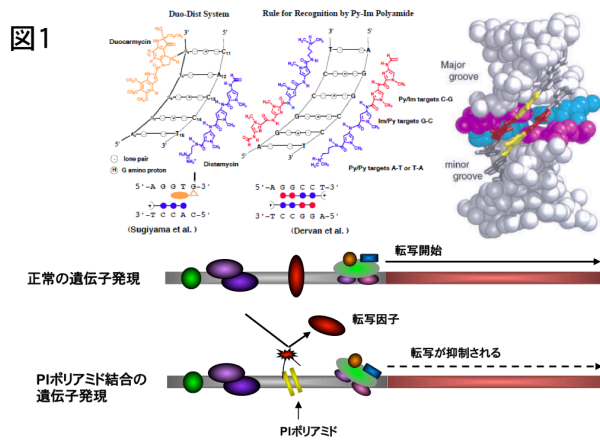


新規バイオ医薬ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの創薬開発

1. 技術シーズの内容・特徴

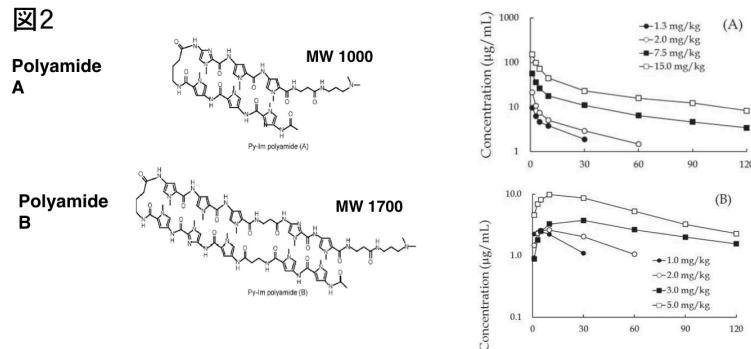
1) これまでに得られている研究成果

PI ポリアミドは、DNA 配列特異的に結合する低分子有機化合物で、プロモーターで転写因子の結合を阻害し遺伝子発現を抑制する（図 1）。



PI ポリアミドは、有機化合物であり生体内で安定で、DDS を必要とせず全ての細胞の核に取り込まれ、いかなる遺伝子にも自由に分子設計できる新規な薬剤である。これまでの日本大学での開発成果として①PI ポリアミドはターゲット dsDNA へは特異的に結合し、転写因子の結合より強力であった。②薬物動態：静脈内投与でPI ポリアミドは長期の核への結合（腎尿管で1週間）が認められ、殆どが尿排泄であった（図 2）。

図 2



③PI ポリアミドの急速静脈内投与で、安全域は 20 mg/kg 以下で、全身投与では 1 mg/kg 以下で効果ある（図 3）。

図3 マウス投与実験(1週間馴化) 溶媒は精製水

| 分類 | 体重(g) | 濃度(mg/mL) | 投与量(mg/kg) | 生死 |
|-----|-------|-----------|------------|----|
| 高用量 | 32.15 | 14.26 | 79.84 | 死亡 |
| 高用量 | 30.88 | 14.26 | 92.36 | 死亡 |
| 低用量 | 32.92 | 7.13 | 43.32 | 死亡 |
| 低用量 | 32.21 | 7.13 | 22.14 | 生存 |

| 体重(g)の変化 | 投与日 | 2日目 | 3日目 | 4日目 | 5日目 |
|----------|------|------|------|------|------|
| | 32.2 | 31.7 | 31.5 | 32.3 | 32.5 |

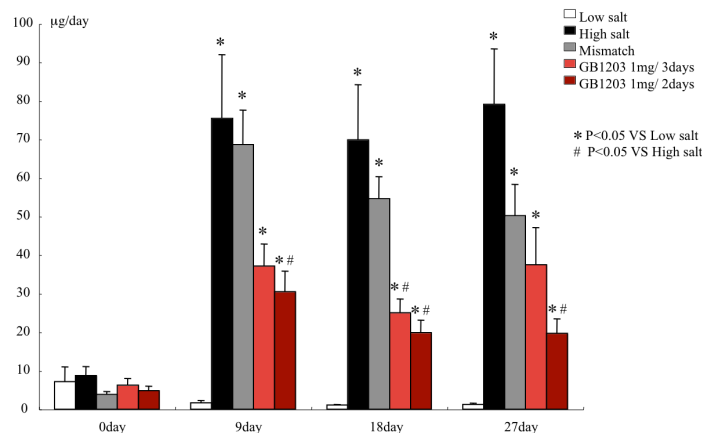
5日後血清データ

総蛋白、A/G比、総コレステロール、尿素窒素は全て正常

AST:コントロールより少し高い、ALT:正常、ALP:コントロールと同じ

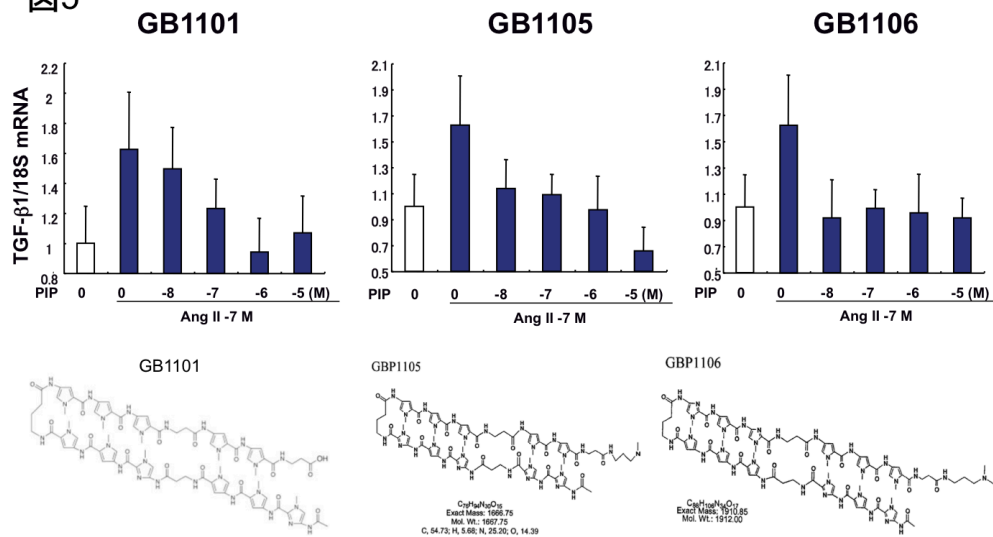
④TGF-β 1PI ポリアミドの4週間の長期投与で副作用を認めなかった。腎機能を有意に改善し、尿中 TGF-β 1 発現を投与量依存性に抑制した (図 4)。

図4



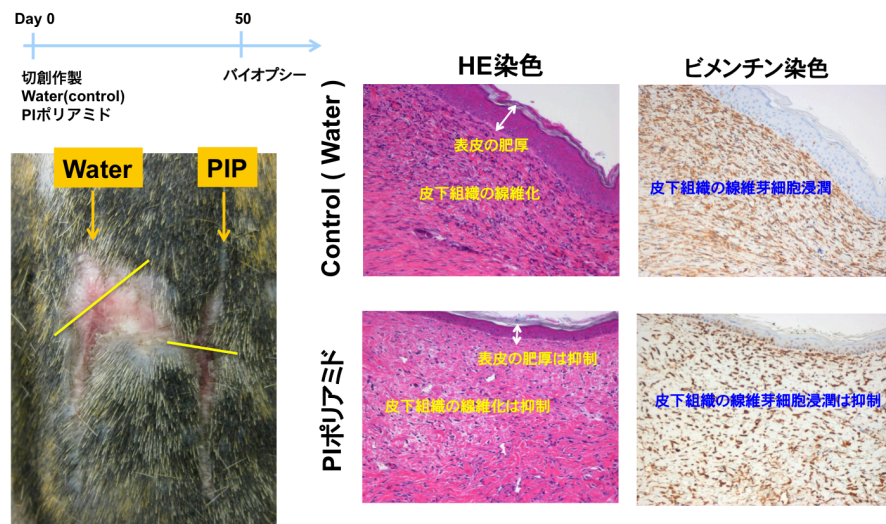
⑤TGF-β 1 の PI ポリアミドのその他の薬剤効果:TGF-β 1PI ポリアミドは傷害後動脈狭窄、炎症性角膜傷害、皮膚肥厚性癬痕に対し強力な抑制効果を示した。⑥特異性:腎皮質の DNA アレイで TGF-β 1PI ポリアミドのターゲット分子への特異性が検証された。⑦ヒト TGF-β 1 の PI ポリアミドの絞り込み:TGF-β 1 の転写調節領域に対し7つの PI ポリアミドを設計し、TGF-β 1 プロモーター活性、mRNA 発現の抑制から、リード化合物を絞り込んだ (図 5)。

図5



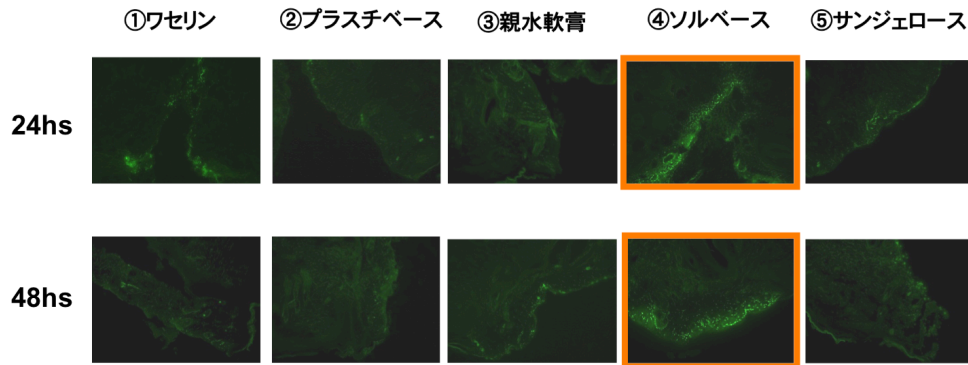
⑧前臨床試験として霊長類マーモセットの切創で、GB1101 は皮膚瘢痕をほぼ完全に抑制した (図6)。

図6



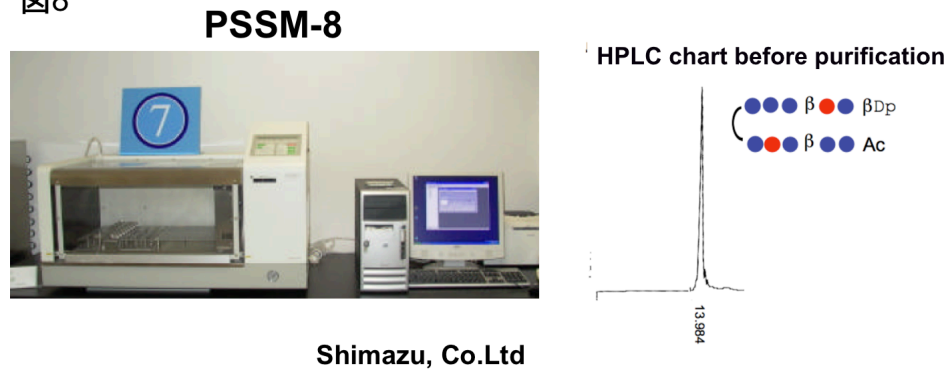
現在ソルベースで軟膏化し、その効果を検討している (図7)。

図7



⑨PI ポリアミド合成法：島津製ペプチド合成機 PSSM-8 にて Fmoc 法固相自動合成を検討し、縮合剤 HCTU を用い、純度 98%以上の最適な合成条件を決定した（図 8）。

図8



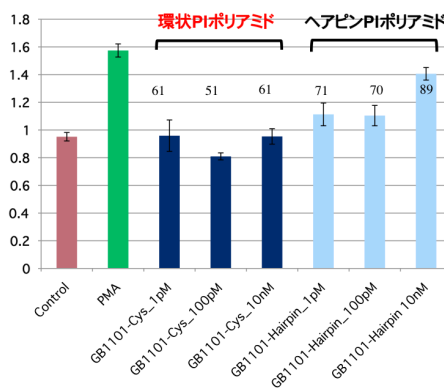
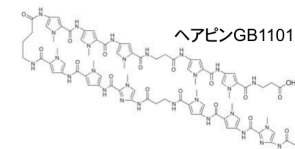
合成機の比較

| | DMF(mL/coupling) | ピペリジン(mL/coupling) | ランニングコスト | 合成量(mmol) |
|---------|------------------|--------------------|----------|-----------|
| PSSM-8 | 13 | 2 | 無 | 0.1×8 |
| 433A | 40 | 2 | > ¥2000 | 0.1~1.0 |
| pioneer | 120 | 30 | 無 | 0.1 |

⑩ 環状 GB1101 はより低濃度で、TGF- β 1 mRNA 発現を抑制した（図 9）。今後、環状 PI ポリアミドの大量合成、創薬開発も合わせて行う。

図9

ヒトTGF- β 1プロモーターでのGB1101結合領域



2) 本技術シーズの背景や動向、現状の問題点や特徴（独創性、新規性）

- ① PI ポリアミドを用いた創薬開発は世界的にはその合成の困難さから殆ど行われず、Dervan らが研究レベルで創薬しているが、実用化研究は行われていない。現在、日本大学、京都大学、ジェンティア社で自動合成を開発、日本大学では TGF- β 1、CTGF、LOX-1 に対する PI ポリアミドを開発している。京都大学の杉山らは PI ポリアミドにアルキル化を持たせ、抗癌剤として開発している。
- ② 遺伝子抑制薬として核酸医薬は核酸分解酵素により分解され易く DDS を必要とし、siRNA は遺伝子発現をノックダウンするために副作用が強いが、PI ポリアミドは疾病で上昇した遺伝子転写のみを抑制するために副作用が少ない。

2. シーズ

- 1) 発明の名称：「TGF- β 遺伝子発現抑制剤」特許 (JP) : 第 4682312 号, (US) : 7, 807, 844, 特許権者：日本大学, ジェンティア・バイオシステムズ(株)
- 2) 発明の名称：「TGF- β 遺伝子発現抑制剤」特許 (US) : 7, 888, 516、JP : 審査請求中, 国際出願番号：PCT/JP2005/014079 (2005. 8. 2 出願), 特許権者 (出願人)：日本大学, ジェンティア・バイオシステムズ(株)
- 3) 発明の名称：「DNA 配列特異的結合化合物を含む局所用眼科疾患治療薬」, 国際出願番号：PCT/JP2009/066108 (2009. 9. 15 出願), US, JP : 審査請求中, 出願人：日本大学

3. 技術シーズの革新性・優位性

1) 技術の革新性

PI ポリアミドは遺伝子転写抑制を抑制する低分子有機化合物で、低分子化合物、抗体薬、分子標的薬とは全く作用機序が異なり、独自性が高い。核酸医薬と異なり、PI ポリアミドは DDS なしで単体で高効率に組織に移行し、核に結合する。すでに責任因子が分かっているが、未だ抑制薬のない疾患に自由に設計し、創薬が可能である。TGF- β 1 の PI ポリアミドの効果は絶大で、皮膚肥厚性瘢痕を完全に抑制する事ができる。持続性が長いため慢性期の線維性疾患にも適応が可能と考えられる。

2) 技術の優位性

PI ポリアミドの合成は高効率な自動合成を確立し、1 回に 1g のポリアミドの合成が可能、Fmoc ブロックの大量入手により安価に合成できる。分子設計でのβリンカー挿入構造により、いかなる塩基配列に対しても設計が可能。PI ポリアミドは疾病で転写活性が上昇した遺伝子のみを抑制するため、オフターゲット効果は無く、特異性が高いことが確認されている。PI ポリアミドは経口投与可能な遺伝子治療薬としての可能性を持つ。現在の PI ポリアミドはヘアピン型であるが、京都大学との共同で環状型ポリアミドは 100 分の 1 の低濃度で遺伝子発現を抑制する。

競合する類似研究・先行技術として Dervan らは、合成の問題を解決するため自動合成機を導入し、t-Boc-、Fmoc-ストラテジーによる PI ポリアミドの固相合成法で低純度の粗生成物による必要な精製の手作業が臨床応用への実用化を阻んでいる。また、需要が少ない試薬の価格は極めて高く、原料価格も合成研究の道を阻んでいる。核酸医薬であるアンチセンス DNA、siRNA は組織への移行が困難で、核酸分解酵素により分解されるため未だ実用化されていない。siRNA は遺伝子発現をノックダウンするため、副作用が懸念され、アンチセンス PNA はペプチド核酸構造にて PI ポリアミドに類似するが、細胞膜透過性が悪く、薬剤としての可能性が低い。

3) 研究開発の優位性

PI ポリアミドは薬として高い疎水性を持ち吸収分布が良く、極めて有望である。未だに特異的な TGF-β1 抑制薬はない。現在、TGF-β1 受容体拮抗薬、抗体薬が開発されているが、PI ポリアミドは疾病時に作用し、作用機序が異なる薬剤であるため、使用目的の棲み分けが出来る。ヒト TGF-β1 に対する PI ポリアミドは、前臨床として霊長類マーモセットでの皮膚癒痕形成を完全に抑制し、その有用性が確認出来ている。

TGF-β1 抑制剤として現在トランラストが市販されているが、TGF-β への特異性は低い。Dervan の先行技術の合成法も創薬目的であり、我々と国際コンソーシアムを組んで問題解決を図っている。Dervan の特許は 5 年後にはその有効性が消滅するため我々の知財権利が残り、更に創薬開発、実用化する時点では Dervan およびカルフォルニア工科大学の特許の権利の影響はない。低分子の TGF-β1 受容体拮抗薬も今のところは研究試薬である。

4. 社会的背景での技術の有用性・可能性

現在の創薬開発はケミカルライブラリーからの創薬の可能性は 32,500 分の 1 の確率であり、今後大手製薬会社でもブロックバスターが望めず、大学や研究機関でのバイオ医薬品に注目が集まっている。PI ポリアミドは低分子有機化合物で、転写抑制薬として、

これまでの薬剤と全く異なり、独創性が高いバイオ医薬である。TGF- β 1 に対する PI ポリアミドは全身疾患として腎不全、肝硬変、局所疾患として血管狭窄、角膜損傷、皮膚肥厚の治療薬となりうる。現在の医療において進行性腎障害に対する有効な治療薬はなく、全国の透析患者は 28 万人を数え、日本の総医療費 30 兆円のうち 1 兆円が透析に費やされている。保健医療上重要疾患である進行性腎障害に TGF- β 1 が責任因子として関わっており、TGF- β 1 遺伝子を特異的に抑制する PI ポリアミドが有効であれば、莫大な医療費の削減が出来、その貢献は大きい。更に遺伝子転写活性抑制と言う全く新しい PI ポリアミドは、いかなる分子にも設計、合成できその市場性は大きく、保健医療への貢献は計り知れない。

5. 技術シーズからの製品・サービスの市場規模

TGF- β 1 に対する PI ポリアミドはまず安全性のハードルの低さと薬剤としての承認の早さから、皮膚肥厚性瘢痕治療薬として医療現場では甲状腺摘出術創、帝王切開部、開胸術部に塗布し瘢痕、熱傷の皮膚瘢痕形成に臨床応用する。また TGF- β 1 が関与する皮膚疾患として皮膚筋炎、強皮症の進展を抑制出来る。このような皮膚疾患の患者数は 1 万人程度と予想されるが、皮膚疾患への適応では PI ポリアミドの薬価が抑えられるので、同時に腎症へは投与方法を変えて糖尿病性腎症、急性腎炎、急速進行性腎症に対し TGF- β 1 に対する PI ポリアミドを週 1 回の筋肉内注射で投与する。腎不全への市場は、新規透析導入患者数 10,000 人、透析患者数 250,000 人であり、毎年 35,000 人が新規透析導入であり、その 30%に TGF- β 1 に対する PI ポリアミドの治療が行われると予想される。その他肺線維症患者数 3,600~6,000 人程度で、アルコール性肝線維症等肝硬変患者数 20 万人で、これらも週 1 回投与で 10 年以上の投与となる。

6. 参考文献

1. Lai Y-M, Fukuda N, et al. Synthetic pyrrole-imidazole polyamide inhibits human transforming growth factor- β 1 gene expression. *J Pharmacol Exp Ther* 315:571-575, 2005.
2. Matsuda H, Fukuda N, et al. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF- β 1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 17:422-432, 2006.
3. Matsuda H, Fukuda N, et al. Transcriptional regulation of progressive renal disease by the gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF- β 1 promoter. *Kidney Int* 79: 46-56, 2011

4. Fukasawa A, Nagashima T, Aoyama T, Fukuda N, et al. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of pyrrole-imidazole polyamides in rat plasma. *J Chromatograph B* 859: 272–275, 2007.
5. Fukusawa A, Aoyama T, Nagashima T, Fukuda N, et al. Pharmacokinetics of pyrrole-imidazole polyamides after intravenous administration in rat. *Biopharm Drug Disp* 30(2):81-89, 2009.
6. Nagashima T, Aoyama T, Fukasawa A, Watabe S, Fukuda N, et al. Determination of pyrrole-imidazole polyamide in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatograph B* 877: 1070-1076, 2009.
7. Nagashima T, Aoyama T, Yokoe T, Fukasawa A, Fukuda N, et al. Pharmacokinetic modeling and prediction of plasma pyrrole-imidazole polyamide concentration in rats using simultaneous urinary and biliary excretion data. *Biol Pharm Bull* 32:921-927, 2009.
8. Yao E-H, Fukuda N, et al. A novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting TGF- β 1 inhibited restenosis and preserved endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc Res* 81:797-804, 2009.
9. Chen M, Matsuda H, Wang L, Watanabe T, Kimura T M, Igarashi J, Wang X, Sakimoto T, Fukuda N, Sawa M, Nagase H. Pre-transcriptional regulation of TGF- β 1 by PI polyamide prevents scarring and accelerates wound healing of the cornea after exposure to alkali. *Mol Ther* 18: 519-527, 2010.
10. Washio H, Fukuda N, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer. *J Invest Dermatol* 31:1987-1995, 2011.
11. Kamei T, Aoyama T, Ueno T, Fukuda N, Nagase H, Matsumoto Y. Pyrrole-imidazole polyamides for gene therapy: Bioanalytical methods and pharmacokinetics. Non-Viral Gene Therapy. Pp 679-696. InTec 2011.