

氏名(生年月日) <sup>にし</sup> <sup>ざわ</sup> <sup>なお</sup> <sup>き</sup>  
西 澤 直 城 (1973年3月30日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第210号

学位授与の日付 2017年9月29日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 (主査) 教授 赤路 健一

(副査) 教授 栄田 敏之

(副査) 教授 山下 正行

## 論文内容の要旨

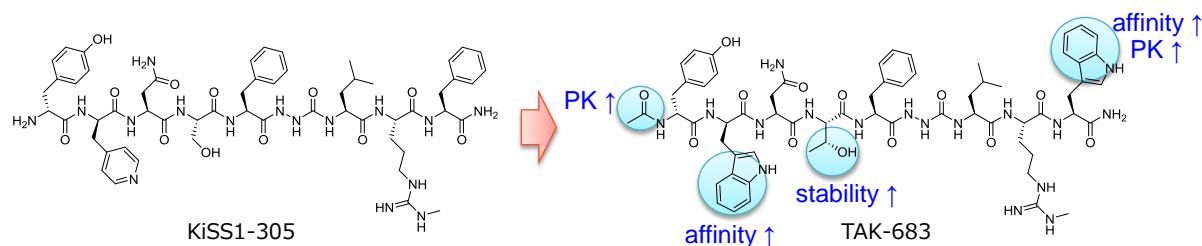
### 序論

メタスチン/キस्पеп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。近年、メタスチンが視床下部のGnRHニューロンからのGnRH放出を促すことが報告され、メタスチン/ KISS1Rシステムが視床下部-下垂体-性腺軸(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明らかとなった。メタスチンは中枢および末梢への急性投与によってHPG軸を活性化し、生殖系を活性化する。対照的にメタスチンの慢性投与はKISS1Rの反応性を低下させ、HPG軸を抑制し、血中性ホルモン濃度の低下をもたらす。これらの知見から著者はメタスチン/ KISS1R系を性ホルモン依存性疾患の合理的な治療標的と考え、合成研究を実施し、ノナペプチドメタスチン誘導体KiSS1-305を取得した。KiSS1-305はラット持続投与試験で血中テストステロン濃度を化学的去勢状態に低下させ、性ホルモン依存的に増殖する前立腺がん治療薬として有望と思われた。しかしながら、臨床開発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おり、薬理活性も十分ではないことが明らかとなった。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 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

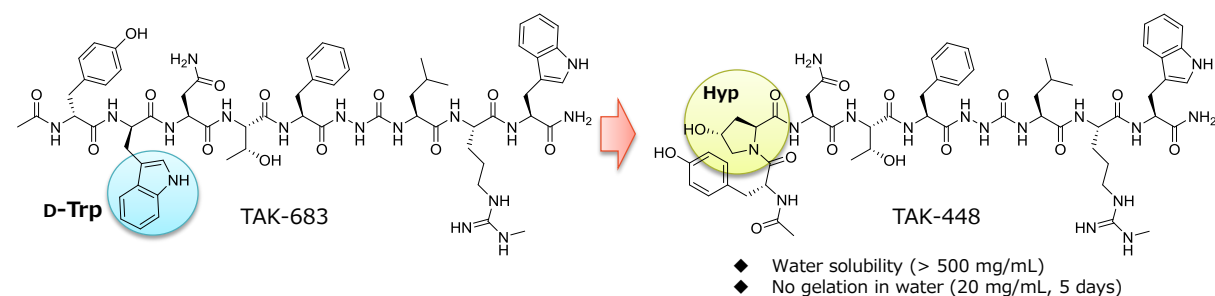
KiSS1-305の化学的安定性の不足が48位Asn側鎖のデアミノ化によるものであることを、分解物の構造解析により特定した。著者は分解の機構が48-49位Asn-Serのスクシンイミド化に起因すると考察し、Serを立体障害が大きいアミノ酸に置換することで分解速度を低下しようと仮説を立てた。仮説に基づき、種々のアミノ酸置換検討を実施した結果、Thrへの置換が薬理活性を損なうことなく分解速度を低下させることを見出した。次に薬理活性向上を目的とした検討に取り組んだ。まず、KiSS1-305の薬物動態パラメーター解析を行い、分布容積が大きいために全身クリアランス値が高値となり、血中濃度が不足したと推定した。ペプチドの親水性は低分子薬剤と比較して高いことが高分布の原因であると考察し、ペプチドの親水性を下げることで分布容積を低下しようと仮説を立てた。仮説をもとにN末端アミ

ノ基のデアミノ体、アシル修飾体合成に取り組んだ結果、分布容積、全身クリアランスが低下し、薬理活性が大幅に向上した。結果として、化学的安定性が向上し、かつ薬理活性がKiSS1-305と比較して30倍程度向上した臨床開発化合物TAK-683の取得に至った。



## 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

TAK-683の注射剤処方検討において、20 mg/mLの水溶液が経時的にゲル化することが明らかとなった。製造、製剤化工程でこの性質が問題となることを懸念し、TAK-683と同程度の薬理活性を保持し、ゲル化が回避された誘導体の取得を目的とした合成検討に着手した。アミノ酸配列の一部に親水性アミノ酸を導入する、もしくはペプチド鎖の立体構造に影響を与えるアミノ酸を導入することでペプチドの溶解性を改善しようと仮説を立て、まず置換可能部位特定のための検討を実施した。その結果、47位での置換検討が最も効果的と判断し、同部位において仮説に基づいた種々のアミノ酸による置換検討を実施した。結果として、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した。特に臨床開発化合物として選択した47位Hyp置換体TAK-448はゲル化回避に加え、500 mg/mL水溶液を作成可能、かつ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す、優れたプロファイルを有していた。立体構造に影響を与える置換が、わずか1残基の置換でありながら、大きく物性を変化し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。



## 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

第一章、第二章で取得したTAK-683およびTAK-448は非常に強力な薬理作用を有しており、ラット持続投与試験では50 nmol/kg/week以下の低用量で薬効を示した。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、検出系構築検討を開始した。通常法では全長ペプチドをキャリアタンパク(KLH)上に結合した免疫原を用いて、抗体を取得するが、同法により得られた2種の抗体によるサンドイッチELISA法では9残基ペ

プチドであるTAK-683およびTAK-448の検出において、抗体同士の干渉による感度低下が認められた。ペプチド末端を精度よく認識する抗体の取得が必要と考え、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を考案し、検討を進めた。その結果、抗体同士が干渉することなくノナペプチドの両末端を認識する、高精度かつ高感度（検出感度1 fmol/mL以下）の検出系構築に成功した。これらの検出系は血漿中の化合物濃度測定において、高い特異性でTAK-683、TAK-448それぞれを検出することが可能であり、薬理試験、動態試験、毒性試験の信頼性を高めるものである。また、本章に記載した手法は様々な短鎖ペプチドの検出に適用可能であり、他のペプチド性医薬品の前臨床、臨床試験の進展に貢献するものと期待される。

## 総括

本論文に記載した手法はペプチド創薬における、薬理活性の改善、化学的安定性、溶解性などの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り、ペプチド創薬全般の発展に大きく貢献するものである。

## 論文審査の結果の要旨

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。メタスチン/ KISS1R システムは視床下部-下垂体-性腺軸(HPG 軸)の調節に関与し、生殖において主要な役割を担っている。メタスチンの中枢および末梢への急性投与は、HPG 軸を活性化し生殖系を活性化する。対照的にメタスチンの慢性投与は、KISS1R の反応性を低下させ HPG 軸を抑制する。これらの知見から申請者はメタスチン/ KISS1R 系を性ホルモン依存性疾患の治療標的と考え、短鎖型メタスチン誘導体 KiSS1-305 を創出した。本研究では、医薬品として開発可能なプロフィールを有するメタスチン誘導体創製を目指し、KiSS1-305 の構造最適化を行った。

### 1. KiSS1-305 の化学的安定性および薬理活性の向上: TAK-683 の創製

申請者はまず、KiSS1-305 が 48 位 Asn 側鎖のデアミノ化による開裂反応を起こし化学的に不安定であることを特定した。この分解反応を抑制するため Ser を立体障害の大きな Thr に置換し、薬理活性を損なうことなく分解速度を低下させることに成功した。ついで、KiSS1-305 の薬物動態パラメーター解析から、分布容積が大きいために全身クリアランス値が高値となり血中濃度が不足することで薬理活性が低下したと推定した。そこで、ペプチドの親水性を下げることで排泄速度を低下しうるとの仮説に基づき、N 末端アミノ基のデアミノ体、アシル修飾体について薬理活性を評価した。その結果、化学的に安定で KiSS1-305 の約 30 倍の薬理活性を示す臨床開発化合物 TAK-683 を取得した。

### 2. TAK-683 の溶解性改善およびゲル化回避: TAK-448 の創製

TAK-683 の 20 mg/mL 水溶液が経時的にゲル化することが明らかとなった。このような溶解特性は製造・製剤化工程で問題となるため、申請者は薬理活性を保持しつつゲル化を回避できる誘導体を開発した。アミノ酸配列の一部に親水性、極性アミノ酸を導入する、もしくはペプチド鎖の立体構造に影響を与えるアミノ酸を導入することでペプチドの溶解性を改善しうるとの仮説を立て、まず置換可能部位の特定を行い、47 位での置換導入が最も効果的であることを見出した。ついで、同部位でのア

ミノ酸置換により、47位をヒドロキシプロリン Hyp に置換した TAK-448 がゲル化を起こすことなく 500 mg/mL 水溶液に調製できることを見出した。さらに、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すことを明らかにした。

### 3. 新規サンドイッチ ELISA 系による TAK-683/TAK-448 の高感度検出系構築

前章で取得した TAK-683/TAK-448 は非常に強力な薬理作用を有しており、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。このため、超高感度検出が可能なサンドイッチ ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)系の構築を目指し、抗体同士の干渉による感度低下を起こすことなく 9 残基からなるペプチド誘導体の両末端部を精度よく認識できる抗体の取得を行った。その結果、末端 3 残基のみのペプチドを KLH 上に担持することで、1 fmol/mL 以下の検出感度でノナペプチドの両末端を認識できるサンドイッチ ELISA 系構築に成功した。

以上申請者は本研究において、ペプチド創薬における薬理活性改善ならびに化学的安定性・溶解性などの物性改善、高感度検出系作成などに伴う様々な問題を論理的に解決できる方法を明らかにした。これらの成果はペプチド創薬全般の発展にも大きく貢献する貴重な成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値を有するものと判断する。