

Ras機能阻害活性を有する化合物の有機合成による構造展開

研究分担者 閏 正博

神戸天然物化学株式会社 創薬化学部長

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 *in silico* 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2012年に国際出願（国際出願番号 PTC/JP2012/061908）後、国内大手製薬企業へ特許実施権許諾契約を締結した。本特許は2015年2月に米国での特許化（Application No. 14/116,152）を完了した。先行開発研究ではフラグメント化合物 KBFM123 及びリード化合物 KMR084 の部分フラグメント化合物の Ras との結合情報を NMR で解析し構築した複合体モデルを用い統合計算科学システム MOE による計算を実施した。その結果に基づいた化合物のデザインと合成によるリード化合物の構造最適化研究を開始した。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コンピュータ・ドッキングシミュレーションによる *in silico* スクリーニング及び新たに構築したELISA法による保有ライブラリーのスクリーニングを実施し、得られるヒット化合物の構造情報を基に先行開発化合物とは構造の異なるリード化合物の探索を実施した。バックアップリード化合物の同定と構造最適化により非臨床候補化合物の早期創出を研究目標として設定し研究を進めている。

A．研究目的

先行開発

保有するリード化合物KMR084の構造最適化研究を研究目的とする。

リード化合物KMR084の部分フラグメント構造及び新たに見出したフラグメント化合物KBFM123とのNMR及びHADDOCKを用いた結合情報や複合体モデル構造を活用した統合計算科学システム(MOE)によりインシリコで新規な化合物をデザインする。デザインされた化合物を実合成とアッセイにより見極めと構造展開により保有リード化合物KMR084の構造最適化を実施する。

後行開発

後行開発では既保有リード化合物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) 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及びドラッグライブラリーからのインシリコスクリーニング選抜ヒット化合物(KBFM561, KBFM492)の構造展開性を検証するために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を創製する。

2) 新たに構築されたELISA法を用いた神戸大保有ライブラリーのスクリーニングから見出され

るヒット化合物のリードへの構造展開性を検証するためにその誘導体をデザイン・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を創製する。

B．研究方法

先行開発

フラグメントマーキング法とフラグメントリンク法を活用した保有リード化合物KMR084の構造最適化研究では、これまで実施された新規ポケット構造をターゲットとしたドッキングスクリーニングからの低分子フラグメントの構造情報やNMRやHADDOCKを用いたH-Rasとの複合体モデルからの結合情報を活用し、統合計算科学システム(MOE)を用いて新たな化合物をインシリコでデザインする。デザインした新規化合物については、合成法も含めて検討し、実合成を行い、その構造活性相関から合成展開性を検証する。

後行開発

1) 神戸大学において実施された大規模 *in silico* ドッキングシミュレーションにより得られた既保有ヒット化合物チオセミカルバジド誘導体(Kobe0065)からの構造展開としてフラグメントリンク法の応用による化合物デザイン・合成を実

施した。本年度は extended な構造を有するチオセミカルバジド構造を folded な環構造へ変換することにより結合阻害活性の向上を試みた。

また、ドラッグライブラリーからのインシリコスクリーニングから選抜した 2 化合物 KBFM561 及び KBFM492 の誘導体をデザイン、合成し、その構造活性相関から合成展開性を検証する。

2)新たに構築された ELISA 法を用いた神戸大保有ライブラリーのスクリーニングから見出される新たなヒット化合物について周辺誘導体をその構造特性に基づきデザイン、合成し、得られる構造活性相関から合成展開性を検証する。

(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

先行開発

新規ポケット構造をターゲットとしたドッキングスクリーニングからの低分子フラグメントの構造情報やNMRやHADDOCKを用いたH-Rasとの複合体モデルからの結合情報を活用し、神戸大で統合計算科学システム(MOE)を用いた新たな化合物のインシリコデザインが実施された。これらデザインされた新規化合物についてRasとの予測結合モードの3次元グラフィックスをもとに合成的な見地も含め協議を重ね、合成可能な52化合物の化合物群をデザインし、再度のシミュレーションを実施し、優先順位付けを行い、化合物の合成を開始した。既に合成した3化合物についてはRas/Raf阻害活性は確認できたが、KMR084を上回る化合物を見出すには現時点では至っていない。優先順位の高い化合物を順次合成し評価する予定である。

後行開発

1)既保有ヒット化合物チオセミカルバジド誘導体(Kobe0065)からの構造展開としてフラグメントリンク法の応用により27化合物をデザインし合成したが、チオセミカルバジド構造を回避する結合様式を見出すことは出来なかった。本年度はチオセミカルバジド構造回避とより高い親和性を求めて環状化構造への変換を実施した。extended な構造を有するチオセミカルバジド構造を folded な環構造へ変換した5化合物(NKB047, 048, 049, 053, 054)を合成したが水溶性が大きく低下したため、結合阻害活性を評価することが出来ない結果となった。

また、ドラッグライブラリーのインシリ

コスクリーニングから選抜したヒット化合物KBFM561から構造展開については既存保有ヒット化合物Kobe0065との構造類似性にも着目し、フラグメントリンク法からの構造情報も加味した新規誘導体5化合物(NKB040, 041, 042, 043, 044)をデザインし合成した。結果としてこれら5化合物に結合阻害活性を見出すことは出来なかった。一方、KBFM492からの誘導体NKB045には良好な水溶性と弱いながらもELISA系で結合阻害活性が認められたことから、さらにその周辺誘導体16化合物(KNB046~065)を合成したがNKB045を上回る阻害活性を示す化合物を見出すには至らなかった。

2)新たに構築されたELISA法を用いた保有ライブラリーのスクリーニングからKobe2400、Kobe0066およびKobe0067が見出された。Kobe2400はH-Rasへの阻害活性が比較的高いことが明らかとなり、合成展開に向けて誘導体合成を実施した。本化合物はイミン結合を2か所対称に持つ化合物で、構造特性としてアルデヒドとアミンへの分解が予想される。分解で生じるアルデヒドを評価した結果、阻害活性が確認されたがRas特異的な阻害ではないことが細胞系の評価で明らかとなった。そこで分解が起こらないより安定なアルキルアミン構造へ構造変換することを試みた。その結果、合成したアルキルアミン体(NKB067)は弱いながら阻害活性は認められたが、その類縁体であるKNB070, 075, 076, 077には活性が認められなかった。

もう一つのヒット化合物Kobe0067はKobe2400と同一のチアジアゾール母核を有し、Kobe0067の追加合成と共にその誘導体NKB071, 072, 073, 074を合成した。これら4化合物はELISA法では強い阻害活性を、また従来法であるOriole-dye法でもNKB073, 074は阻害活性を示したがcell-based assay系からはRas特異的な阻害活性ではないことが明らかとなった。一方、ヒットKobe066はKobe0065と同じ部分構造であるヒドラジン構造を含有する化合物であるが、その後の評価結果より下流のMEK、Arkのリン酸化抑制作用が確認されたことよりその後の構造展開はペンディングとした。

D. 考察

先行開発

現在、保有するリード化合物(KMR084系)、シード化合物(Kobe0065系)並びにリード化合物のフラグメント化合物のRasとの複合体モデル構造情報やNMRによる解析で得られたRasとの結合情報を統合する計算科学システムMOEを用いて、新たなシード化合物の構造デザインに着手した。これ

らのデザイン化合物を基に合成法も加味した複数のタイプの化合物群をデザインし、それらをさらにMOEにより再解析評価を実施し、優先度の高い化合物の絞り込みを行い化合物合成を進めている。本法により保有するリード化合物KMR084の構造最適化研究を効率的に進める。

後行開発

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、本年度は既保有ヒット化合物やドラッグライブラリーのインシリコスクリーニングヒット化合物からの創薬化学的手法による展開、並びに新たなELISA法を用いた保有ライブラリーのスクリーニングヒットからの展開と複数のアプローチを実施した。既保有ヒット化合物からの展開では毒性懸念のあるチオセミカルバジド構造の回避を目的に環状構造への変換を試みたが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らなかった。また、適正な分子量を持つドラッグライクなライブラリーから得られたインシリコスクリーニングヒット化合物からの誘導体展開については、阻害活性を示す化合物を得るには至らなかった。また、新たに構築されたELISA法を用いたスクリーニングからは既存保有ヒット化合物とは構造の異なるヒット化合物が得られたことより、ヒット化合物の検証のために新たに周辺誘導体をデザインし合成した。その結果、結合阻害活性を示す化合物も見出されたが、細胞評価系においてRas特異的な阻害ではないことが明らかとなり、目的とする別骨格リード候補化合物を見出すには至っていない。

E . 結論

既保有ヒット化合物に加え、新たなスクリーニングにより見出したヒット化合物を含めそれぞれのヒット化合物からリード創出のための構造展開を実施したが、先行するリード化合物KMR084と構造が異なり、且つ同等以上の活性を有するリード候補化合物を見出すには至っていない。

今後はこれまで蓄積されたRasと様々な化合物との複合体構造情報や結合情報を統合する計算科学システムMOEの活用により、既保有ヒット化合物KMR084の構造最適化と共に別骨格構造を持つヒット創出とその構造展開からのリード化合物の創製を早期に達成する。

G . 研究発表

1 . 論文発表

該当なし

2 . 学会発表

該当なし

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

米国特許化：

US Pat Application No.: 14/116,152

Filing Date: 01/17/2014

Title of invention: Thioxothiazolidine derivative having Ras function inhibitory effect

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

特記事項なし