

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 自然免疫制御による全身性エリテマトーデス治療薬の創製  
(英語) Development of therapeutic drugs for systemic lupus erythematosus  
regulating innate immunity

研究開発実施期間：令和2年8月12日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 長井 良憲  
(英語) Yoshinori Nagai

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 公立大学法人富山県立大学・工学部医薬品工学科・教授  
(英語) Professor  
Department of Pharmaceutical Engineering, Faculty of Engineering,  
Toyama Prefectural University

## II 研究開発の概要

近年、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) の創薬標的として自然免疫受容体 TLR7 が注目されている。本研究では、ACT-MS におけるメディシナルケミストリーにより TLR7 阻害活性を高めた2つの最適化リード化合物について、物性評価及び薬物動態・薬物代謝試験、ヒト細胞を用いた試験、薬効薬理試験を実施し、開発候補化合物(化合物 X)を一つに絞込むことに成功した。また、化合物 X について各種非臨床試験を実施し、化合物プロファイルを確立した。さらに、化合物 X の合成ルート最適化を検討するとともに、クライオ電顕及び分子動力学シミュレーションにより化合物 X と TLR7 との結合様式を解明し、その結果を基にバックアップ化合物の探索を進めた。各研究開発項目の成果の概要は以下の通りである。

### (1) 最適化リード化合物の物性評価及び薬物動態・薬物代謝試験

2つの最適化リード化合物(以降、化合物 X 及び化合物 Y と称する)に関して、各化合物を合成・精製後の粉末原体を用いて、物性評価(旋光度等)を実施した。

薬物動態試験の結果、化合物 X の最大血中濃度は化合物 Y よりも 1.8 倍高かった。また、薬物代謝試験の結果、化合物 Y はヒト肝ミクロソームとの2時間の反応において、未変化体残存率は約 80%であったが、化合物

X はヒト及びマウス由来の肝ミクロソームとの 2 時間の反応において、いずれも約 90%の未変化体残存率を示した。以上の結果から、化合物 Y よりも化合物 X の方が薬物動態・代謝安定性に優れていると結論付けた。

## (2) 最適化リード化合物の SLE モデルマウスを用いた薬効薬理試験

化合物 X の薬効について再現性試験を実施した。NZB/WF1 雌マウスに、化合物 X または対照薬としてヒドロキシクロロキン (HCQ) を 15 週間連日経口投与し、薬効を評価した。その結果、化合物 X 投与群では、溶媒 (生理食塩液) 投与群及び HCQ 投与群に比べて NZB/WF1 マウスの腎機能 (血清 BUN・Cr、尿蛋白量) 及び血中自己抗体価 (anti-SSA, anti-Sm) の上昇が顕著に抑制されることを確認した。腎臓組織解析の結果、溶媒投与群に比べて化合物 X 投与群では、ループス腎炎に特徴的な病変を顕著に抑制することを確認した。また、化合物 X 投与群では、糸球体における免疫複合体の沈着とそれに伴う補体の活性化を抑制することが示唆された。

さらに、NZB/WF1 雌マウスに化合物 X または HCQ を 24 週間連日経口投与し、生存率を検定した。その結果、化合物 X の長期投与は、HCQ 投与群または溶媒投与群に比べて、ループス腎炎の進行を顕著に抑制し、NZB/WF1 マウスの生存率を有意に延長することを明らかにした。

## (3) ヒト細胞を用いた最適化リード化合物の内因性 TLR7 リガンドに対する有効性評価

健康人末梢血よりヒト形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC) を単離し、化合物 X 及び化合物 Y の TLR7 阻害作用を検討した。その結果、シード化合物 Z よりも化合物 X 及び化合物 Y の方が、loxoribine 刺激による IFN- $\alpha$  産生を抑制することを確認した。一方、SLE の病態形成に関わる内因性 TLR7 リガンドの候補であるマイクロ RNA (miR574) 刺激では、化合物 X 及び化合物 Y に比べて、HCQ の方が IFN- $\alpha$  産生を抑制した。

また、健康人末梢血から単核球 (PBMC) を単離し、ウイルス由来 RNA40 またはマイクロ RNA (miR574 または let7b) で刺激した。これらの刺激では IFN- $\alpha$  産生及び IFN- $\beta$  遺伝子発現は認められなかったため、TNF- $\alpha$  遺伝子発現を検討した。その結果、外来 SLE 患者または関節リウマチ患者の PBMC において、miR574 刺激による TNF- $\alpha$  遺伝子発現が誘導され、その発現を化合物 X、化合物 Y 及び HCQ が抑制することを確認した。抑制効果は HCQ、化合物 Y、化合物 X の順に強かった。以上から、最適化リード化合物が内因性 TLR7 リガンド候補による SLE 患者 PBMC の TLR7 活性化を阻害することを明らかにした。

## (4) 化合物 X を用いた各種非臨床試験の実施

原体および投与液の分析法検討の結果、化合物 X 及び化合物 Y とともに全ての分析法バリデーション項目の判定基準を満たし、原体及び投与液中の濃度分析法を確立することができた。確立された分析法に従い、化合物 X について、原体及び投与液の安定性試験を実施した。その結果、原体中の化合物 X または生理食塩液を媒体として調製した投与検体中の化合物 X は、安定であることが確認された。

化合物 X の単回経口投与毒性を評価するため、ICR マウスに化合物 X (低用量、中用量及び高用量投与群) または媒体である生理食塩液 (対照群) を投与し、投与後 14 日までの観察期間中に一般状態観察及び体重測定を行い、観察期間終了後に剖検した。その結果、化合物 X 投与群に、観察期間を通じて一般状態及び体重推移に異常は認められず、剖検後の胸腔内及び腹腔内器官に異常は認められなかった。

さらに、化合物 X の反復経口投与毒性を評価するため、ICR マウスに化合物 X (低用量、中用量及び高用量投与群) または媒体である生理食塩液 (対照群) を 14 日間反復経口投与し、投与開始から 14 日間までを観察期間とし、一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行った。その結果、観察期間を通して異常は認められなかった。剖検後、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った結果、化合物 X の高用量投与群の雄 1 例のみに、化合物 X の投与の影響を否定できない異常が認められた。

#### (5) 最適化リード化合物の TLR7 活性化阻害作用機序の解明

クライオ電子顕微鏡を用いて TLR7 と化合物 X との直接の可視化を試みた。ブタ TLR7 について化合物 X を添加なしと化合物 X を添加した条件でクライオ電子顕微鏡解析を行った。その結果、化合物 X を添加した条件では二次元クラス平均化像はほとんどが二量体を示したのに対して、化合物を添加していないものはほとんどが単量体であった。観察された粒子の方位に偏りがあったため、電子顕微鏡観察の際にステージを傾けて撮影すること (tilt 法) で検討した結果、粒子の方位の偏りが大幅に改善され密度マップの質も向上した。この密度マップに対して TLR7 と化合物 X の複合体の構造モデルを構築した。その結果、TLR7 と化合物 X は 2:2 の複合体を形成し、TLR7 は 2 つのプロトマーの C 末端が互いに離れた open 型のコンフォメーション (不活性化型二量体) を形成していた。化合物 X は TLR7 の二量体界面に結合し不活性化型二量体を安定化することで、TLR7 の活性化を阻害すると考えられた。

また、クライオ電子顕微鏡の構造データを基に、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて、TLR7 と化合物 X との結合エネルギーを算出した。クライオ電子顕微鏡の構造データでは、ブタ TLR7 であったため、ヒト TLR7 の配列に置き換えて MD シミュレーションを実施した。また作用機序の理解のため、TLR7 単量体と TLR7 二量体における化合物 X の結合状態を MD シミュレーションで比較検討を行った。その結果、TLR7 と化合物 X との結合自由エネルギーは、平均して  $-62.69 \text{ kcal/mol}$  であった。種差による違いを検討するため、マウス TLR7 でも MD シミュレーションを実施したが、ヒトとマウスとの間では結合エネルギーに差は認められなかった。また、TLR7 単量体では化合物 X は結合を維持できず解離する傾向にあった。一方、TLR7 二量体では結合が維持されたため、化合物 X は二量体状態を認識して結合するタイプの化合物であることが示唆された。

#### (6) 化合物 X の合成ルート最適化の検討

化合物 X の合成には複数の問題点があり、今後、GMP グレードの製造方法を検討するには、合成ルートの最適化が必要である。そこで、化合物 X の製造期間の短縮及び製造コストの削減を目的に、合成ルートの最適化検討を実施した。従来の合成スキームのブラッシュアップと複数の新規合成スキームの検討を進めた。その結果、従来の合成スキームに比べて、より安全性が高く、工程数削減及び収率改善が実現可能な新規合成スキームの開発に成功した。

#### (7) バックアップ化合物のデザイン・合成と *in vitro* 阻害活性評価

クライオ電子顕微鏡法により構造決定されたヒト TLR7 と化合物 X とのドッキングモデルを用いて、バーチャルスクリーニングによりバックアップ化合物を選定した。化合物ライブラリーには、商社が提供するドラッグアブルな約 650 万品目を用いた。ヒト TLR7-化合物 X ドッキングモデルに結合可能な化合物を絞り込み、その後、A) ドッキングスコアに基づく評価と、B) リガンドベースに基づく評価、C) ドッキングとリガンドベース共に上位の 3 評価でそれぞれ、A) 160、B) 172、C) 140 品目をバックアップ化合物として選定した。

ドッキングスコアで上位 40、リガンドベースで上位 40、両者で上位 140 の計 220 品目について商社に在庫等を確認したところ、ロシア-ウクライナ紛争による影響のため、半数以上が供給不可であった。そこで供給可能で評価上位の化合物 30 品目を購入し、TLR7 発現細胞株を用いて化合物の活性を *in vitro* で評価した。その結果、6 つの化合物に TLR7 阻害活性を認め、そのうちの一つはリード化合物 Z と同等の阻害活性を認めた。当該化合物は化合物 X とは化学構造の母核が異なっており、バックアップ候補化合物として期待が持てるものであった。

In this study, two optimized lead compounds with enhanced TLR7 inhibitory activity were subjected to physical properties evaluation, pharmacokinetic and metabolism studies, human cell-

based studies, and pharmacodynamic studies, and one development candidate compound (Compound X) was successfully identified. We also conducted various non-clinical studies on Compound X and established a compound profile. In addition, we investigated the optimization of the synthesis route of Compound X, elucidated the binding mode of Compound X to TLR7 by cryo-EM and molecular dynamics (MD) simulation, and explored backup compounds based on the results of these studies.

(1) Evaluation of physical properties and pharmacokinetic and metabolism studies of optimized lead compounds

Physical properties of the two optimized lead compounds (hereinafter referred to as "Compound X" and "Compound Y") were evaluated using the bulk powder of each compound after synthesis and purification. The maximum blood concentration of Compound X was 1.8 times higher than that of Compound Y. In addition, Compound Y had an unchanged drug residue of about 80% in a 2-hour reaction with human liver microsomes, while Compound X had an unchanged drug residue of about 90% in both a 2-hour reaction with human and mouse-derived liver microsomes. From these results, we conclude that Compound X has better pharmacokinetic and metabolic stability than Compound Y.

(2) Pharmacodynamic study of the optimized lead compound in a mouse model of SLE

NZB/WF1 female mice were orally administered Compound X or hydroxychloroquine (HCQ) as a control drug for 15 weeks. The increases in serum BUN, Cr, urinary protein levels, and blood autoantibody titers (anti-SSA, anti-Sm) of NZB/WF1 mice were significantly suppressed in the Compound X group compared to the placebo (saline) and HCQ groups. Histological analysis confirmed that lesions characteristic of lupus nephritis were significantly suppressed in the Compound X group compared to the placebo group. In addition, it was suggested that the Compound X inhibited immune complex deposition in glomeruli and the activation of complement. Furthermore, long-term administration of Compound X significantly inhibited the progression of lupus nephritis and prolonged the survival rate of NZB/WF1 mice compared to the HCQ and placebo groups.

(3) Evaluation of efficacy of optimized lead compounds against endogenous TLR7 ligands using human cells

Human plasmacytoid dendritic cells (pDCs) were isolated from peripheral blood of healthy individuals, and the TLR7 inhibitory effects of Compound X and Y were examined. These compounds inhibited loxoribine-stimulated IFN- $\alpha$  production more than seed Compound Z. On the other hand, microRNA (miR574) stimulation, a candidate endogenous TLR7 ligand, inhibited IFN- $\alpha$  production more with HCQ than with Compound X and Y. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were also isolated from healthy peripheral blood and stimulated with virus-derived RNA40 or microRNAs (miR574 or let7b). Since IFN- $\alpha$  production and IFN- $\beta$  gene expression were not observed with these stimuli, TNF- $\alpha$  gene expression was examined. miR574 stimulation induced TNF- $\alpha$  gene expression in PBMCs from patients with SLE or rheumatoid arthritis, and that Compound X, Y, and HCQ suppressed this expression. The inhibitory effect was stronger for HCQ, Compound Y, and X, in that order. These results indicate that the optimized lead compounds inhibit TLR7 activation in PBMCs of SLE patients by candidate endogenous TLR7 ligands.

#### (4) Non-clinical studies using Compound X

We were able to establish analytical methods for the concentrations of Compound X and Y in the drug substance and administered solution. Stability tests of the drug substance and the administered solution were conducted for Compound X according to the established analytical method. Compound X in the drug substance or in the dosing sample prepared with saline solution as a medium was stable.

To evaluate the single oral dose toxicity of Compound X, ICR mice were administered Compound X (low, medium, and high dose groups) or saline solution (control group), and were observed for general condition and weighed during the observation period up to 14 days after administration. As a result, no abnormalities in general condition or body weight were observed in the Compound X-treated group throughout the observation period, and no abnormalities were observed in the thoracic or abdominal organs after necropsy. In addition, to evaluate the repeated oral administration toxicity of Compound X, ICR mice were repeatedly orally administered Compound X (low, medium, and high dose groups) or saline solution (control group) for 14 days, and the general condition, body weight, and food intake were measured during the observation period from the start of administration to 14 days. As a result, no abnormalities were observed throughout the observation period. After necropsy, organ weights and histopathological examination revealed that only one male in the high-dose Compound X group had abnormalities that could not be ruled out due to the administration of Compound X.

#### (5) Elucidation of the mechanism of action of optimized lead compounds to inhibit TLR7 activation

Cryo-EM analysis of porcine TLR7 was performed without and with Compound X. The two-dimensional class-averaged images under the condition with Compound X showed mostly TLR7 dimers, whereas those without Compound X showed mostly TLR7 monomers. Because of the bias in the orientation of the observed particles, we investigated the use of tilting the stage during electron microscopy (tilt method), which greatly improved the bias in the orientation of the particles and the quality of the density map. A structural model of the complex of TLR7 and Compound X was constructed for this density map. The results showed that TLR7 and Compound X formed a 2:2 complex, and TLR7 formed an open conformation (inactivated dimer) with the C-termini of the two protomers separated from each other. Compound X was thought to inhibit TLR7 activation by binding to the dimer interface of TLR7 and stabilizing the inactivated dimer.

The binding energy between TLR7 and Compound X was calculated using MD simulations. Since the cryo-EM structural data showed porcine TLR7, MD simulations were performed by replacing it with the sequence of human TLR7. Then, we compared the binding states of Compound X in TLR7 monomer and TLR7 dimer. The binding free energies of TLR7 and Compound X were found to be -62.69 kcal/mol on average. MD simulations were also performed on mouse TLR7, but no differences in binding energies were observed between human and mouse TLR7. In the TLR7 monomer, Compound X could not maintain the binding with TLR7 and tended to dissociate. On the other hand, the binding was maintained in the TLR7 dimer, suggesting that Compound X may recognize and bind to the dimeric state.

#### (6) Study on optimization of synthesis route of Compound X

We conducted an optimization study of the synthesis route with the aim of shortening the manufacturing time and reducing the manufacturing cost of Compound X. We brushed up the conventional

synthetic scheme and examined several patterns of new synthetic schemes. As a result, we succeeded in narrowing down to novel synthetic schemes that are safer, reduce the number of processes, and improve the yield compared to the conventional synthetic schemes.

(7) Design and synthesis of backup compounds and evaluation of *in vitro* inhibitory activity

Backup compounds were selected by virtual screening using a docking model of human TLR7 and Compound X. About 6.5 million druggable items provided by a trading company were used for the compound library. Compounds that could bind to the human TLR7-Compound X docking model were selected, and then A) 160, B) 172, and C) 140 compounds were further selected as backup compounds based on A) docking score, B) ligand-based evaluation, and C) both docking and ligand-based evaluation, respectively. When we confirmed the availability of a total of 220 compounds (top 40 in docking score, top 40 in ligand-based score, and top 140 in both scores) with trading companies, more than half of them were not available due to the Russian-Ukrainian conflict. Therefore, we purchased the top 30 compounds that were available, and evaluated their activities *in vitro* using a mouse TLR7-expressing cell line. As a result, six compounds showed TLR7 inhibitory activity, and one of them showed inhibitory activity equivalent to seed Compound Z. The chemical structure of the compound was different from that of Compound X, suggesting that this could be a candidate for backup compounds.

### III 事後評価総合所見

SLE 治療薬を目指して TLR7 選択的阻害薬の開発候補化合物として化合物 X を特定しマウスモデル等でその有用性を検証したことは高く評価できる。既存承認薬である HCQ との薬効比較を種々行って優位性を確認している。PK/PD のデータを基にした詳細な薬効プロファイルの確認が必要である。

一方、マウス反復投与毒性試験で認められた化合物 X の高用量投与群の雄 1 例のみにおいて、化合物 X の投与の影響を否定できない異常が認められた件については、用量依存性、PK との関係、投与期間、回復性などを精査する必要があると思われる。ヒト POC 試験までをアカデミアと現在の企業が共同で進めた後に大手企業へライセンスアウトするという事業計画であるが、全体の開発戦略の観点からは、POC 試験段階から大手企業との提携も検討いただきたい。今後の開発に期待する。