

低酸素に対する体の抵抗力を 選択的に上昇させる薬PyrzA

佐賀大学

大学院先進健康科学研究科

健康機能分子科学コース

准教授 川口 真一

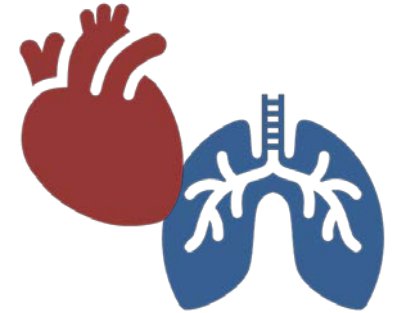
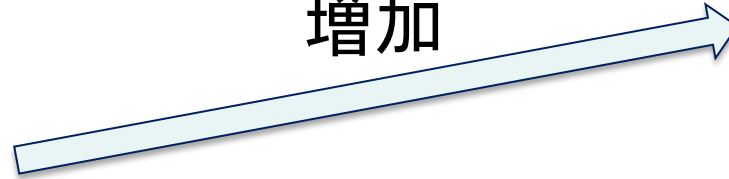
2021年9月28日

低酸素適応の例 — 高地トレーニング—

低酸素
適応

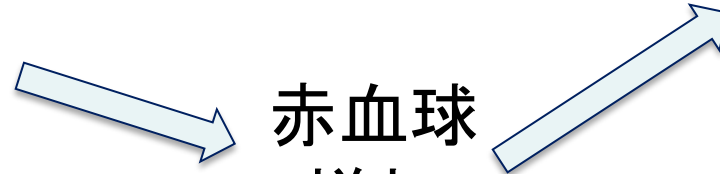


最大酸素摂取量
増加

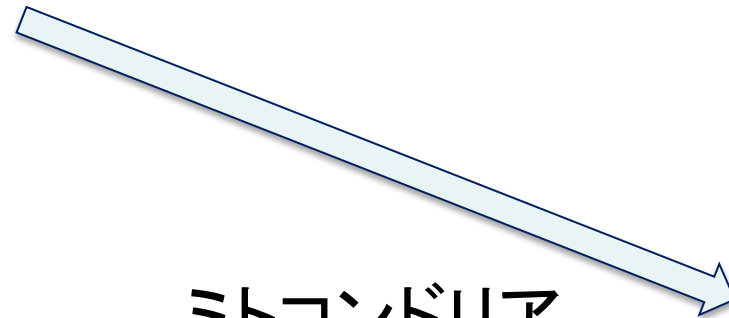


心肺機能増強
持久力向上

赤血球
増加



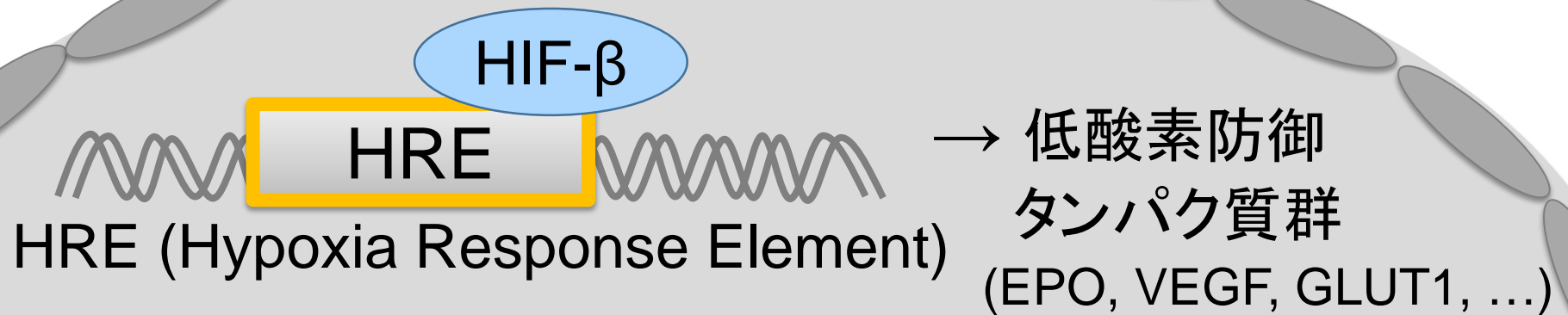
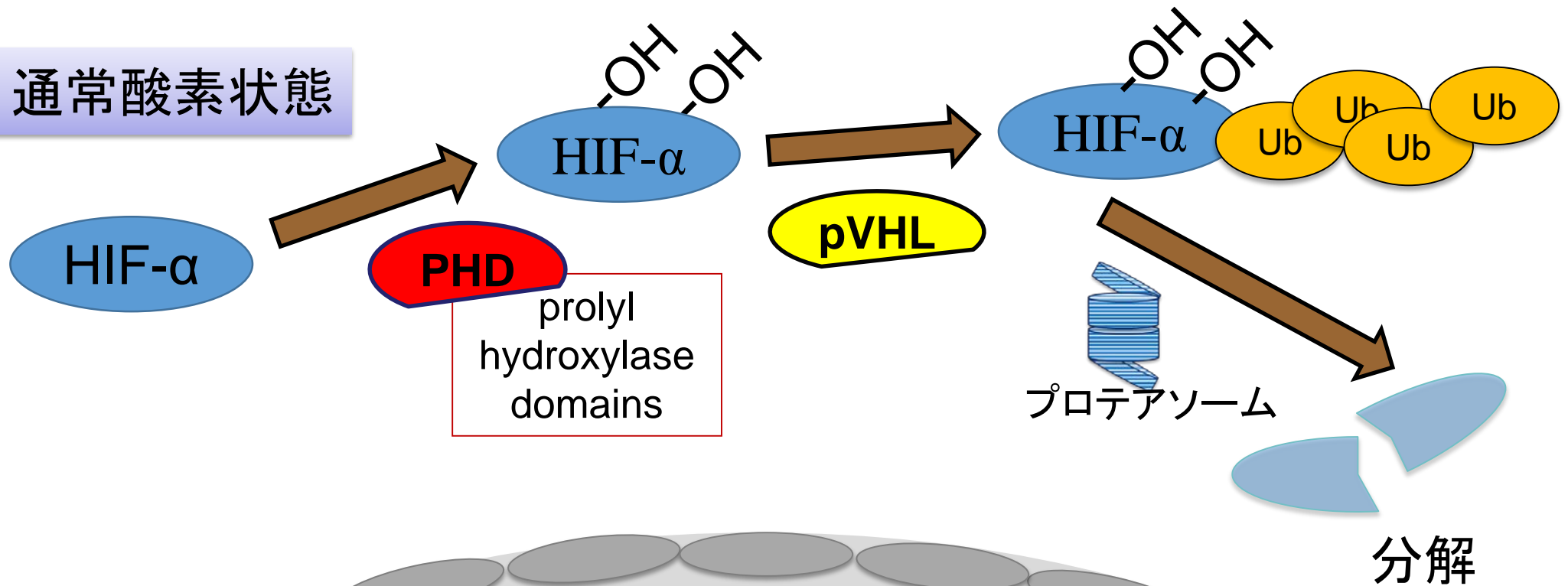
ミトコンドリア
機能強化



代謝向上

HIFの制御メカニズム

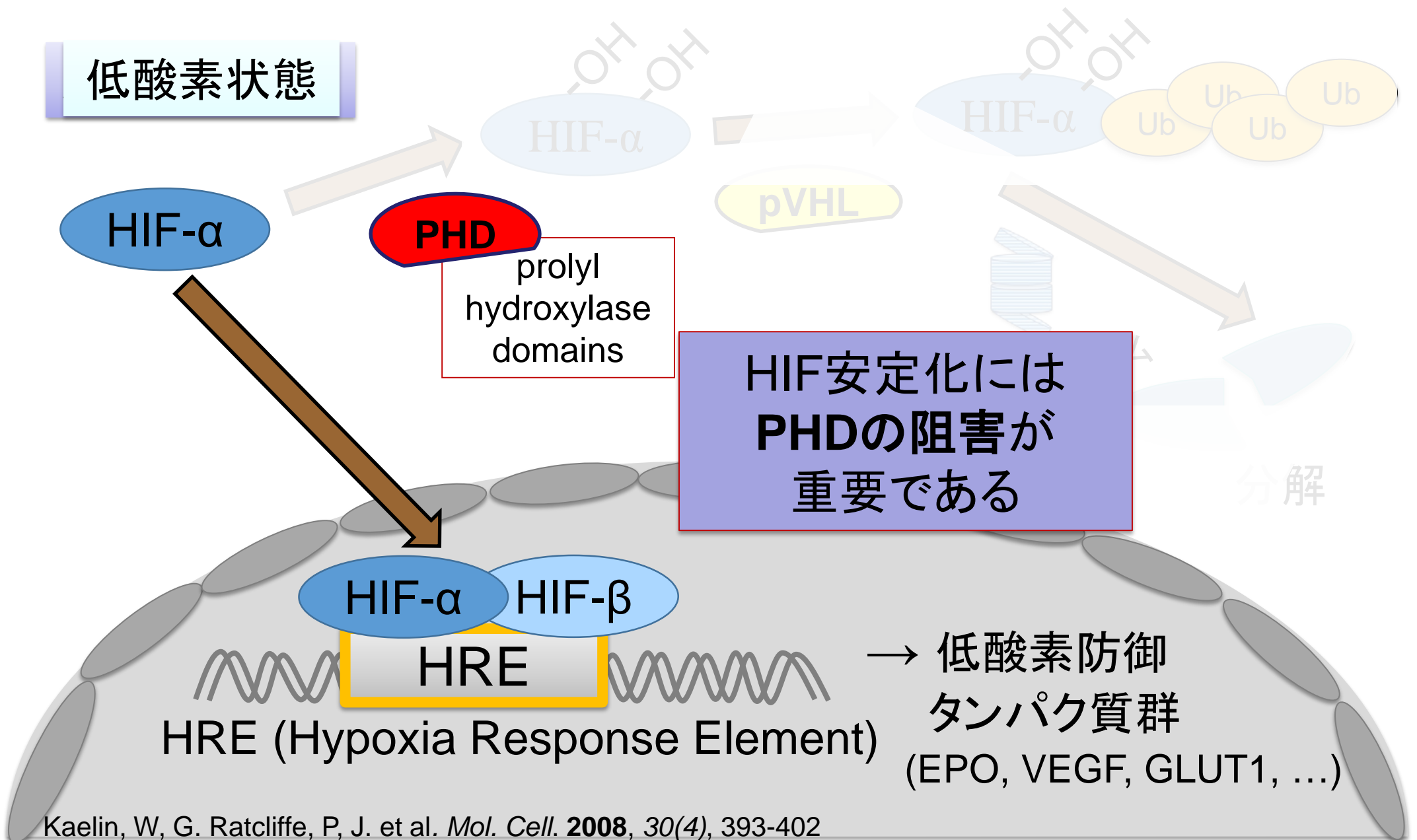
通常酸素状態



Kaelin, W, G. Ratcliffe, P, J. et al. *Mol. Cell.* **2008**, 30(4), 393-402

Wang, G, L. Semenza, G, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, 90(9), 4304-4308

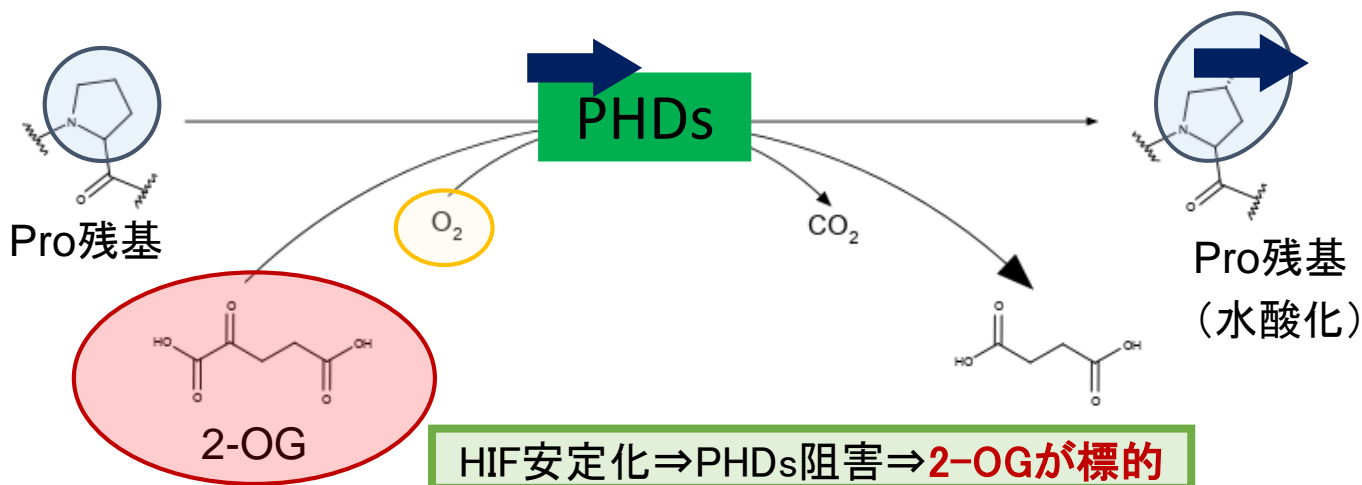
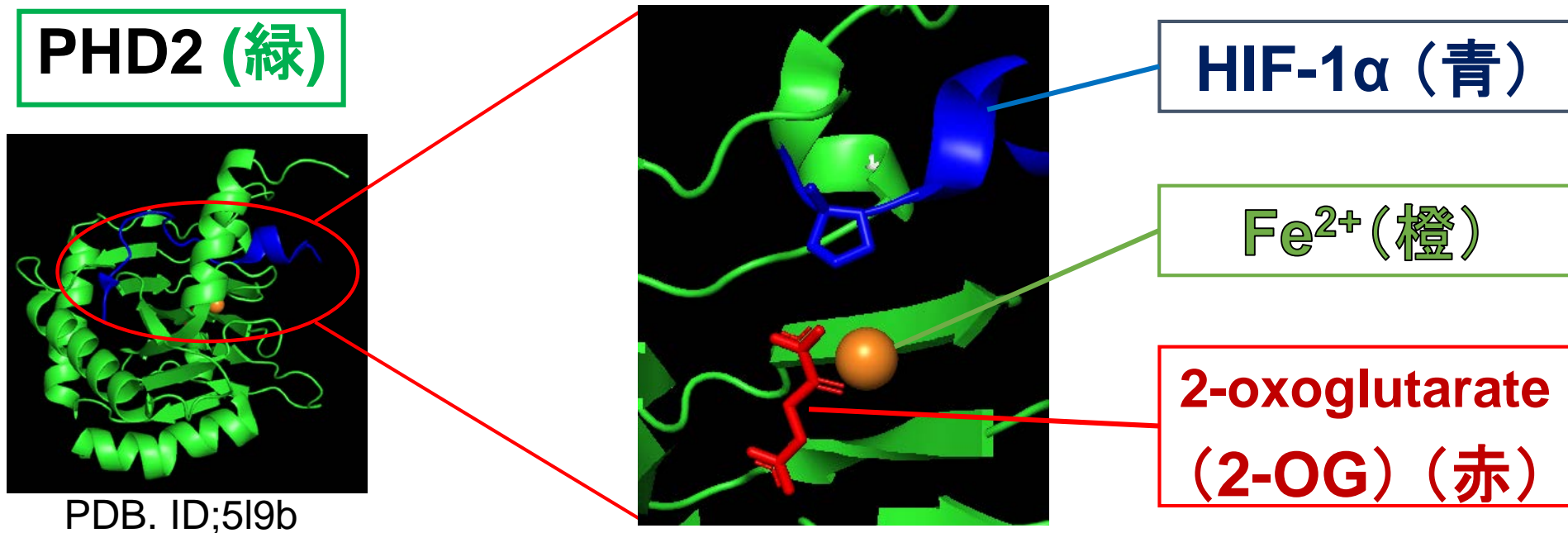
HIFの制御メカニズム



Kaelin, W, G. Ratcliffe, P, J. et al. *Mol. Cell.* **2008**, 30(4), 393-402

Wang, G, L. Semenza, G, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, 90(9), 4304-4308

PHD (prolyl hydroxylase domains) の阻害の設計

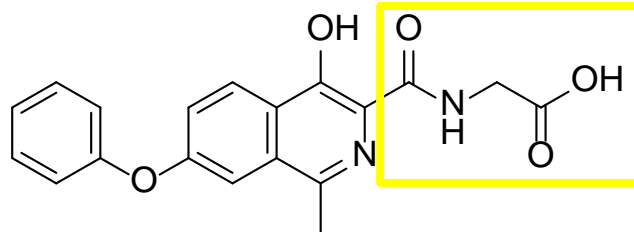


PHDsには
3つの
アイソフォームが
存在(PHD1,2,3)

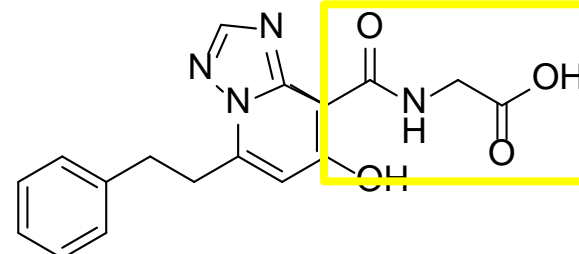
Chowdhury, R., Schofield, C.J. et al. (2016) *Nat. Commun.*, 7, 12673

従来型HIF活性化剤

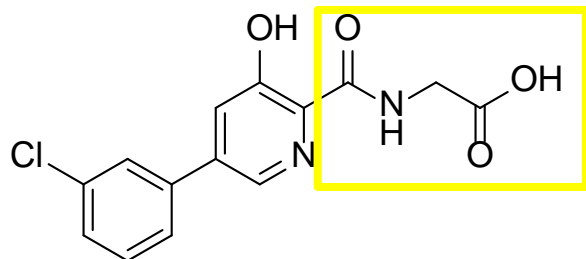
現在販売承認されている腎性貧血治療薬2020-2021年



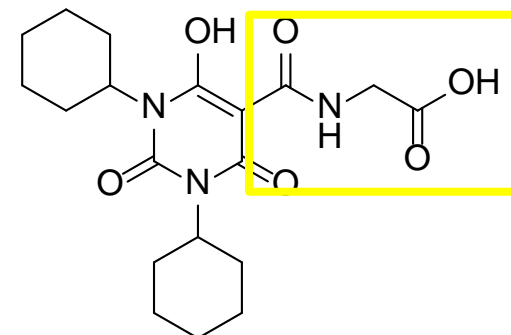
ロキサデュスタット(エレベソ)
アステラス製薬/Fibrogen



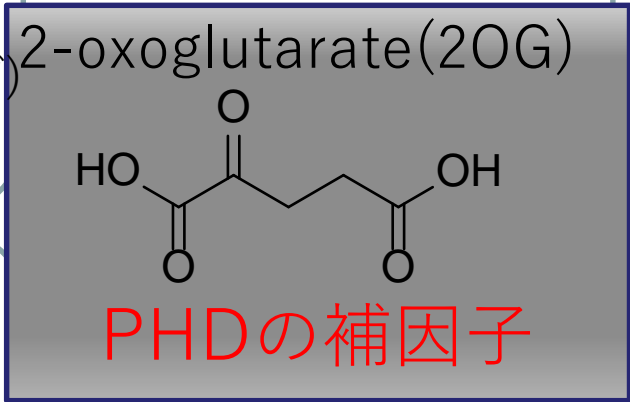
エナロデュスタット(エナロイ)
日本たばこ産業/鳥居薬品



バダデュスタット(バフセオ)
田辺三菱製薬/Akebia



ダブロデュスタット(ダーブロック錠)
グラクソ・スミスクライン

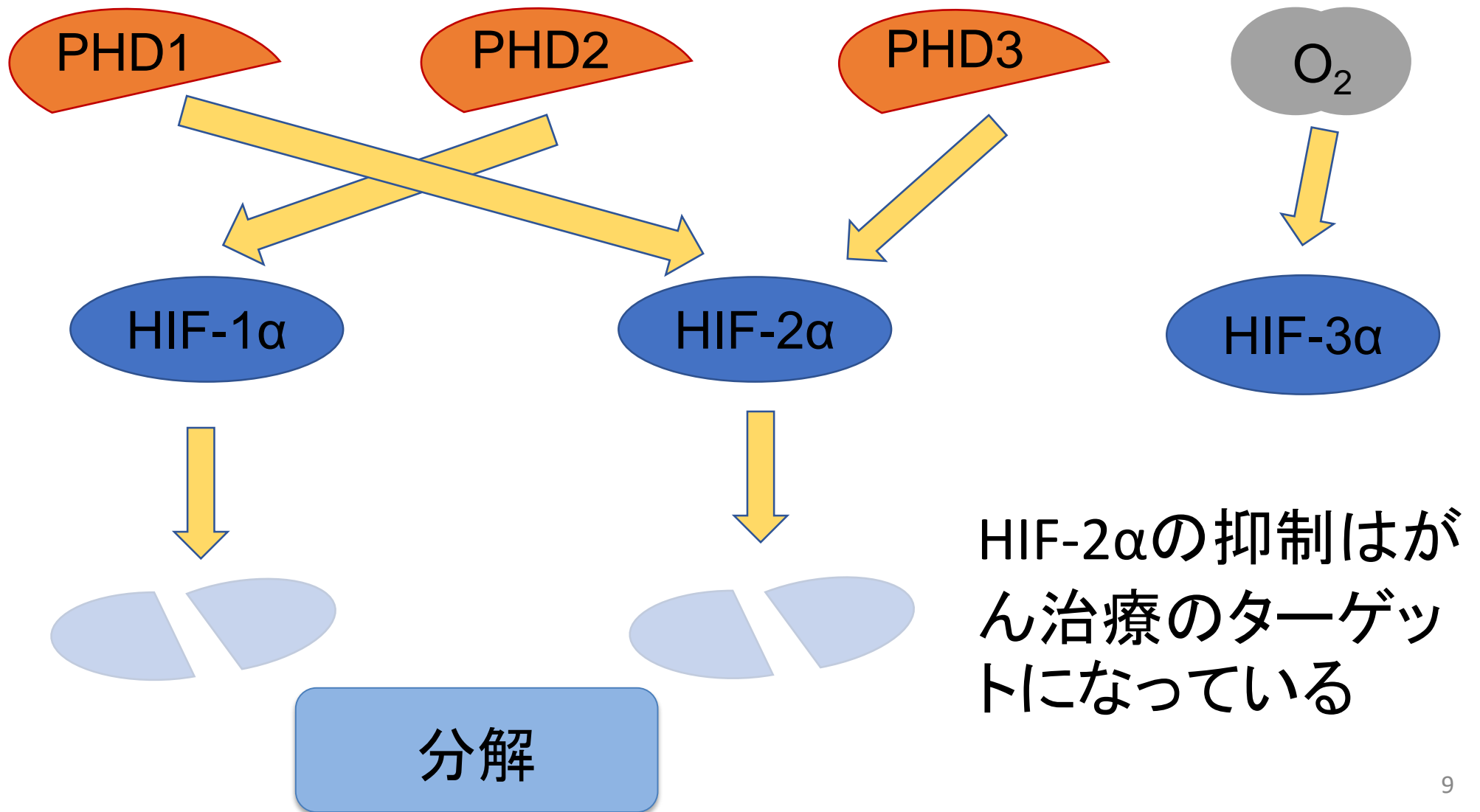


競合阻害により
PHDを阻害

生体内には2OGを補因子とするタンパク質は60種類以上

PHDとHIFにもアイソフォームがある

- PHDとHIFアイソフォーム間の関係

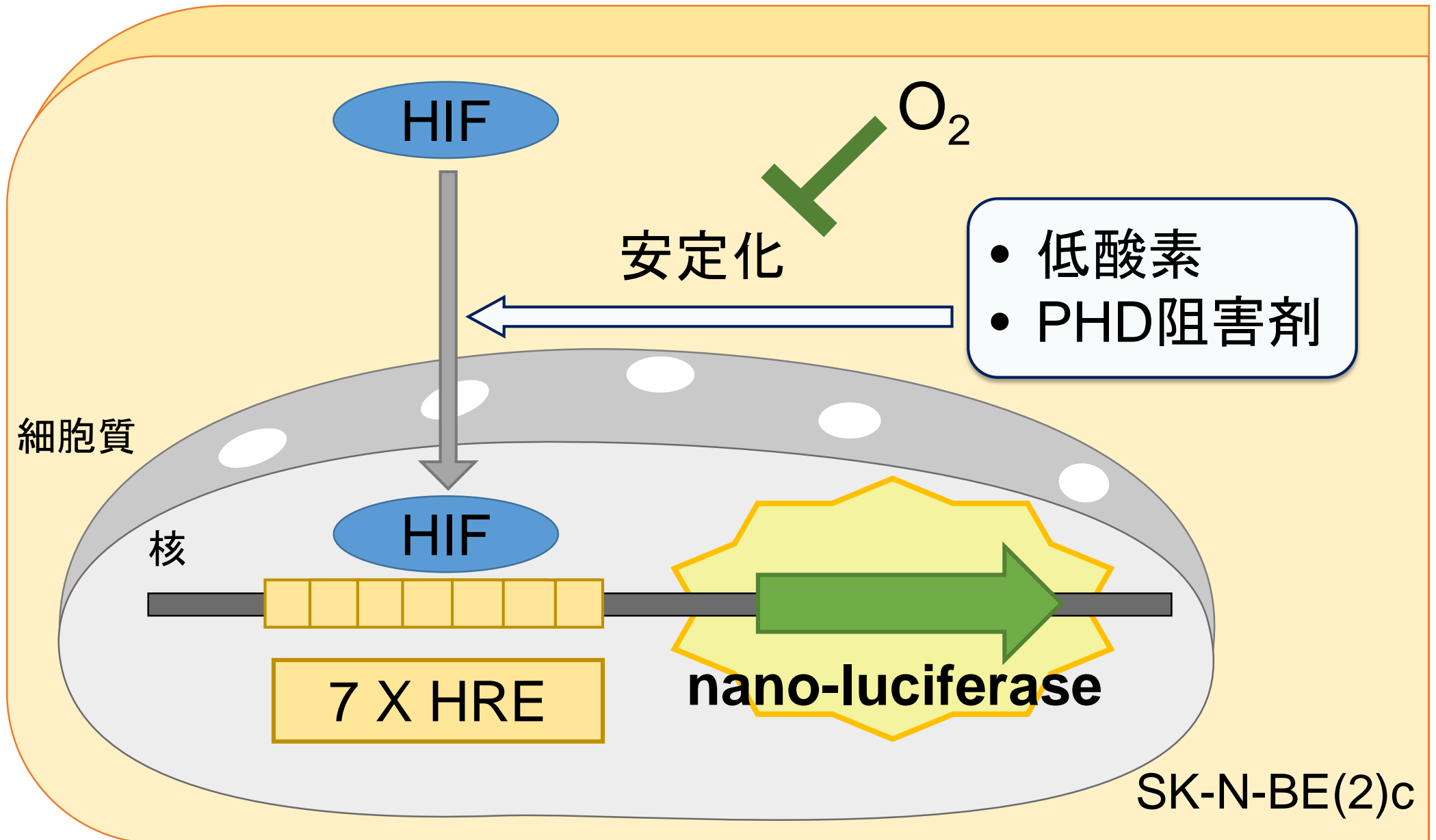


本技術の目的: アイソフォーム選択的な HIF活性化剤の開発

従来型である2-OGアナログ型PHD阻害による
HIF活性化剤からの脱却

→HIF-1 α 選択的阻害剤の開発

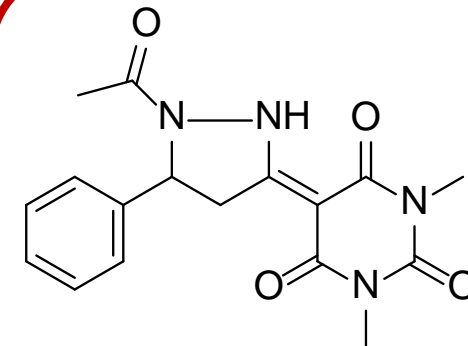
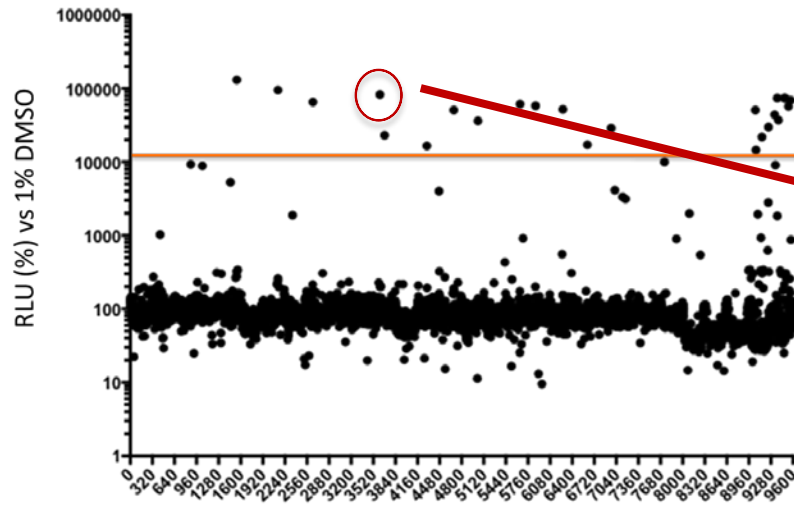
HIF転写活性モニタリングシステム



Tsujita, T., Kawaguchi, S-i. et al. (2015) *Tohoku J. Exp. Med.* 235, 151-159

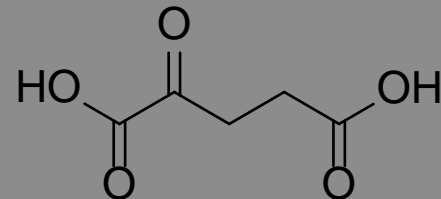
2-OG骨格を保持しないHIF活性化剤Pyrza

化合物の大規模スクリーニング



Pyrza
(ピルズエー)

2-oxoglutarate(2OG)

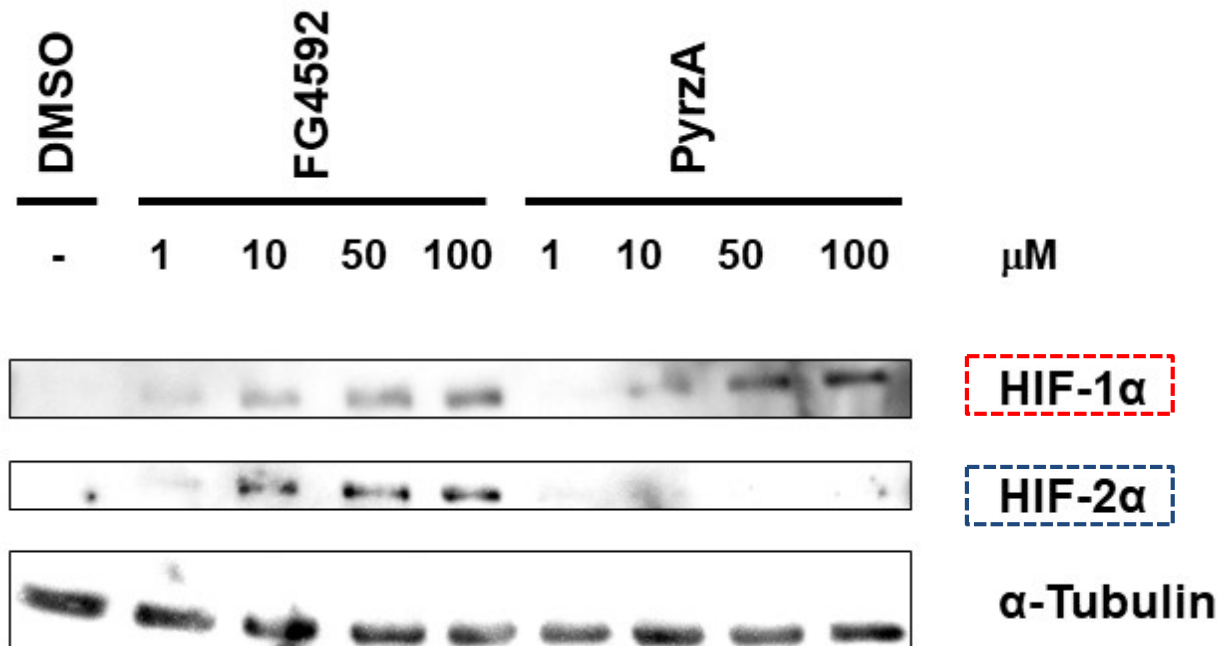


PHDの補因子

- 2-OG骨格を含まない
- HIFの活性作用が高い

<結果・Immunoblot>

SK-N-BE(2)c cell

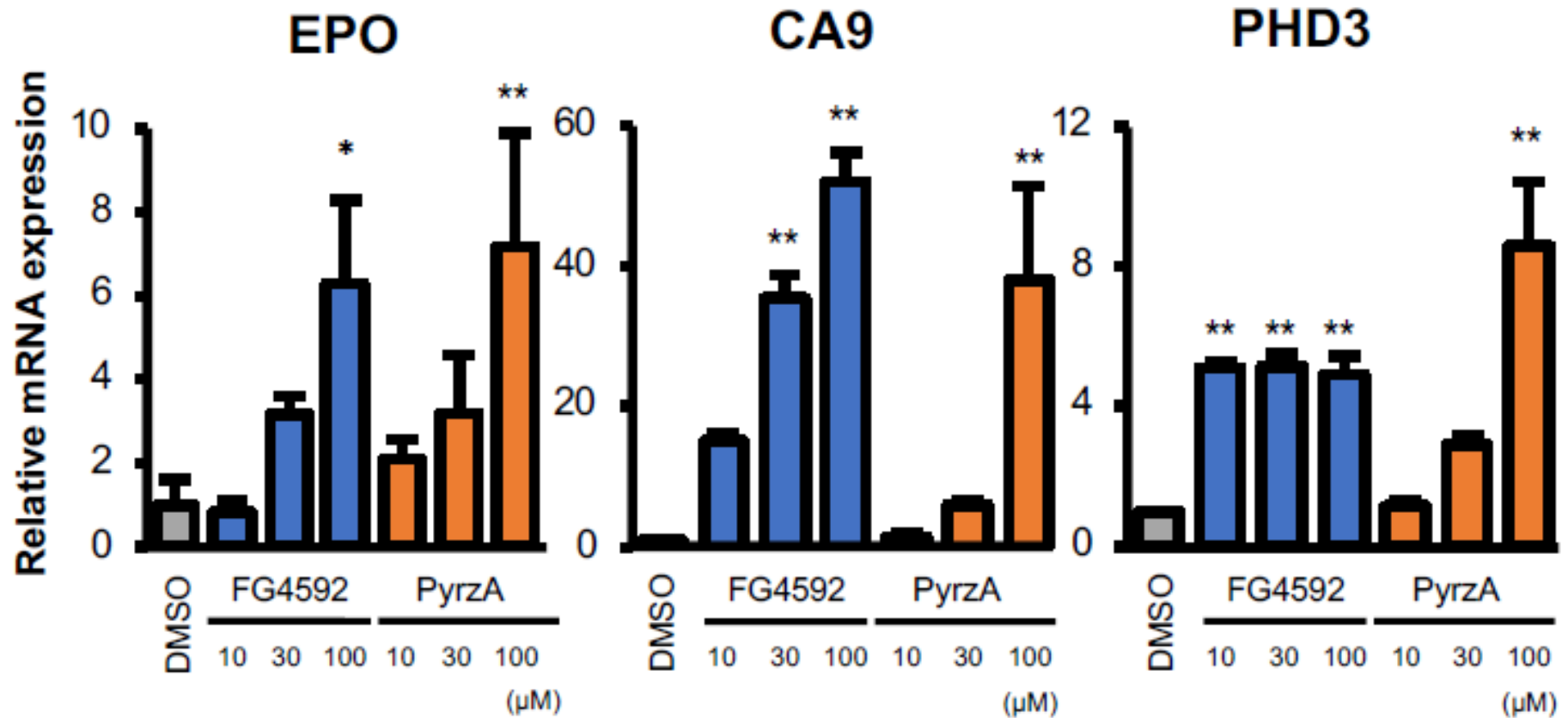


HIF-α安定化
(SK-N-BE(2)c cell)

- PyrZAは**HIF-1α**を濃度依存的に安定化
- PyrZAのみで**HIF-2α**が安定化されない

PyrZAは既存PHD阻害剤と異なり
選択的なHIF-α安定化が可能

各細胞におけるHIF下流遺伝子の活性化 (リアルタイムPCR法)

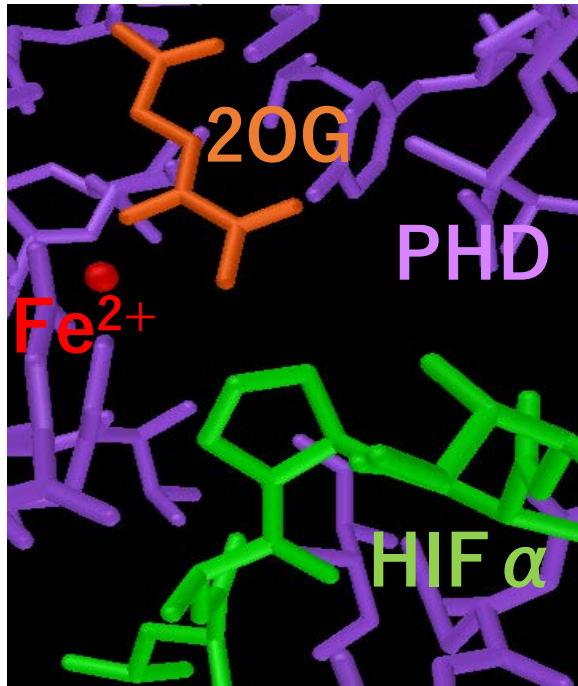


** (p<0.01), * (p<0.05)

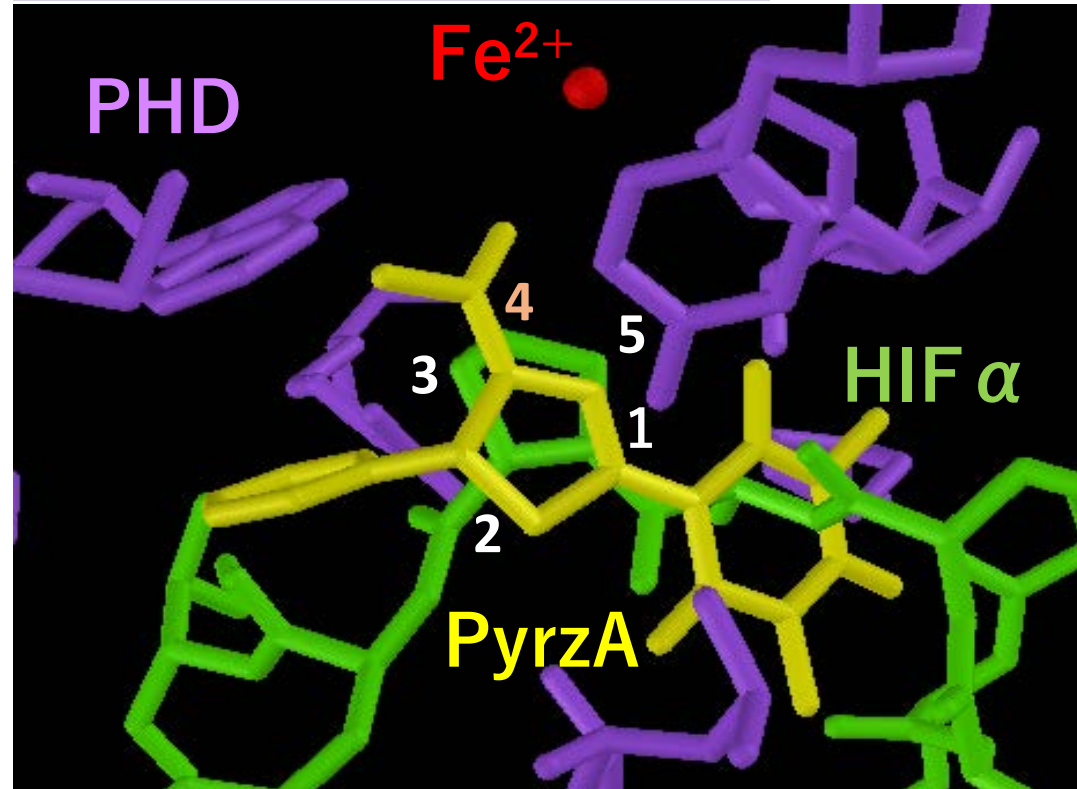
HIFの重要な下流遺伝子であるEPO, CA9, PHD3の遺伝子の発現上昇も確認

PyrzAは20Gアナログと違う場所でPHDを阻害している

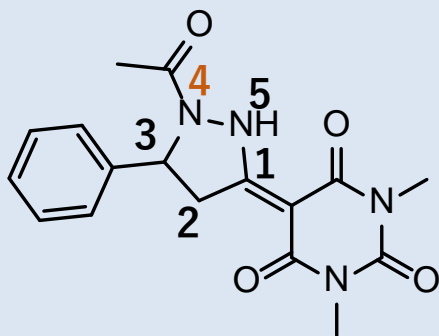
PHD, HIF α 複合体



PyrzAの阻害予測図



PyrzA



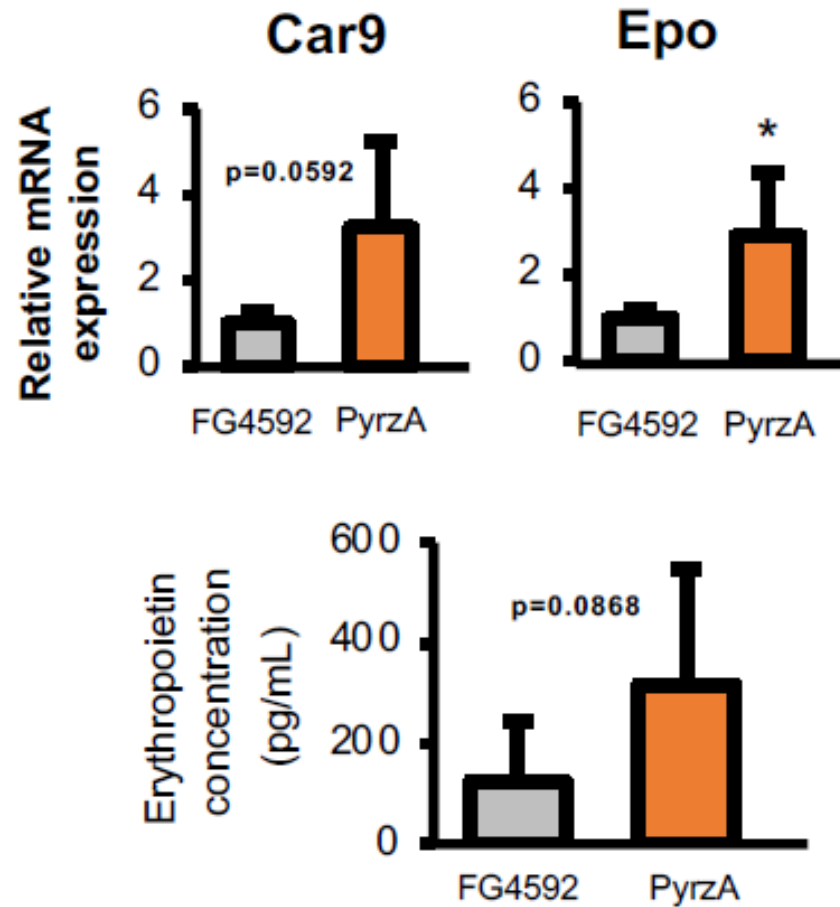
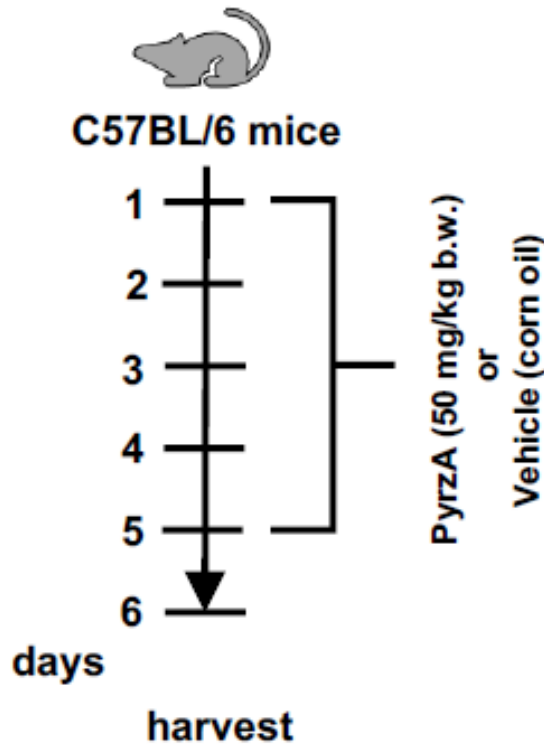
PyrzAはHIF α のプロリン残基部分と構造が酷似



初めてHIF1 α と競合阻害をする薬剤

マウスにおけるエリスロポエチンの発現上昇

in vivo

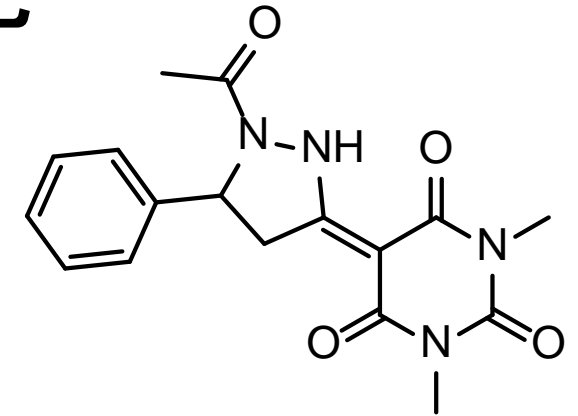


リアルタイムPCR法

ELISA法

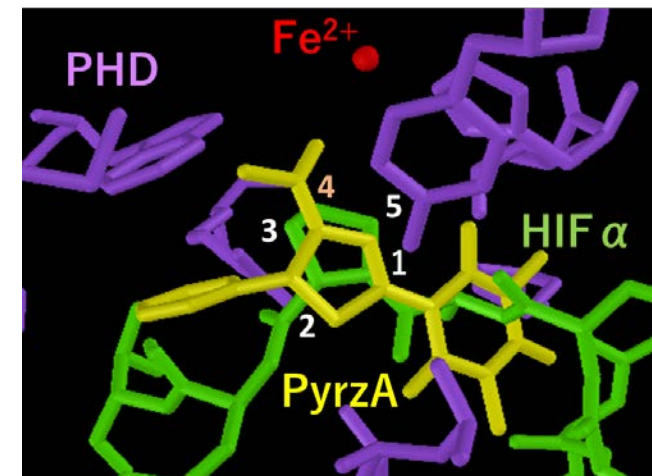
小括：初めてHIFを選択的に活性化する 化合物PyrzA（ピルズエー）を発見

従来型である2-OGアナログ型PHD
阻害によるHIF活性化剤からの脱却



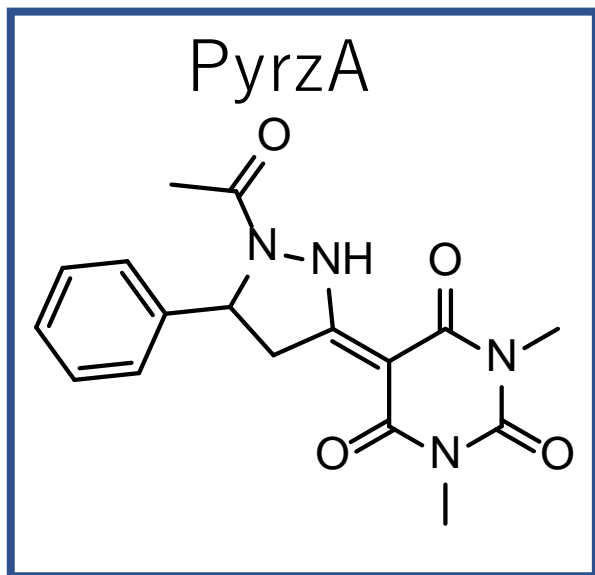
PyrzA

- ・従来品と同程度の活性
- ・マウスでの実験で効果があることを検証済み
- ・初のHIFアナログによるPHD阻害

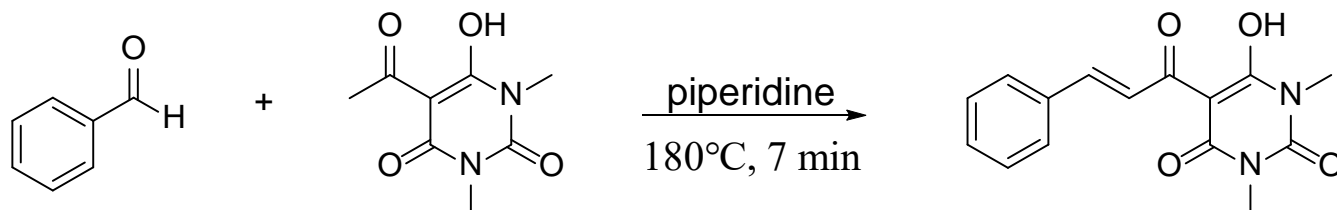


PyrzAは従来品より高収率で短時間で合成
できる

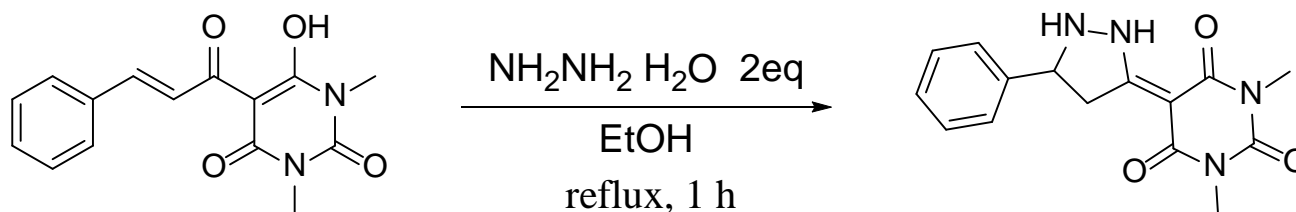
合成経路



i, アルドール縮合

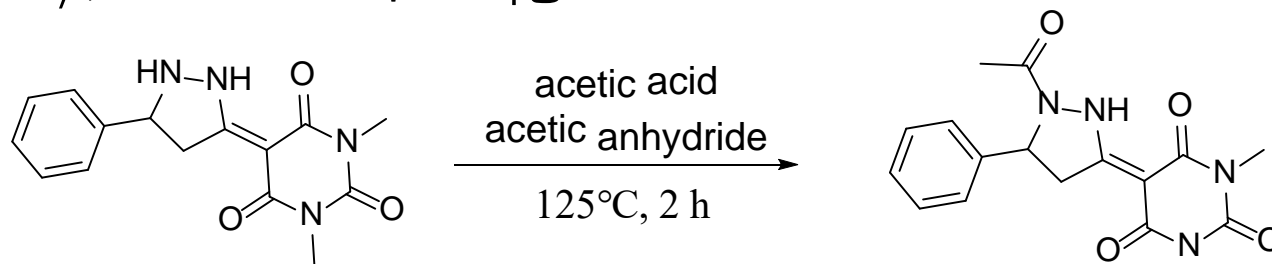


ii, ピラゾリジン環形成



20G構造を持たない

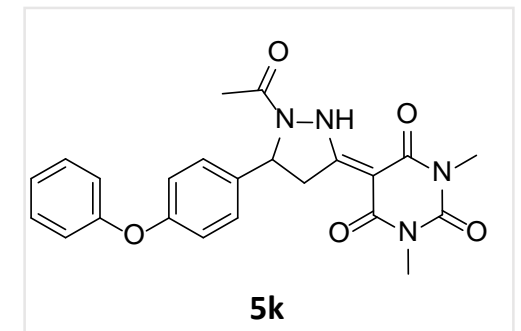
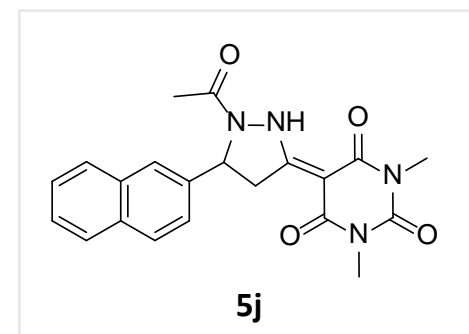
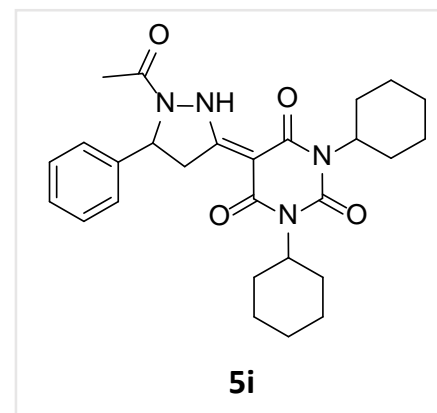
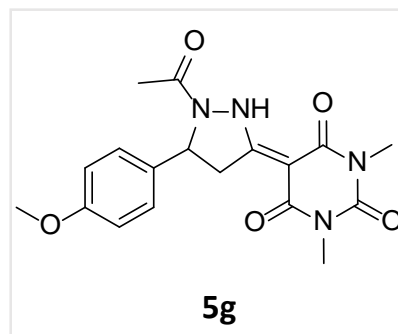
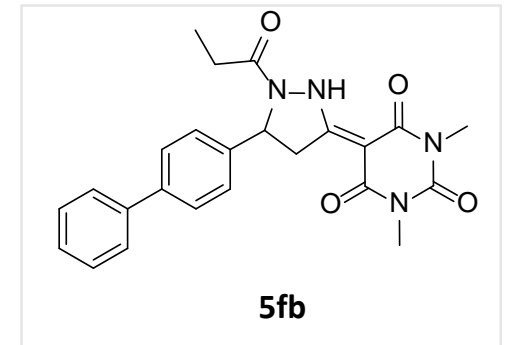
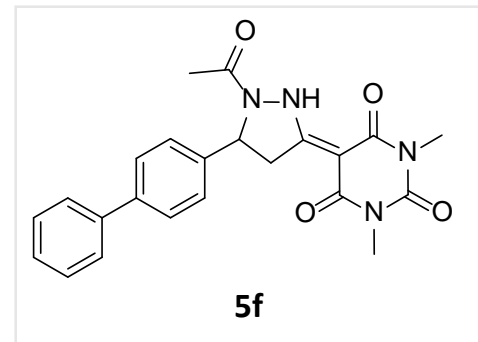
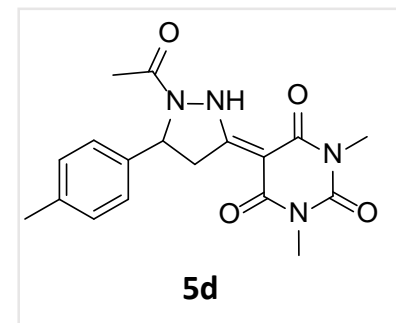
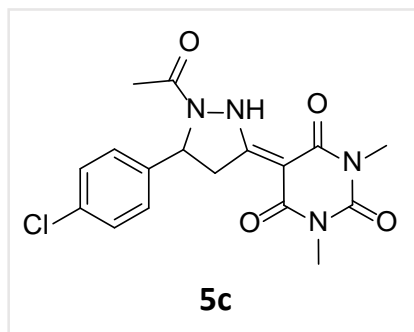
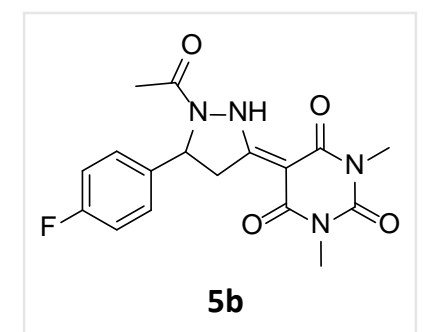
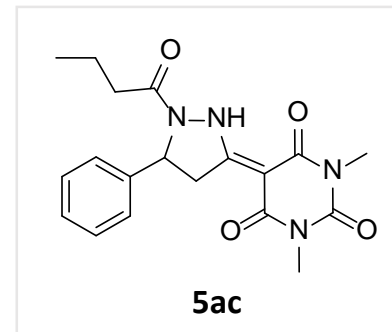
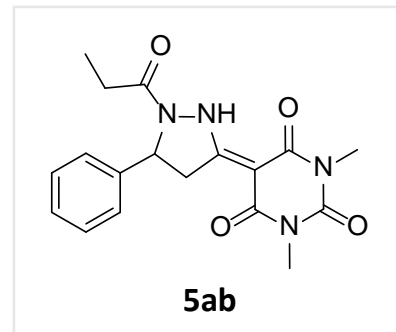
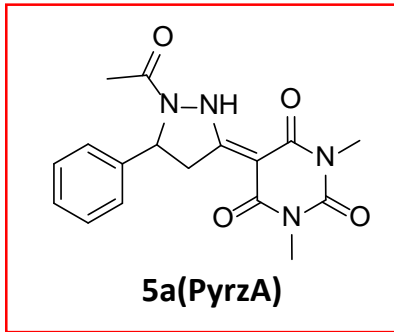
iii, アルカノイル化



再結晶と濾過で容易に単離

総収率 50%

PyrzAの誘導体実施例：現在までに20種以上合成

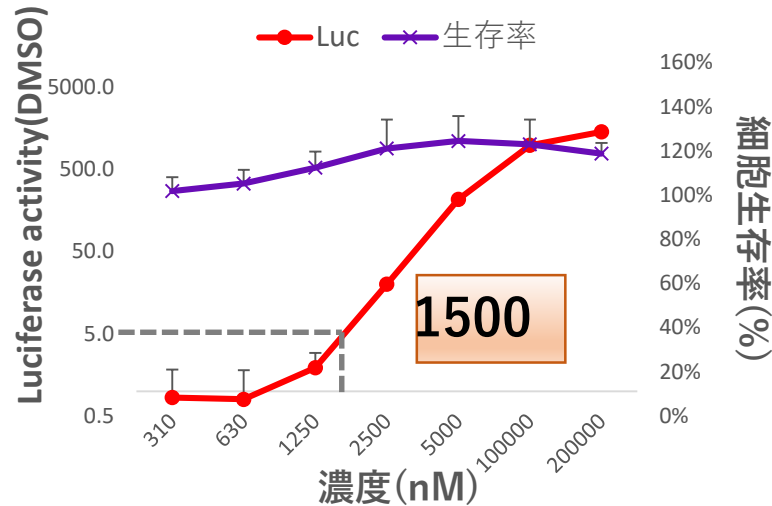
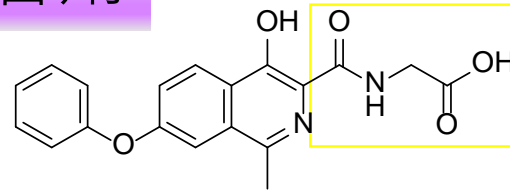


5a,5c以外は完全に新規化合物

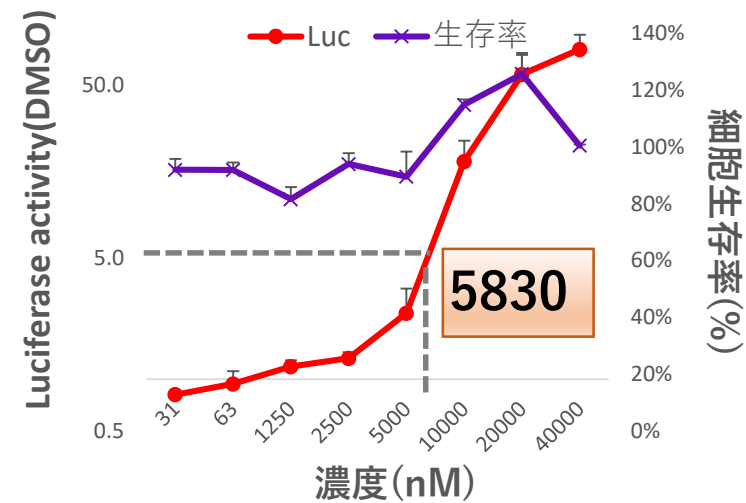
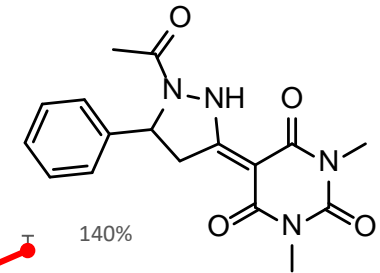
PyrzAの活性評価：ルシフェラーゼアッセイとMTTアッセイ

既存のPHD阻害剤

FG-4592



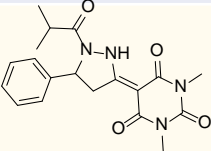
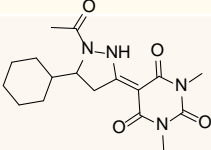
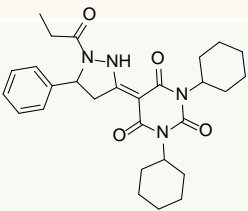
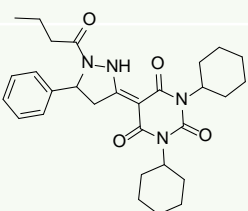
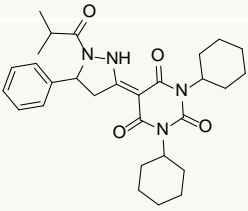
PyrzA



HIF5倍転写活性：DMSO 0.1%のときのルシフェラーゼ発光量を1とした時の5倍の化合物濃度(nM)

毒性評価：100 μ Mまでの刺激で細胞生存率を確認した。

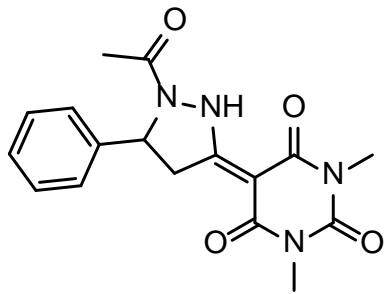
PyrzAの45倍活性が高い誘導体

化合物	構造	HIF5倍活性濃度 (nM)	IC ₅₀ (μM)	LogP
FG-4592	-	1470	>100	2.38
PyrzA	-	5830	>100	- 0.91
6a		2890	>100	- 0.08
6e		2870	>100	0.31
6b		158	>100	2.84
6c		129	>100	3.26
6d		188	>100	3.41

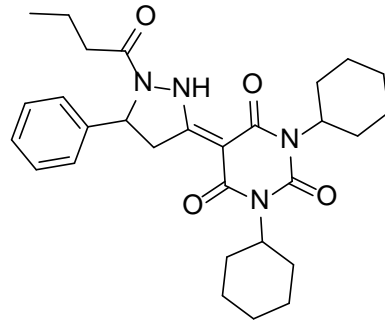
約45倍

本技術の総括

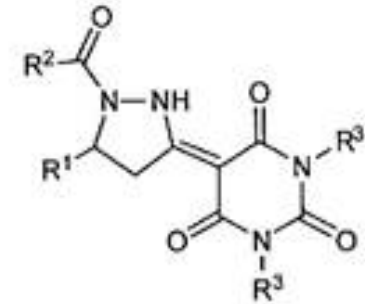
選択的にHIFを活性化する化合物PyrzA



PyrzaA

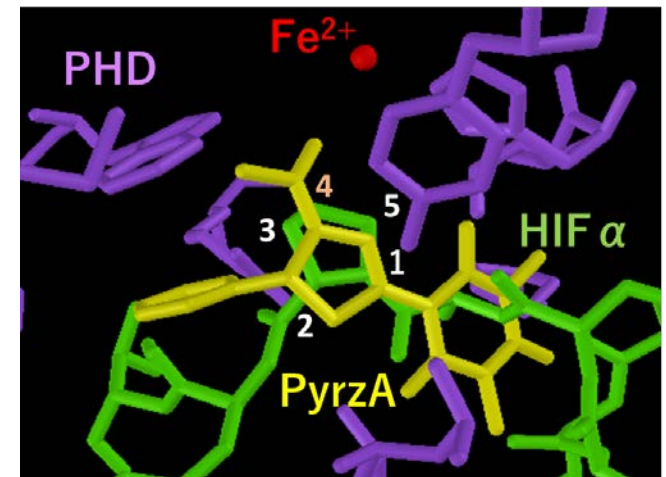


活性の高い誘導体



特許範囲の一般式

- ・高い収率、効率的な合成スキーム
- ・高いHIFの安定化
- ・毒性は今のところなし
- ・マウスでEPO活性化
- ・HIFの活性化は将来の創薬ターゲット、研究ツールとしてかなり有望



企業への期待

- 創薬、その他の用途開発を進めるために共同研究を行っていただける企業を募集しています。
- 試薬として本製品を販売していただける企業を募集しています。

現在の技術移転の状況

- 発明者らが設立したベンチャー（テトラクリエイト株式会社：2020年10月登記、佐賀大学発ベンチャーの申請手続中）と連携し、商品化と販売のルート等を模索中である。
- 試薬として売り出すのであれば、今すぐにもでも大量生産（10g-1kg）できる状況である。サンプルも提供できる。

今後の課題と展望

- 薬として上市していくには、各種毒性試験を実施していかなければならない
- 安全で選択的なHIF活性化分子であるとわかれば、慢性腎炎の治療薬だけでなく、用途はかなり広がる。(例、COVID-19における低酸素症に対する治療、ペットの治療：猫の慢性腎炎治療)

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 新規な含窒素環状化合物
およびその用途
- 出願番号 : 特願2020-174971
- 特許番号 : 6904528 (令和3年6月28日登録)
- 出願人 : 佐賀大学
- 発明者 : 川口真一、辻田忠志

お問い合わせ先

- 国立大学法人 佐賀大学
- 学術研究協力部
- 社会連携課 木村政治
- TEL. 0952-28-8416 / FAX. 0952-28-8186
- e-mail tlo@mail.admin.saga-u.ac.jp