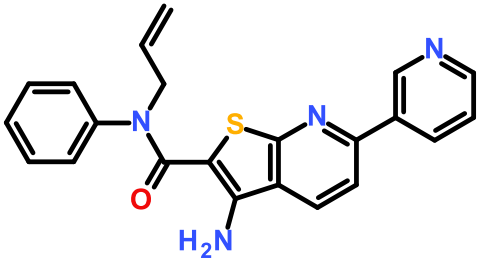
SOD1-Derlin-1結合阻害を介した家族性ALS（FALS）治療薬の開発

発明のポイント

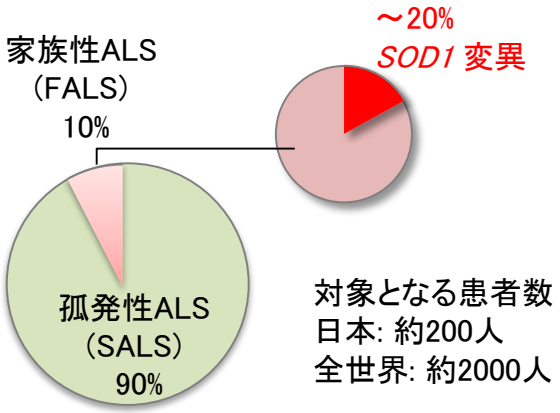
◎16万個の化合物より大規模なスクリーニングと合成展開を実施
→生体内で作用する有力な新規リード化合物を合成に成功し、基本骨格を同定

◎家族性ALSの発症メカニズムを直接的に阻害する低分子化合物
→従来の進行遅延薬と異なり、ALS病因物質を抑制する根本治療薬になり得る可能性

＊変異型SOD1と特異的に結合する家族性ALS診断用抗体も保有
→診断薬の開発も合わせて可能です。
（ Fujisawa et al., ANN NEUROL, 2012）（日本にて特許登録済　特許第5828521号）



#56-59



家族性ALSの治療薬開発を進めていただける企業を探しています。

＜発明者＞
東京大学大学院薬学系研究科　一條秀憲教授　他
＜特許＞
特許出願中　日本：特願2018-523952　米国：16/306696（権利登録済）
＜関連論文＞
Tsuburaya et al., Nat Commu volume 9, Article number: 2668 (2018)
＜お問い合わせ先＞
株式会社 東京大学TLO（CASTI）　繁田　薫（Kaoru SHIGETA）
TEL：03-4330-2049　Email：shigeta@todaitlo.jp　HP：http://www.todaitlo.com/

治療薬ターゲット

家族性ALSの発症原因として、様々な遺伝子変異が知られている。そのうち最も頻度の高い*SOD1*遺伝子変異型について、発明者らは発症メカニズムを解明しており（Nishitoh et al., Genes Dev. 2008 Jun 1; 22(11): 1451−1464）、膜タンパク質のDerlin−1に変異型SOD1が結合することで、小胞体ストレスを引き起こすことを見出した。そこで、これら2つのタンパク質の相互作用を阻害する低分子化合物の開発を進めた。

Fig. 1

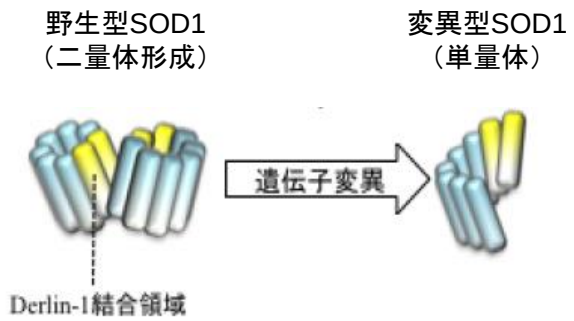
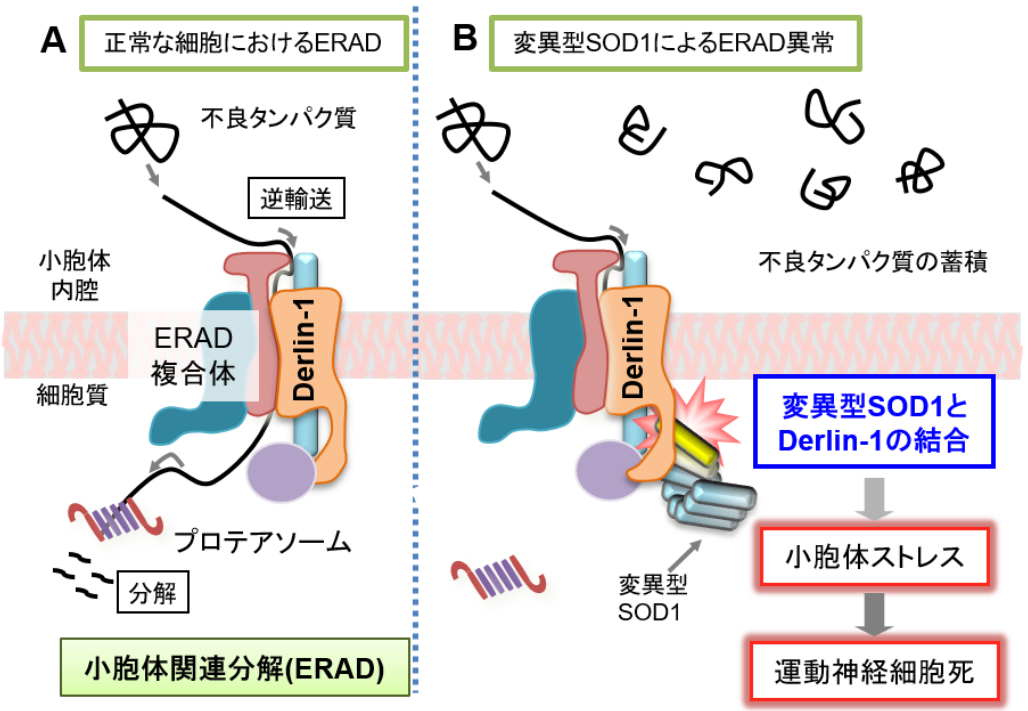


Fig.1 野生型SOD1は生体内で二量体を形成している。一方、変異型SOD1では単量体となり、Derlin−1結合領域が外側に露出している（132種の*SOD1*変異のほぼ全てで同様の構造変化が起きている）。

Fig. 2A 正常な細胞ではERADにより小胞体内腔の不良タンパク質はDerlin−1を介して細胞質側へと逆輸送され、ユビキチン−プロテアソーム系により分解される。

Fig. 2B ALS関連変異型SOD1存在下では、SOD1がDerlin−1と結合してERADを阻害する。これにより、不良タンパク質が小胞体内に蓄積することで小胞体ストレスが誘導され、運動神経細胞死が引き起こされる。

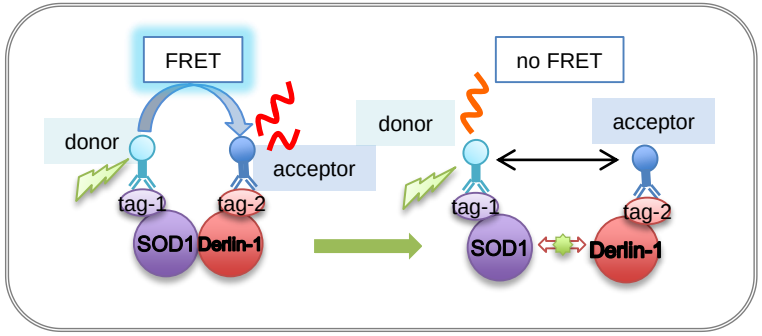
Fig. 2



化合物のスクリーニング方法

TR-FRETを活用したSOD1-Derlin-1結合評価系を確立し、約160,000化合物に対して1次スクリーニングを実施し、候補化合物を1,460個に絞り込んだ。2次スクリーニングでは、再現性の検討と偽陽性化合物の排除を行った。その結果得られた131化合物について、3次スクリーニングで濃度依存性を検討し、77個の候補化合物を得た。更に、共免疫沈降実験により阻害活性を再評価し、12化合物まで絞り込み、中でも再現性よく顕著な阻害活性を示した化合物の構造に基づき新規合成展開を行い、類似体を評価した。その結果、生体内でも安定かつ高い阻害活性を持つCompound #56-59を得た。

TR-FRETを利用したSOD1-Derlin-1結合評価



（左図）SOD1とDerlin-1が結合していると蛍光分子間の距離も近接し、FRETによる蛍光が見られる。
（右図）低分子化合物によってSOD1-Derlin-1結合が阻害されるとFRETがおこらない。

約160,000化合物

1st スクリーニング

SOD1-Derlin-1結合阻害

1,460化合物

2nd スクリーニング

再現性　偽陽性化合物の排除

131化合物

3rd スクリーニング

濃度依存性の検討

77化合物

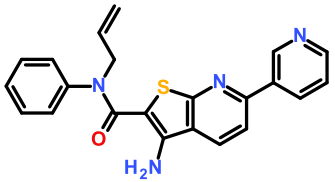
共免疫沈降による再評価

12化合物

有望候補化合物からの合成展開

Compound #56-59

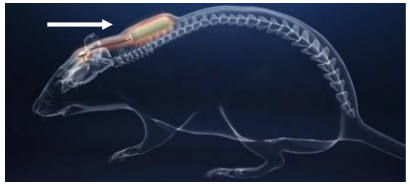
Compound #56-59



	#56-59
clogP /clogD	4.78 / 3.69
免疫沈降法 (%inhi@20,10,5μM)	68, 45, 30
JP1/ JP2 (μM)	83.2 / < 1
hCL /mCL (mL/min/kg)	176.1 / 705.7
Mw	386.5
IC50	10μM

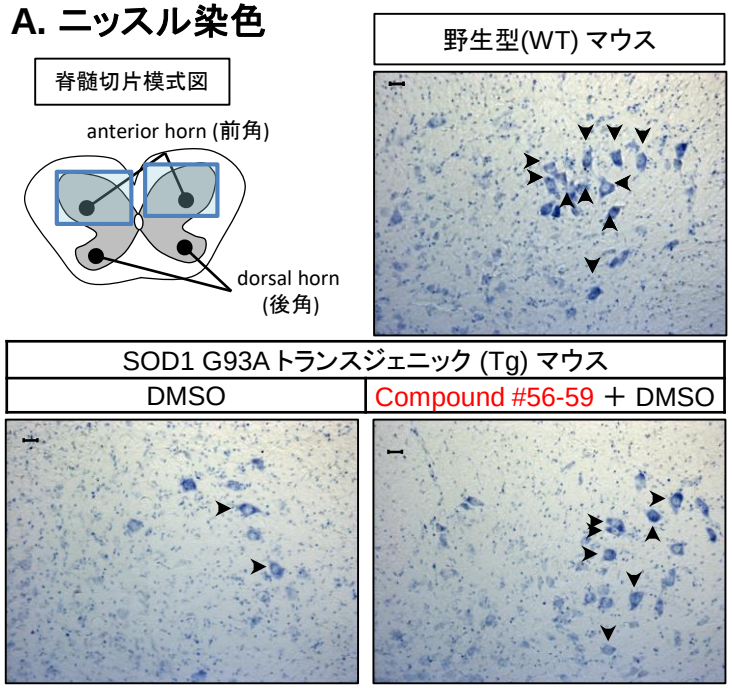
ALSモデルマウスにおける運動神経細胞死抑制効果の確認

オスモティックポンプ

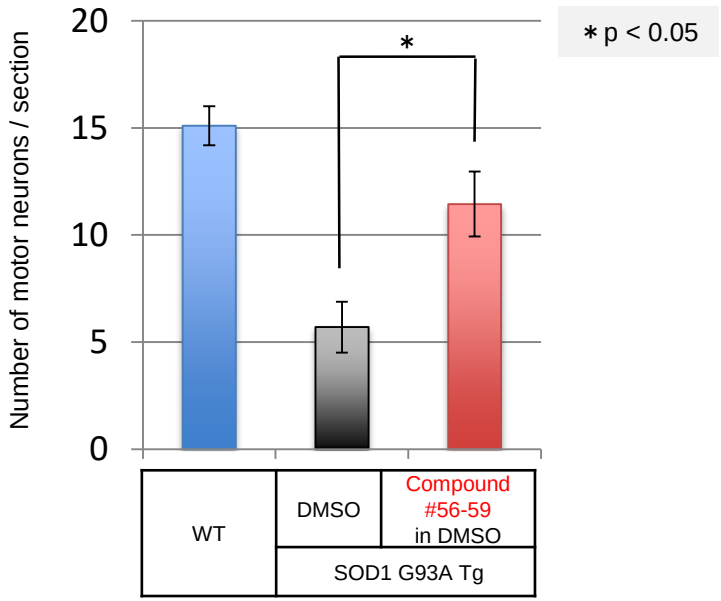


＜実験方法＞
野生型又はALSモデルマウス（SOD1 G93A トランスジェニックマウス）
22週齢～オスモティックポンプを用いて脳室内持続投与
- コントロール群：DMSO
- 投与群： Compound #56-59（3mMを連続投与；約4.17 μg/day）

A. ニッスル染色



B. 運動神経細胞数

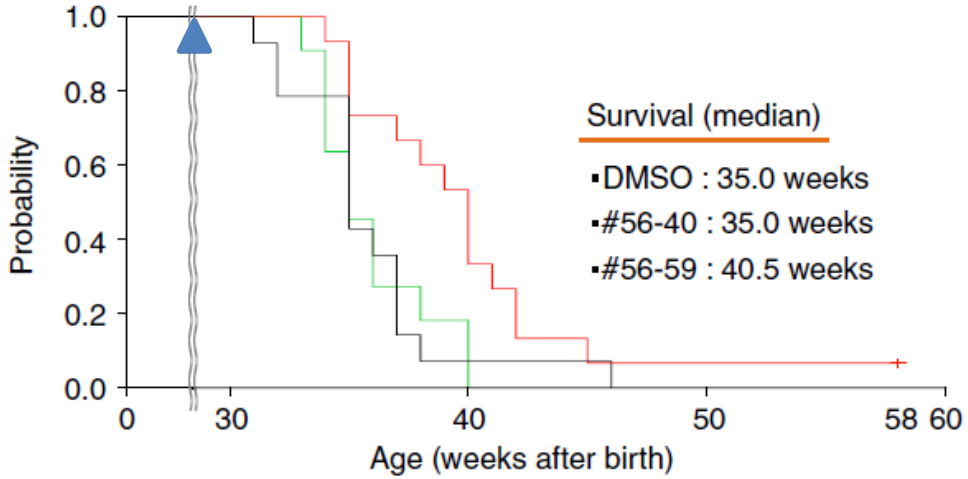


A. 31週齢の各SOD1 G93A Tg マウス群と、34週齢のWTマウスの凍結脊髄切片（40 μm）のニッスル染色を行い顕微鏡観察した。腰随前角における代表的なニッスル染色像を示した。SOD1 G93A Tg マウスのCompound #56-59投与群において、コントロール（DMSOのみ投与）群よりも運動神経細胞数が多くみられた（矢印: 運動神経細胞）。

B. 各マウス由来のニッスル染色切片における運動神経細胞数をカウントした結果を示した（mean±s.e.m. ）。SOD1 G93A Tg マウスのCompound #56-59投与群において、コントロールと比較し、運動神経細胞数が倍増し、WTマウスと比較して80%の運動神経細胞数を維持した。（WT マウス: n=4; DMSOのみ投与あるいはCompound #56-59投与SOD1 G93A Tg マウス: n=8 in each group; 5 sections per each mice; *p<0.05 by Student's t-test.）

ALSモデルマウスにおける延命効果の確認

Survival （前頁と同じ実験系で評価）



▲ 投与開始（22週齢～）

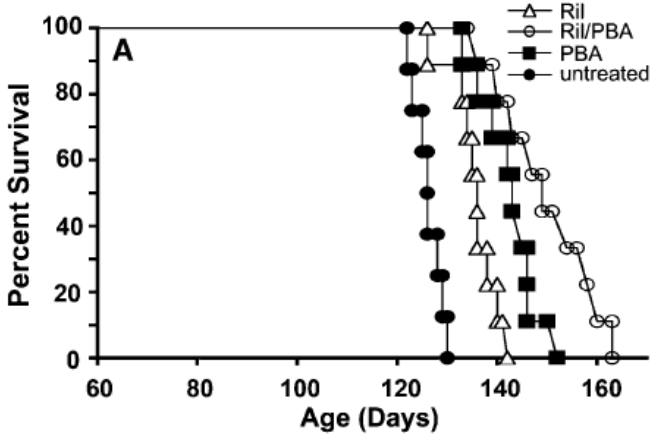
— DMSO (*n*=14)
— #56-40 (*n*=11)
— #56-59 (*n*=15)

n.s.

*$P < 0.05$

Compound #56−59の脳室内投与により
14.2%の延命効果を確認

<比較参考資料>



既存薬　Riluzole (Sanofi/Covis Pharma)

- ◆ SOD1 G93A Tgマウス（ALSモデルマウス）を使用
- ◆ 経口投与 （16 mg/kg）
- ◆ 生後30日から投与開始
- ◆ 結果

Control : 126.1±2.7 days (n=10)
Riluzole (16 mg/kg) : 135.5±4.4 days (n=10)

＊ $p < 0.05$

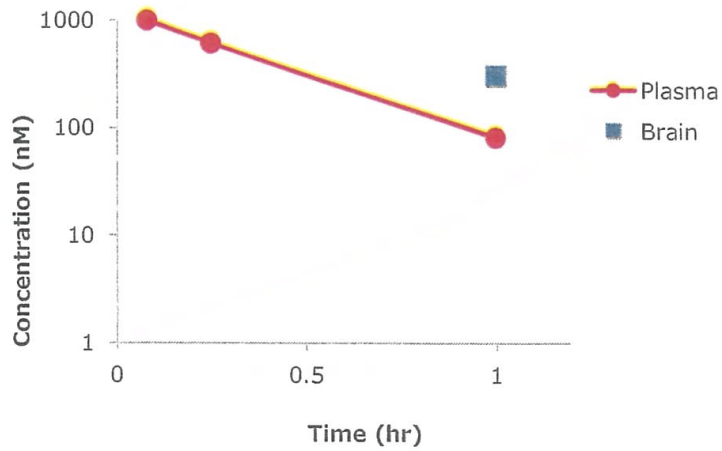
→ リルゾール投与により**7.5%**の延命効果を確認

（引用：J. Del Signore et al., Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2009; 10: 8594）

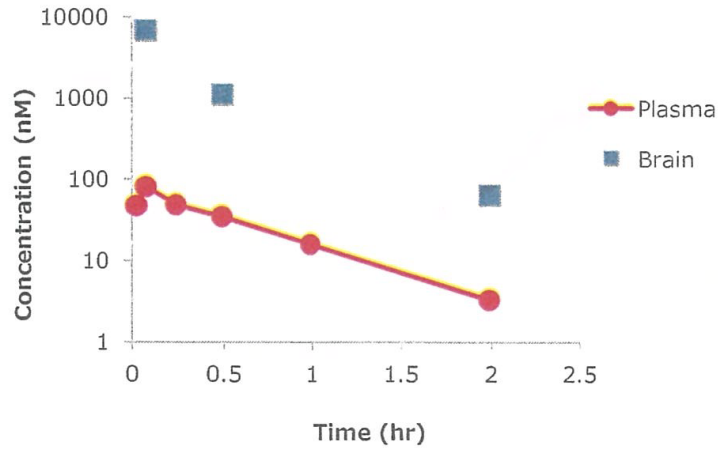
Compound #56-59の薬物動態試験

野生型マウスに4種類の投与経路でCompound #56-59を投与した結果、いずれの投与経路でも脳内に移行した。

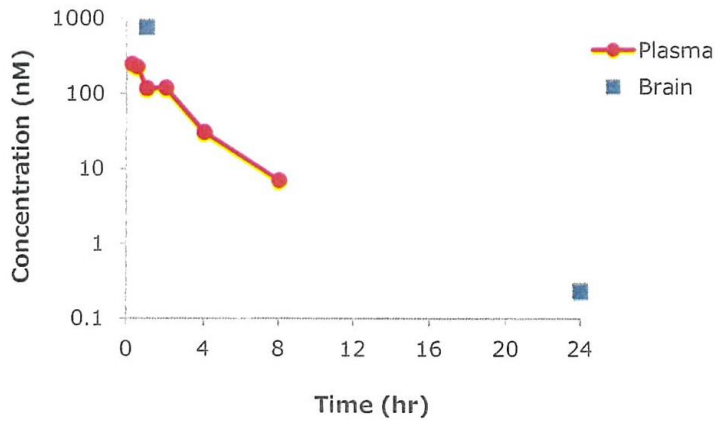
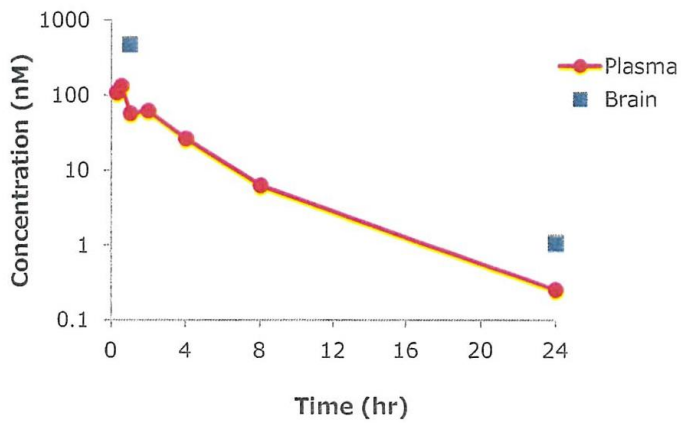
・静脈内投与



・脳室内投与



・経口投与



・皮下注射投与