

研究要旨 我々はRas機能阻害作用を有する医薬候補化合物を創出するためにRas構造情報を用いたインシリコ及び生化学・細胞生物学的スクリーニングで見出されたヒット化合物からメドケム手法により構造展開を実施してリード化合物 KMR084 を見出し、特許（特願2011-105613）を出願した。さらに特許の強化を目的にフラグメントリンク法からの合成展開を加え2012年に国際出願（国際出願番号 PTC/JP2012/061908）を完了し、国内大手製薬企業へ特許実施権許諾契約を締結した。本研究では先行開発研究としてリード化合物の構造最適化研究を導出先製薬企業が実施することを研究目標とし、一方後行開発研究では新規ポケット構造情報を用いた新たなスクリーニング（コンピュータ・ドッキングシミュレーションと生化学・細胞学的活性評価）により先行開発化合物とは構造の異なるリード化合物をバックアップリードとして見出し非臨床候補化合物を創出することを研究目標として設定した。本年度は既保有ヒット化合物および新たなインシリコスクリーニングより見出されたリード化合物からの構造展開を実施し新たなリード候補化合物の創製を進めている。

A．研究目的

先行開発

保有するリード化合物 KMR084 の構造最適化研究（リード最適化シミュレーション）は本化合物を含む特許の実施権を許諾した国内製薬企業と神戸大学が実施し、開発候補化合物の早期創製を目的とする合成展開を実施する。保有リード化合物からの化合物のデザインと合成は製薬企業が実施することから、我々の分担研究機関では後行開発を実施する。

後行開発

後行開発では保有リード化合物 KMR084 とは構造の異なる新規リード化合物の創製を研究目的とする。

1) 出願済み特許（PCT/JP2010/61821, PCT/JP2012/052078）に記載されている新規ポケット構造に基づく大規模インシリコドッキングシミュレーション（H23, 24年度）から得られるインシリコヒット化合物より生化学・細胞学的活性が確認された化合物を選抜し、構造展開によるバリデーションを行い、母核構造の異なる新規リード候補化合物の可能性を検証し創製する。

2) 既保有ヒット化合物であるチオセミカルバジド誘導体 Kobe0065 を基に、フラグメントリンク法並びにMOEを利用して新規誘導体をデザイン・合成し、保有リード化合物 KMR084 とは母核構造の異なるリード候補化合物の可能性を検証し創製する。

B．研究方法

後行開発

1) 神戸大学で既に出願された新規ポケット構造情報に基づき大規模インシリコドッキングシミュレーションを実施した。対象となる市販化合物ライブラリーはフラグメントエボリューションを目的とする比較的分子量の化合物ライブラリーと分子量にはこだわらないドラッグライクなライブラリーとした。得られたインシリコヒット化合物は生化学・細胞学的活性評価により絞り込みを実施し、それらを構造分類後、合成法、特許既知情報・市販類似化合物の調査を行うと共に、活性データと溶解性など物性データも加味して構造展開性を総合的に解析する。構造展開の可能性が認められたヒット化合物から新たな化合物デザインと合成を行い、生化学・細胞学的活性評価を実施し、新規性のあるリード候補化合物へと導く。

2) 神戸大学で既に見出されている Kobe0065 など既に保有するチオセミカルバジド系ヒット化合物については、これまでに得られているフラグメントリンク手法を応用したデザインや MOE を利用しデザインを行い、構造の展開性を検証する。また、チオセミカルバジド構造を回避する目的でデザインした母核構造の新規等価変換体について見極めを行う。合成する誘導体はこれまで得られている構造活性相関や計算科学的な手法も取り入れた合理的なデザインを行う。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組み換え実験や動物実験は含まれておらず、有機合成化学的手法によるものである。

C. 研究結果

後行開発

1) ドラッグライクな化合物ライブラリーからインシリコスクリーニングによって見いだされたヒット化合物についてRas阻害活性評価を実施した結果、低い水溶性のため結合阻害活性の評価は困難であったが、細胞系の活性評価系で阻害活性を示す化合物が19種類見出された。そこで、これらの化合物の物性(水溶性)の改善を目的に、積極的に優先度の高い7種の化合物を選択し、これらを初期化合物としてStarDropNovaを用いて水溶性の改善が期待できる誘導体構造を複数発生させた。さらに、その中から構造展開性より選抜した化合物について結合自由エネルギーを計算することにより、物性、構造展開性、阻害活性の改善を合わせ持つ化合物群3シリーズ(KBFM561、KBFM492、KBFM580)を得た。これら3シリーズの中から、既保有ヒットKobe0065(チオセミカルバジド構造)と構造類似性の高いKBFM561シリーズにまず着目し、新規誘導体5化合物(NKB038-042)をデザイン・合成した。その結果、2化合物については物性の改善は認められたものの、結合阻害活性では有意な活性は認められなかった。2つ目のヒットであるKBFM492シリーズについても現在誘導体の合成を実施中であり、物性の改善と結合活性の評価により検証を進める予定である。

2) 既保有ヒット化合物からの展開については、*in vitro*と*in vivo*の評価で共に先行開発化合物KMR084と同様に活性が明らかにされているチオセミカルバジド系化合物の構造展開性を再度検討した。まず、チオセミカルバジド構造を保持した上で、これまでの構造活性相関やフラグメントリンク法で得られた知見を活用しデザインした9化合物(NKB002, 005, 20-29)を合成した。その結果、フラグメントリンク法を応用したKNB023は、既存ヒット化合物Kobe0065を結合阻害活性と細胞系評価において共に同等以上の活性を示し、さらに担癌モデルマウス(腹腔内投与)での抗癌作用においても同等の腫瘍増殖抑制作用を示した。一方、さらにRasの特定残基との水素結合形成による活性向上を目的にデザインしたNKB024(塩基性基の導入)やNKB028(フラグメントの伸長と塩基性基の導入)は結合阻害活性において大幅な低下が認められた。このことは今回導入したフラグメントリンクがドッキングシミュレーションから予測したRas結合部位に配置できていないことを示唆した。

また、チオセミカルバジド構造の等価変換を目的とする新規母核誘導体の可能性を検証するために、これまで得られている構造活性相関やフラグメントリンク法の知見を活用した誘導体を主に合成した。新たに8化合物(NKB030-037)を加えた計27化合物をデザインし合成したが、いずれの化合物も結合阻害試験で活性の大幅な低下が認められた。今回、チオセミカルバジド構造に変わり得る母核構造としてはポテンシャルは低いことが確認されたことから、今後の本構造展開は中止することとした。

D. 考察

非前臨床試験候補と成り得る新規構造を持つリード化合物の創出を目的に、計算科学的手法によるインシリコスクリーニングヒットからの展開や既保有ヒットからの創薬化学的手法による展開など複数のアプローチを検討し実施している。ドラッグライクである程度の分子量を持つライブラリーから得られたヒット化合物からの誘導体展開については、溶解性の改善と結合阻害活性の発現を両立する化合物を得るには至っていない。そこで現在、既存ヒット化合物Kobe0065のチオセミカルバジド構造と母核構造の等価性が期待できるKBFM492シリーズの合成展開の可能性を見極めるため、既存ヒット化合物の構造活性相関の活用と水に対する溶解性向上を考慮に入れた誘導体合成を進め、結合阻害活性の確認を実施する予定である

また、セミカルバジド構造の回避を目的とした本年度検討した等価変換体構造では活性の維持向上は認められなかった。セミカルバジド構造には2つのアミド結合があり、それぞれのシス、トランス異性体から4種の幾何異性体の存在が考えられる。今後、それぞれ配座を安定させるために修飾を加えた類縁体をデザイン合成し、結合活性への影響を確認する。

さらに、既保有ヒットからのフラグメントリンク法を活用した合成展開では新規なポケット構造情報とRas結合部位情報を再度見直すと共にその結合シミュレーション解析を加えることでデザインの精度を向上させていきたい。

E. 結論

インシリコスクリーニングから選択された化合物については生化学・細胞学的活性データ、物性(溶解性)、合成法、既知特許情報に加えて標的蛋白質Rasとの理論計算科学的な解析など様々な視点からデザイン・合成・評価を進めているが、難易度が高く先行開発で進めているリード化合物KMR084と構造の異なる新規リード化合物を得るには

至っていない。考察に記したKBFM492シリーズ化合物からの展開、セミカルバジド構造のフラグメントリンク法から新たに見出したNKB023からの展開も含め、ポケット構造情報に基づく計算科学による合理的なアプローチにより、ツルヒットを見極め、リード候補化合物の早期創製を目指す。

G．研究発表

1．論文発表

無

2．学会発表

無

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

出願日：平成23年5月10日

出願番号：特願2011-105613

発明の名称：Ras機能阻害作用を有するチオキノチアゾリジン誘導体

国際出願番号：PTC/JP2012/061908

国際出願日：平成24年5月9日

国際公開番号：WO2012/153775 A1

2．実用新案登録

無

3．その他

無