

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(革新的中分子創薬技術の開発)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 立体構造を基盤とする中分子創薬の合理的設計
(英語) Structure-based design of middle molecules for drug discovery

研究開発実施期間: 平成30年6月4日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 前仲 勝実
(英語) Maenaka, Katsumi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人北海道大学 大学院薬学研究院 教授
(英語) Hokkaido University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

本課題の目的は、分子シミュレーションおよび実測検証の積み重ねエビデンスに基づく、実効性の高い中分子の合理的設計法開発と、その具体成果物としての新規中分子（ライブラリー）創出である。中分子は低分子医薬品、高分子抗体に続く第三の創薬モダリティとして注目され、生命現象解明のプロブとしては勿論のこと、創薬ターゲットに多く含まれるタンパク質間相互作用（Protein-Protein Interaction, PPI）を標的とした医薬応用が期待されている。事業開始時において、中分子シミュレーションについては、低分子に対する膜透過・薬物動態 ADME のシミュレーション技術は存在するが、より複雑な中分子への適用は困難であった。中分子とタンパク質とのドッキングシミュレーションにおいても、PPI が重要となるタンパク質複合体に対して、動的構造解析から中分子結合に対するシミュレーションを行う技術は整っていなかった。他方、天然物を含む中分子に対する膜透過・ADME 評価リストは存在しておらず、ケモタイプ別という意味でもほとんど存在していなかった。また、中分子化合物ライブラリーとして整備されたものもほとんど存在していなかった。そこで、化合物ライブラリーから立体構造に基づく中分子・バイオ医薬品開発研究に実績のある北海道大学薬学研究院創薬科学研究センターを軸として、世界的にユニークで貴重な中分子天然物を多

数含む「大村天然化合物ライブラリー」を有する北里大学、生体膜内外での特色あるシミュレーション技術を有する筑波大学と ADME 評価と誘導体合成を製薬会社出身者が実践する東京大学創薬機構構造展開ユニットが、新たに中分子創薬ネットワークを形成し、クライオ電子顕微鏡構造解析などの最先端技術を組み合わせることで、構造基盤に基づく実験とシミュレーションを評価・フィードバックを繰り返すことにより、特にがん、希少難治性疾患、ウイルスや細菌の新興再興感染症に対する治療薬の開発に向けた、中分子の合理的設計法の開発を目指した。

本課題の最終目標は、実験者が容易に利用できる、膜透過を可能とする PPI (Protein-Protein Interaction) 阻害剤の設計ソフト及び PC システムの開発である。本課題の目的は、中分子シミュレーションおよび実測検証の積み重ねエビデンスに基づく、実効性の高い中分子の合理的設計法開発と、その具体成果物として新規中分子 (ライブラリー) 創出である。事業開始時において、中分子に対する膜透過・薬物動態 ADME のシミュレーション技術や中分子と創薬標的タンパク質とのドッキングシミュレーション技術は整っていなかった。さらに、中分子化合物ライブラリーとして整備されたものもほとんど存在していなかった。本課題では、低分子医薬品とバイオ (高分子) 医薬品の利点を併せ持つ中分子に焦点を当て、北大-北里大-東大中分子化合物ライブラリーを構築し、膜透過性及び ADME の基礎データを収集する。そのため、化合物を性質別に分類できることから、ユーザーがスクリーニングに用いる最適な化合物群を選択することができる。他方、細胞アッセイを用いたスクリーニングなどの場合、膜透過性や ADME 予測から創薬ターゲットを選別できる場合もあり得る。これらは結果として、北大-北里大-東大中分子化合物ライブラリーの質の向上に直結し、本邦が有する独自且つ強力な資産となる。

さらに、実験者が容易に利用できる、膜透過を可能とする PPI 阻害剤の設計ソフト及び PC システムの開発のため、構造基盤に基づくシミュレーション法の開発と膜透過性及び ADME の実測値を評価・フィードバックを繰り返すことにより、がん、感染症や難治性疾患等に対する治療薬の開発に向けた、中分子の合理的設計法 (設計ソフト及び PC システム) を構築する。これらの成果は、膜透過性及び ADME のデータを有さない化合物にあっては、膜透過性・PPI 阻害の予測精度の向上は実験計画の段階で極めて有効であり、実際の実験量や費用を大幅に軽減すると同時に成功確率を向上させることにつながる。事業年度内の成果は以下のとおりである。

本事業で開発した中分子シミュレーション技術は、従来の分子動力学 (MD; molecular dynamics) 法では、極めて時間がかかる点、従来法を用いた構造探索法では、低エネルギーの中分子の配座を高速に探索することができない点を解決し、膜透過シミュレーションを従来法に比べ 100 倍以上加速することができる方法である。また、自動化ツールを作成することで、計算資源を有効に活用でき、同手法を用いた構造探索法では、低エネルギーの中分子の配座を高速に探索できるようになっており、従来法では困難であった中分子シミュレーションを可能とする技術である。

また、本事業で整備された北大-北里大-東大中分子ライブラリーは、大村天然物ライブラリー、北大天然物ライブラリー、東大創薬機構化合物ライブラリーより選別した中分子天然物、環状ペプチド、核酸誘導体等多様なケモタイプの約 2,000 の中分子化合物が、誘導体を含め系統的に揃っており、膜透過性及び溶解性等のデータと紐づけされている。ライブラリーを構成する化合物の多様性や数、実データとの紐づけという点で他の天然物ライブラリー等とは一線を画す。本ライブラリーは、課題間連携を含む事業内外への配布実績が既にあり、21 の研究テーマでヒット化合物が見出されているなど、既に社会実装が可能なところまで整備できている。

中分子のうち天然物 (医薬品) およびその誘導体について、低分子の評価系として実施している溶解度測定および PAMPA による膜透過性評価の、中分子に対する適用性を、種々のケモタイプで確認し、適用可能であることを見出した。本手法を用いて、事業期間内に新規に合成された約 900 化合物に関して、溶解度測定と PAMPA および Caco-2 細胞を用いた膜透過性評価を実施した。PAMPA で得られた透過性値と Caco-2 細胞を

用いた細胞膜透過性値のデータに相関がある化合物については、膜透過性プロファイルの相関についてまとめ、両者に大きな乖離が認められる化合物については、Caco-2 細胞に発現しているトランスポーターに認識されている可能性を見出した。さらに、Caco-2 細胞を用いたトランスポーター関与の可能性を検討する評価を行った。トランスポーターである P 糖タンパク質高発現細胞に対する基質輸送に及ぼす共存薬物の阻害効果を測定することでトランスポーターを介した膜透過を示唆する化合物を明らかにした。

創薬標的タンパク質およびタンパク質と薬物候補化合物の相互作用の動的構造特性を明らかにするため、事業初年度にクライオ電子顕微鏡を導入・運用体制を整え、代表的な創薬標的タンパク質の構造解析に着手し、2 年目以降には標的タンパク質のみならず、中分子-標的タンパク質複合体の構造解析を進めた。さらに、2 年目にはクライオ集束イオンビーム装置を導入し、cryoET や microED の実施環境整備を進め、microED にて有機化合物の構造解析に成功する等成果を挙げている。現在、他の中分子化合物の構造決定をするなど着実に進められた。

上述の膜透過性・ADME 等の実験データからなる実験データベースと膜透過性シミュレーション等のシミュレーションデータからなるシミュレーションデータベースを開発し、各中分子化合物と紐づけした新規の中分子データベースを開発した。本データベースは、化合物構造だけでなく同一条件下で実施された実験とシミュレーションのデータが化合物毎に紐づけられており、データの直接の比較が可能な他に類を見ないデータベースとなっている。

上記で開発した新規の中分子シミュレーション技術およびデータベースを、連携企業である HPC システムズ(株)の協力のもと、カスタマイズ PC に搭載しテスト計算を実施した。HPC システムズ(株)とシミュレーションチームが連携して中分子シミュレーション用カスタマイズ PC システムのシステム化を進め、班内で試用したフィードバックをもとに改良を進めた。本システムは、従来では困難であった中分子の合理的設計を可能とするものであり、新たなモダリティである中分子創薬に貢献できる資産である。最終年度には、東大創薬機構の出向元企業と意見交換の後、2 社に PC システムを提供した。現在そのうちの 1 社から事業終了後以降の共同研究について話が進んでおり、社会的ニーズに答える形での共同研究やソフト開発へと発展が見込まれている。また、提供を見合わせた 1 社に関しても事業終了後に共同研究を打診されており、協議を継続中である。

以上の成果に加えて、シミュレーション技術の開発においては、予定していた研究に加えて、膜透過性を定量的に評価するための自由エネルギー解析に基づく解析手法も確立しつつあり、そのモジュールもさらに追加することで、より信頼性の高いプログラムを提供することが見込まれる。また、MD 計算に慣れている企業向けには、より自由度の高い自動化シェルプログラムを提供することも想定しており、今後、重田グループで開発するその他のモジュール（上記 PaCS-MD ドッキング法など）をシームレスに繋げることが可能である。

本課題で整備した「北大-北里大-東大中分子ライブラリー」は、事業終了後も新規に合成される化合物について溶解性・膜透過性・ADME 評価を進めつつ随時ライブラリーに追加し拡充を進める予定である。本ライブラリーは既に社会実装可能である。現状の配布実績のほとんどはアカデミアに限られているが、製薬企業との具体的な意見交換をしており、今後企業のフィードバックを参考に、更なる内容や体制の改善が見込まれ、より良質なライブラリーへと発展させることが期待できる。

The final goal of this project is the development of design software and PC systems for protein-protein interactions (PPI) inhibitors that enable membrane transmission, which can be easily used by experimenters. The purpose of this project is to develop a highly effective method for rational design of middle molecules based on accumulated evidence of both molecular simulation and experimental verification, and to create novel middle molecules (libraries) as concrete deliverables. Middle molecules are attracting attention as the third drug discovery modality following small molecule drugs and biologics. They are also expected to be used for pharmaceutical applications targeting PPI, as well as for elucidating biologically relevant events as probes. However, there was little technology to predict membrane permeability and binding activity to target proteins of middle molecules. Moreover, little techniques for membrane transmission and pharmacokinetic ADME evaluation method are applicable for middle molecules. In addition, there were few compound libraries developed for middle molecules. Therefore, our group has formed a new middle-molecule drug discovery network and combined cutting-edge technologies such as cryo-electron microscopy studies to evaluate and feedback experiments and simulations based on facilities of structural studies. In particular, we aimed to develop rational design methods for middle molecules to develop therapeutic agents against cancer, rare refractory diseases, and emerging and/or re-emerging infectious diseases.

Next, the middle-molecule simulation technology has been developed based on the Parallel Cascade Selection molecular dynamics (PaCS MD) method, which enables efficient structural sampling. We also developed a method for LogPo/w calculation by combining quantum chemical calculation using semi-empirical method for screening and solvation free energy calculation based on dielectric model. This method enables us to perform middle molecule simulation, which was difficult with the conventional method.

In addition, the Hokudai-Kitasato-Todai Middle Molecule Library developed in this project systematically contains about 2,000 middle molecule compounds of various chemotypes such as natural products, cyclic peptides, nucleic acid derivatives, and is linked with data such as membrane permeability and solubility. Therefore, this library is unique and useful for drug discovery studies.

Solubility and membrane permeability using the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) and Caco-2 cells were evaluated for 900 of newly synthesized compounds and derivatives. Based on the results, we propose a method to predict the membrane permeability characteristics of middle molecules from their three-dimensional structural features.

Finally, we have developed customized PC system comprising of simulation methods and the data base linked with molecular structure, experimental and simulation databases.