

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 独自の反応基を利用した高選択的コバレントドラッグ開発プラットフォーム
Development of highly target selective covalent drugs using chlorofluoroacetamide

研究開発実施期間： 令和元年 12 月 16 日～令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：進藤 直哉
Naoya Shindo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人九州大学 大学院薬学研究院 助教
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University; Assistant Professor

II 研究開発の概要

本研究開発課題では、申請者が独自に見出したシステイン反応性求電子基であるクロロフルオロアセタミド (CFA) 基を活用し、標的選択的な新規コバレントドラッグ創薬を実施した。共有結合の形成により標的タンパク質機能を不可逆的に阻害するコバレントドラッグは、強く持続的な薬効や薬剤耐性の克服といった利点を有する反面、標的以外のオフターゲットタンパク質との非特異反応により毒性を生じる懸念もある。近年、標的タンパク質と選択的に共有結合するよう論理的にデザインされたコバレントドラッグ・TCI (targeted covalent inhibitor) の開発が盛んだが、システイン反応性求電子基として汎用されるアクリルアミドは、薬剤構造によっては濃度・時間依存的な非特異反応が進行する (Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2014**)。これに対し申請者は、新たなシステイン反応性求電子基を探索し、CFA 基を見出した (*Nat. Chem. Biol.* **2019**)。CFA 基はアクリルアミドと比べシステイン残基と穏やかに反応し、かつシステイン修飾が可逆的であったことから、標的タンパク質選択性の高いコバレントドラッグ創薬への応用が期待できる。そこで、CFA 基を活用した新規コバレントドラッグ創薬として、① Structure-guided アプローチによるコバレントドラッグ型抗がん剤の開発、② Fragment-based アプローチによるコバレントドラッグ型抗炎症剤の開発、③ SARS-CoV-2 メインプロテアーゼ (M^{pro}) を標的とした CFA 型コバレントドラッグの開発の 3 つ項目について検討を行った。以下、各項目について研究開発の概要を記述する。

① 本項目では KRAS G12C 変異体を標的とし、既知阻害剤構造を端緒とした CFA 型コバレントドラッグの開発を検討した。複数の既知阻害剤骨格に反応基として CFA を導入した化合物を多数合成し、KRAS G12C 依存的な細胞株 (肺癌由来の H358 細胞および膵臓癌由来の MIA PaCa-2 細胞) に対する増殖阻害活性を MTT アッセイで評価した。種々構造最適化の結果、臨床試験中のアクリルアミド型阻害剤と同等の細胞増殖阻害活性を示す CFA 化合物を見出した。そこで、*in vivo* 抗腫瘍活性評価の

予備検討として、マウスにて動態試験を実施した。しかし、経口投与後の薬剤血中濃度を測定したところ、既知阻害剤では十分な血中濃度が見られたのに対し、CFA 化合物ではほとんど血中濃度の上昇が見られず、吸収性に難があることが判明した。また、レポーターハンドルとしてアルキンを導入したプローブを合成し、細胞処置後にクリックケミストリーによって蛍光色素を導入し、化合物のプロテオーム反応性を *in-gel* 蛍光解析により評価したところ、予想に反しアクリルアミド化合物と比べ CFA 化合物で多くの非特異反応が見られた。アクリルアミドと CFA のモデル化合物を合成し、GSH に対する反応性を測定したところ、アニリド誘導体の場合はアクリルアミドの方が CFA より高い反応性を示したのに対し、ピペラジンなどの環状アミンに反応基を導入した場合には CFA の反応性が高くなり、アクリルアミドと同等もしくはそれ以上の GSH 反応性を示すことが明らかとなった。そこで、CFA と類縁構造のジクロロアセタミド誘導体の GSH 反応性を改めて精査した結果、CFA よりさらに穏やかな反応性を示す新規反応基として、ジクロロアセタミド (DCA) 基を見出した。最終的に、アクリルアミド型既知阻害剤と同等の細胞活性を示す DCA 化合物の同定に成功した。ウェスタンブロッティングにより、DCA 化合物が KRAS の下流シグナルである ERK のリン酸化を抑制することを確認した。また、マウス動態試験の結果、CFA 化合物と異なり DCA 化合物では経口投与によって十分な血中濃度が得られることを確認した。今後、マウス *in vivo* で DCA 化合物の抗腫瘍活性試験を実施する。

② 本項目では、プリン応答性の GPCR である P2Y₆ 受容体を標的とした。研究開始時点で、P2Y₆R のノックアウトにより抗炎症作用が見られることを見出していたが、詳細な機序は不明であった。また、既知阻害剤としては高反応性のイソチオシアネート (ITC) 化合物がいくつか報告されている程度であったことから、FBDD (Fragment-based drug discovery) アプローチによる新規骨格のコバレント P2Y₆R 阻害剤の創出を目指した。P2Y₆R を高度に発現する RAW264.7 細胞を用い、UDP 刺激後に産生されるサイトカイン MCP-1 を ELISA 法で検出するスループット性の高いアッセイ系を確立し、申請者が保有する反応性フラグメントライブラリーのスクリーニングを実施した。CFA 基は反応性が穏やかであり、タンパク質への可逆的親和性が低～中程度のフラグメントでは、標的システイン残基との共有結合形成が進行しにくいことが予想された。そこで、CFA 基と構造的相同性が高く、かつチオール反応性が CFA 基と比べ 100 倍以上高いクロロアセタミド (CA) 基を有する高反応性フラグメントライブラリーで「偵察」スクリーンを行い、得られたヒットフラグメントの構造最適化によって可逆的親和性を向上させたのちに反応基を CA 基から CFA 基にスイッチする戦略を検討した。CA フラグメントライブラリー (約 200 化合物) のスクリーニングを実施したところ、コントロールと比べ MCP-1 の産生を有意に抑制するヒットフラグメントが多数同定された。CA ライブラリーの高いヒット率から、P2Y₆R の標的システイン残基は高い求核性を有することが示唆されたため、反応性の低い CFA フラグメントからも直接ヒットが得られることを期待し、ヒット CA フラグメントに対応する CFA フラグメントを中心にスクリーニングを行った。その結果、3 つのヒット CFA フラグメントの取得に成功した。これらの CFA フラグメントによる MCP-1 産生阻害活性には濃度依存性が見られたことから、標的タンパク質との共有結合形成の寄与が示唆された。次に、求電子化合物による P2Y₆R 調節機構の解明を行った。この検討では、求電子化合物として ITC 基を有するスルフォラファン (SFN) を使用した。FLAG 標識 P2Y₆R を発現した細胞に SFN を処置したところ、P2Y₆R の細胞内への内在化およびプロテアソーム系を介した分解が認められた。P2Y₆R の各システイン残基をセリン残基に置換した変異体で検討したところ、C220S 変異体では SFN 処置による分解が起らなかった。さらなる検討の結果、P2Y₆R の C220 が求電子化合物で修飾されたのち、E3 リガーゼである NEDD4 を介して K137 がユビキチン化され、内在化とプロテアソームによる分解が進行することを明らかとした (*Sci. Signal.* 2020)。CFA フラグメントも SFN と同様の挙動を示し、同じ機構で作用することが示唆された。

③ 本項目では、SARS-CoV-2 のメインプロテアーゼ (M^{pro}) を標的とした。SARS-CoV-2 は本研究の実施期間中に発生した COVID-19 パンデミックの原因ウイルスであり、 M^{pro} はウイルス増殖に必須である一方、ヒトには対応するホモログが存在しないことから、SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス薬開発の有望な標的として注目されている。Pfizer 社の nirmatrelvir が ritonavir との合剤 (Paxlovid™) として FDA に薬事承認を受けたほか、塩野義製薬が開発した S-217622 が臨床試験中である。SARS-CoV-2 M^{pro} は Leu-Gln 配列に対して高い基質特異性を示し、nirmatrelvir をはじめとする多くの M^{pro} 阻害剤はこの配列を模したペプチドミメティクスである。一方で、Ugi 多成分反応により得られるジペプチド骨格の化合物も M^{pro} 阻害剤として報告されていた。本研究では、クロロフルオロ酢酸を用いた Ugi 多成分反応によって CFA 化合物が一举に得られる点に注目し、ジペプチド型の阻害剤を検討した。構造展開が容易な多成分反応の強みを活かし、50 以上の化合物を合成して SAR を検討した結果、精製 M^{pro} の活性を強力に阻害する CFA ジペプチド型阻害剤を見出した。CFA ジペプチドは、CFA 基に不斉中心があり、Ugi 反応でも新たに不斉中心が生じるためジアステレオマーとして得られるが、興味深いことに CFA ジペプチドのジアステレオマー間で阻害活性に大きな差が見られた。そこで、光学活性なクロロフルオロ酢酸を得る簡便な合成手法を確立し、最適化された CFA ジペプチドの 4 つの立体異性体 (*RR*, *RS*, *SR*, *SS*) を単離して M^{pro} 阻害活性を検討した。その結果、CFA 基と Ugi 反応で生成する不斉中心の絶対立体配置がともに *R* の化合物のみが $IC_{50} = 56$ nM の強力な活性を示すことを明らかにした (*Chemical Science* 2020)。ドッキングシミュレーションの結果、*R*-CFA 基のフッ素原子が Gly143 のアミド骨格 NH 基と水素結合することで、CFA 基と触媒中心の Cys145 との S_N2 反応に適した配座が安定となることが示唆された。Gly143 は M^{pro} のオキシアニオンホールを形成するアミノ酸残基の一つである。オキシアニオンホールはプロテアーゼなどの酵素において、アミドカルボニル基への求核剤の付加により生じる酸素アニオンを安定化する部位であり、様々な酵素で保存されている。すなわち、今回見られたシステイン修飾における CFA のキラリティーの重要性は、他のシステイン含有タンパク質においても同様に見られる可能性があり、創薬有機化学の観点から重要な知見である。

以上のように、本研究開発では申請者が独自に見出したシステイン反応性求電子基を活用し、癌・炎症・感染症と幅広い疾患を標的としたコバレントドラッグ創薬を実施した。特に、KRAS G12C 阻害剤の検討では、ジハロアセタミド型反応基のハロゲン原子の変換による、システイン反応性および可逆的加水分解速度のチューニングの可能性が見出された。また、SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害剤の開発では、システイン修飾における CFA のキラリティーの影響について新たな知見が得られた。今後はこれらの点について、創薬有機化学の基礎検討として系統的な評価を行い、システイン残基の可逆的共有結合修飾に利用可能な反応基のバリエーションを拡張し、コバレントドラッグ創薬の基盤拡充に務める。

Covalent drugs exert potent and durable activity by chemical modification of the targeted protein. To maximize pharmacological efficacy while alleviating the risk of toxicity due to nonspecific off-target reactions, current covalent drug discovery focuses on the development of targeted covalent inhibitors (TCIs), wherein a reactive group (warhead) is strategically incorporated onto a reversible ligand of the target protein to facilitate specific covalent engagement. Although TCIs clinically approved to date largely rely on acrylamide-type electrophiles for cysteine targeting, acrylamide-based TCIs are shown to undergo concentration- and time-dependent off-target labeling depending on the molecular architecture (Cravatt et al. *Nat. Chem. Biol.* **2014**). We have recently introduced chlorofluoroacetamide (CFA) as a novel cysteine-directed warhead with weak electrophilic reactivity (*Nat. Chem. Biol.* **2019**). We found that the CFA derivatives exhibited higher selectivity in covalent modification of the targeted tyrosine kinases than the structurally related acrylamide-based inhibitors. We also demonstrated that the CFA-thiol adducts is hydrolyzed under neutral aqueous conditions to reversibly generate an unmodified cysteine, which could contribute to high target selectivity by eliminating the solvent-exposed off-target labeling. In this research project, we utilized these desirable features of CFA for the development of novel covalent drugs with high target selectivity.

I. Structure-guided development of novel covalent KRAS G12C inhibitors. Based on the molecular architecture of reported acrylamide-based KRAS G12C inhibitors, we synthesized a number of CFA-type compounds and evaluated their antiproliferative activity against KRAS G12C mutant cell lines. We identified a CFA compound with equipotent activity to a reported inhibitor, however, its oral bioavailability was found insufficient. In addition, in-gel ABPP experiments using alkynylated analogs revealed that the CFA compound showed higher off-target labeling than the acrylamide-based known inhibitor. GSH reactivity of model compounds were assessed to confirm that the electrophilic reactivity of CFA on the KRAS G12C inhibitor core was unexpectedly high. We reexamined GSH reactivity of dihaloacetamides and identified dichloroacetamide (DCA) as a warhead that show weaker reactivity than CFA. Finally, we successfully generated a DCA-based KRAS G12C inhibitor with comparable cellular activity to acrylamide-based inhibitors. The DCA compound exhibited sufficient oral absorption for the evaluation of *in vivo* antitumor activity.

II. Covalent fragment-based drug discovery (FBDD) targeting P2Y₆R. We previously discovered that inhibition of the purinergic P2Y₆ receptor limited colitis progression. An ELISA assay detecting MCP-1 produced by UDP stimulation of P2Y₆R was established for the exploration of novel P2Y₆R inhibitors. By screening our in-house covalent fragment library, we discovered chloroacetamide (CA) and CFA fragments that suppress MCP-1 production. We also investigated the mechanism of the electrophile-induced internalization and degradation of P2Y₆R. We found that the modification of C220 of the intracellular domain of P2Y₆R induced NEDD4-mediated ubiquitination of K137, which resulted in the internalization and the proteasomal degradation of P2Y₆R (*Science Signaling* **2022**).

III. Covalent targeting of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}) with chlorofluoroacetamide. SARS-CoV-2 is the causative pathogen of current pandemic of COVID-19. SARS-CoV-2 M^{pro} is a cysteine protease essential for the viral replication and a promising target for the development of novel antiviral agents against SARS-CoV-2. We used Ugi multi-component reaction (MCR) for the rapid generation of numbers of CFA dipeptides and successfully identified a potent CFA-based covalent M^{pro} inhibitor (*Chemical Science* **2022**). Interestingly, the chirality at CFA warhead showed marked influence on the M^{pro} inhibitory activity, suggesting stereospecific activation of CFA reactivity in the protein's binding pocket.