

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) コラーゲン分泌阻害低分子による抗線維化薬
(英語) Development of oral liver antifibrotic drug inhibiting collagen secretion

研究開発実施期間: 平成30年9月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 谷村 隆次
(英語) Ryuji TANIMURA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 東レ株式会社
医薬研究所 デジタルライフサイエンスグループ
グループリーダー
(英語) Toray Industries, Inc.
Pharmaceutical Laboratories, Digital Life Science Group
Group Leader

II 研究開発の概要

本研究開発課題の最終目標は、標的蛋白質 X と標的蛋白質 Y との間の蛋白-蛋白相互作用(PPI)の阻害を薬効発現メカニズムとし、薬効、ADMET、物性プロファイル、製造コスト面で臨床開発に供するに十分なプロファイルを有する経口低分子肝硬変治療薬の開発化合物を獲得することであった。参画した3機関、東レ株式会社、京都産業大学及び産業技術総合研究所は、それぞれ、「開発化合物取得に向けた誘導体合成と薬効・ADMET評価」、「分子・細胞レベルの薬効メカニズムの解明」及び「化合物の結合・作用機構解析及び解析結果に基づいた合成展開方針の策定」の研究開発を分担担当し、開発化合物取得に向け密に連携し、一体となってリード化合物探索及びリード化合物最適化を実施した。

1. リード化合物探索

本研究開発課題に先立ち京都産業大が実施した ACT-MS (セットアップ企業東レ株式会社) の成果として得られた低分子シード化合物 TRF-159 を起点化合物として、リード化合物探索を実施した。リード化合物探索においては、ACT-MS を通じて確立した *in vitro* 評価系に加え、本研究開発課題で新たに構築した *in vitro* 評価系を活用し、化合物スクリーニングを実施した。また、シード化合物誘導体の標的蛋白質 X における結

合部位及び相互作用様式を NMR 解析により解明し、TRF-159 誘導体の分子設計に活用しながら、効率的にリード化合物探索を進めた。リード化合物 TRF-159 誘導体の設計及び合成、さらに合成誘導体の薬効・ADMET・物性評価を通じたリード化合物探索の結果、経口投与で複数の肝硬変病態モデル動物において肝線維化の進行抑制効果を示し、ADMET・物性プロファイルについても設定したリード化合物のクライテリアを満たしたリード化合物 TRF-167 の創出に成功した。

2. 評価系の構築

・無細胞評価系

細胞を用いない無細胞評価系として、標的蛋白質 X—標的蛋白質 Y 間の相互作用及び化合物によるその相互作用阻害能を定量的に評価する評価系を構築した。標的蛋白質 X—標的蛋白質 Y 間の特異的な相互作用阻害によらない化合物の光吸収、蛍光等に起因する評価系の妨害による擬陽性を極力排除するため、検出系の異なる複数の評価系、TR-TRET(蛍光検出)、ELISA(発色検出)、AlphaLISA(化学発光)及び SPR (質量検出)を用いた評価系を構築した。また、動物種差を確認するため、ヒト、イヌ、マウスの標的蛋白質 X を発現・精製し、評価系に使用した。

・細胞評価系

2つの高感度細胞評価系、細胞内における化合物の蛋白-蛋白相互作用(PPI)の阻害能を定量的に評価できる「NanoBiT 法」、及び細胞内からのコラーゲン分泌速度阻害を評価できる「パルスチェイス法」を確立した。無細胞評価系同様に動物種差確認のため、NanoBiT 法においては、ヒト及びマウスのいずれの標的蛋白質の相互作用をも評価できる系を構築した。そして、NanoBiT 法は無細胞評価系で阻害活性を有する化合物が、標的蛋白質 X—標的蛋白質 Y 間の相互作用阻害能を有することの確認に、パルスチェイス法は実際に細胞において結合阻害化合物が細胞外へのコラーゲン分泌阻害能を有することの確認に活用した。これら評価系は無細胞評価系に続く 2 次評価系として、薬効メカニズムであるコラーゲン分泌阻害をより反映した細胞評価系をスループット良く評価することにより、*in vivo* 薬効評価に供する化合物の絞り込みに活用した。

・*in vivo* 薬効評価系

候補化合物の薬効を経口投与で評価可能な動物モデルとして、ラット及びマウス四塩化炭素誘発肝線維化モデル、マウス胆管結紮肝線維化モデル、マウスコンカナバリン A 誘発肝線維化モデルを作成した。*in vitro* 薬効及び ADMET 評価、さらに薬物動態評価によるスクリーニングで選抜した候補化合物の評価及び治療対象患者・治療対象ステージを絞り込むための候補化合物の薬効プロファイル解析に活用した。

3. 結合様式・作用機構解析

NMR を活用した相互作用解析による合理的な分子設計により、効率的にリード化合物探索、リード最適化を進めた。まず、標的蛋白質 X の 1 アミノ酸置換体を多数作成し、NMR シグナルの帰属を確立した。阻害化合物の滴定に伴う化学シフト変化から、化合物が標的蛋白質 Y ではなく標的蛋白質 X に結合すること、及びそのシグナル帰属に基づき標的蛋白質 X において阻害化合物が結合する部位の特定に成功した。さらに、産業技術総合研究所で開発した NMR 解析手法である DIRECTION 法を活用することで、標的タンパク質 X と化合物の結合において、標的タンパク質 X と直接相互作用している化合物の構造部位と相互作用していない構造部位の特定にも成功し、これらの相互作用情報を活用することにより、より合理的かつ効率的に誘導体設計を実施することができた。

また、分子量数万以上の標的蛋白質 X と Y とは、広く平らな相互作用界面で強固に結合していることが知られている。このような広く平らな面で結合する蛋白-蛋白相互作用(PPI)を低分子で阻害することは非常に困難であると一般にいられている。にもかかわらず、分子量 400 前後の低分子である阻害化合物がこの蛋白-蛋白相互作用(PPI)を阻害できているその阻害作用機構の解明を、NMR 解析により試みた。その結果、阻

害化合物は標的蛋白質 X と結合するだけではなく、その結合が標的蛋白質 X の相互作用界面付近の立体構造変化を引き起こしていること、またその立体構造変化が活性の高い化合物程大きいことを突き止めることができた。

4. 薬効メカニズム解明

薬効メカニズム、すなわち低分子化合物による標的蛋白質 X—標的蛋白質 Y 間の相互作用の阻害が、コラーゲン分泌阻害につながるメカニズムの解明を試みた。まず、無細胞評価系において標的蛋白質 X—標的蛋白質 Y 間の相互作用阻害活性を有する化合物群が、細胞内においても標的蛋白質 X—標的蛋白質 Y 間の相互作用阻害を引き起こすことを本課題で確立した NanoBiT 法を用いて確認できた。そして、同じく本課題で確立したパルスチェイス法を用いて、コラーゲンを分泌する線維芽細胞にこれら阻害化合物を添加するとそのコラーゲン分泌速度を低下させることを、さらに免疫染色法を用いて、細胞外に分泌されるコラーゲンマトリックス量を減少させることをそれぞれ確認することができた。これらが確認実験により、細胞において、化合物による標的蛋白質 X—標的蛋白質 Y 間の相互作用阻害が細胞のコラーゲン分泌の阻害につながるというメカニズムの検証に成功した。さらに、阻害化合物の添加により小胞体ストレスが誘導されることも確認でき、本治療薬で狙っているもう一つの薬効発現メカニズムである、治療薬により引き起こされる小胞体ストレスが最終的に細胞死を誘導しコラーゲンを分泌する線維芽細胞の数を減少させ、線維化組織から通常組織への回復に寄与する、というメカニズムを裏付ける結果を得ることができた。

5. リード最適化

開発化合物獲得に向け、初年度に獲得したリード化合物 TRF-167 を起点として、その誘導體合成展開によるリード最適化を実施した。リード化合物誘導體の効率的な合成法を確立し、約 400 種の誘導體合成及び評価を実施した。その結果、*in vitro* 阻害活性と肝組織中化合物濃度で説明可能な *in vivo* 薬効を確認することができ、低分子による標的蛋白質 X—標的蛋白質 Y 間の蛋白-蛋白相互作用(PPI)阻害メカニズムは、肝線維化抑制に有効であることを明らかにすることができた。また、より薬物動態が改善した TRF-412,TRF-503 を獲得することに成功した。しかし、これら化合物は開発化合物としては薬効が不十分であり、本研究開発期間内では、最終目標である開発化合物の選定までは至っていない。

6. 成果の意義、今後の展開

肝硬変をはじめとする各種線維化疾患は、臓器に障害が起きたことを契機にして、コラーゲンが異常に合成・蓄積される病態であり、肺線維症においては 2 種の治療薬が承認されてはいるものの、肺線維症以外の線維化疾患では未だに有効な治療薬の存在しない難病であり、有効な治療薬の登場が待ち望まれている。線維化治療薬として有望な治療薬として、核酸製剤が現在治験中ではあるものの、長期にわたってゆっくり進行する線維化疾患の治療法としては、投与経路としても費用面でも、核酸製剤よりもより安価で経口投与可能な治療薬であることが望ましい。我々は、これまでにない経口投与可能な低分子医薬を用いた肝硬変（肝線維化）の治療法の確立を目指しており、本研究開発課題において、標的蛋白質 X と標的蛋白質 Y 間の蛋白-蛋白相互作用(PPI)阻害低分子を経口投与することにより動物モデルにおいて肝線維化の進行を抑制すること、というメカニズム証明、いわゆる Proof of Principle(POP)がとれたことは、治療薬創製に向けた意義のある進展だといえる。画期的な線維症治療薬をできるだけ早く患者さんに提供するべく、本研究開発課題終了後も引き続き本研究開発課題で開発した評価法及び解析法を活用したリード最適化により、治験に供することができる開発化合物獲得を目指した研究開発の継続を予定している。

The goal of this research and development project is to obtain compounds for clinical development of oral small molecule liver cirrhosis drugs whose mechanism of drug efficacy is inhibition of protein-protein interaction (PPI) between target protein X and target protein Y. Participation in the three organizations, Toray Industries, Inc., Kyoto Sangyo University and the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, respectively, was responsible for research and development item 1 "derivative synthesis and drug efficacy / ADMET evaluation for lead compound search and lead compound optimization", research and development item 2 "Elucidation of the molecular and cellular level efficacy mechanism", and research and development item 3 "Analysis of compound binding and action mechanism and formulation of synthetic development strategy based on analysis results", and have jointly conducted lead compound search and lead compound optimization.

Various fibrotic diseases such as liver cirrhosis are pathological conditions in which collagen is abnormally synthesized and accumulated when an organ is damaged, and two types of therapeutic agents have been approved for pulmonary fibrosis. However, it is an intractable disease for which there is still no effective therapeutic agent for fibrotic diseases other than pulmonary fibrosis, and the appearance of an effective therapeutic agent is awaited. Although a nucleic acid drug is currently in clinical trials as a promising therapeutic agent for fibrosis, it can be used as a treatment method for a fibrotic disease that progresses slowly over a long period of time, it is desirable that the therapeutic agent can be orally administered at a lower cost.

We are aiming to establish a treatment for liver cirrhosis (liver fibrosis) using a small molecule drug that can be administered orally. In this research and development project, mechanism proof that a small molecule that inhibits protein-protein interaction (PPI) between target protein X and target protein Y suppresses the progression of liver fibrosis in an animal model, the so-called Proof of Principle (POP), has been obtained. Utilizing the methods of analyzing the binding mode of a compound and target protein X by NMR and the methods of the *in vitro* efficacy evaluation developed in this R & D project, we have obtained lead compound TRF-167 that is orally active in multiple pathological animal models.

In order to obtain compounds for clinical development, lead optimization was carried out by developing the derivative synthesis of the lead compound TRF-167. Efficient methods for synthesizing lead compound derivatives were established, and about 400 kinds of derivatives were synthesized and evaluated. As the result, *in vitro* inhibitory activity and *in vivo* drug efficacy that can be explained by the concentration of compounds in liver tissue can be confirmed. Then, it was clarified that the protein-protein interaction (PPI) inhibition mechanism between the target protein X and the target protein Y by a small molecule is effective in suppressing hepatic fibrosis. We succeeded in acquiring TRF-412 and TRF-503 with improved pharmacokinetics. Since these compounds have insufficient medicinal properties as development compounds, we are continuing lead optimization to obtain compounds for clinical development.

III 事後評価総合所見

リード化合物からの精力的な誘導体への展開および NMR 解析による化合物-標的蛋白質相互作用の情報解析により、本薬効発現に必要な化合物の部分構造部位を見出し、活性を向上させるとともに、リード化合物の作用機序も明らかにし、化合物の溶解度の改善がリード最適化での改善ポイントであることを見出し、今後の化合物開発に有効な知見を得たことが評価された。

一方で、開発化合物の獲得には至っていない。構造活性相関に起因するものが何であるか不明瞭な状態であり、誘導体デザインに大きく影響を与えている。今後、いち早く最適化の要因を探り、開発化合物を見出し、治療に貢献する低分子薬の開発に期待する。