを比較すると (Table 20)、静脈内投与後の AUC は化合物 **51** で向上しており、また分布容積がそれぞれ TAK-683 より低下したことに伴い、全身クリアランス値が改善した。第一章では、ペプチドの親水性を低下させることで分布容積を低下させようとの仮定に基づいた置換検討により TAK-683 を創出した。TAK-683 は高い疎水性を有するため、一定の組織移行性を有すると考えられる。TAK-683 より疎水性が低下した化合物 **51, 59** は化合物の物性のバランスが良く、より低分布となったと考察している。皮下投与後のパラメータでは特にバイオアベイラビリティ (BA) が改善した。化合物 **51** は 43.9% と TAK-683 の 5 倍程度向上し、さらに化合物 **59** では 100% 近い BA が得られた。親水性残基導入によって、皮下から血中への透過効率が向上したこと、酸性残基導入によって、皮下プロテアーゼに対する耐性が向上したことが BA 改善に奏功したと考察している。BA の改善と全身クリアランスの低下から、皮下投与後の AUC は大幅に改善し、化合物 **51** は TAK-683 の約 6 倍、化合物 **59** では約 11 倍の値を示した。皮下持続投与時の化合物血中濃度が大幅に改善し、強い薬効を示したと考えられる。

Table 20. TAK-683, 化合物 51, 59 のラットにおける薬物動態パラメータおよび静脈内投与後、皮下投与後血漿中濃度推移^a

compound	TAK-683	51	59
intravenous administration			
C _{5min} (ng/mL)	2509 ± 287	2850 ± 121	2633 ± 165
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	1225 ± 79	1547 ± 105	1331 ± 275
MRT (h)	0.69 ± 0	0.62 ± 0.04	0.53 ± 0.03
V _{d(ss)} (mL/kg)	562 ± 37	403 ± 5	406 ± 58
CL _{total} (mL/h/kg)	819 ± 52	648 ± 45	771 ± 143
subcutaneous administration			
C _{max} (ng/mL)	100 ± 44	342 ± 40	703 ± 97
T _{max} (h)	0.19 ± 0.10	0.33 ± 0.14	0.39 ± 0.19
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	115 ± 44	679 ± 196	1258 ± 71
MRT (h)	0.86 ± 0.2	1.21 ± 0.34	1.09 ± 0.13
BA (%)	9.4 ± 3.6	43.9 ± 13.0	94.5 ± 20.2

^aペプチドをSDラット (n=3) に1 mg/kgの用量で静脈内または皮下投与後5,10,15,30分および1,2,4,8,24時間後に採血、除タンパク処理後、LC/MSによりペプチドの血漿濃度を測定し、各パラメータを算出した。AUC:血中濃度曲線下面積, CL_{total}:全身クリアランス, MRT:平均滞留時間, V_{d(ss)}:定常状態分布容積, C_{5min}:投与5分後血中濃度, C_{max}:最高血中濃度, T_{max}:最高血中濃度到達時間, BA:生物学的利用率



*検出限界値(0.1 ng/mL)以下を0として計算、記載した。

(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, 2016, 59, 8804-8811. Table 3

次に47位への様々なアミノ酸置換が実際に水溶性改善効果を発揮し、20 mg/mL水溶液のゲル化が回避されるかについて検討した (Table 21)。TAK-683 と化合物 **51**, **59** を含む7化合物を代表化合物として選択し、20 mg/mL での水溶性と水溶液の性状について観察した。TAK-683 は20 mg/mL に可溶で経時的にゲル化する性質を有していたが、立体異性体である47位 L-Trp 体 **33** は溶解性が低下しており、よりゲル化しやすいことが明らかとなった。ペプチドの疎水性だけでなく、立体構造が物性に強く関与していることを示唆する結果である。親水性アミノ酸 Lys, Glu が導入された化合物 **58**, **59** のうち、Lys 体 **58** は良好な水溶性を示し、ゲル化も起こらなかった。一方 Glu 体 **59** は水溶性が低下し、ゲル化も観察された。化合物 **59** は酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸が一残基ずつ存在するため、中性付近に等電点があり、水溶性が低下したと考察している。ペプチドの水溶性向上を目指すうえで、等電点にも配慮する必要があることを示唆する結果である。ペプチドの立体構造に影響を与える置換として導入したアキラルアミノ酸 Gly (**36**), Aib (**38**) および環状アミノ酸 Hyp (**51**) 置換体はいずれも良好な水溶性を示し、**36** では析出までの時間が延長され、**38** および **51** では5日目までゲル化が観察されなかった。また、化合物 **51** が500 mg/mL の濃度でも水溶液を作成することができる、極めて高い水溶性を有することも確認した。

Table 21. 47位置換体の水溶性(20 mg/mL)および溶液状態の観察

Ac-D-Tyr-AA⁴⁷-Asn-Thr-AA⁵⁰-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

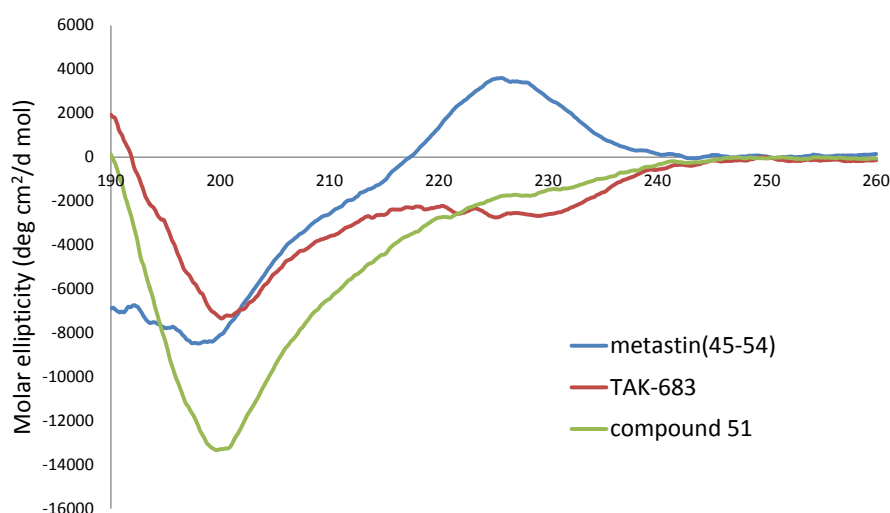
compound	AA47	AA50	20 mg/mL 水溶液 への溶解度 ^a	5日目までの観察 ^a
TAK-683	D-Trp	Phe	可溶	3時間以内にゲル化
33	Trp	Phe	難溶	すぐにゲル化
36	Gly	Phe	可溶	40時間後浮遊物析出
38	Aib	Phe	可溶	5日間ゲル化しない
51	Hyp	Phe	可溶	5日間ゲル化しない
58	Lys	Phe(3F)	可溶	5日間ゲル化しない
59	Glu	Phe(3F)	難溶	48時間後、液状部とゲル状部が分離

^a各誘導体凍結乾燥粉末に20mg/mLになるように蒸留水を加え、溶解性を目視で確認後、5日目まで室温で放置し、経時的にゲル化の進行を観察した。

(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, 2016, 59, 8804-8811. Table 4

TAK-683 と化合物 **51** は一残基の違いで大きく異なる物性を示した。TAK-683, 化合物 **51** の 0.1 mg/mL 水溶液の CD スペクトルを測定し、比較したところ、それぞれのスペクトル形状に違いが認められた。JASCO Spectra Manager software を用いて予測した β -シート構造の割合は天然型 metastin(45-54)の 13.7%に対し、TAK-683 が 34.8%、化合物 **51** が 21.9%であり、各置換を実施することで β -シート構造を取りやすくなった TAK-683 に対し、Pro と同様に ' β -sheet breaker'効果があると予想される Hyp 置換を導入することで、分子間の相互作用が弱まったと考えられる^{54,55}。

Figure 11. metastin(45-54), TAK-683, 化合物 **51** の CD スペクトル



(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8804-8811. Fig. S1

化合物 **51** の 4 種の pH 溶液中での安定性を確認した結果、Table 12 に記載の誘導体と同様の傾向を示し、pH 3, pH 5 緩衝溶液中では比較的安定であり、pH 1.2 の JP 1 溶液中および pH 7 緩衝溶液中での分解が認められた (Table 22)。pH 7 溶液中の分解速度は TAK-683 よりも遅く、D-Trp から Hyp への置換によるペプチド構造変化、もしくは物性変化が安定化をもたらしたと考えられる。また、pH 7 緩衝溶液中の分解産物については、TAK-683、化合物 **51** と同様の KiSS1-305 と同様の 48 位 Asn のデアミノ体 (Asp および β Asp への変換体) であることを確認した。なお、本 Table 中の測定条件は Table 12 とは異なり、全て 10% MeCN を含有する緩衝溶液を用いたことから、TAK-683 の pH 7 溶液中安定性は再試験し、比較に用いた。

Table 22. TAK-683、化合物 51 の溶液安定性

TAK-683 Ac-D-Tyr-**D-Trp**-Asn -Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂
51 Ac-D-Tyr- **Hyp** -Asn -Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp -NH₂

Compd	time	残存率 (%)			
		pH 1.2 (JP1)	pH 3	pH 5	pH 7
TAK-683^a	initial	ND	ND	ND	100
	1 week	ND	ND	ND	86.5
	2 week	ND	ND	ND	72.6
51^b	initial	100	100	100	100
	1 week	49.1	97.1	99.2	91.0
	2 week	21.8	93.9	97.9	81.5

^a試料濃度が50 µg/mLとなるように、pH7 buffer溶液を調製 (MeCN含量 : 10 %) 後、37 °Cで保存、経時的にサンプリングしてHPLC分析し、イニシャル (0時間) に対する残存率を求めた。

^b試料濃度 25µg/mLでJP1(pH 1.2)及び各種pH buffer(pH 3, pH 5及びpH 7)溶液を調製(MeCN含量 : 10 %) 後、37 °Cで保存、経時的にサンプリングしてHPLC分析し、イニシャル (0時間) に対する残存率を求めた。

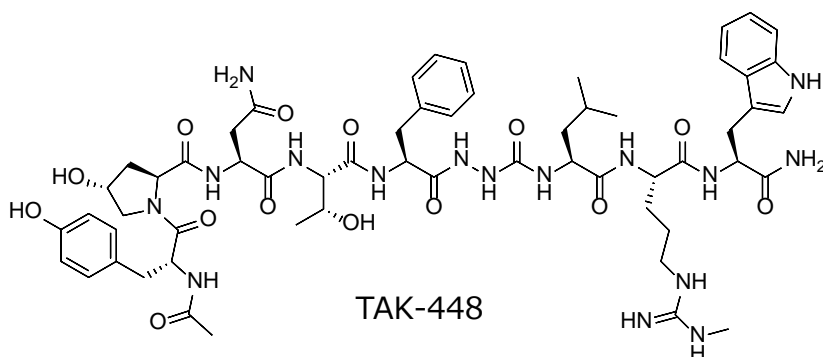
Abbreviations: ND, not determined

6. 結論

本章では臨床開発化合物 TAK-683 の物性改善を目的とした合成検討について記述した。ペプチドの溶解性を向上させるアミノ酸置換戦略に基づき、47 位に親水性アミノ酸もしくはペプチド鎖の立体構造に影響を与えうるアミノ酸を導入することで、活性低下を伴うことなく、20 mg/mL 水溶液のゲル化が回避された数種の化合物を取得することに成功した。特に 47 位 Hyp 置換体である化合物 **51** はラット持続投与試験において、TAK-683 の 3 倍程度の活性強度を示し、かつ 20 mg/mL 水溶液が 5 日間ゲル化しない、500 mg/mL 水溶液を作成可能、と活性、物性面とも優れたプロファイルを示した。化合物 **51** の非常に強力な薬理活性と良好な溶解性は長期持続投与製剤化工程において有利と考えられる。著者は TAK-683 のバックアップ化合物として化合物 **51** を選択し、臨床開発化合物 TAK-448 のコード番号を設定した。

健常人男性および前立腺癌患者を対象とした phase 1 臨床試験において、TAK-448 は投与量依存的な血中曝露を示し、健常人への単回投与においてテストステロン/LH/FSH 上昇作用を示した。また、健常人への 14 日間連続投与あるいは前立腺患者への一か月投与製剤での投与によって、血中テストステロンレベルを去勢レベルまで低下させる作用を示し、前立腺特異抗原(prostate specific antigen, PSA)の低下作用も認められた⁵⁶。

TAK-448 は 2016 年女性疾患および前立腺癌治療を対象としたバイオ医薬品会社である Myovant Sciences Ltd. に導出され、2017 年現在検討が継続されている。



第三章 新規サンドイッチ ELISA 系による TAK-683 および TAK-448 の高感度検出系構築

1. 諸言

第一章、第二章に記載した通り、新規性ホルモン依存性疾患治療薬を目指した合成研究の結果、短鎖型 KISS1R アゴニスト TAK-683 および TAK-448 を創製した。TAK-683、TAK-448 は雄ラット持続投与試験において、30 pmol/h (0.16 μ mol/kg/week)の低投与量で化学的去勢状態に血中テストステロン濃度を抑制する、非常に強力な薬理活性を有している。

その強力な活性から、TAK-683、TAK-448 のラットにおける有効血中濃度はそれぞれ 10 fmol/mL (10 pg/mL) 未満であると予想され、LC/MS/MS を用いた評価系の定量限界を下回る可能性があった。LC/MS/MS 以外の高感度測定系に抗原抗体反応を利用したイムノアッセイがあり、イムノアッセイは低分子量薬物から巨大分子まで様々な化合物の定量に利用されている⁵⁷⁻⁶⁰。一般に競合的酵素免疫測定法 (competitive enzyme immunoassays, cEIA) の検出感度は 100 fmol/mL-10 pmol/mL の範囲であり、LC/MS/MS を上回る感度が得られる例が多い。例えば、TAK-683、TAK-448 と同様に、9 アミノ酸からなる高活性 GnRH 誘導体リユープロレリン酢酸塩の血中濃度はラジオイムノアッセイ (RIA) によって測定されており、その測定範囲は 0.1-100 pmol/mL とされている⁶¹⁻⁶³。しかしながら、前述の通り TAK-683 および TAK-448 のラットにおける有効血中濃度は 10 fmol/mL 未満であると予想されることから、同様のアッセイ系では検出困難な可能性がある。

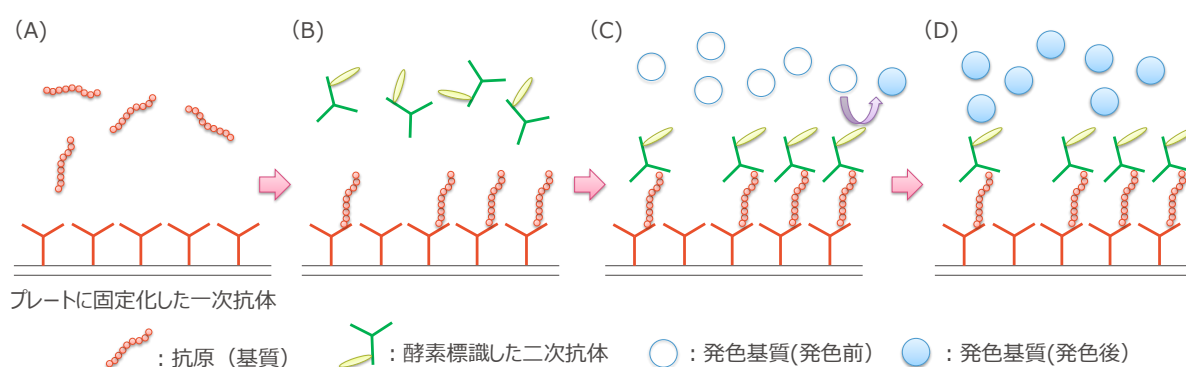
本章ではラット血漿中のこれらの薬剤を、薬物代謝産物などの類似体の干渉を避け、確実に検出することができる高感度アッセイ系 (10 fmol/mL [10 pg/mL]未満) を開発することを目的とした検討について記述する。

臨床研究において薬物の定量法は、生物学的同等性、薬物動態および毒性評価の研究および解釈において重要な役割を果たす。これらの研究は、生物分析データの高い精度に支えられるものであり、高精度のアッセイ結果を得るための指標として、イムノアッセイを検証するための推奨事項 - 校正曲線、特異性、再現性など - についての報告がなされている^{57,64-66}。本章の前半では第一の目的である TAK-683、TAK-448 測定系の構築について記述し、後半では構築された測定系についての信頼性を確保するための、これらの推奨事項に基づいた検証について記述する。

2. 研究方針

高感度化および特異性向上を達成するために、各末端を特異的に認識する 2 つの異なるモノクローナル抗体(mAb)を使用するサンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) の構築を検討することとした。ELISA 法は酵素免疫アッセイ (EIA)の中でも抗体をプレートなどに固定化した方法を指す。サンドイッチ ELISA 法は一つの抗原に対し、2 つの抗体を同時に結合することにより、高感度かつ特異性が高い結果が得られる。以下に概要について記載する。

Figure 12. サンドイッチ ELISA 法の概要



- (A) 抗原の免疫化から取得した抗体をアッセイプレートに結合し、プレートに固定化された一次抗体を作製する。作製した一次抗体を血漿などのサンプルと反応後、プレート洗浄を行う。
- (B) 酵素を Fc 領域などに結合した(酵素標識)二次抗体を作製し、(A)の洗浄後プレートと反応させる。酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどが用いられる。本論文では horseradish peroxidase (HRP)を用いた。
- (C) (B)の反応後プレートに二次抗体の酵素に対応した発色基質を添加する。酵素反応によって、基質が変化し、呈色などが起こる。今回は HRP の水溶性基質である TMB を用いた。
- (D) 反応による呈色 (吸光)、蛍光、化学発光などを測定し、検量線に基づいて濃度を算出する。

アミノ酸数の少ないペプチドの免疫測定系は、1 種類の抗体を用いラジオイムノアッセイ (RIA) による競合法での測定系を確立するのが一般的であるが、サンドイッチ ELISA 系と比較すると簡便性および特異性などの面から遠く及ばない。

現在までに 10 アミノ酸以下からなる短鎖ペプチドに対する EIA は、9 アミノ酸残基からなるオキシトシンで報告されているものの、1 種類の抗体を用いた競合法による EIA であり、検出感度は 1 pmol/ml である⁶⁷。また、オクタペプチドであるアンギオテンシン II は、EIA 測定キット (Cayman) が販売されており、検出感度は 1-2 fmol/ml と高感度であるものの、本キット使

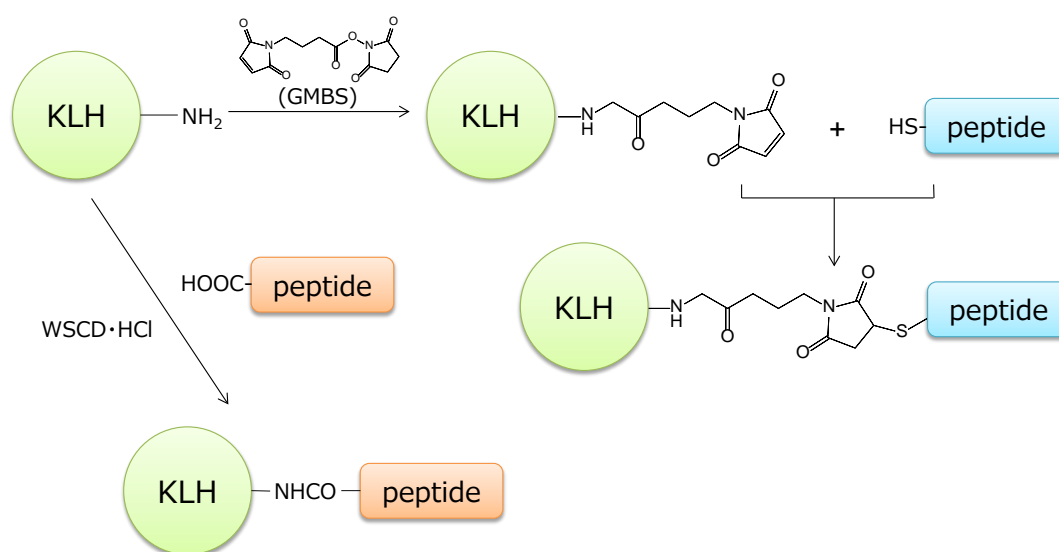
用には血漿からの抽出操作やその他の煩雑な操作が必要となる^{68, 69}。加えて、本測定系は非競合法ながら1種類のモノクローナル抗体で検出するために、アンギオテンシンIIIあるいはアンギオテンシン(3-8)と30%以上交差するデータが示されており、キットの特異性は高くないと思われる。

このように、10残基以下のペプチド(分子量約1200)に対して2種類の抗体(分子量150,000)で検出する系はこれまで報告されておらず、高感度かつ簡便なサンドイッチELISA系を構築することは容易ではないと予想された。抗体が抗原決定基であるエピトープと結合する部位は、超可変領域と呼ばれ、L鎖およびH鎖のN端側にそれぞれ3箇所ずつ存在し、それぞれ5-10アミノ酸残基で形成されている。従って、9アミノ酸残基であるTAK-683およびTAK-448を2種類の抗体で認識するためには、出来る限りN末端およびC末端に近い部位のアミノ酸配列を認識する抗体をそれぞれ作製することが最も重要であり、そのためには論理的な免疫原のデザインが必要であると考えた。また、それぞれの末端を認識する数種のmAbが取得できた場合、互いに干渉することなくノナペプチドを認識する最良の組み合わせを見出すことが鍵となる。

3. 免疫原ペプチドデザインとサンドイッチ ELISA 系の構築

特定のペプチドを認識する抗体を取得するためには抗原となるペプチド(ハプテン)をキャリアタンパク質に結合し、免疫原性化する必要がある⁷⁰。キャリアタンパク質として一般的に用いられている KLH の Lys 側鎖のアミノ基を GMBS によってマレイミド化後、チオールペプチドと結合させる方法と、KLH 上の Lys 側鎖とペプチドのカルボン酸を WSCD・HCl によって結合させる方法がハプテン-キャリア結合体合成にはよく用いられる (Fig. 13)。

Figure 13. KLH とペプチドによるハプテン-キャリア結合体形成



まず、TAK-683 のペプチド配列の N 末端にキャリアタンパク質との結合用に 3-メルカプトプロピオン酸と 3,3'-ジチオプロピオン酸を導入した化合物 **63**, **64** を合成し (Table 23)、マレイミド結合、アミド結合によるハプテン-キャリア結合体の形成を実施後、免疫化を試みた。その結果、化合物 **63**-KLH 複合体 (以下、免疫原 **63**) および化合物 **64**-KLH 複合体 (免疫原 **64**) の免疫化によって、数種の抗体が取得された。ペプチドの C 末端を提示することで、C 末端認識抗体を取得することを目的としていたが、TAK-683 類縁体との免疫反応性を確認する過程で N 末端を認識する抗体も同時に取得されていることが分かった。それぞれ TAK-683 の C 末端領域、N 末端領域を認識する mAb として、Cab, Nab とした。

結果として、免疫原 **63** から 2 種の mAb: Cab#1 (IgG1, κ) および Nab#1 (IgG1, κ) が得られ、免疫原 **64** から、Cab #2 (IgG2b, κ) および Nab #2 (IgG1, κ) が得られた (Table 23)。

Table 23. TAK-683 抗原ペプチドの構造と免疫化により取得された抗体(mAb)

	N-terminal	AA ⁴⁶	AA ⁴⁷	AA ⁴⁸	AA ⁴⁹	AA ⁵⁰	AA ⁵¹	AA ⁵²	AA ⁵³	AA ⁵⁴	C-terminal	mAb
TAK-683	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	-NH ₂	
63	HSCH ₂ CH ₂ CO-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	-NH ₂	Cab#1, Nab#1
64	HOOC(CH ₂) ₂ SS(CH ₂) ₂ CO-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	-NH ₂	Cab#2, Nab#2

(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *70*, 369-377. Table 1

Table 24. Table 23 で取得した抗 TAK-683 抗体と TAK-683 類縁ペプチドの免疫反応性

	N-term	AA ⁴⁶	AA ⁴⁷	AA ⁴⁸	AA ⁴⁹	AA ⁵⁰	AA ⁵¹	AA ⁵²	AA ⁵³	AA ⁵⁴	C-term	IC ₅₀ (nM)			
												Cab#1	Nab#1	Cab#2	Nab#2
TAK-683	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	1.3	1.0	1.5	0.4
65	H-	-	-	-	-	-	-	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	> 1000	-	> 1000	-
66	Ac-	-	-	-	-	-	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	18	> 1000	420	> 1000
67	Ac-	-	-	-	-	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	2.9	> 1000	19	> 1000
68	H-	-	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	1.1	> 1000	1.5	> 1000
69	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Phe	Ser	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	2.1	1.1	3	1.0
70	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Ala	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	1.3	1.0	9.8	170
71	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	Gly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	14	0.7	500	0.5
72	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	D-Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	> 1000	1.0	17	0.9
73	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Tos)	Trp	NH ₂	4.7	1.3	60	1.0
74	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Leu	NH ₂	> 1000	1.0	> 1000	0.3
75	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	OH	330	1.2	> 1000	0.4

配列中の太字のアミノ酸はTAK-683と異なるアミノ酸を示している。

(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *70*, 369-377. Table 2

免疫原 **63**, **64** から得られた 4 種の mAb の認識部位を確認するため、種々の TAK-683 類縁体との免疫反応性を確認した (Table 24)。それぞれの免疫原は KLH との結合スペーサーの構造の違いのみであるが、抗体の反応性には差が認められた。免疫原 **63** から得られた Cab#1 は 52 位 D-Leu 置換体 **72** と反応しなかったが、免疫原 **64** から得られた Cab#2 は **72** を認識した。一方、C 末端カルボン酸体 **75** は Cab#1 にのみ認識され、Cab#2 には認識されなかった。Nab # 1 と Nab # 2 との間には 50 位 Ala 体 **70** に対する反応性に差が認められた。Nab # 1 は **70** と強く (IC₅₀ ≤ 1 nM) 反応したが、Nab # 2 の反応性は弱かった (IC₅₀ > 100 nM)。これらの検討から推定した各抗体の認識部位について Table 25 に記載した。

Table 25. Table 23 で取得した抗 TAK-683 抗体の推定認識部位

mAb	免疫原	推定認識部位*										
		N-term	AA ⁴⁶	AA ⁴⁷	AA ⁴⁸	AA ⁴⁹	AA ⁵⁰	AA ⁵¹	AA ⁵²	AA ⁵³	AA ⁵⁴	C-term
Cab#1	63	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe-	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂
Nab#1	63	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe-	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂
Cab#2	64	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe-	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂
Nab#2	64	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe-	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂

* 太線は強く結合する部位を示し、破線は弱い結合部位を示す。

(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *70*, 369-377. Table 3

TAK-683 と 4 種の mAb の親和性は Nab # 2 > Nab # 1 > Cab # 1 > Cab # 2 の順であり、N 末端領域は C 末端領域よりも強い免疫原性を有していた。免疫原 **63**, **64** はペプチドの N 末端を KLH と結合したものであり、C 末端側が提示されているため、C 末端を強く認識する抗体が取れやすいと予想していたが、逆の結果となった。TAK-683 の 46-47 位は芳香族アミノ酸が連続している (D-Tyr-D-Trp) ことが、高い免疫原性を示したと考察している。この中で、最も強い親和性を有する Nab#2 を競合的 EIA 法に用いた場合も十分な感度 (10 pg/mL) は達成できなかったため、4 つの mAb の種々の組み合わせによるサンドイッチ ELISA 法構築を検討した。方法は C 末端を認識する抗体をプレートに固定し、TAK-683 溶液と反応後、HRP 標識した N 末端認識二次抗体で検出を行う、もしくはその逆の組み合わせによる検出系を全て調べ、最良の組み合わせを見出すものである。

これらの組み合わせの中で、Cab # 2-プレート-Nab # 2-HRP の組合せのみが 1 pmol/mL (1300 pg/mL) の TAK-683 を検出可能であった。しかしながら、さらに低濃度での検討を行った結果、最低感度は目標値 (10 fmol/mL) 以上の 0.3 pmol/mL (390pg/mL) であることが分かった (Fig. 14)。Cab # 1 と Cab # 2、Nab # 1 と Nab # 2 は同様の部位を認識するが、他の全ての組み合わせは TAK-683 をほとんど検出しなかった。また、固定化抗体と二次抗体の組み合わせを逆にした、Nab # 2 プレートと Cab # 2-HRP との組み合わせにおいても、顕著な感度低下が認められた (data not shown)。

最も良好な組み合わせ (Cab # 2-プレート-Nab # 2-HRP) においても十分な感度が得られなかった原因として、2 次抗体である Nab#2 の抗原に結合しない部位である Fc 領域とプレート上の Cab#2 間で立体的干渉が生じた可能性が考えられた。そこで、ペプシン消化によって Nab#2 を断片化し、生成した Fab'断片を HRP 標識した Nab#2 (Fab')-HRP を用いて、Cab#2-プレート-Nab#2 (Fab')-HRP の組み合わせによる TAK-683 検出を試みたが、Cab#2-プレート-Nab#2-HRP の組み合わせの感度と同等であった (data not shown)。本結果から、感度が上昇しない原因は Fc 領域の干渉ではなく、Cab#2 と Nab#2 が TAK-683 を同時に認識する際に、2 つの抗体の抗原認識部位同士が干渉している可能性が高いと考察した。抗体同士の干渉を避け、高感度化を達

成するためには、C末端領域を精度よく認識する抗体の取得が必要と考えられた。しかしながら、前述のように TAK-683 の N 末端領域は免疫原性が高く、C 末端を提示した免疫原でも C 末端のみを認識する抗体の取得は困難であった。そこで、十分な免疫原性が得られるかは未知数であったが、短いペプチドのみを提示する手法を新たに考案した。免疫原ペプチドとしては異例の短さである 3 アミノ酸残基 (-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂) を抗原提示部位とし、KLH との干渉を避けるため、スペーサーである Acp (6-アミノカプロン酸) を挟んで、KLH との結合部位であるメルカプトプロピオン酸を導入した化合物 76 を新たにデザインし、検討に用いた (Table 26)。

Table 26. TAK-683 および TAK-448 抗原ペプチドの構造と免疫化により取得された抗体 (mAb)

	N-terminal	AA ⁴⁶	AA ⁴⁷	AA ⁴⁸	AA ⁴⁹	AA ⁵⁰	AA ⁵¹	AA ⁵²	AA ⁵³	AA ⁵⁴	C-terminal	mAb
TAK-683	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	AzaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	-NH ₂	
TAK-448	Ac-	D-Tyr	Hyp	Asn	Thr	Phe	AzaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	-NH ₂	
76	HS(CH ₂) ₂ CO-NH(CH ₂) ₅ CO-	-	-	-	-	-	-	Leu	Arg(Me)	Trp	-NH ₂	Cab#3
77	Ac-	D-Tyr	Hyp	Asn	-	-	-	-	-	-	-NH(CH ₂) ₅ CO-NH(CH ₂) ₂ SH	Nab#4

(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *70*, 369-377. Table 1

化合物 76-KLH 複合体 (免疫原 **76**) を免疫原として免疫を実施し、新たな抗体 Cab#3 を取得した。Cab#3 の認識部位を Table 23 と同様に確認した結果、Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ 配列を含む大半のペプチドを認識し、また 52, 53 位および C 末端の改変体は認識しなかった。本結果から、Cab#3 は C 末端の 52, 53 位アミノ酸残基および C 末端アミド部分を認識していると示唆された (Table 27)。

Table 27. Table 23, 26 で取得した抗 TAK-683 抗体と TAK-683 類縁ペプチドの免疫反応性

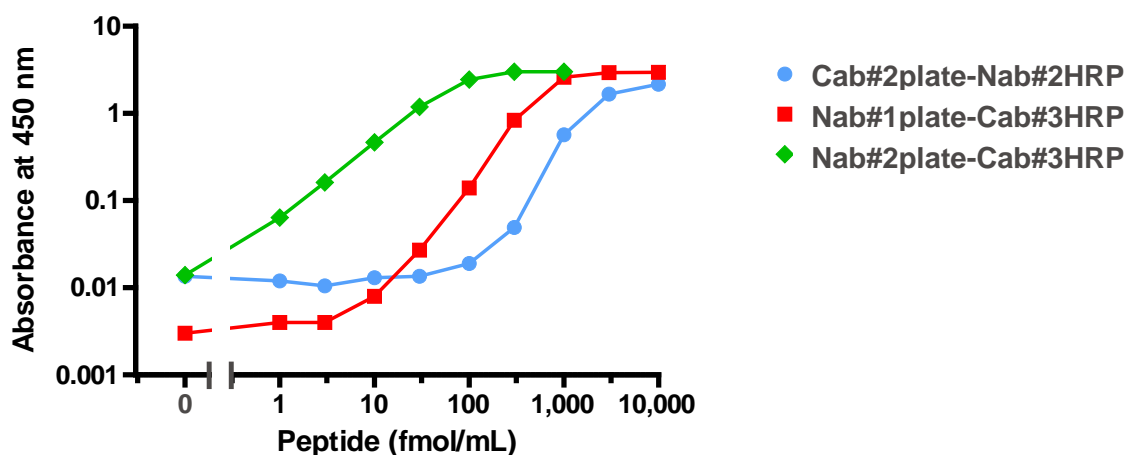
	N-term	AA ⁴⁶	AA ⁴⁷	AA ⁴⁸	AA ⁴⁹	AA ⁵⁰	AA ⁵¹	AA ⁵²	AA ⁵³	AA ⁵⁴	C-term	IC ₅₀ (nM)		
												Nab#2	Cab#2	Cab#3
TAK-683	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	0.4	1.5	320
65	H-	-	-	-	-	-	-	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	-	> 1000	> 1000
66	Ac-	-	-	-	-	-	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	> 1000	420	> 1000
67	Ac-	-	-	-	-	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	> 1000	19	200
68	H-	-	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	> 1000	1.5	200
69	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Ser	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	1.0	3	210
70	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Ala	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	170	9.8	220
71	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	Gly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	0.5	500	110
72	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	D-Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	0.9	17	> 1000
73	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Tos)	Trp	NH ₂	1.0	60	> 1000
74	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Leu	NH ₂	0.3	> 1000	300
75	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	OH	0.4	> 1000	> 1000

配列中の太字のアミノ酸はTAK-683と異なるアミノ酸を示している。

(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *70*, 369-377. Table 2

Cab#3 を用い、Nab#1, Nab#2 とのサンドイッチ ELISA を検討したところ、Nab#2-プレート-Cab#3-HRP の組み合わせにおいて、TAK-683 検出感度 1 fmol/mL (1.3 pg/mL) と劇的な改善が認められた (Fig. 14)。興味深いことに、Cab#2, Cab#3 それぞれ単独の TAK-683 との結合活性は Cab#2 の方が 100 倍以上強い。しかしながら、干渉を避けることで、Cab#2-プレート-Nab#2-HRP の組み合わせ (検出感度 0.3 pmol/mL) と比較し、100 倍以上の感度向上が達成された。

Figure 14. 2 種類の mAb によるサンドイッチ ELISA 系における TAK-683 の標準曲線



(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, 70, 369-377. Fig. 1

同様の手法で、TAK-448 検出系の構築を試みた。すなわち、TAK-448 の N 末端 3 残基 (Ac-D-Tyr-Hyp-Asn) の C 末端にスペーサー Acp を挟み、システアミンを導入した化合物 77 (Table 26) を用い、KLH との複合体 (免疫原 77) を作製した。

Table 28. TAK-448 抗体と TAK-683 および TAK-448 類縁ペプチドの免疫反応性

	N-term	AA ⁴⁶	AA ⁴⁷	AA ⁴⁸	AA ⁴⁹	AA ⁵⁰	AA ⁵¹	AA ⁵²	AA ⁵³	AA ⁵⁴	C-term	IC ₅₀ (nM)			
												Cab#1	Cab#2	Cab#3	Nab#4
TAK-448	Ac-	D-Tyr	Hyp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	0.6	1.0	400	20
TAK-683	Ac-	D-Tyr	D-Trp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	1.3	1.5	320	> 1000
78		Ac	Hyp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	-	-	-	> 1000
79	HOCH₂CO-	D-Tyr	Hyp	Asn	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	-	-	-	700
80	Ac-	D-Tyr	Hyp	Alb	Thr	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	-	-	-	500
81	Ac-	D-Tyr	Hyp	Asn	Ala	Phe	azaGly	Leu	Arg(Me)	Trp	NH ₂	-	-	-	250

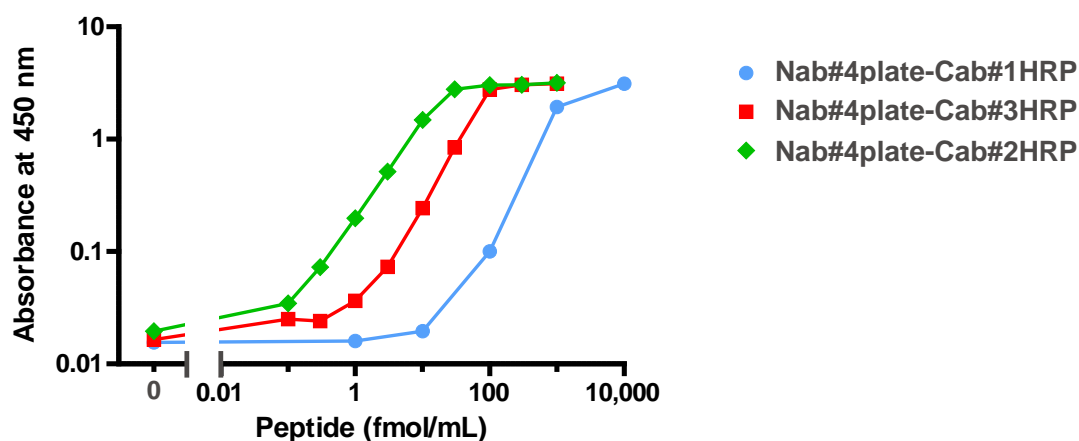
配列中の太字はTAK-448と異なるアミノ酸・置換基であることを示している。

(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, 70, 369-377. Table 2

免疫原 77 を用いて、取得した Nab#4 は TAK-448 を IC₅₀ 20 nM の親和性で認識し、47 位 D-Trp 体である TAK-683 は認識しなかった (Table 28)。また、TAK-448 類縁化合物 78-81 との反応性を確認した結果、46 位欠損体化合物 78 が認識されなかったことから、Nab#4 は 46, 47 位を強く認識していることが示唆された。

TAK-448 と TAK-683 の配列は 47 位以外は共通しているので、C 末端側認識抗体はこれまでに構築した mAb (Cab#1-#3) を使用し、サンドイッチ ELISA 系の構築を試みた。プレート上に固定化した Nab#4 と C 末端認識 2 次抗体の組み合わせを検討した結果、Nab#4-プレート-Cab#2-HRP の組み合わせが最も良好な感度を示し、その感度は 0.3 fmol/mL (0.39 pg/mL) だった (Fig. 15)。一方、C 末端の狭い領域を認識する Cab#3 を用いた場合 (Nab#4-プレート-Cab#3-HRP) は、その 1/10 程度の感度であった。N 末端、C 末端 3 残基を提示することで得られた mAb である Nab#4、Cab#3 は精度よくペプチドの末端部分を認識するが、単独での親和性は認識部位が小さいためか低い。今回、Nab#4 との組み合わせで、広く認識する Cab#2 の方が Cab#3 より良い感度が得られたことから、抗体同士の干渉が無い範囲で可能な限り広く認識する組み合わせを見出すことが、高感度化において重要と考えられる。

Figure 15. 2 種類の mAb によるサンドイッチ ELISA 系における TAK-448 の標準曲線



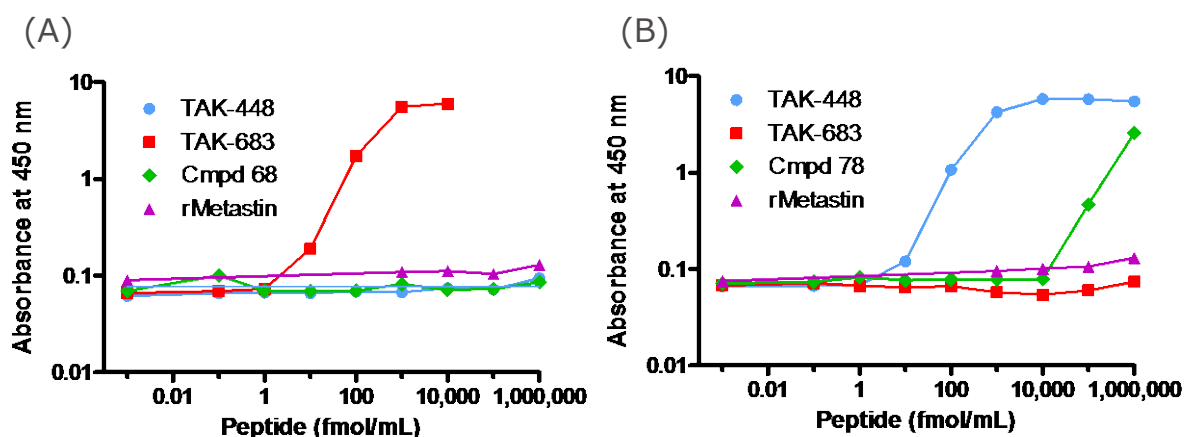
(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, 70, 369-377. Fig. 1

4. サンドイッチ ELISA 系の特異性評価

前節では TAK-683 の検出系として、プレートに固定した N 末端認識 mAb (Nab#2-プレート) と HRP 標識した C 末端認識 mAb (Cab#3-HRP) の組み合わせが最も良い感度(1 fmol/mL)を示し、TAK-448 の検出系として、Nab#4-プレート-Cab#2-HRP の組み合わせが最高感度(0.3 fmol/mL)を示したことを記述した。次に取得した検出系でラット血漿中の TAK-683 および TAK-448 を検出する際に代謝物や体内に存在するメタスチンによる干渉を受けないかを確認することを目的とし、基質特異性を検証した。方法として、それぞれの検出系を用い、TAK-683、TAK-448、ラットメタスチン(全長)、TAK-683 およ TAK-448 の N 末端欠損体 (化合物 **68**, **78**, Table 27, 28) との反応性を確認した。

その結果、TAK-683 検出系は TAK-683 を選択的に検出し、TAK-448, ラットメタスチン、化合物 **68** は検出しなかった (Fig. 16)。また、TAK-448 検出系は TAK-683, ラットメタスチンとは反応しなかったが、化合物 **78** (TAK-448 の 46 位 D-Tyr 欠損体)とは僅かに反応した。しかしながら、その感度は TAK-448 と比較し、1/1000 以下であったため、基質特異性としては十分と考えられる。

Figure 16. TAK-683 検出系 (A) および TAK-448 検出系 (B) サンドイッチ ELISA 系における基質特異性



(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, 70, 369-377. Fig. 2

5. アッセイの検証

高精度のアッセイ結果を得るための指標として、免疫アッセイを検証するための推奨事項—校正曲線、特異性、再現性など—についての報告がなされている^{57, 64-66}。そこで、構築した TAK-683 および TAK-448 の測定系について、定量範囲、回収率、日内および日間変動、サンプル希釈効果、および標準サンプルの安定性を測定することでアッセイの精度を検証した。定量範囲、回収率試験は異なるラット血漿に添加（スパイク）した 6 セット (n=6) のサンプルを測定することで実施し、CV（変動係数, coefficient of variation）および RE（相対誤差, relative error）を算出することで評価した。日内変動については 3 つの濃度の 6 セットの標準サンプルを一日内に測定し、日間変動は 1 セット 3 濃度の標準サンプルを異なる日に 6 回測定することで評価した。各検体の濃度は、それぞれ校正曲線から計算し、CV および RE は 1 日に得られた平均値から計算した。サンプル希釈分析は標準サンプル（200 ng/mL）をコントロール血漿（n=3）を用いて 20 pg/mL まで希釈、分析し、CV および RE を観測値に希釈係数（×10,000）を掛けたものとして計算した。これらの評価に用いる標準サンプルは安定性が保証されたものである必要があるため、標準サンプルの安定性について氷温で 4.5-5 時間保存した場合（短期安定性試験, n=3）、-30 ± 10 °C で 3 か月および 6 か月保存した場合（長期安定性試験, n=3）の評価として、最初のアッセイに対する残存率を算出した。

定量範囲、定量下限およびカーブフィッティングについて

それぞれのアッセイ系のラット血漿による干渉を確認すべく、TAK-683、TAK-448 をそれぞれ 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pg/mL (TAK-683) および 3, 6, 15, 30, 60, 150, 300 pg/mL (TAK-448) の濃度で異なるラット血漿に添加（スパイク）した 6 セットのサンプルを測定した（Table 29）。その結果、TAK-683 サンプルの 6 個体間の CV（変動係数, coefficient of variation）は 2.1–24.4%、RE（相対誤差, relative error）は -10.0–4.0%（Table 4A）であったことから、測定範囲として、5-500 pg/mL が保証された。また、TAK-448 は CV 2.5–7.1 %、RE -9.3–10.0 % であり、3–300 pg/mL の測定範囲が保証された。TAK-683 と TAK-448 の計算上の定量下限 LLQ（lower limit of quantification）はそれぞれ 5 pg/mL、3 pg/mL であり、目標値 10 pg/mL より良好であった。TAK-448 および TAK-683 測定系の標準曲線から求めた回帰方程式を以下に示す：

$$\text{TAK-683 : } y = \frac{(0.00761 - 5.69)}{(1 + (x/759)^{1.24}) + 5.69}$$

$$\text{TAK-448 : } y = \frac{(0.00164 - 4.73)}{((1 + (x/3.69e+06)^{1.1})^{1.94e+04}) + 4.73}$$

各アッセイの相関係数は TAK-683 では 1.000 ± 0.000 (n=3)、TAK-448 では 0.991 ± 0.002 (n=6) であり、それぞれ測定範囲では良好な直線性を有していることが確認された。以上の検証により、両方のアッセイにおいて、ラット血漿中の TAK-448 および TAK-683 測定における、十分な感度と精度が確認された。

Table 29. ラット血漿中に添加された (A)TAK-683 および(B)TAK-448 の測定値*

(A)		サンプル濃度 (pg/mL)							
TAK-683		0	5	10	25	50	100	250	500
測定値の平均 (n=6)		0.6	4.5	10.4	25.5	50.3	99.5	250.2	500.1
SD		1	1.1	1.7	1.9	3.7	5.7	10.2	10.3
CV (%)		-	24.4	16.3	7.5	7.4	5.7	4.1	2.1
RE (%)		-	-10.0	4.0	2.0	0.6	-0.5	0.1	0.0

(B)		サンプル濃度 (pg/mL)							
TAK-448		0	3	6	15	30	60	150	300
測定値の平均 (n=6)		0	3.05	5.61	16.5	29.6	54.4	164	284
SD		0	0.17	0.4	0.5	1.8	2.5	8.0	7.0
CV (%)		-	5.6	7.1	3	6.1	4.6	4.9	2.5
RE (%)		-	1.7	-6.5	10	-1.3	-9.3	9.3	-5.3

*6つの異なるサンプルを測定して平均値を記載した。SD, 標準偏差; CV, 変動係数; RE, 相対誤差

(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *70*, 369-377. Table 4

日内変動および日間変動について

Table 30 に各化合物の日中繰り返し試験、および日間繰り返し試験結果を記載した。両化合物とも日中繰り返しの変動係数 (CV) は全濃度で 10 %以下であり、相対誤差 (RE)についても全濃度±20 %であった。これらは評価基準を満たすものであり、全臨床試験におけるラット血漿中のこれらの化合物濃度測定に十分に使用しうることが確認された。

Table 30. ラット血漿中に添加された (A)TAK-683 および(B)TAK-448 の日中、日間アッセイ

(A)		サンプル濃度 (pg/ml)			(B)		サンプル濃度 (pg/ml)		
Inter- day		サンプル濃度 (pg/ml)			Intra- day		サンプル濃度 (pg/ml)		
TAK-683		15	75	400	TAK-683		15	75	400
測定値の平均 (n=5)		12.7	62.8	379.5	測定値の平均(n=3)		12.3	64.2	356.7
SD		0.3	1.6	15.8	SD		0.6	1.2	19.9
CV (%)		2.4	2.5	4.2	CV(%)		4.9	1.9	5.6
RE (%)		-15.3	-16.3	-5.1	RE(%)		-18	-14.4	-10.8

(B)		サンプル濃度 (pg/ml)			(B)		サンプル濃度 (pg/ml)		
Inter- day		サンプル濃度 (pg/ml)			Intra- day		サンプル濃度 (pg/ml)		
TAK-448		9	45	240	TAK-448		9	45	240
測定値の平均 (n=5)		10	46.9	255	測定値の平均(n=3)		9.07	43.8	241
SD		0.4	2.1	6	SD		0.82	2.7	14
CV (%)		4	4.5	2.4	CV(%)		9	6.2	5.8
RE (%)		11.1	4.2	6.3	RE(%)		0.8	-2.7	0.4

(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *70*, 369-377. Table 5

希釈分析

サンプル希釈分析は標準サンプル (200 ng/mL) をコントロール血漿を用いて 20 pg/mL まで希釈、分析し、希釈係数 ($\times 10,000$) を掛けたものとして計算した。TAK-683 のアッセイにおける実測値は $175,759 \pm 9921$ pg/mL (理論値: 200,000 pg/mL) であり、CV および RE はそれぞれ 5.6 % および -12.1 % であった。TAK-448 アッセイでは、観察値に希釈係数を掛けた値は $239,000 \pm 7024$ pg/mL、CV および RE はそれぞれ 2.9 % および 19.5 % であった。また、較正曲線の上限を超える濃度のサンプル希釈においても影響は認められなかった。

標準サンプルの安定性

高濃度 (QC-H, $15 \mu\text{g/mL}$) および低濃度 (QC-L, $400 \mu\text{g/mL}$) の 2 種類の標準試料を用いて、TAK-683 のアッセイ中安定性を評価した。氷温で 5 時間保存した場合の残存率は 115.4 % (QC-L)/100.7 % (QC-H) であり、 -30 ± 10 °C で 3 か月および 6 か月保存した場合の残存率は 93.5 % (QC-L)/104.2 % (QC-H) および 105.8 % (QC-L)/104.8 % (QC-H) であった。また -30 ± 10 °C で 3 回凍結再融解を繰り返した後の残存率は 106.5 % (QC-L) および 93.3 % (QC-H) であった。TAK-448 は $9 \mu\text{g/mL}$ (QC-H)、 $240 \mu\text{g/mL}$ (QC-L) の標準試料で同様の評価を行った。氷温 5 時間保存後残存率 98.9 % (QC-L)/96.7 % (QC-H)、 -30 ± 10 °C での 3 か月、6 か月保存後は 108.4 % (QC-L)/106.5 % (QC-H) および 118.2 % (QC-L)/104.8 % (QC-H) であった。また 3 回の凍結再融解後残存率は 95.9 % (QC-H) および 97.4 % (QC-L) であった。全ての値が 80-120 % 以内に入っていることから、TAK-683、TAK-448 はラット血漿中で十分な安定性を有していることが確認された。

以上の試験結果は既報に基づく評価基準を全て満たした^{57,64-66}。n=6 のサンプルから測定し、標準曲線によって濃度を算出した場合の CV および RE は定量下限で ± 25 % であったことを除き、 ± 20 % 以内であった。標準曲線の相関係数 (r^2) は日内、日間試験ともに >0.985 以上、標準サンプルの 3 濃度における CV、RE は ± 20 % 以内であった。標準サンプルの安定性は 80-120 % の範囲、測定サンプル内での安定性は 90-110 % の範囲であり、十分な安定性を有していた。希釈試験時の CV 及び RE が ± 20 % 以内であり、希釈が測定に影響を与えないことを確認した。

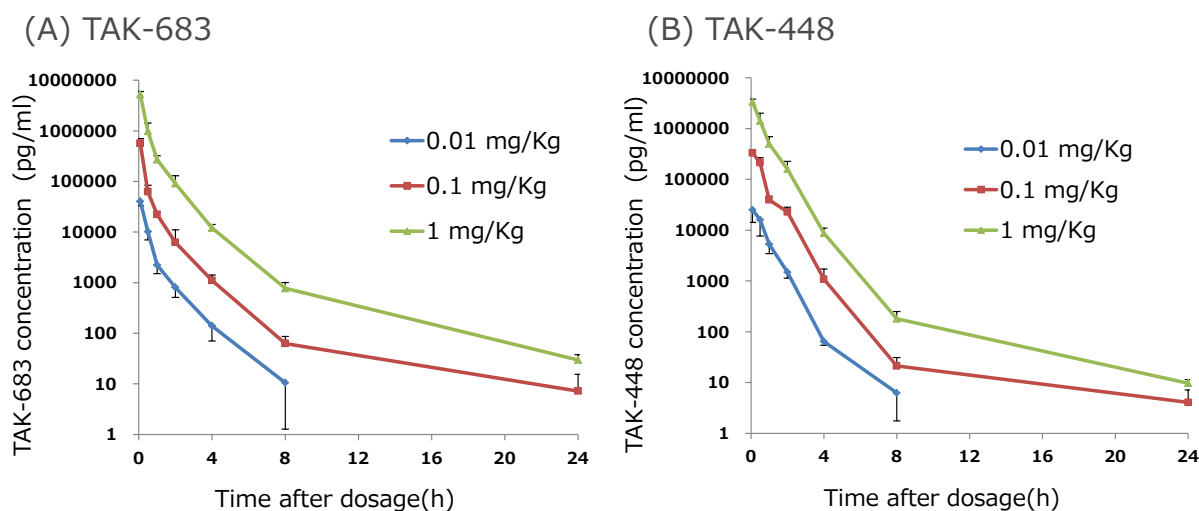
ラット動態試験での検証

Fig.17 に示すように、1、0.1、0.01 mg/kg の用量で TAK-683 および TAK-448 をラットへ静脈内投与後、経時的血中濃度測定を実施した。その結果、各アッセイ系は 0.1 および 1 mg/kg の用量での投与後 24 時間までの TAK-683、TAK-448 の血中濃度を検出可能であった。なお、LC/MS/MS を評価系に用いた同化合物の静脈内投与試験 (1 mg/mL) においては、投与後 4 時間あるいは 8 時間までは検出可能であったが、24 時間後には検出感度以下となった (Table 20)。

投与 24 時間後の免疫反応性(ir)TAK-683 の血漿中濃度は 6.3 ± 4.5 pg/mL (0.1 mg/kg) および 10.5 ± 9.2 pg/mL (1 mg/kg) であり、irTAK-448 の濃度は 7.2 ± 8.3 pg/mL および 29.7 ± 7.9 pg/mL であった。両化合物の 0.01 mg/mL 投与試験では 8 時間後までの血漿中濃度を検出可能であり、

投与 8 時間後の血漿中濃度は TAK-683 で 10.5 ± 9.2 pg/mL, TAK-448 で 6.3 ± 4.5 pg/mL であった。ラット 静脈内投与後 24 時間後に用量依存的な血中濃度検出が可能であったこと、0.01 mg/kg 投与群で 8 時間までの血中濃度検出が可能であったことは、本章で構築した ELISA 系がラット血漿中濃度を測定するにあたり、十分な信頼性と実用性があることを示している。今回構築した ELISA 系を前臨床の薬理、動態、初期毒性試験だけではなく、長期毒性試験、臨床動態、生物学的同等試験にも適応することも視野に入れ、イヌおよびヒトにおける検証が進められている。

Figure 17 TAK-683(A) および TAK-448(B)のラットへの静脈内投与後の血中濃度推移



(出典) Yoshida et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, 70, 369-377. Fig. 3

6. 結論

本章では臨床開発化合物 TAK-683 および TAK-448 の新規サンドイッチ ELISA 検出系構築について記述した。9 残基ペプチドのような短いペプチドに対するサンドイッチ ELISA 系の構築は過去に例がなかったが、末端 3 残基のみのペプチドをスペーサーを挟んで KLH 上に担持する新しい手法によって、抗体同士の干渉を避けることに成功し、高精度かつ高感度のサンドイッチ ELISA 系を構築した。これらの検出系はラット血漿中の化合物濃度測定において、高い特異性で高感度に TAK-683 および TAK-448 を検出することが可能であり、ラットでの薬理試験、動態試験、毒性試験の信頼性を高めることが期待される。また、本章に記載した手法は TAK-683、TAK-448 だけでなく、様々な短鎖ペプチドの検出にも適用可能であり、他の低分子ペプチドの研究を加速することを期待している。

総括

性ホルモン依存性疾患治療薬を指向した短鎖型 KISS1R アゴニストについての合成研究を行い、臨床開発化合物 TAK-683 および TAK-448 を創製した。また、TAK-683 と TAK-448 の高感度測定系構築についての研究を実施し、以下の結果を得た。

1. リード化合物 KiSS1-305 の溶液安定性の向上を目的とした変換検討を実施した。中性溶液中での分解が Asn-Ser 配列に起因するスクシンイミド形成が原因であると考察し、立体障害を高めるアミノ酸置換を導入することで、スクシンイミド形成反応速度が低下し、安定性が向上すると仮説を立てた。仮説に基づいた変換検討の結果、Ser を Thr に置換することで、活性低下を伴うことなく安定性が向上することを見出した。
2. リード化合物 KiSS1-305 の薬理活性向上を目的とした検討を実施した。薬物動態学的パラメータを解析し、持続投与時の血中濃度を向上させるために、分布容積の低下が必要であると考察した。高分布の要因が高い親水性によるとの仮説を立て、仮説に基づいた置換検討の結果、N末端アミノ基を Ac 化することで、分布容積を低下させ、全身クリアランスを改善しうることを見出した。N末端 Ac 化、47 位 D-Trp、49 位 Thr、54 位 Trp 置換を行った TAK-683 は優れた *in vitro* 活性と動態プロファイルを有し、4 週間ラット持続投与試験における最小有効投与量 30 pmol/h (0.16 μ mol/kg/week) と非常に強力な活性を示した。
3. TAK-683 20 mg/mL 水溶液を常温静置することで溶液がゲル化することが明らかとなったことから、ゲル化回避、溶解度改善を目的とした検討を実施した。ペプチドの溶解性を向上させる手法として、親水性アミノ酸もしくはペプチド鎖の立体構造に影響を与えうるアミノ酸を導入することを計画し、47 位での置換検討を実施することで、活性が低下することなく、20 mg/mL 水溶液のゲル化が回避された数種の化合物を取得することに成功した。特に 47 位 Hyp 置換体 TAK-448 は 20 mg/mL 水溶液が 5 日間ゲル化しない、500 mg/mL 水溶液を作成可能、と優れたプロファイルを示し、ラット持続投与試験において、TAK-683 の 3 倍程度の活性強度を示した。
4. TAK-683 および TAK-448 の高感度検出系構築についての検討を実施した。末端 3 残基のみのペプチドをスペーサーを挟んで KLH 上に担持する新しい手法によってペプチドの末端部分のみを認識する抗体を取得しうること示した。本法により構築したサンドイッチ ELISA 系は、ノナペプチドの両末端を認識する抗体同士が干渉することなく高精度かつ高感度に両化合物を認識した。

上記、1.の結果はペプチド性医薬品開発において、Asn を含む配列に起因した化学的不安定への懸念がある場合にそれを回避しうる方法を示したものである。2.の結果はペプチドの親水性/疎水性バランスをコントロールすることで薬物動態を制御しうることを示したものであり、ペプチド創薬における動態改善検討の指標になるものである。3.の結果は特にペプチドの立体構造に影響を与えるアミノ酸置換が、わずか 1 残基の置換であっても大きく物性を変化させうることを

示したもので、これらの手法はペプチド性医薬品の物性改善検討に大いに参考になると思われる。4.に記載した新規手法は、これまで高感度の検出系作成が困難であった短鎖ペプチドの検出にも適用可能であり、他の短鎖ペプチドの研究を加速することが期待される。

本論文に記述した手法はペプチド創薬における、薬理活性改善、物性改善および検出系作成などに伴う様々な問題を論理的に解決する方法を例示したものである。これらの手法はペプチド創薬全般の発展に大きく貢献するものである。

実験項

[合成]

全ての誘導体は、ABI 433A 固相合成機、もしくは Fmoc 固相法による manual 合成によりペプチド鎖を伸長し、TFA による脱保護後、HPLC 精製を行い最終目的物とした。全ての溶媒、アミノ酸誘導体、カルボン酸類、縮合試薬、脱保護試薬、グアニド化試薬は和光純薬、ペプチド研究所、渡辺化学、ナカライテスク、Nova、Advanced Chemtech、Chem-Impex、Bachem、Anaspec、NeoMPS より購入した。以下に、manual 固相合成法、脱保護法、HPLC 精製法について記載する。

Manual 固相合成法

1. 出発原料となる樹脂をフィルター付きのポリプロピレン、あるいはガラス製反応容器（リアクター）に量り入れ、樹脂を DMF に懸濁した。懸濁溶液を 20 分間攪拌することで樹脂を膨潤、続いて濾過により DMF を除いた後、樹脂に少量の DMF を加え、手で数秒間攪拌後、濾過により DMF を除く操作を 10 回繰り返すことにより樹脂を洗浄した。
2. 膨潤した樹脂に 5 倍程度の容量の 20 %ピペリジン/DMF 溶液を加え、懸濁溶液を室温 20 分間攪拌することで N 末端の Fmoc 基を除いた後、前項と同様に DMF で樹脂を洗浄した。この際、洗浄後の DMF の pH が中性となるまで洗浄を繰り返し、完全にピペリジンが系内から除かれたこと確認した。
3. 得られた N 末端遊離の樹脂に対し、Fmoc アミノ酸などのカルボン酸成分 (4eq.)を加え、少量の DMF で溶解後、0.5 M HOAt/DMF 溶液(4 eq.)、DIPCDI(4 eq.)を順に加えた後、懸濁溶液を室温 90 分間攪拌した。
4. 樹脂を DMF で洗浄後、少量(10-20 粒)の樹脂を小試験管に移し、ニンヒドリンテスト (Kaiser test)を行うことで遊離のアミノ基の有無を確認した。この際、ニンヒドリンの呈色が確認された場合には、完全に反応が進行するまで 3. 4.のステップを繰り返した。
5. 2.-4.のステップを繰り返し行うことでペプチド鎖を順次伸長し、伸長終了後の保護ペプチド樹脂はメタノールで洗浄後、真空乾燥した。

Fmoc 基の定量による樹脂置換率測定法

樹脂 1-2 mg 程度を 20 mL のメスフラスコに正確に量り取り、ピペリジン 0.8 mL、DMF 0.8 mL を加えた後、軽くメスフラスコを振盪し 30 分間静置した。続いて MeOH 3.2 mL を加え、DMF にてメスアップし、メスフラスコを転倒混和した。また、樹脂を加えていないメスフラスコにおいて同様の操作を行いブランク溶液とした。それぞれの溶液の 301 nm における吸光度を測定し、以下に示す式を用いて樹脂の置換率を算出した。

$$\text{置換率}(\text{mmol/g}) = \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 20 (\text{mL})}{7800 \times \text{樹脂量} (\text{g})}$$

脱保護法

あらかじめ調製し冷蔵保存しておいた TFA: thioanisole: *m*-cresol: H₂O: EDT: TIS (80: 5: 5: 5: 2.5: 2.5) (TFA-scavengers) を乾燥した保護ペプチド樹脂 100 mg に対し 1 mL の割合で加えた。得られた溶液を室温で 90 分間攪拌後、10-30 倍量のジエチルエーテルを加え、白色粉末を析出させた。得られた懸濁溶液を遠心分離後、上清のジエチルエーテル層を除くことで酸と scavenger 類を除いた。残渣に再びジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを懸濁し、同様の操作を再度行った後、残渣を風乾した。得られた粗ペプチド粉末 (樹脂を含む) を酢酸水溶液で懸濁溶解後、孔径 0.45 μm のディスクフィルターで濾過し、樹脂と不溶物を除去した。得られた溶液を HPLC 分析して純度を确认后、分取 HPLC を用いて精製した。

HPLC 精製

一連の合成ペプチドは、島津 HPLC システム SCL-10Avp、Gilson HPLC システム A-16 Medel 303 または日立 HPLC システムにより純度と溶出位置を確認し、分取 HPLC での精製条件を決定後、島津 HPLC システム LC6AD を用いて精製した。HPLC による分取精製は分取用カラムに YMC D-ODS-5-ST S-5 120A ODS (2×25 cm) を用い、移動相に A 液: 0.1%TFA 含有水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い実施した。粗ペプチドが溶解した酢酸水溶液を注入し、初期アセトニトリル濃度で 5 分間イソクラティック溶出後、アセトニトリル濃度を 6 分間につき 1% ずつ上昇させる直線型濃度勾配溶出を行った。溶出した目的物はフラクションに分画して集め、各フラクションに含まれる目的物の純度を分析 HPLC により確認した。目的物のみを含むフラクションをナスフラスコに集めた後、凍結乾燥により溶媒を昇華させ、無晶形粉末として精製ペプチドを得た。得られたペプチドは分析 HPLC にて純度确认后、MALDI TOF MS 分析 (Applied Biosystems 社製 Voyager-DE™ PRO あるいは Bruker 社 autoflex speed, matrix: α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, reflector mode、モノアイソトピック分析) を用いて構造を確認した。

以下に一般的合成法の例として、TAK-448 合成プロトコルを記載する。

全ての化合物は以下の方法に準じた方法により合成した。なお、第 3 章に記載の化合物 **63**, **76** については N 末端アシル基として 3-tritylsulfanylpropionic acid を manual 固相合成法により導入し、通常の脱保護、精製操作を実施した。また、化合物 **64** は DMF 中 3,3'-dithiodipropionic acid (4eq.), DIPCDI (4eq.), DIEA (4eq.) を 10 分間反応させた溶液を樹脂に加え室温一晩攪拌することで N 末端を修飾した。また、化合物 **77** は H₂NCH₂CH₂-S-Clt resin (渡辺化学) を出発物質として、通常法によって合成した。

各化合物の物理化学データについては Table 30-32 に記載した。

Fmoc-azaGly-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp(Boc)-NH-Rink Amide MBHA resin の合成

• *N*-Methyl-*N,N'*-bis-Boc-1-guanylpyrazole

60% NaH in oil 360 mg を dry DMF 20 mL に溶解し、*N,N'*-bis-Boc-1-guanylpyrazole 2793 mg (Advanced Chemtech 社) の dry DMF 溶液 10 mL を 0 °C 下に加え、10 分間攪拌した。

methyl iodide 748 μ L を加え、室温にて 24 時間攪拌した。溶媒を留去後 AcOEt に溶解し satd NaHCO₃ aq.、satd NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄ で乾燥後溶媒を濃縮し、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し目的物 2.96 g を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.30 (9H, s), 1.53 (9H, s), 3.25 (3H, s), 6.40-6.46 (1H, m), 7.68-7.72 (1H, m), 8.00 (1H, br)

Fmoc-azaGly-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp(Boc)-NH-Rink Amide MBHA resin

Rink amide MBHA resin (0.4 mmol/g) 5 g (2 mmol) に 20% ピペリジン/DMF による脱 Fmoc と DIPCDI/HOAt 法による縮合法を用いた manual 固相合成法により Trp(Boc), Orn(Mtt) を順に導入し、Fmoc-Orn(Mtt)-Trp(Boc)-NH-resin とした。得られた樹脂を DCM にて膨潤後、TFA: TIS: TFE: DCM (1: 5: 19: 75) 50 mL 中で約 10 分懸濁、攪拌した後、反応溶液を除く操作を液に色が付かなくなるまで繰り返した。樹脂を洗浄、中和後、得られた Fmoc-Orn-Trp(Boc)-NH-resin に DCM: TFE (4:1) 中 *N*-methyl-*N,N'*-bis-Boc-1-guanylpyrazole 1.946 g (6 mmol) を加え、DIEA で pH を 10 に合わせ、室温終夜処理した。反応の進行を kaiser test にて確認後、樹脂を洗浄乾燥し、樹脂をピペリジンで処理して遊離の Fmoc 基の吸光度を測定することにより置換率を求めた (0.309 mmol/g)。

得られた樹脂 6.164 g のうち 3.236 g (1 mmol) に manual 固相合成法により Leu を導入、得られた Fmoc-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp(Boc)-NH resin のうち約半分を分け取り、洗浄、乾燥した。残りの半分の樹脂 (0.5 mmol) を脱 Fmoc し、THF 中 Fmoc-NHNH₂·HCl 872.3 mg (3 mmol), CDI 486.5 mg (3 mmol), DIEA 522.6 μ L (3 mmol) を 1hr 反応させた溶液を加え、一晩攪拌した。Kaiser test で反応の進行を確認し、樹脂を DMF, MeOH で洗浄後、乾燥した。

収量: Fmoc-Arg(Me)(Boc₂)-Trp(Boc)-NH resin: 2.928g (0.309 mmol/g)

Fmoc-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp(Boc)-NH resin: 1.657g (0.299 mmol/g)

Fmoc-azaGly-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp(Boc)-NH resin: 1.668g (0.294 mmol/g)

Ac-D-Tyr(*t*Bu)-Hyp(*t*Bu)-Asn(Trt)-Thr(*t*Bu)-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp-NH-Rink amide MBHA

Fmoc-azaGly-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp-NH-Rink Amide MBHA resin 850 mg (0.25 mmol) を出発物質とし、ABI 433A (Fmoc/DCC/HOBt 0.25 mmol プロトコル) にて、Phe, Thr(*t*Bu), Asn(Trt), Hyp(*t*Bu), D-Tyr(*t*Bu) を順に導入した。得られた H-D-Tyr(*t*Bu)-Hyp(*t*Bu)-Asn(Trt)-Thr(*t*Bu)-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp-NH-Rink Amide MBHA resin を DMF 中、無水酢酸 94.4 μ L (1 mmol)、DIEA 174.2 μ L (1 mmol) で室温 20 分間処理することで N 末端アミノ基をアセチル化した。得られた樹脂を DMF, MeOH で洗浄後、乾燥し、1.049 g の樹脂を得た。

Ac-D-Tyr-Hyp-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ (TAK-448)

Ac-D-Tyr(*t*Bu)-Hyp(*t*Bu)-Asn(Trt)-Thr(*t*Bu)-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)(Boc₂)-Trp-NH-Rink amide MBHA 1.035 g に調製し冷蔵保存しておいた TFA: thioanisole: m-cresol: H₂O: EDT: TIS

(80:5:5:5:2.5:2.5) (TFA-scavengers) 8 mL を加え、室温 90 分間攪拌した。攪拌後、ジエチルエーテルを加え、白色粉末を析出させ、得られた懸濁溶液を遠心分離し、上清のジエチルエーテル層を除くことで酸と scavenger 類を除いた。残渣に再びジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを懸濁し、同様の操作を再度行った後、残渣を風乾した。得られた粗ペプチド粉末を酢酸水溶液で懸濁溶解後、孔径 0.45 μm のディスクフィルターで濾過し、樹脂と不溶物を除いた。得られた溶液を分取 HPLC を用いて精製した。HPLC 精製後、目的物の身を含むフラクションを凍結乾燥し、159.5 mg の白色粉末を得た。

分取条件

カラム：YMC pack R&D-ODS-5-B S-5, 120 A column (30 mm I.D. \times \times 250 mm)

溶出液 A: 0.1% TFA-H₂O; 溶出液 B: 0.1% TFA-CH₃CN

流速：15 mL/min

溶出条件：直線型濃度勾配溶出：A/B: 76/24 – 66/34 (60min)

得られた白色粉末 159.5 mg を 200 mL の蒸留水に溶解後、550 μL の AG 1x8 acetate 陰イオン交換樹脂 (0.66 mmol, BioRAD 社) を加え、時々攪拌しつつ 1 時間静置した。溶液を 0.45 μm の細孔径のメンブランフィルターに通過させることで樹脂と微粒子を除いた後、凍結乾燥し、134.5 mg の精製 TAK-448 酢酸塩を取得した。

精製サンプルは以下の HPLC 条件で純度を確認し、MALDI TOF MS 分析で同定を行った (C₆₄H₈₃N₁₇O₁₃ [M+H]⁺ 1225.79 (理論値 1225.61))。

HPLC 分析条件

逆相 HPLC 分析

カラム：MERCK Chromolith® FastGradient RP-18 end-capped column (2.0mm I.D. \times 50 mm)

溶出液 A: 0.1% TFA-H₂O; 溶出液 B: 0.1% TFA-CH₃CN

流速：0.5 mL/min

溶出条件：直線型濃度勾配溶出：A/B: 95/5 – 25/75 (14 min)

保持時間：11.05 分

イオン交換 HPLC

カラム：Phenomenex Luna® 5- μm SCX 100 Å column (4.6 mm I.D. \times 100 mm)

溶出液 A: 20 mM sodium phosphate buffer (pH 2.1)/acetonitrile (75/25)

溶出液 B: 0.5 M NaCl -20 mM sodium phosphate buffer (pH 2.1)/acetonitrile (75/25)

流速：1.0 mL/min

溶出条件：直線型濃度勾配溶出：A/B =100/0 – 0/100 (20 min)

保持時間：7.48 分

バイアル内でのサンプル凍結乾燥手順

134.5 mg の精製サンプルに 6.725 mL (20 mg/mL) の氷酢酸を加え、超音波洗浄機にて 5 分間攪拌した。続いて、20.175 mL の蒸留水を加え、5 mg/ml-25 % 酢酸水溶液を作製した。得られた 5 mg/ml 酢酸水溶液を 4 mL ずつ 6 本のバイアルに分注し、残った溶液は別のバイアルに移した。それぞれのバイアルは -80 °C で 2 時間凍結した後、凍結乾燥した。その際凍結乾燥機の棚温度を -40°C 1 hr、-20 °C 2 hr、0 °C 12 hr、5 °C 8 hr、20 °C 5 hr と連続的に変化させた。結果として、20 mg の TAK-448 が入ったバイアル 6 本と 12.34 mg のバイアル 1 本を取得した。

Table 31. 第1章に記載した誘導体の物理化学データ

compound	RP-HPLC ^a			RP-HPLC ^b			IE-HPLC ^c			IE-HPLC ^d			mass (Da) ^e	
	t _{ret} (min)	Purity (%)	t _{ret} (min)	t _{ret} (min)	Purity (%)	t _{ret} (min)	t _{ret} (min)	Purity (%)	t _{ret} (min)	Purity (%)	t _{ret} (min)	Purity (%)	Calculated	Observed
4	10.07	98.3	10.08	22.18	100.0	22.18	22.18	97.5	22.18	98.2	22.18	97.5	1165.28	1165.59
5	11.42	98.2	11.42	12.69	100.0	12.69	12.69	95.3	12.69	98.2	12.69	98.2	1342.00	1341.65
6	10.21	99.1	10.21	10.21	97.8	22.20	22.20	100.0	22.20	99.4	22.20	99.4	1204.71	1204.60
7	10.29	98.7	10.28	10.28	95.8	22.20	22.20	100.0	22.20	98.2	22.20	98.2	1218.12	1218.62
8	10.85	98.2	10.85	10.85	99.2	21.95	21.95	100.0	21.95	99.3	21.95	99.3	1216.59	1216.64
9	11.23	97.2	11.24	11.24	96.2	22.52	22.52	100.0	22.52	99.7	22.52	99.7	1250.61	1250.62
10	11.19	96.1	11.19	11.19	95.1	21.68	21.68	100.0	21.69	100.0	21.69	100.0	1230.62	1230.65
11	11.37	97.3	11.37	11.37	95.9	22.73	22.73	100.0	22.74	99.0	22.74	99.0	1303.71	1303.65
12	10.78	98.8	10.79	10.79	97.3	22.74	22.74	100.0	22.74	100.0	22.74	100.0	1214.57	1214.62
13	10.39	97.7	10.39	10.39	97.3	21.96	21.96	100.0	21.97	98.7	21.97	98.7	1230.52	1230.62
14	11.33	96.7	11.33	11.33	95.7	13.82	13.82	98.7	13.82	95.0	13.82	95.0	1242.59	1242.62
15	11.37	98.7	11.38	11.38	97.2	13.62	13.62	100.0	13.62	99.6	13.62	99.6	1256.81	1256.63
16	11.93	99.1	11.92	11.92	98.2	13.46	13.46	100.0	13.46	100.0	13.46	100.0	1254.63	1254.65
17	10.29	97.9	10.29	10.29	95.4	22.41	22.41	100.0	22.41	96.9	22.41	96.9	1161.64	1161.60
18	10.26	98.4	10.26	10.26	97.8	21.74	21.74	100.0	21.74	98.0	21.74	98.0	1191.64	1191.61
19	11.64	98.2	11.64	11.64	97.7	13.71	13.71	100.0	13.72	99.4	13.72	99.4	1199.26	1199.61
20	11.66	98.0	11.67	11.67	95.6	13.63	13.63	100.0	13.63	99.3	13.63	99.3	1213.51	1213.63
21	11.77	98.1	11.77	11.77	96.1	13.60	13.60	100.0	13.61	99.2	13.61	99.2	1213.48	1213.63
22	12.22	99.1	12.23	12.23	96.9	7.23	7.23	100.0	7.23	99.5	7.23	99.5	1241.43	1241.62
23	11.92	100.0	11.92	11.92	99.5	7.27	7.27	99.4	7.28	98.8	7.28	98.8	1298.82	1298.64
24	12.38	98.8	12.38	12.38	98.9	7.17	7.17	100.0	7.17	99.5	7.17	99.5	1326.76	1326.67
25	12.28	97.0	12.28	12.28	98.3	7.23	7.23	100.0	7.23	99.3	7.23	99.3	1324.75	1324.66
26	12.73	99.0	12.73	12.73	95.1	7.16	7.16	100.0	7.16	99.0	7.16	99.0	1360.72	1360.66
27	10.67	99.7	10.68	10.68	98.6	14.39	14.39	100.0	14.39	98.6	14.39	98.6	1260.56	1260.63
28	11.83	99.5	11.83	11.83	99.1	7.23	7.23	100.0	7.23	100.0	7.23	100.0	1259.73	1259.63

^aRetention times and purities of peptides were characterized by reversed phase HPLC analyses performed with a Shimadzu gradient system using MerckChromolith FastGradient RP-18 end-capped column (2.0 × 50 mm) at a wavelength of 210 nm. Peptides were eluted with a linear gradient 5-75% acetonitrile in water containing 0.1% TFA over 14 min (0.5 mL/min). b)Retention times and purities of peptides were characterized by reversed phase HPLC analyses at a wavelength of 254 nm. ^cRetention times and purities of peptides were characterized by ion exchange HPLC analyses performed with a Shimadzu gradient system using Phenomenex Luna 5 μm SCX 100 Å column (4.6 × 100 mm) at a wavelength of 210 nm. Peptides were eluted with a linear gradient with eluent A/eluent B = 100/0 to 0/100 (20 min) using 20 mM sodium phosphate buffer (pH 2.1)/acetonitrile (75/25) as eluent A and 0.5 M NaCl in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 2.1)/acetonitrile (75/25) as eluent B at a flow rate of 1.0 mL/min. ^dRetention times and purities of peptides were characterized by ion exchange HPLC analyses at a wavelength of 254 nm. e)Molecular weights of peptides were determined by Voyager MALDI-TOF mass spectrometer.

(出典) Asami et al. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 6105-6115. Table S1

Table 32. 第2章に記載した誘導体の物理化学データ

compound	RP-HPLC ^a			IE-HPLC ^c			IE-HPLC ^d			mass (Da) ^e	
	<i>t_{ret}</i> (min)	Purity (%)	<i>t_{ret}</i> (min)	<i>t_{ret}</i> (min)	Purity (%)	<i>t_{ret}</i> (min)	<i>t_{ret}</i> (min)	Purity (%)	<i>t_{ret}</i> (min)	Calculated	Observed
29	11.06	99.4	11.06	100.0	7.63	100.0	7.63	100.0	7.63	1183.74	1183.60
30	11.76	97.2	11.75	97.2	7.50	100.0	7.50	100.0	7.50	1225.77	1225.65
31	10.65	98.6	10.66	98.0	13.14	100.0	13.14	100.0	13.14	1240.56	1240.66
32	10.99	97.9	10.99	98.0	7.16	100.0	7.16	97.3	7.16	1241.35	1241.61
33	12.08	96.8	12.09	100.0	7.53	100.0	7.53	100.0	7.53	1298.38	1298.64
34	10.70	99.3	10.71	100.0	13.30	98.2	13.30	98.0	13.30	1240.50	1240.66
35	11.01	99.6	11.01	100.0	7.18	100.0	7.18	100.0	7.18	1241.80	1241.61
36	11.63	99.0	11.64	98.3	7.41	100.0	7.41	95.2	7.41	1169.59	1169.59
37	11.06	99.3	11.16	100.0	7.51	100.0	7.51	100.0	7.51	1183.60	1183.60
38	11.63	97.7	11.63	99.3	7.48	100.0	7.48	100.0	7.48	1197.62	1197.62
39	11.23	98.6	11.23	100.0	7.66	98.8	7.66	100.0	7.66	1197.82	1197.62
40	11.61	98.6	11.61	96.5	7.65	98.4	7.65	100.0	7.65	1197.79	1197.62
41	11.08	98.2	11.08	96.8	7.66	100.0	7.66	100.0	7.66	1183.46	1183.60
42	10.99	95.0	10.90	96.4	7.70	100.0	7.70	100.0	7.70	1183.77	1183.60
43	11.62	100.0	11.62	100.0	7.77	96.9	7.77	95.1	7.77	1231.66	1231.60
44	11.40	100.0	11.40	100.0	7.81	98.1	7.81	98.6	7.81	1209.71	1209.62
45	11.07	98.7	11.07	96.1	7.88	100.0	7.88	100.0	7.88	1209.25	1209.62
46	11.13	99.8	11.13	100.0	7.72	100.0	7.72	99.0	7.72	1195.62	1195.60
47	11.42	97.8	11.42	95.8	7.68	100.0	7.68	98.0	7.68	1223.78	1223.63
48	10.91	100.0	10.91	100.0	7.87	100.0	7.87	98.5	7.87	1195.49	1195.60
49	11.17	96.5	11.17	95.5	7.92	100.0	7.92	100.0	7.92	1223.83	1223.63
50	11.95	100.0	11.95	100.0	7.89	100.0	7.89	100.0	7.90	1271.39	1271.63
51	11.05	99.3	11.05	98.3	7.48	100.0	7.48	100.0	7.48	1225.79	1225.61
52	11.43	97.3	11.43	95.6	7.73	100.0	7.73	100.0	7.74	1227.73	1227.57
53	12.05	100.0	12.05	100.0	7.50	100.0	7.51	100.0	7.51	1316.72	1316.63
54	12.11	96.0	12.11	97.5	7.51	98.6	7.51	97.3	7.51	1316.67	1316.63
55	12.12	100.0	12.12	100.0	7.49	100.0	7.49	100.0	7.49	1316.16	1316.63
56	12.45	100.0	12.45	100.0	7.64	100.0	7.65	100.0	7.65	1332.73	1332.60
57	12.25	98.5	12.25	97.4	7.44	100.0	7.45	100.0	7.45	1316.96	1316.63
58	10.88	96.4	10.88	97.5	12.95	99.3	12.95	100.0	12.95	1258.45	1258.65
59	11.21	98.5	11.21	96.9	7.18	97.7	7.19	95.0	7.19	1259.88	1259.60
60	11.19	97.5	11.19	97.5	7.60	95.1	7.60	95.0	7.60	1187.29	1187.58
61	11.82	100.0	11.82	97.7	7.41	100.0	7.40	97.4	7.40	1215.55	1215.61
62	11.23	99.1	11.23	100.0	7.45	97.3	7.46	98.2	7.46	1243.82	1243.60

^a Retention times and purities of peptides were characterized by reversed phase HPLC analyses performed with a Shimadzu gradient system using MERCK Chromolith® FastGradient RP-18 endcapped column (2.0 x 50 mm) at a wavelength of 210 nm. Peptides were eluted with a linear gradient 5-75% acetonitrile in water containing 0.1% TFA over 14 min (0.5 mL/min). ^b Retention times and purities of peptides were characterized by reversed phase HPLC analyses at a wavelength of 254 nm. ^c Retention times and purities of peptides were characterized by ion exchange HPLC analyses performed with a Shimadzu gradient system using Phenomenex Luna® 5 µm SCX 100 Å column (4.6 x 100 mm) at a wavelength of 210 nm. Peptides were eluted with a linear gradient with eluents A/B = 100/0-0/100 (20 min) using 20 mM sodium phosphate buffer (pH 2.1)/acetonitrile (75/25) as eluent A and 0.5 M NaCl-containing 20 mM sodium phosphate buffer (pH 2.1)/acetonitrile (75/25) as eluent B at a flow rate of 1.0 mL/min. ^d Retention times and purities of peptides were characterized by ion exchange HPLC analyses at a wavelength of 254 nm. ^e Molecular weights of peptides were determined by Voyager MALDI-TOF mass spectrometer.

(出典) Nishizawa et al. *J. Med. Chem.*, 2016, 59, 8804-8811, Table S1

Table 33. 第3章に記載した誘導体の物理化学データ

compound	RP-HPLC ^{a, b}		mass (Da) ^c	
	t _{ret} (min)	Purity (%)	Calculated	Observed
63	6.28	100.0	1344.63	1344.56
3,3'-disulfanediyldipropionyl-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
64	6.19	88.0	1447.62	1448.44
3-Sulfanypropionyl-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
65	3.26	100.0	487.31	487.37
[Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(52-54)				
66	3.85	100.0	587.34	587.17
Ac-[azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(51-54)				
67	5.09	100.0	734.41	734.44
Ac-[azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(50-54)				
68	5.07	96.2	1093.57	1093.72
[D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(47-54)				
69	5.84	100.0	1284.63	1284.62
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
70	5.18	100.0	1222.61	1222.89
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,Ala ⁵⁰ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
71	6.01	100.0	1297.65	1297.60
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
72	5.80	100.0	1298.64	1298.60
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,D-Leu ⁵² ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
73	6.67	97.0	1438.64	1438.65
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Tos) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
74	5.75	100.0	1225.72	1225.72
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Leu ⁵⁴]metastatin(46-54)				
75	6.12	100.0	1299.63	1299.60
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)-COOH				
76	5.02	100.0	688.40	688.49
3-Sulfanypropionyl-[Acp51,Arg(Me) ⁵³ ,Trp54]metastatin(51-54)				
77	12.34 ^b	97.3 ^b	746.00	746.46
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,Acp ⁵⁰]metastatin(46-50)-NHCH ₂ CH ₂ SH				
78	4.88	100.0	1062.55	1062.70
Ac-[Hyp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(47-54)				
79	5.07	100.0	1241.61	1241.34
2-Hydroxyacetyl-[D-Tyr ⁴⁶ ,Hyp ⁴⁷ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
80	5.38	92.4	1240.62	1240.36
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,D-Trp ⁴⁷ ,Alb ⁴⁸ ,Thr ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				
81	5.34	100.0	1196.59	1195.40
Ac-[D-Tyr ⁴⁶ ,Hyp ⁴⁷ ,Ala ⁴⁹ ,azaGly ⁵¹ ,Arg(Me) ⁵³ ,Trp ⁵⁴]metastatin(46-54)				

^a Retention times and purities of peptides were characterized by reversed phase HPLC analyses performed with a Shimadzu gradient system using MERCK Chromolith[®] Performance RP-18 column (4.6 x 100 mm) at a wavelength of 220 nm. Peptides were eluted with a linear gradient 5-65% acetonitrile in water containing 0.1% TFA over 10 min (3 mL/min). ^b Retention times and purities of peptides were characterized by reversed phase HPLC analyses performed with a Shimadzu gradient system using YMC-AM301 (4.6 x 100 mm) at a wavelength of 220 nm. Peptides were eluted with a linear gradient 0-50% acetonitrile in water containing 0.1% TFA over 25 min (1 mL/min). ^c Molecular weights of peptides were determined by Voyager or Autoflex speed MALDI-TOF mass spectrometer.

[分析試験]

溶液安定性試験 (第一章)

試料濃度が約 50 $\mu\text{g/mL}$ となるように、10% MeCN を含む JP1(日本薬局方崩壊試験第 1 液、pH 1.2)、及び各種 pH buffer (pH 3, pH 5 及び pH 7)溶液を調製して、37 °Cで保存し、経時的にサンプリングして、下記の HPLC 条件で測定し、イニシャル (0 時間) に対する残存率を求めた。

HPLC 分析条件

Detector: PDA 220-800 nm(解析は 230-280 nm)

Column: CAPCELLPAK C18 MG 5 μm (4.6mm I.D. \times 250mm)

Mobile Phase A : H₂O/0.05 mol/L AcONH₄ 水溶液/MeCN (8:1:1)

Mobile Phase B : 0.05mol/L AcONH₄ 水溶液/MeCN (1:9)

Gradient Program: 0 \rightarrow 20 min 10 \rightarrow 50% B)

20 \rightarrow 25 min 50% B)

25.1 \rightarrow 30 min 50% B)

Column Temp.: 40°C

Flow Rate: 1 mL/min

Injection volume : 50 μL

溶液安定性試験 (第二章)

<化合物 51>

試料濃度が約 25 $\mu\text{g/mL}$ となるように、JP1(pH 1.2)、及び各種 pH buffer (pH3、pH5 及び pH7) 溶液を調製 (MeCN 含量 : 10%) 後、37°Cで保存し、経時的にサンプリングして下記の HPLC 条件で測定し、イニシャル (0 時間) に対する残存率を求めた。

<TAK-683>

試料濃度が 50 $\mu\text{g/mL}$ となるように、pH7 buffer 溶液を調製 (MeCN 含量 : 10%) 後、37°Cで保存し、経時的にサンプリングして下記の HPLC 条件で測定し、イニシャル (0 時間) に対する残存率を求めた。

<HPLC 条件>

Detector : UV 230nm

Column : CAPCELLPAK C18 MG II 5 μm (4.6mm I.D. \times 250mm)

Mobile Phase A : 0.05mol/L AcONH₄

Mobile Phase B : MeCN

Gradient Program: 0 \rightarrow 20 min 18 \rightarrow 50% B)

20 \rightarrow 25 min 50% B)

25.1 min 18% B)

Column Temp.: 40°C

Flow Rate: 1 mL/min

Injection volume : 20 μ L

溶解性試験

20 mg の凍結乾燥粉末が入ったガラスバイアルに蒸留水 1 mL を入れ、溶解性を目視観察した。溶解した溶液について、室温で静置し、5 日目まで水溶液の性状について観察した。TAK-448 については 500 mg/mL 水溶液を作製し、9 時間後まで観察、ゲル化は認められなかった。

CD スペクトル分析

TAK-683, TAK-448 および metastin(45-54) の 0.1 mg/mL 水溶液を光路長 0.1 cm のセルに入れ、CD スペクトルを Jasco J-820 CD 測定装置(日本分光)にて測定した(測定温度: 20 °C, 測定範囲: 190 - 260 nm, データ間隔: 0.1 nm, レスポンス: 1 秒, バンド幅 1.0 nm, 走査速度: 100 nm/min)。10 回の分析の平均値として平均残基モル楕円率 $[\theta]$ (deg cm²/d mol) を算出し、JWSSE-480 タンパク質二次構造予測ソフトウェア(日本分光)による解析を行った。

[生物活性に関する試験]

細胞内カルシウムイオン濃度変化測定法によるアゴニスト活性の測定

1. ヒト KISS1R およびラット KISS1R 安定発現細胞株の作製

ヒト KISS1R およびラット KISS1R 安定発現細胞株は動物細胞発現用プラスミドを CHO/dhfr 細胞に CellPect Transfection kit (GE healthcare 製) を用いて形質導入することにより取得した。まず、蒸留水 240 μ L に溶解したプラスミド DNA 9.6 μ g に対して Buffer A (CellPect Transfection kit に添付) 240 μ L を添加し、攪拌し、10 分間静置後、Buffer B (CellPect Transfection kit に添付) 480 μ L を添加し、激しく攪拌し該 DNA を含有するリポソームを形成させた。4 \times 10⁵ 個の CHO/dhfr 細胞 (ATCC より入手) を 60 mm シャーレに播き、10% のウシ胎児血清 (BIO WHITTAKER 製) を含む Ham's F-12 培地 (日水製薬製) 中で 37 °C、5% 炭酸ガス中で 2 日間培養した後、該リポソーム 480 mL をシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37 °C) で 6 時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12 培地で 2 回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に 15% グリセロール 3 mL を添加し 2 分間処理した。これを、再度、血清を含まない Ham's F-12 培地で 2 回洗浄した後、10% のウシ胎児血清を含む Ham's F-12 培地中で CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37 °C) で 15 時間培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、1.25 \times 10⁴ 個ずつ 6-well plate に播種し、透析済み 10% ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社) を含む Dulbecco's modified Eagle medium 培地 (DMEM、日水製薬製) 中にて CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37 °C) で培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換 CHO 細胞は該培地中で生育するが非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始 1 日目、および 2 日目に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始 8-10 日後に生育してきた形質転換 CHO 細胞のコロニーを約 20 個単離した。これらのコロニーの細胞からリガンドペプチドであるメタスチンに対して高い反応性を示す細胞 (以後 h175KB19 株、

h175KB29 株と略称する) を選別し、以降の実験に用いた。

2. 細胞の播種

ヒト KISS1R 発現 CHO 細胞株およびラット KISS1R 発現 CHO 細胞株を 96-well plate (type 3904, Corning 製) に 3×10^4 cell/well で播種し、CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37 °C) で 24 時間培養した。培地は、透析済み 10 %ウシ胎児血清 (Thermo 製 MultiSer) を含む MEM α 培地 (核酸不含、日研生物医学研究所製) を使用した。

3. Fluo-4 NW の細胞内へのローディング

アッセイ・バッファーとして、0.1% BSA、20 mM HEPES (pH 7.4, GIBCO 製) および 1 mM probenecid (In vitrogen 製) を含む $1 \times$ HANKS/HBSS (GIBCO 製) を調製した。細胞を播種したプレートの well 内の培地を除き、このアッセイ・バッファー (37 °C に保温済) を各 well に 100 μ L ずつ添加した。10 mL のアッセイ・バッファー (2 枚のプレート測定用の分量) を、Fluo-4NW dye mix (Component A, Fluo-4 NW calcium assay kit (starter pack), In vitrogen 製) 1 ボトルに添加し、穏やかに攪拌して Fluo-4 NW ローディング溶液を調製した。このローディング溶液を各 well に 50 μ L ずつ添加し、CO₂ インキュベーター (5 % CO₂, 37°C) で、30 分間反応して Fluo-4 NW を細胞内へローディングし、続いて室温 (25 °C) で 15 分間静置した後、測定に使用した。

4. アゴニスト活性測定

ヒト metastin(45-54)* 特異的アゴニスト活性は、ヒト metastin(45-54) 添加で示された蛍光変化量から無添加対照で示された蛍光変化量を減じた値である。試験化合物の特異的アゴニスト活性は、試験化合物添加で示された蛍光変化量から無添加対照で示された蛍光変化量を減じた値である。50 % のアゴニスト応答活性を示す化合物濃度 (EC₅₀ 値) は、用量反応曲線から算出した。ヒト metastin(45-54) 特異的アゴニスト活性の最大値を 100 % とした場合、これに対して最大活性が 70 % 以上の値を示した試験化合物について EC₅₀ 値を算出した。

*ヒトの metastin アミノ酸配列の 45 位から 54 位を合成したペプチド [ヒト metastin(45-54)] はペプチド研究所合成品を用いた。

メタスチン受容体結合阻害アッセイ

アッセイ基本バッファー (20 mM Tris, 2.5 mM magnesium acetate, 2 mM EGTA, pH 7.4) 100mL 当たり、1 mg leupeptin (ペプチド研, 4041)、1 mg E-64 (ペプチド研, 4096)、10 mg o-phenanthroline (同仁化学)、9 mg PMSF (和光純薬)、1 mg pepstatin A (ペプチド研, 4397) を加えた。このバッファーは実験当日調製し、使用時まで 4°C で保管した。BSA 添加測定条件では以上の溶液に 1 mg/mL となるように BSA (Fraction V, Serologicals protein Inc.) を添加して使用した。

使用直前に、ヒト KISS1R 発現 CHO 株 (h175KB34) より採取した膜面分をアッセイ基本バッファーに 250 倍で希釈した。96-ウェルプレートで測定する場合、1 ウェルにつき 178 μ L を使用した。

ラクトパーオキシダーゼ法でラベル化した $[^{125}\text{I}]$ -metastin(40-54) stock 溶液(48 nM)を使用直前に、リガンド希釈バッファー(アッセイ基本バッファー20 mLにBSA 20 mg、CHAPS 10 mgを添加する)に最終 1.5 nM となるように希釈した。この希釈はBSA添加測定条件あるいは無添加測定条件に関係なく行った。96-well plate (type 3363, Corning 製)に希釈した膜面分 178 μl を各 well に添加した。次に、化合物 (DMSO 溶液) を 2 μl 添加した。また、TB用にDMSOを2 μl 、NSB用に200 μM metasin(45-54) (ペプチド研、4389- v, DMSO 溶液)を2 μl 添加した。希釈した $[^{125}\text{I}]$ -Metastin(40-54)溶液を20 μL 各ウェルに添加し、室温で60分、マイクロミキサー(三光純薬)で混合し、バインディング反応を行った。次に、セルハーベスター (PerkinElmer 製)を使用して、PEI 処理(事前に0.3% polyethyleneimine, 20 mM Tris, pH 7.4 に浸漬)済みUniFilterGF/B plate (PerkinElmer 製)でバインディング反応液をろ過した。ろ過後、洗浄バッファー(50 mM Tris, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.05% CHAPS, 0.05% NaN_3 , 0.1% BSA, pH 7.4)でplateを3回洗浄し、乾燥機(50 $^{\circ}\text{C}$)で45分間、このplateを乾燥した。このplateの底面にシールを貼り、液体シンチレーター (MicroScint O, PerkinElmer 製)を30 μl 添加した。その後、TopCount (PerkinElmer 製)で、plateの各wellに残存した放射活性を1分間測定した。

(TB-SB) / (TB-NSB) \times 100 (TB:最大結合放射活性、SB:化合物存在下の放射活性、NSB:非特異的結合放射活性)を計算して、各被験化合物の結合阻害率を求めた。また、各被験化合物の濃度を変化させて阻害率を求め、 ^{125}I -metastin(40-54)の特異的結合を50%阻害する被験化合物濃度 (IC_{50} 値) は GraphPad Prism (GraphPad 製)を用いて算出した。

成熟雄性ラットを用いたメタスチン誘導体の血中テストステロン減少作用 (1週間スクリーニング試験)

メタスチン誘導体 (以下、ペプチドと呼ぶ) を蒸留水あるいは50% DMSO 水溶液 (DMSO:Sigma-Aldrich、注射用蒸留水:大塚製薬) に溶解し、所定の濃度のペプチド溶液を調製した。このペプチド溶液をALZET浸透圧ポンプ (Model 2001、容量0.2 mL、放出速度 0.001 mL/hr、DURECT Corporation) 5個に封入した。ペプチド溶液を封入したALZETポンプを、エーテル麻酔した生後9週齢の雄性CD(SD)IGSラット (日本チャールズリバー) 5匹に、1匹あたり1個ずつ、背部皮下に移植した。また、陰性コントロールとして50% DMSO水溶液をALZET浸透圧ポンプ5個に封入し、同様に雄性CD(SD)IGSラット (日本チャールズリバー) 5匹にそれぞれ移植した。ポンプを移植したこれらのラットは、通常の飼育条件にて6日間飼育し、体重を測定した後、断頭して血液を採取した。血液1 mLあたり、0.1 g/mL EDTA \cdot 2Naを含むアプロチニン (トラジロール、バイエル) 溶液を0.03 mL添加し、1,800 \times gで30分間遠心して、血漿を分離・回収した。得られた血漿0.05 mLをラジオイムノアッセイ (DPC \cdot トータルテストステロンキット、Diagnostic Products Corporation) に向け、各ラットの血漿テストステロン濃度を測定した。ペプチドを投与したラット5匹中、テストステロン濃度が、ラジオイムノアッセイ測定限界 (血漿中濃度0.04 ng/mL) 以下を示した個体数を表記した。

成熟雄性ラットを用いたメタスチン誘導体の血中テストステロン減少作用の評価（4週間精査試験）

メタスチン誘導体（以下、ペプチドと呼ぶ）を50% DMSO水溶液（DMSO: Sigma-Aldrich、注射用蒸留水: 大塚製薬）に溶解し、それぞれ1週間徐放型 ALZET 浸透圧ポンプ（Model 2001、容量 0.2 mL、放出速度 0.001 mL/hr、DURECT Corporation）5個に封入した。ペプチド溶液を封入した ALZET ポンプを、エーテル麻酔した生後9週齢の雄性 CD(SD)IGS ラット（日本チャールズリバー）5匹に、1匹あたり1個ずつ、背部皮下に移植した。ポンプは1週ごとに入れ替えて合計4回（4週間）投与した。採血は投与直前から28日後にかけて経日的に実施した。血液1 mLあたり、0.1 g/mL EDTA・2Naを含むアプロチニン（トラジロール、バイエル）溶液を0.03 mL添加し、4°Cで3000 rpm、15分間遠心して、血漿を分離・回収した。得られた血漿0.05 mLをラジオイムノアッセイ（DPC・トータルテストステロンキット、三菱化学ヤトロン）にかけ、血漿中テストステロン濃度を測定した。

ラット薬物動態試験

メタスチン誘導体（以下、ペプチドと呼ぶ）を50% DMSO水溶液（DMSO: Sigma-Aldrich、注射用蒸留水: 大塚製薬）に溶解し、をSDラットに1 mg/kgの用量で静脈内または皮下投与後、5, 10, 15, 30分および1, 2, 4, 8, 24時間後に採血を行った。0.2%ギ酸/メタノール（1:4, v/v）およびアセトニトリルを用いて血漿タンパク質を除去し、続いて15000 rpmで5分間遠心分離することによって血漿を回収した。得られた上清を0.4%ギ酸水溶液で処理し、15000 rpmで5分間遠心分離した。LC/MSによりペプチドの血漿濃度を測定後、モーメント解析により、静脈内投与後の各ラットについて C_{5min} 、 AUC_{0-24h} 、MRT、 $V_{d(ss)}$ および CL_{total} を、皮下投与後の各ラットについて、 C_{max} 、 T_{max} 、 AUC_{0-24h} 、MRT および BA を算出し、平均±標準偏差（n=3）として表した。（AUC:血中濃度曲線下面積、 CL_{total} :全身クリアランス、MRT:平均滞留時間、 $V_{d(ss)}$:定常状態分布容積、 C_{5min} :投与5分後血中濃度、 C_{max} :最高血中濃度、 T_{max} :最高血中濃度到達時間、BA:生物学的利用率）

[サンドイッチ EIA 系作成に関する試験]

実験動物

免疫用および腹水化用には8週齢、胸腺の摘出には4~5週齢の雌性 BALB/c マウス（日本チャールズリバー）を用いた。マウスは自由摂食下、12時間の明暗サイクル（8:00 から 20:00 まで明期）で温度（ 24 ± 1 °C）および湿度を一定に保ち、飼育を行った。動物実験は武田薬品工業株の実験動物倫理規定に基づいて実施した。

モノクローナル抗体の作製

1. 免疫原の作製

チオールペプチドである化合物 **63**, **76**, **77** はマレイミド法を用い、KLH (CALBIOCHEM)との複合体をそれぞれ作製し、免疫原とした。すなわち、KLH 20 mg を 1.4 mL の 0.1 M リン酸緩衝液（pH 6.5）に溶解させ、GMBS（和光純薬工業）2.2 mg（8 μ mol）を含む DMF 溶液（和光純薬

工業) 100 μ L と混合し、室温で 40 分間反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラム (AmershamBioscience) で未反応の GMBS を除去し、マレイミド基が導入された KLH (20 mg) と 2.41mg のペプチドをそれぞれ混合し、4°C で 24 時間反応させた。反応後、PBS (pH 7.4) に対し、4°C で 2 日間透析し、得られた複合体を免疫原とした。また、N 末端にカルボキシル基を導入した化合物 64 はカルボジイミド法によって、KLH および bTG (SIGMA) との複合体を作製した。すなわち、化合物 64 (4.52 mg) を、55% アセトニトリル、35% DMF 水溶液 900 μ L に溶解し、10% HOSu/MeCN 溶液を 40 μ L を加え、さらに 10% WSCD \cdot HCl/MeCN 溶液を 10 μ L 添加して一晩室温で攪拌した。反応液の一部(50 μ L) を使用して HPLC によって反応の進行を確認後、反応液 200 μ L と 1 mL の 0.1M リン酸緩衝液(pH6.5) に溶解した KLH 10 mg と混和し、終夜反応後、PBS に対して 4°C で 2 日間透析し、得られた複合体を免疫原とした。

2. 免疫

BALB/c マウスに、ペプチド-KLH 複合体を 40 μ g/mouse の割合で完全フロイントアジュバント (DIFCO) にて乳化し、皮下投与し第 1 回目の免疫を行った。追加免疫は第 1 回目の免疫から 3 週間間隔で同量の免疫原を不完全フロイントアジュバント (DIFCO) にて乳化し、実施した。最終免疫は、細胞融合の 4 日前に約 20 μ g/mouse の割合で尾静脈内投与を行った。

3. 抗体価の測定

各種免疫用ペプチド-KLH 複合体を追加免疫してから 1 週間後の抗血清中の抗体価を下記の方法により測定した。まず、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製するため、抗マウスイムノグロブリン抗体(IgG 画分, Cappel) を 100 μ g/mL 含む 0.1 M 炭酸緩衝液(pH 9.6) 溶液を 96 ウェルマイクロプレートに 100 μ L ずつ分注し、4°C で 24 時間放置した。次に、プレートを PBS(400 μ L/well) で 2 回洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位を塞ぐため 25% ブロックエース (雪印乳業) を含む PBS を 300 μ L ずつ分注し、4°C で少なくとも 24 時間処理した。得られた抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに buffer C [1% BSA、0.4M NaCl、2 mM EDTA \cdot 2 Na (DOJINDO) を含む 20 mM リン酸緩衝液、pH 7.0] 50 μ L、および buffer C で希釈した抗血清 100 μ L (各種免疫用ペプチド-KLH 複合体を免疫後に得られた抗血清) を加え、4°C で 16 時間反応させた。次に、該プレートを PBS で 4 回洗浄したのち、buffer C で 300 倍希釈した各免疫原に対応する HRP 標識化免疫用ペプチドを 100 μ L 加え、室温で 1 日反応させた。PBS で洗浄後、固相上の HRP 酵素活性を TMB マイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム (KIRKEGAARD&PERRYLAB, INC) 100 μ L を加え、室温で 10 分間反応させた後、1 M リン酸 100 μ L を加え反応を停止させたのち、450 nm の吸光度をプレートリーダー (大日本製薬) で測定した。

4. モノクローナル抗体の作製

免疫用ペプチド-KLH 複合体を免疫したマウスの脾臓を用いて細胞融合を実施した。細胞融合は既報の方法⁷¹を改変して行った。すなわち、最終免疫 4 日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、MEM (日水製薬) に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た後、常法

に従い BALB/c マウス由来ミエローマ細胞 P3-X63.Ag8.U1(P3U1)と細胞融合を行った。すなわち、脾臓細胞および P3U1 をそれぞれ、血清を含有しない MEM で 3 度洗浄し、脾臓細胞と P3U1 数の比率を 5:1 になるよう混合して、800 回転で 15 分間遠心を行い、細胞を沈澱させた。上清を十分に除去した後、沈澱を軽くほぐし、45% ポリエチレングリコール(PEG)6000 (コッホライト)を 0.3 mL 加え、37 °C 温水槽中で 7 分間静置して細胞融合を行った。細胞融合後、細胞に毎分 2 mL の割合で MEM を添加し、合計 15 mL の MEM を加えた後 600 回転 15 分間遠心して上清を除去した。10% 牛胎児血清(ニチレイ)を含有する GIT 培地(和光純薬)(GIT-10% FCS)に、P3U1 が 1 mL 当り 2×10^5 個になるように、遠心後の細胞沈澱物を浮遊し、24 ウェルマルチディッシュ (Limbro) に 1 mL/well ずつ 240 ウェルに播種した。播種後、細胞を 37°C で 5% 炭酸ガスインキュベーター中にて培養した。24 時間後、HAT (ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-3} M) を含んだ GIT-10% FCS (HAT 培地) を 1 mL/well ずつ添加することにより、HAT 選択培養を開始した。HAT 選択培養は、培養開始 3、6 および 9 日後に旧液を 1 mL 捨てた後、1 mL の HAT 培地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後 9~14 日で認められ、培養液が黄変したとき (1×10^6 cells/ml)、上清を採取し抗体価を測定した。その後、高い抗体価を示す抗体産生ハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングに付した。クローニングに際しては、フィーダー細胞として BALB/c マウス(雌、4 週齢)の胸腺細胞を 5×10^5 cells/well で加えた。クローニング後、ハイブリドーマを、あらかじめミネラルオイル 0.5 mL を腹腔内投与された BALB/c マウス(雌、8 週齢)に $1 \sim 3 \times 10^6$ cells/匹を腹腔内投与したのち、8~12 日後に抗体含有腹水を採取した。モノクローナル抗体は、得られた腹水より AKTA prime システム(AmershamBiosciences)を用いて精製した。即ち、腹水を 5 倍量の結合緩衝液[20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)]で希釈し、4°C で 1 時間反応させてフィブリンを溶出したのち、0.45 μ m のフィルター(Millipore)でろ過した。あらかじめ結合緩衝液で平衡化した HiTrap™ Protein GHP カラム(AmershamBiosciences)に供し、特異抗体を溶離緩衝液[0.1 M グリシン-HCl 溶液(pH 2.7)]で溶出した。溶出液を PBS に対して 4°C、2 日間透析したのち、0.22 μ m のフィルター(Millipore)により除菌濾過し、4 °C あるいは -80 °C で保存した。モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定はイソタイプタイピングキット (BioRad) を使用して実施した。

5. モノクローナル抗体の反応特異性の検討

各モノクローナル抗体の抗体価を 3.に記載の方法により調べた。競合法-EIA に用いる抗体濃度として、HRP 標識化ペプチドと抗体との結合量が飽和結合量の約 50%となるハイブリドーマ培養上清希釈倍率をそれぞれ決定した。次に、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、(i) buffer C (3.に組成を記載)を 50 μ L、(ii) buffer C で希釈した培養上清を 50 μ L、(iii) buffer C で希釈した 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 pmol/mL の TAK-683、TAK-448 および誘導体ペプチド溶液 50 μ L を、(i)(ii)(iii)の順で添加し室温で 4 時間反応させた後、各免疫原に対応する HRP 標識化ペプチド(buffer C で 300 倍希釈)を 50 μ L を加え、4°C で 16 時間反応させた。PBS で洗浄した後、固相上の HRP 酵素活性を、3.に記載の方法により測定した。

6. モノクローナル抗体の Fab'化

取得したモノクローナル抗体のうち、Nab#2 の Fab'化を実施した。Nab#2 10 mg をセントリプレップ(YM-10、Amicon)で 0.7 mL に濃縮して、0.1 M 酢酸緩衝液(pH 4.5)に対して 4°C で 3 時間、透析を行った後、0.25 mg のペプシン(和光純薬)を添加し、37°C で 17 時間反応させた。次に、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)に置換し、UltrogelAcA54 (IBF)にて Fab'画分を採取し、セントリプレップにて濃縮した。採取画分は Native-PAGE によって、モノクローナル抗体が Fab'化されていることを確認した。

7. HRP 標識モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体を約 12 mg 含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8)に、抗体の 12 倍モル量の GMBS を含む DMF 50 μ L を加え、室温で 40 分反応させた。反応液をセファデックス G-25 カラム (溶離液 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.7)で分離し、マレイミド基の導入された抗体画分を約 9 mg を得た。次に、約 16 mg (400 nmol)の HRP を 0.15M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液(pH 6.8) 1.4 mL に溶解した後、15 倍モル量(約 6 μ mol)の SPDP (Pierce)を含む DMF 60 μ L を添加し、室温で 40 分反応させた。次に、その 10 倍モル量(約 60 μ mol)の DTT (和光純薬)を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.2 mL を加え、室温で 20 分反応させた後、2 mM EDTA \cdot 2Na を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0)で平衡化したセファデックス G-25 カラムを用いて、HRP に SH 基を導入した画分を分離した。次に、SH 基の導入された HRP 画分とマレイミド基の導入された抗体画分とを混合し、セントリプレップ YM-10 で約 0.5mL にまで濃縮したのち、4°C で 16 時間反応させた。反応液を 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.5)で平衡化した Sephacryl S-300HR カラム (AmershamBioscience)に供し、各モノクローナル抗体-HRP 複合体画分を精製した。

8. サンドイッチ ELISA 系の組み合わせ検討

今回作製した C 末端認識モノクローナル抗体および 5 種類の N 末端認識モノクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA 系に使用する抗体の組合せを検討した。3. の手法に従い、各モノクローナル抗体を固定化(1.5 μ g/100 μ L/well)した 96 ウェルプレートを作製し、各ウェルに、buffer C を 50 μ L および 0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 および 10000 fmol/mL の濃度となるように buffer C で希釈した TAK-683、TAK-448 をそれぞれ 100 μ L 加え、4°C で 24 時間反応させた。PBS で洗浄後、7.で作製した HRP 標識化モノクローナル抗体 (buffer C で 10,000 倍希釈) を 100 μ L 添加し、4°C で 24 時間反応させた。PBS で洗浄した後、マイクロプレート上の HRP 酵素活性を、3.に記載の方法により測定した。

標準サンプルの作製

コントロール血漿として使用するラット血漿サンプルは 8 週齢の SD ラット(クレア)から採取した。血漿サンプルは 1 mg/mL の EDTA-2Na と 100 mg/mL trasylol (プロテアーゼ阻害剤、バイエル)を含有するようにサンプルチューブに集め、13,000 \times g で 10 分間 4 °C で遠心後、アッセイに使用するまで -80°C で保存した。TAK-683、TAK-448 それぞれを含む標準溶液(メタノール：蒸留水：ギ酸, 400: 100: 1, v/v/v)を加えたチューブの溶媒を留去、乾燥後、氷冷下 100 μ L のコ

ントロール血漿を加え、30 秒間攪拌、1 分間超音波洗浄、30 秒間攪拌操作を行うことで、所定の濃度の TAK-683 添加血漿、TAK-448 添加血漿を作製した。

標準アッセイ手順

TAK-448 の測定には、Nab # 4 と Cab#2 の組み合わせを感度、選択性の点から最適な組み合わせとして選択した。buffer C (50 μ L) を Nab#4 でコーティングしたアッセイプレートに添加し、20 μ L のコントロール血漿で希釈した 3-300 pmol/mL の標準サンプルを添加した。

マイクロプレートを 5 ± 3 °C で 16-24 時間インキュベートした後、それぞれの well を PBS で 4 回洗浄した。次に HRP 標識した Cab#2 をそれぞれの well に 100 μ L 添加し、室温で 3 時間 \pm 10 分間静置した。PBS で 4 回洗浄後、100 μ L の TMB 溶液を添加し、室温 20 ± 5 分間静置し、最後に反応停止溶液として 1M 硫酸を 100 μ L 添加した。各サンプルの吸光度を測定し、各試料中の TAK-448 濃度を標準サンプルの検量線を用いて作成した回帰式を用い、SoftMaxPro5.4 ソフトウェア (モレキュラーデバイス社) を用いて算出した。

TAK-683 の測定には Nab#2 プレートと Cab#3-HRP の組み合わせを感度、選択性の点から選択した。標準サンプルの添加量が 10 μ L であることと濃度範囲が 5-500 pg/mL であること以外は TAK-448 測定と同様の操作で測定した。

ラット血中濃度評価

ラット血中濃度評価試験は 21-23 °C 下、12 時間の明期/暗期サイクルで自由摂餌で飼育した体重 300-400 g、8 週齢の雄 SD ラット (日本チャールズリバー) を用いて実施した。0.01 mg, 0.1 mg, 1 mg/kg の TAK-683 および TAK-448 を DMA-5% glucose (10: 90, v/v) 溶液に 1 mL/kg となるように溶解し、1.5 % イソフルラン麻酔下、伏在静脈を介して投与した。投与後 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間に尾静脈を介して経時的採血を行い、抗凝固剤およびプロテアーゼ阻害剤として 10 mM EDTA-2Na と 4mM AEBS を含む 1.5mL チューブに採取した。血液サンプルは氷温で保存した後、13,000 \times g で 4°C 下 5 分間遠心分離を行い、得られた血漿サンプルはアッセイを実施するまで、凍結保存した。アッセイ時にはコントロール血漿を用いて、適切な濃度に希釈し、濃度測定を実施した。

引用文献

- (1) H. Charlton. Hypothalamic control of anterior pituitary function: a history. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 641–646.
- (2) Andrew V. Schally. Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides* **1999**, *20*, 1247–1262.
- (3) 医薬品インタビューフォーム: リュープリン SR 注射用キット 1.88 mg, リュープリン PRO 注射用キット 22.5 mg (2016年10月改訂) (第13版) .
- (4) Tetsuya Ohtaki, Yasushi Shintani, Susumu Honda, Hirokazu Matsumoto, Akira Hori, Kimiko Kanehashi, Yasuko Terao, Satoshi Kumano, Yoshihiro Takatsu, Yasushi Masuda, Yoshihiro Ishibashi, Takuya Watanabe, Mari Asada, Takao Yamada, Masato Suenaga, Chieko Kitada, Satoshi Usuki, Tsutomu Kurokawa, Haruo Onda, Osamu Nishimura and Masahiko Fujino. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **2001**, *411*, 613-617.
- (5) Masato Kotani, Michel Detheux, Ann Vandenberghe, David Communi, Jean-Marie Vanderwinden, Emmanuel Le Poul, Stephane Brezillon, Richard Tyldesley, Nathalie Suarez-Huerta, Fabrice Vandeput, Cedric Blanpain, Serge N. Schiffmann, Gilbert Vassart, and Marc Parmentier. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34631-34636.
- (6) Alison I. Muir, Larissa Chamberlain, Nabil A. Elshourbagy, David Michalovich, Darren J. Moore, Amy Calamari, Philip G. Szekeres, Henry M. Sarau, Jon K. Chambers, Paul Murdock, Klaudia Steplewski, Usman Shabon, Jane E. Miller, Susan E. Middleton, John G. Darker, Christopher G. C. Larminie, Shelagh Wilson, Derk J. Bergsma, Piers Emson, Richard Faull, Karen L. Philpott, and David C. Harrison. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28969-28975.
- (7) Juan Roa, Enrique Aguilar, Carlos Dieguez, Leonor Pinilla, Manuel Tena-Sempere., New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.* **2008**, *29*, 48-69.
- (8) Simina M. Popa, Donald K. Clifton, Robert A. Steiner. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu. Rev. Physiol.* **2008**, *70*, 213-238.
- (9) A.K. Roseweir, R.P. Millar., The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum. Reprod. Update.* **2009**, *15*, 203-212.
- (10) Dennis K. Lee, Tuan Nguyenc, Gary P. O'Neill, Regina Chengc, Yang Liua, Andrew D. Howarde, Nathalie Coulombed, Carina P. Tane, Anh-Thi Tang-Nguyena, Susan R. Georgea, Brian F. O'Dowd. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* **1999**, *446*, 103-107.

- (11) Michelle K. Clements, Terrence P. McDonald, Ruiping Wang, Guochun Xie, Brian F. O'Dowd, Susan R. George, Christopher P. Austin, Qingyun Liu. FMRamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *284*, 1189-1193.
- (12) Nicolas de Roux, Emmanuelle Genin, Jean-Claude Carel, Fumihiko Matsuda, Jean-Louis Chaussain, Edwin Milgrom. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 10972-10976.
- (13) Stephanie B. Seminara, Sophie Messenger, Emmanouella E. Chatzidaki, Rosemary R. Thresher, James S. Acierno Jr., , Jenna K. Shagoury, Yousef Bo-Abbas, Wendy Kuohung, Kristine M. Schwinof, Alan G. Hendrick, Dirk Zahn, John Dixon, Ursula B. Kaiser, Susan A. Slaugenhaupt, James F. Gusella, Stephen O'Rahilly, Mark B.L. Carlton, William F. Crowley Jr., Samuel A. J. R. Aparicio, William H. Colledge. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1614-1627.
- (14) Juan Roa, Manuel Tena-Sempere, M. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2007**, *153*, 132-140.
- (15) M. L. Gottsch, M. J. Cunningham, J. T. Smith, S. M. Popa, B. V. Acohido, W. F. Crowley, S. Seminara, D. K. Clifton, R. A. Steiner. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* **2004**, *145*, 4073-4077.
- (16) Michael S. Irwig, Gregory S. Fraley, Jeremy T. Smith, Blake V. Acohido, Simina M. Popa, Matthew J. Cunningham, Michelle L. Gottsch, Donald K Clifton, Robert A. Steiner. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, **2004**, *80*, 264-272.
- (17) E. L. Thompson, M. Patterson, K. G. Murphy, K. L. Smith, W. S. Dhillon, J. F. Todd, M. A. Ghatei, S. R. Bloom. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J. Neuroendocrinol.* **2004**, *16*, 850-858.
- (18) Waljit S. Dhillon, Owais B. Chaudhri, Michael Patterson, Emily L. Thompson, Kevin G. Murphy, Michael K. Badman, Barbara M. McGowan, Vian Amber, Sejal Patel, Mohammad A. Ghatei, Stephen R. Bloom. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 6609-6615.
- (19) Hisanori Matsui, Yoshihiro Takatsu, Satoshi Kumano, Hirokazu Matsumoto, Tetsuya Ohtaki. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 383-388.
- (20) Emily L. Thompson, Kevin G. Murphy, Michael Patterson, Gavin A. Bewick, Gordon W. H. Stamp, Annette E. Curtis, Jennifer H. Cooke, Preeti H. Jethwa, Jeannie F. Todd, Mohammad A. Ghatei, Stephen R. Bloom. Chronic subcutaneous administration of

- kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, *291*, E1074-1082.
- (21) Stephanie B. Seminara, Meloni J. DiPietro, Suresh Ramaswamy, William F. Crowley Jr, Tony M. Plant. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* **2006**, *147*, 2122-2126.
- (22) Suresh Ramaswamy, Stephanie B. Seminara, Clifford R. Pohl, Meloni J. DiPietro, William F. Crowley Jr., Tony M. Plant Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45-54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* **2007**, *148*, 3364-3370.
- (23) C. N. Jayasena, G. M. Nijher, A. Abbara, K. G. Murphy, A. Lim, D. Patel, A. Mehta, C. Todd, M. Donaldson, G. H. Trew, M. A. Ghatei, S.R. Bloom, W. S. Dhillon. Twice-weekly administration of kisspeptin-54 for 8 weeks stimulates release of reproductive hormones in women with hypothalamic amenorrhea. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *88*, 840-847.
- (24) Taiji Asami, Naoki Nishizawa, Yoshihiro Ishibashi, Kimiko Nishibori, Yasuko Horikoshi, Hirokazu Matsumoto, Tetsuya Ohtaki, Chieko Kitada. Trypsin resistance of a decapeptide KISS1R agonist containing an N^ω-methylarginine substitution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6328-6332.
- (25) Taiji Asami, Naoki Nishizawa, Yoshihiro Ishibashi, Kimiko Nishibori, Masaharu Nakayama, Yasuko Horikoshi, Shin-ichi Matsumoto, Masashi Yamaguchi, Hirokazu Matsumoto, Naoki Tarui, Tetsuya Ohtaki, Chieko Kitada. Serum stability of selected decapeptide agonists of KISS1R using pseudopeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6391-6396.
- (26) Taiji Asami, Naoki Nishizawa, Hisanori Matsui, Kimiko Nishibori, Yoshihiro Ishibashi, Yasuko Horikoshi, Masaharu Nakayama, Shin-ichi Matsumoto, Naoki Tarui, Masashi Yamaguchi, Hirokazu Matsumoto, Tetsuya Ohtaki, Chieko Kitada. Design, synthesis, and biological evaluation of novel investigational nonapeptide KISS1R agonists with testosterone-suppressive activity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8298-8307.
- (27) Hisanori Matsui, Akira Tanaka, Kotaro Yokoyama, Yoshihiro Takatsu, Kaori Ishikawa, Taiji Asami, Naoki Nishizawa, Atsuko Suzuki, Satoshi Kumano, Michiko Terada, Masami Kusaka, Chieko Kitada, Tetsuya Ohtaki. Chronic administration of the metastin/kisspeptin analog KiSS1-305 or the investigational agent TAK-448 suppresses hypothalamic pituitary gonadal function and depletes plasma testosterone in adult male rats. *Endocrinology* **2012**, *153*, 5297-5308.
- (28) Gleen J. Bubley. Is the flare phenomenon clinically significant?. *Urology* **2001**, *58* (Suppl 2A): 5-9.

- (29) Massimo Perachino, Valerio Cavalli, Fabio Bravi. Testosterone levels in patients with metastatic prostate cancer treated with luteinizing hormone-releasing hormone therapy: prognostic significance? *BJU International* **2009**, *105*, 648-651.
- (30) J. Le'on E. Reubsæet, Jos H. Beijnen, Auke Bult, Rianne J. van Maanen, J. A. Danie " lle Marchal, Willy J.M. Underberg. Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 955-978.
- (31) Jeffrey L. Bada. *In vivo* racemization in mammalian proteins. *Methods Enzymol.* **1984**, *106*, 98-115.
- (32) Paul A. C. Cloos, Christian Fledelius. Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential. *Biochem. J.* **2000**, *345*, 473 – 480.
- (33) Noah E. Robinson, Arthur B. Robinson. Molecular clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 944 – 949.
- (34) Arthur B. Robinson, James H. McKerrow, Paul Cary. Controlled deamidation of peptides and proteins: an experimental hazard and a possible biological timer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1970**, *66*, 753 – 757.
- (35) Kamlesh Patel, Ronald T. Borchardt. Chemical Pathways of Peptide Degradation. II. Kinetics of Deamidation of an Asparaginyl Residue in a Model Hexapeptide. *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 703-711.
- (36) Mark C. Manning, Kamlesh Patel, Ronald T. Borchardt, Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 903 – 918.
- (37) Steven Clarke, Robert C. Stephenson, Jonathan D. Lowenson. In *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation*; Tim J. Ahern, Mark C. Manning. Eds.; Plenum Press: New York, **1992**; p 1-29.
- (38) Glen Tesbima, William S. Hancock, Eleanor Canova-Davis. In *Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins*; Aswad, D. W., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, **1995**. p168-186.
- (39) Cecilla Oliyai, Ronald T. Borchardt. Chemical pathways of peptide degradation. VI. Effect of the primary sequence on the pathways of degradation of aspartyl residues in model hexapeptides. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 751-758.
- (40) Jennifer L. Radkiewicz, Hendrik Zipse, Steven Clarke, K. N. Houk. Neighboring side chain effects on asparaginyl and aspartyl degradation: an ab initio study of the relationship between peptide conformation and backbone NH acidity. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3499 – 3506.
- (41) Yoshiaki Nabuchi, Eri Fujiwara, Hitoshi Kuboniwa, Yoshinori Asoh, Hidetoshi Ushio. The stability and degradation pathway of recombinant human parathyroid hormone: deamidation of asparaginyl residue and peptide bond cleavage at aspartyl and asparaginyl residues. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1685-1690.

- (42) Hiroaki Okada, Toshiro Heya, Yasutaka Igari, Yasuaki Ogawa, Hajime Toguchi, Tsugio Shimamoto. One-month release injectable microspheres of leuprolide acetate inhibit steroidogenesis and genital organ growth in rats. *Int. J. Pharm.* **1989**, *54*, 231-239.
- (43) Leonard T. Nguyen, Johnny K. Chau, Nicole A. Perry, Leonie de Boer, Sebastian A. J. Zaat, Hans J. Vogel. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS One* **2010**, *5*, e12684.
- (44) Graham Scott, Irfan Ahmad, Katy Howard, David MacLean, Cristina Oliva, Steve Warrington, Darren Wilbraham, Paul Worthington. Double-blind, randomized, placebo-controlled study of safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of TAK-683, an investigational metastatin analogue in healthy men. *Br J Clin Pharmacol.* **2013**, *75*, 381-91.
- (45) Hajime Toguchi, Yasuaki Ogawa, Hiroaki Okada, Masaki Yamamoto. Once-a-month injectable microcapsules of leuprorelin acetate. *Yakugaku Zasshi* **1991**, *111*, 397-409.
- (46) Yutaka Kuroda, Atsushi Suenaga, Yuji Sato, Satoshi Kosuda, Makoto Taiji. All-atom molecular dynamics analysis of multi-peptide systems reproduces peptide solubility in line with experimental observations. *Sci Rep.* **2016**, *6*, 19479.
- (47) Peter Y. Chou, Gerald D. Fasman, Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* **1978**, *47*, 45-148.
- (48) Subrayashastry Aravinda, Narayanaswamy Shamala, Rai Rajkishore, Hosahudya N. Gopi, Padmanabhan Balaram. A crystalline beta-hairpin peptide nucleated by a type I' Aib-D-Ala beta-turn: evidence for cross-strand aromatic interactions. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2002** *41*, 3863-3865.
- (49) T. J. Abbruscato, S. A. Williams, A. Misicka, A. W. Lipkowski, V. J. Hrubby, T. P. Davis. Blood-to-central nervous system entry, and stability of biphalin, a unique double-enkephalin analog, and its halogenated derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *276*, 1049-1057.
- (50) C.L. Gentry, R.D. Egleton, T. Gillespie, T.J. Abbruscato, H.B. Bechowski, V.J. Hrubby. The effect of halogenation on blood-brain barrier permeability of a novel peptide drug. *Peptides* **1999**, *20*, 1229-1238.
- (51) Steven J. Weber, Thomas J. Abbruscato, E. A. Brownson, Andrzej W. Lipkowski, Robin Polt, Aleksandra Misicka, Ronald C. Haaseth, Hubert Bartosz, Victor J. Hrubby, Thomas P. Davis. Assessment of an *in vitro* blood-brain barrier model using several [Met⁵]enkephalin opioid analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *266*, 1649-1655.
- (52) Steven J. Weber, Diana L. Greene, Shubh D. Sharma, Henry I. Yamamura, Thomas H. Kramer, Thomas F. Burks, Victor J. Hrubby, Louis B. Hersh, Thomas P. Davis. Distribution, and analgesia of [³H][D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin, and two halogenated analogs after intravenous administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *259*, 1109-1117.
- (53) Hong-Mei Liu, Xue-Feng Liu, Jin-Long Yao, Chang-Lin Wang, Ye Yu, Rui WangLiu,

- Utilization of combined chemical modifications to enhance the blood–brain barrier permeability and pharmacological activity of endomorphin-1. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319*, 308-316.
- (54) Shun-Cheng Li, Natalie K. Goto, Karen A. Williams, Charles M. Deber. Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**, *93*, 6676-6681.
- (55) Danlel L. Minor Jr, Peter S. Kim. Measurement of the beta-sheet-forming propensities of amino acids. *Nature*, **1994**, *367*, 660-663.
- (56) David B. MacLean, Hisanori Matsui, Ajit Suri, Rachel Neuwirth, Marc Colombel. Sustained exposure to the investigational Kisspeptin analog, TAK-448, down-regulates testosterone into the castration range in healthy males and in patients with prostate cancer: results from two phase 1 studies. *J Clin Endocrinol Metab.* **2014**, *99*, E1445–E1453.
- (57) J.W.A. Findlay, W.C. Smith, J.W. Lee, G.D. Nordblom, I. Das, B.S. DeSilva, M.N. Khan, R.R. Bowsher. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *21*, 1249–1273.
- (58) John. W. A. Findlay, Ira. Das. Some validation considerations for immunoassay, *J. Clin. Ligand Assay* **1997**, *20*, 49–55.
- (59) John. D. Gilbert. The use of methods based on LC–MS/MS for establishing the specificity of radioimmunoassay by cross-validation, *J. Clin. Ligand Assay*, **1997**, *20*, 23–31.
- (60) Peter K. Working. Potential effects of antibody induction by protein drugs. *In Pharmaceutical Biotechnology. Vol. 1. Protein Pharmacokinetics and Metabolism*, Bobbe. L. Ferraiolo, Marjorie. A. Mohler, C. A. Gloff. Eds., *New York: Plenum Press*, **1992**, 73-92.
- (61) Iwao Yamazaki, Hiroaki Okada, A Radioimmunoassay for a Highly Active Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue and Relation between the Serum Level of the Analogue and that of Gonadotropin. *Endocrinol. Japon.*, **1980**, *27*, 593-605.
- (62) T. Mazzei, E. Mini, M. Eandi, E. F. Reali, L. Fioretto, R. Bartoletti, M. Rizzo, G. Calabro, P. Periti. Pharmacokinetics, Endocrine and antitumour effects of leuprolide depot (TAP-144-SR) in advanced prostatic cancer: a dose–response evaluation. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1989**, *15*, 373–387.
- (63) Hiroaki Okada, Yayoi Inoue, Yasuaki Ogawa, Hajime Toguchi. Suppression of serum testosterone levels in rats after repeated administration of depot formulations of leuprorelin acetate and goserelin acetate, *Jpn. Pharmacol. Ther.* **1992**, *20*, 39–45.
- (64) Krys J. Miller,¹ Ronald R. Bowsher, Abbie Celniker, Jacqueline Gibbons, Shalini Gupta, Jean W. Lee, Steve J. Swanson, Wendell C. Smith, Russell S. Weiner. Workshop on bioanalytical methods validation for macromolecules: summary report. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1373–1383.
- (65) United States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research,

- Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Available at <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>, May 2001.
- (66) Binodh DeSilva, Wendell Smith, Russell Weiner, Marian Kelley, JoMarie Smolec, Ben Lee, Masood Khan, Richard Tacey, Howard Hill, Abbie Celniker. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1885–1900.
- (67) C. Péqueux, J.-C. Hendrick, M.-T. Hagelstein, V. Geenen, J.-J. Legros. Novel plasma extraction procedure and development of a specific enzyme- immunoassay of oxytocin. *Scnd J Clin Lab Invest.* **2001**, *61*, 407-415.
- (68) Herve'Volland, Philippe Pradelles, Pierre Ronco, Michel Azizi, Dominique Simon, Christophe Cre ´ minon, Jacques Grassi. A solid-phase immobilized epitope immunoassay (SPIE-IA) permitting very sensitive and specific measurment of angiotensine II in plasma. *J Immuno Methods* **1999**, *228*, 37-47.
- (69) Jacques Grassi, Philippe Pradelles. Compounds labelled by the acetylcholonesterase of *Electrophorus Electricus*. Its preparation process and its use as a tracer or marquer in enzy-mo-immunological determinations. *United states patent, N° 1,047,330. September 10; 1991*
- (70) Thermo Scientific Pierce Antibody Production and Purification Technical Handbook Version. 2 Available at <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1601975-Antibody-Production-Purification-Guide.pdf>
- (71) Nobuhiro Suzuki, Hirokazu Matsumoto, Chieko Kitada, Tomoh Masaki, Masahiko Fujino. A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J Immunol Methods* **1989**, *118*, 245-250.

本論文に関わる研究業績

- 1) Physicochemically and pharmacokinetically stable nonapeptide KISS1 receptor agonists with highly potent testosterone-suppressive activity.
Taiji Asami, Naoki Nishizawa, Hisanori Matsui, Yoshihiro Takatsu, Atsuko Suzuki, Atsushi Kiba, Michiko Terada, Kimiko Nishibori, Masaharu Nakayama, Junko Ban, Shin-ichi Matsumoto, Naoki Tarui, Yukihiro Ikeda, Masashi Yamaguchi, Masami Kusaka, Tetsuya Ohtaki, Chieko Kitada.
J. Med. Chem., **2014**, *57*, 6105-6115.

- 2) Design and synthesis of an Investigational nonapeptide KISS1 receptor (KISS1R) agonist, Ac-D-Tyr-Hydroxyproline(Hyp)-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ (TAK-448), with highly potent testosterone-suppressive activity and excellent water solubility.
Naoki Nishizawa, Yoshihiro Takatsu, Satoshi Kumano, Atsushi Kiba, Junko Ban, Shunichirou Tsutsumi, Hisanori Matsui, Shin-ichi Matsumoto, Masashi Yamaguchi, Yukihiro Ikeda, Masami Kusaka, Tetsuya Ohtaki, Fumio Itoh, Taiji Asami.
J. Med. Chem., **2016**, *59*, 8804-8811.

- 3) Development and validation of sensitive sandwich ELISAs for two investigational nonapeptide metastin receptor agonists, TAK-448 and TAK-683.
Nobuyo Yoshida, Naoki Nishizawa, Hisanori Matsui, Yuu Moriya, Chieko Kitada, Taiji Asami, Hirokazu Matsumoto.
J. Pharm. Biomed. Anal., **2012**, *70*, 369-377.

謝辞

本論文を作成するにあたり、またこの度の学位取得にあたり、京都薬科大学創薬科学系薬品化学分野 赤路 健一教授に懇切なご指導、ご高配を賜りました。深く感謝いたします。

本論文の審査をして頂き、有益なるご助言、ご指導を頂きました京都薬科大学創薬科学系 製造学分野 山下 正行教授、医療薬学科系薬物動態学分野 栄田 敏之教授に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者で、研究遂行および論文発表に際して、多大な協力とご指導を頂きました元化学研究所 主席研究員 浅見泰司 博士、元開拓研究所リサーチマネージャー 北田千恵子 博士、元化学研究所リサーチマネージャー 伊藤 文雄 博士、プロジェクトリーダーとして、研究を先導された大瀧徹也 博士、日下雅美 博士、松井久典 博士に深く感謝いたします。

本論文の基礎となる論文の共著者であり、生物試験を担当して頂きました高津吉広氏、鈴木敦子氏、木場篤氏、寺田理子氏、西堀貴美子氏、熊野聡氏、中山政治氏、樽井直樹氏、動態試験を担当して頂きました松本真一氏、守屋優氏、山口昌史氏、物理化学試験を担当していただきました伴淳子氏、堤俊一郎氏、池田幸弘氏、免疫研究を実施頂きました吉田信代氏、松本寛和氏、ならびにメタスチン研究に関わった全ての共同研究者の方々に深くお礼を申し上げます。

私にペプチド創薬の機会を与えて下さいました元武田薬品工業株式会社社長 故 藤野 政彦 博士、ペプチド研究、創薬研究について指導して下さった京都薬科大学薬品化学教室、武田薬品工業株式会社の先生、先輩方、同僚の方々に厚くお礼申し上げます。

末筆ではありますが、本論文の作成は家族の支援と理解なくしては成しえなかったものです。本論文中の多くの化合物合成に力を貸していただき、現在は家庭を支えてくれている妻、研究者としての道を支援して下さった両親に心から感謝いたします。

- Chapter 1 is adapted with permission from *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 6105-6115. Copyright 2014 American Chemical Society.
- Chapter 2 is adapted with permission from *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 8804-8811. Copyright 2016 American Chemical Society.
- Chapter 3 is adapted with permission from *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *70*, 369-377. Copyright 2012 Elsevier B.V. .