

(様式5)

# 学 位 論 文 要 旨

平成 30 年 1 月 9 日

学位申請者

細木 淳 印

## 学位論文題目

ピペラジン環骨格を有する新規キナーゼ阻害剤のモノアミノオキシダーゼB及びアルデヒドオキシダーゼによる代謝

---

## 学位論文の要旨

### 1. 背景・目的

医薬品の多くは体内にて代謝を受け、体外に排出されることから、医薬品候補化合物の代謝について解析することは、臨床での医薬品の薬物動態を予測し、適切な用法用量を設定する上で重要である。上市されている医薬品の約80%はシトクロームP450 (CYP) で代謝されることから、多くの製薬企業では、CYPに対する代謝安定性やCYP阻害に関するスクリーニング法を開発し、医薬品開発に利用している。このようにCYPによる代謝を制御、回避する方法論が進歩した一方で、候補化合物がCYP以外の薬物代謝酵素 (Non-CYP) により思わぬ代謝を受け、開発中止に追い込まれる事例の報告が増加している。

KW-2449は、白血病治療薬候補物質として開発されていたFLT3キナーゼ阻害を主な薬理作用とする新規キナーゼ阻害剤であり、ピペラジン環骨格を有する。KW-2449は生体外試験において高い有効性を示したにもかかわらず、臨床試験において、十分な抗腫瘍活性を示せず開発中止となった。そこで本研究では、KW-2449が十分な有効性を示せなかったこと背景にあるメカニズムを解明し、それにより、類似薬物の開発における問題の解決に資することを目的とした。

KW-2449は臨床試験において以下に挙げる想定外の薬物動態を示したことから、特にそのメカニズムについて検討した。

1. KW-2449のピペラジン環部分がオキソピペラジン体 (M1) に変換され、速やかにKW-2449の血中濃度が低下した。

2. 薬理活性を有するM1の血中濃度も反復投与により著しく低下し、M1によるキナーゼ阻害も不十分となった。

KW-2449はCYPへの代謝安定性を高めた化合物であり、その代謝にはNon-CYP酵素の関与が考えられたことから、Non-CYP代謝酵素の寄与を中心に検討した。

### 2. 研究1 - KW-2449のM1への代謝経路の解明

第一に、KW-2449が臨床試験において短半減期を示し、十分な曝露が得られなかった点について、そのメカニズムを検討した。

肝細胞を用いたKW-2449の代謝物プロファイル解析では、ヒトにもっとも近いKW-2449の代謝を示す動物種はカニクイザルであり、ヒト、サルではM1が主代謝物であったのに対し、ラット、イヌではほとんどM1は産生されなかった。次いで、サル及びラットにKW-2449を投与した

ところ、サルではヒトと同様に短半減期を示し、*in vivo*でもM1が主代謝物として検出されたが、ラットではM1の産生は認められず、長半減期を示した。サルにおけるKW-2449からM1への変換率は30%前後と高く、M1への代謝がKW-2449の短半減期、低曝露の原因と考えられた。

KW-2449からM1への代謝には代表的な薬物代謝酵素であるシトクロームP450 (CYP) の関与は認められなかった。シアン化ナトリウムを用いた代謝中間体のトラップ法を用いて、M1への代謝中間体としてイミニウムイオンが存在していることを見だし、阻害剤、酵素発現系を用いた検討により、KW-2449がモノアミンオキシダーゼB (MAO-B) によってイミニウム中間体へと代謝され、さらに、このイミニウムイオン中間体がアルデヒドオキシダーゼ (AO) によりM1に代謝されることを明らかにした。この代謝機構はピペラジン環の代謝としては、本研究で初めて同定した。また、MAO-B及びAOの活性には種差が知られており、特にAO活性は霊長類>>げっ歯類>イヌであることから、ラットやイヌで、ほとんどM1が産生されず、ヒト、カニクイザルで主代謝物であった原因は、AO活性の種差が一因であると考えられた。

MAO-B、AO共に全身に発現している代謝酵素であることから、MAO-B及びAOが代謝に関与した場合にヒトの全身クリアランスを予測する方法について、比較検討を行った。肝細胞の代謝データをサルの*in vivo*データで補正することにより、従来法では大幅に過少評価していたクリアランスを2-4倍の実用的精度で予測可能であった。

### 3. 研究2 - 反復投与によるM1濃度低下の原因解明

第二に、KW-2449の臨床試験において薬理活性をもつ代謝物であるM1の濃度が反復投与により著しく低下した原因を検討した。

ヒトと類似した代謝物プロファイルを持つカニクイザルにKW-2449を反復投与したところ、サルでもヒトと同様にM1濃度が顕著に低下した。サルにおけるM1濃度は投与翌日には低下していたことから、M1濃度低下の原因として、M1産生酵素 (MAO-B及びAO) の阻害が推測された。

KW-2449及びM1の代謝酵素阻害検討から、KW-2449及びM1がMAO-Bを競合阻害することを見出したが、その阻害定数 ( $K_i$ ) は臨床におけるKW-2449及びM1濃度よりも十分低く、臨床においてMAO-B阻害が生じる可能性は低いと考えられた。次いで、KW-2449のイミニウムイオン中間体の代謝酵素阻害能を検討し、イミニウムイオン中間体がAOを不可逆的に阻害することを見出した。その阻害パラメータは臨床でCYPを不可逆的に阻害することが知られている他の阻害剤に匹敵する値であった。また、各国規制当局から発出されているガイドラインによる評価法でも、酵素阻害が強く疑われるレベルであり、反復投与によりM1濃度が低下した原因はイミニウムイオン中間体によるAOの不可逆阻害であると考えられた。

イミニウムイオンのような化学的に活性な代謝物 (反応性代謝物) は生体中のタンパクと不可逆的に結合することで、特異体質的な毒性を惹起することが知られているため、本検討の結果から、KW-2449も代謝活性化を介してタンパクへ共有結合することが懸念された。サルに $^{14}\text{C}$ -KW-2449を経口投与したところ、放射能の血漿上清への回収率は時間依存的に低下し、 $^{14}\text{C}$ -KW-2449由来の放射能が血漿中タンパクに共有結合していることが強く示唆された。MAO-B阻害剤及びイミニウムイオン捕捉剤 (シアン化ナトリウム) を用いたタンパク結合実験から、イミニウムイオン中間体がタンパクとの共有結合を起こしていることを明らかにした。イミニウムイオン中間体によるタンパクとの共有結合量は、過去に報告されている毒性発現リスクのカットオフ値を超えており、臨床試験において毒性発現の危険性を有していたことが示唆された。

### 4. 考察

研究 1、2 の結果から、KW-2449 が臨床試験において十分な薬効を示せなかった原因は、MAO-B 及び AO による協奏的代謝にあると推定された。これはピペラジン環の代謝経路としては本研究で初めて明らかにした機構である。すなわち、KW-2449 が速やかに M1 に代謝されることで KW-2449 濃度が低下し、KW-2449 本体によるキナーゼ阻害が不十分となった。次いで、代謝中間体であるイミニウムイオンの AO 不可逆阻害により、薬理作用を有する M1 の

濃度も反復投与で低下し、結果として M1 によるキナーゼ阻害も減少したと考えられた。また、イミニウムイオン中間体による AO の阻害はイミニウムイオン中間体の M1 への変換率を低下させ、タンパクへの共有結合量を増加させた可能性もある。

このように、CYP の代謝安定性を指標に化合物を選択する場合、Non-CYP 代謝を見落とすことがあり、薬物動態や安全性上の問題につながる可能性がある。KW-2449 の薬物動態上の問題点を改善するため、本研究の前段部で明らかにした KW-2449 の体内代謝機構を根拠として、MAO-B 及び AO による代謝に対する安定性を高めた後続化合物 Compound A が合成された。その結果、Compound A は薬物動態プロファイル、タンパクとの共有結合量とも KW-2449 に比べて改善していた。このことから、医薬品候補化合物が Non-CYP 酵素による想定外の代謝を受けた場合においても、その代謝経路や代謝中間体の物性を分析し、代謝安定性を高める戦略は、より優れた化合物を創出する上で有効であることが示された。

ピペラジン環のような *N*-ヘテロ環構造は、開発中の他の多くの医薬品においても、化合物の溶解性の向上や CYP に対する代謝安定性向上を目的に導入されている構造である。*N*-ヘテロ環構造が代謝されてラクタム型に変換される事例は多くの医薬品で報告されているが、これまで詳細な代謝機構を検討した報告は少なく、本研究で明らかにした MAO-B 及び AO によるピペラジン環の協奏的代謝は、今後 *N*-ヘテロ環化合物の代謝経路を検討する上で有用な知見であると考えられる。

また、本研究で実証した代謝中間体の捕捉法、代謝中間体による酵素阻害の評価法、ヒトの薬物動態予測法は、反応性代謝物や Non-CYP 代謝が医薬品の代謝に介在する場合に、その影響を精査する上で有用であると考えられる。本研究において得られた知見は、医薬品の安全性確保と有効性確保の両方の観点から、今後の医薬品開発において活用しうるものと期待される。

(様式6)

## S u m m a r y

Applicant for degree :

Jun Hosogi

Title of thesis :

Metabolism of a novel tyrosine kinase inhibitor containing piperazine moiety mediated by monoamine oxidase B and aldehyde oxidase

### Summary

This study was conducted to investigate the cause of clinical failure of a novel tyrosine kinase inhibitor, KW-2449, which was developed as a drug candidate for leukemia, even though it appeared the remarkable drug efficacy *in vitro* condition.

In this study, we discovered that the unique metabolic pathway of KW-2449 to its oxo-piperazine form (M1) and the inhibition mechanism of its metabolizing enzymes. These findings were possible phenomena applied in common to the compounds which have piperazine moiety.

Firstly, we revealed that the contribution of typical metabolic enzyme cytochrome P450 (CYPs) to the metabolism of KW-2449 to M1 was minimal and KW-2449 was primarily metabolized to an iminium ion intermediate by monoamine oxidase B (MAO-B) and the iminium ion intermediate was metabolized to M1 by aldehyde oxidase (AO).

Also, we demonstrate that the human body clearance mediated by MAO-B and AO can be predicted by correcting the *in vitro* hepatocyte data using *in vivo* cynomolgus monkey data.

Secondary, the investigation of inhibitory parameters of KW-2449 and M1 on MAO-B and AO revealed that direct inhibition of MAO-B and AO by KW-2449 and M1 would not be a main cause of the decline of M1 concentration after repeated administration of KW-2449. We identified that the iminium ion intermediate inhibited AO irreversibly and caused covalent bindings to endogenous proteins.

These results suggest that the main cause of the failure of KW-2449 in the clinical trial was a cooperative metabolism by MAO-B and AO discovered in this study. Primary metabolism by MAO-B decreased KW-2449 concentration and the irreversible inhibition on AO by the iminium ion intermediate hampered the target kinase inhibition by M1. AO inhibition might be also involved in the increase in the covalent binding to endogenous proteins by reducing the conversion ratio of the iminium ion intermediate to M1.

In these days, the screening methods for stable compounds against typical drug metabolizing enzyme CYPs were greatly developed, resulting in increasing the chances of facing unexpected metabolism mediated by non-CYPs, such as MAO and AO. To improve the pharmacokinetic issue of KW-2449, a successor compound which was more stable against MAO-B and AO metabolism was newly synthesized. This successor compound showed that superior pharmacokinetic profiles and less covalent binding to endogenous proteins than those of KW-2449.

These results indicated that the optimization of drug candidate through identifying the metabolic pathway and investigating the physicochemical properties of metabolic intermediate,

was effective to create successor compounds with better profiles even when the drug candidate was metabolized by Non-CYP metabolizing enzymes.

*N*-heterocyclic structures including piperazine moiety are introduced to a lot of marketed and drug candidates under development. Therefore, the pharmacokinetic methodologies established in this study are valuable for the future drug development from the perspective of ensuring drug efficacy and drug safety.