

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：次世代ヘリックス模倣ライブラリーの構築

Construction of Next Generation Helix-Mimetic Libraries

研究開発実施期間：平成 27 年 11 月 2 日～令和 2 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：高島 一

Hajime Takashima

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

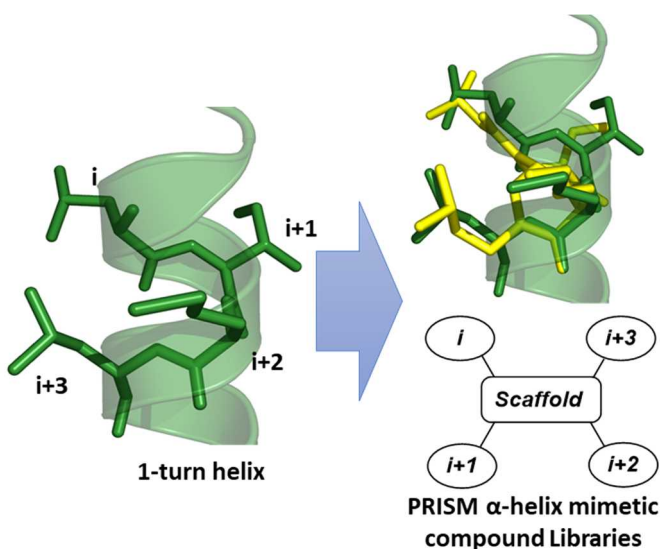
株式会社 PRISM BioLab 研究開発部 部長

PRISM BioLab Co., Ltd., Research and Development Dept., Director

II 研究開発の概要

(1) 研究開発の目的

PRISM のペプチド模倣低分子を創出する技術は、多くの製薬会社が過去精力的に挑戦したにも関わらず実現できていない細胞内タンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) を制御できる技術である。本技術を用いて、広範囲な PPI を標的にした「次世代ヘリックス模倣ライブラリー」として 15,000 化合物の構築を行う。併せて新たなヘリックス模倣化合物設計に基づいた新規テンプレートを開発する。また、最終年度は当初予定であったライブラリー構築計画を変更し、PPI 創薬を指向して構築した次世代ヘリックス模倣化合物ライブラリーの創薬における有用性を検証する。



(2) 研究開発項目及び成果

1) 次世代ヘリックス模倣ライブラリーの構築

1-1) 1 ターンヘリックス模倣ライブラリーの構築

1 ターンの α ヘリックス模倣として 4 つのアミノ酸側鎖を模倣したライブラリーの設計を行った。置換基の種類としては、PPI に関与することが知られているアミノ酸の側鎖のほかに、これまであまり合成実績がなかったアルコールやアミドなどの高極性の置換基などを加えてライブラリー化合物の多様性を持たせ、計 7,744 化合物の設計を行った。高極性官能基の官能基変換や保護基を検討して反応条件を確立した結果、90%以上の純度で 7,106 化合物の合成を完了した（合成成功率 91.8%）。

1-2) 1 ターン親水性アミノ酸モチーフライブラリーの構築

自社内での蛋白質間相互作用の配列解析の結果から PPI に重要な親水性アミノ酸を含む配列モチーフが見出された。これに対応するための 1 ターン親水性アミノ酸モチーフライブラリーとして、3,840 化合物の設計を行った。新たな側鎖の種類に対応するべく保護基の選択や反応条件、精製条件の検討を行い合成手法を確立し、計 3,554 化合物の合成を完了した（合成成功率 92.6%）。

1-3) 2 ターンヘリックスライブラリーの構築

従来の 1 ターンヘリックスライブラリーの骨格を拡張利用することで、アミノ酸側鎖を最大 5 つまで取り込んだ化合物を設計した。これにより、1, 4, 7 番目の 3 アミノ酸の模倣といった従来では難しかった 2 ターンヘリックスも模倣でき幅広いターゲットに対応できるようになった。これまでと異なる合成原料や中間体を利用するため合成検討も新たに行い、最終的に 3,861 化合物の合成を完了した（合成成功率 96.5%）。

2015～2018 年度の 4 年間であわせて計 14,521 化合物の合成を 90%以上の合成成功率で達成し、4 年間のマイルストーンであった 12,000 化合物を上回る次世代ヘリックス模倣化合物ライブラリーの構築を行った。このライブラリーは構造活性相関を推定するのに十分な多様性と適度な密度を持っており、特に α ヘリックスを標的とした PPI 創薬において十分意味のあるライブラリーと言える。合成したライブラリー化合物は AMED の産学協働スクリーニングコンソーシアム (DISC) に提供済みであり、産学一体となった創薬活動への貢献が期待される。

2) ヘリックス模倣新規テンプレートの開発

2-1) 新規アザビシクロテンプレートの開発（研究開発分担者・横浜薬科大学 高橋孝志、増井悠）

新規アザビシクロ骨格を有する α ヘリックス模倣化合物を開発した。出発原料の大量自動合成法を確立し（Beilstein J. Org. Chem. 2017, 13, 106-110）、目的のアザビシクロ化合物を複数合成することに成功した。本テンプレートは置換基の位置がこれまでと異なる場所にあるのが特長であり、新しい様式の α ヘリックス模倣化合物ライブラリーを構築することが期待できる。

2-2) ワンポット合成を駆使した新規テンプレートの開発（研究開発分担者・東京工業大学 中村浩之、布施新一郎）

ペプチド模倣可能で立体性に富んだ三次元骨格をもつ新規 bicyclo[3, 3, 1]non-2-ene テンプレートを開発した。また、Ugi 型反応を利用した 3 成分ワンポット合成法を確立した。開発した新規テンプレートを用い、

低酸素誘導因子 HIF-1 α と補因子 P300 との PPI に関する α ヘリックス構造を模倣した化合物をデザイン、合成し評価した結果、IC₅₀ 値が 3.0~6.3 μ M を示す化合物を見出した (Bioorg. Med. Chem. 2018, 26(12), 3345-3351)。

2-3) ヘリックス模倣新規テンプレートの設計と骨格多様化合成 (研究開発分担者・東京農工大学 大栗博毅、坪内彰)

PPI を司る 1 ターンヘリックスの立体構造の 4 つのアミノ酸側鎖を模倣する新規テンプレートを設計するとともに合成法を改良し、合成した化合物群の中から抗癌活性を有する化合物を取得した。

以上のように蛋白質間相互作用 (PPI) の制御を志向した新規テンプレート骨格及びライブラリー構築につながる合成法を開発した。当初はこれら新規テンプレートを用いたライブラリー構築を最終年度に予定していたが、PPI を指向して構築してきた次世代ヘリックス模倣化合物ライブラリーの創薬における有用性を検証するため、最終年度は以下の研究開発を実施した。

3) 次世代ヘリックス模倣ライブラリーを用いた PPI 阻害剤の探索

本ライブラリーの化合物はヘリックスを模倣しているため、標的となる PPI としては一方の蛋白質がヘリックスを形成して結合することが望ましい。今回はモデルケースとして天然変性蛋白質 (IDP) が関わる PPI として、c-Myb/MLL と KIX 蛋白質との相互作用系をとりあげた。転写コアクチベーター CBP (CREB-Binding Protein) の KIX ドメイン領域に結合する c-Myb や MLL などの転写因子群は、ヘリックス構造を形成して KIX と結合する天然変性蛋白質 (IDP) であり、本相互作用系は抗癌剤や白血病治療薬の有望な標的部位である。そこで、c-Myb/MLL と KIX の相互作用系を標的とした抗癌剤の創出を目指し、次世代ヘリックス模倣化合物ライブラリーから化合物探索を行った。

3-1) ヘリックス模倣化合物による蛋白質間相互作用阻害剤の創出

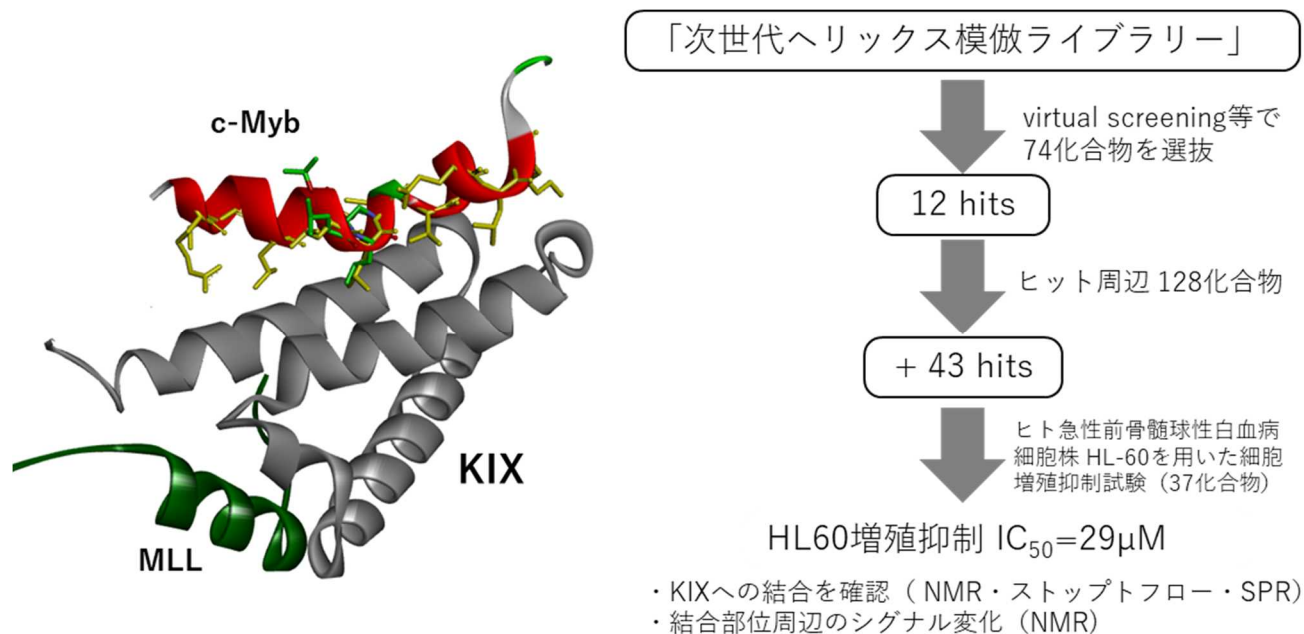
ライブラリー 14,500 化合物を全てスクリーニングする事は困難なため、標的部位の配列情報及び構造情報を利用したバーチャルスクリーニングなどによって 74 化合物を選抜し、東京大学で構築したサーマルシフトアッセイ (TSA) 及び表面プラズモン共鳴 (SPR) による KIX 結合スクリーニングを実施した。その結果、両方の系で活性を示す 12 ヒット化合物を得た。ヒット周辺化合物を 128 化合物選抜して評価した結果、43 化合物に活性が認められた。スクリーニングで得られた計 55 ヒット化合物の中から比較的活性の強い 37 化合物についてヒト急性前骨髄球性白血病細胞株である HL-60 を用いた細胞増殖抑制試験を実施したところ、20 化合物について増殖抑制が認められ、その中から IC₅₀=28.5 (μ M) を有する化合物が見出された。本化合物は細胞毒性が弱く、癌細胞に対する増殖抑制との乖離が見られた。また PAMPA 膜透過性も良好であり α ヘリックスを低分子で模倣した意義があると言える。

3-2) 蛋白質間相互作用阻害剤のスクリーニングと阻害機構の解明 (研究開発分担者・東京大学 新井宗仁)

大腸菌を用いて KIX 蛋白質を大量に発現・精製し、これを用いて TSA 及び SPR の評価系を構築した。KIX が疎水性アミノ酸に富む蛋白質のため、実験条件を検討し独自に設定することでスクリーニング評価が可能となった。選抜されたヘリックス模倣化合物についてアッセイを行い、ヒット化合物を取得した。

得られたヒット化合物について、SPR アッセイ、ストップフロー、NMR 結合解析、変異体を用いた結合部位解析や競合阻害実験を行い、いずれも KIX に対する結合を確認する事ができた。SPR やストップフローから、 μ M オーダーあるいはそれ以下の解離定数を有する結果が示唆された。NMR 滴定実験によって、MLL 結

合部位周辺のピーク変化が認められた。これらの結果から、今回得られた化合物は KIX への結合に基づく細胞増殖抑制を示していると考えられた。



以上より、今回我々が構築した「次世代ヘリックス模倣ライブラリー」は、そのコンセプトに基づき PPI 阻害化合物を高いヒット率で見出すことができ、創薬探索において有用であることを実証した。今後は、見出されたシード化合物から創薬研究を進めて開発化合物へと展開していくとともに、他の PPI 標的にも適用していくことで本ヘリックス模倣化合物ライブラリーの有用性と価値をさらに高めていきたいと考えている。

Construction of Next Generation Helix-Mimetic Libraries

(PRISM BioLab Co., Ltd.)

(1) Objective

PRISM BioLab has α -helix mimetic technologies which can modulate and inhibit intracellular protein-protein interaction (PPI). In this program, we construct “next-generation helix-mimetic compound libraries” targeting PPI drug discovery. We also develop novel helix-mimetic templates by precise structural design and synthetic improvement. In the last year we apply our helix-mimetic library to the actual PPI system and validate its usefulness for PPI hit compound finding and drug discovery.

(2) Results

1) Construction of the “Next Generation Helix-Mimetic Libraries”

1-1) One-turn helix-mimetic libraries: We designed helix-mimetic compounds with four side chains which can mimic four consecutive helical amino acids. We introduced hydrophilic groups as well as hydrophobic groups and synthesized 7,106 library compounds with more than 90% purities.

1-2) One-turn hydrophilic motif libraries: From our internal analysis we extracted important PPI motif which includes specified hydrophilic amino acid. Then, we designed new libraries including such hydrophilic motif. We established a new reaction conditions and protecting groups and synthesized 3,554 library compounds.

1-3) Two-turn helix-mimetic libraries: We designed a new scaffold incorporating five helical amino acid side chains, which can mimic i-th, (i+4)-th and (i+7)-th amino acids and synthesized 3,861 library compounds.

Through this project we totally synthesized 14,521 compounds with success rate of more than 90%. This library has enough diversity and density for collecting SAR information and is suitable for PPI drug discovery targeting α -helix. The constructed libraries are also supplied to DISC (Drug discovery Innovation & Screening Consortium).

2) Development of novel helix-mimetic scaffolds

2-1) We developed novel helix-mimetic compounds using azabicyclo scaffold and a solution-phase automated synthesis of an α -amino aldehyde used as a starting material (Beilstein J. Org. Chem., 2017, 13, 106–110). (Prof. Takahashi and Masui).

2-2) We also developed a novel three-dimensional skeleton, bicyclo[3,3,1]non-2-ene compound and its one-pot synthesis method. Among the designed and synthesized compounds, two compounds showed inhibition of HIF-1 α transcriptional activities with IC₅₀=3.0-6.3 μ M (Bioorg. Med. Chem. 2018, 26(12), 3345-3351). (Prof. Nakamura and Fuse).

2-3) In addition, we designed and developed a novel helix-mimetic template and improved its synthesis method. Synthesized compounds showed growth inhibitory activities on a cancer cell line. (Prof. Oguri and Tsubouchi)

3) Application of the “next generation helix-mimetic libraries” to PPI drug discovery

Helix-related PPI is one of preferable application for our helix-mimetic libraries. c-Myb and MLL are known as intrinsically disordered proteins that form α -helix when bound to their target protein, the KIX domain of transcriptional coactivator CBP. This KIX and c-Myb/MLL interaction is also known as a drug discovery target for cancer and leukemia. Therefore, we applied our libraries to the “KIX and c-Myb/MLL” PPI system for finding PPI hit compounds and validating our libraries.

3-1) Discovery of PPI inhibitors by helix-mimetic libraries: 74 compounds selected from our helix-mimetic libraries by

virtual screening were evaluated by TSA/SPR screening assays, and we found 12 hit compounds. We selected additional 128 compounds resembling the hit compounds, evaluated them, and found additional 43 hit compounds. Among these hit compounds we obtained a compound exhibiting potent growth inhibitory activity ($IC_{50}=28.5\ \mu M$) in HL-60, human promyelocytic leukemia cells. The compound shows weak cytotoxicity and good membrane permeability assay (PAMPA). Since peptides do not show membrane permeability, our helix-mimetic technology is promising in drug development.

3-2) Screening of PPI inhibitor and investigation of its inhibitory mechanism (Prof. Arai's group): We expressed and purified the KIX protein and established TSA/SPR screening assays using it. We screened compounds selected from libraries and found hit compounds. We also evaluated the KIX-binding ability of the HL-60 hit compound by SPR assay, stopped-flow experiment, NMR binding assay, binding site analysis using mutant proteins and competitive inhibition assays and confirmed that it binds to the KIX protein. In NMR titration assay we found signal changes for the peaks around the MLL binding site of KIX. Taken together, we demonstrated that our helix-mimetic libraries can find hit compounds with high hit rates and are useful for PPI drug discovery.