

# 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



## I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業

（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）大江知之

（英語）Tomoyuki Ohe

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：

（日本語）慶應義塾大学 薬学部 准教授

（英語）Keio university, Faculty of Pharmacy, Associate Professor

## II 補助事業の概要

### （1）支援

#### 1. 代謝部位同定・代謝の回避を目指した構造展開

- 支援課題「パーキンソン病治療薬の創製」に関して、ヒット化合物からの構造展開で見出したリード化合物の代謝物解析を行い、代謝物標品の化学合成及び LC/MS 分析により代謝物を同定した。また、別途、非酵素的にも生成する化合物を単離し、NMR 分析により構造を同定した。これらの代謝物解析結果に基づき、リード化合物に対しフッ素の導入や環構造の変換などを行い、安定性が向上した化合物の創製に成功した。
- 支援課題「Nrf2 モジュレーターの開発」の代表的化合物について、代謝安定性が悪い原因を探るために代謝物解析を行った。その結果に基づき、側鎖にアミドを導入することで、代謝安定性が向上した化合物を合成した。
- 支援課題「Pin-1 阻害剤の探索」では、LC/MS 解析や合成標品との比較より、候補化合物の主代謝物を同定した。
- 支援課題「胆道がん・膵臓がん治療薬の創製」では、ヒット化合物のイミダゾールをピラゾールやメチルイミダゾールにすることで CYP 阻害をほぼ完全に抑制できることを見出した。

- 代謝物構造解析において、市販の代謝物予測ソフトによる予測結果と一致するかを検証し、実用可能であることを示した。
2. 反応性代謝物評価
- 支援課題「パーキンソン病治療薬の創製」および「放射線防護剤の創製」で構造展開している化合物群には、代謝活性化が起き得る構造的な懸念があるので、代表的化合物についてトラッピング剤を用い評価を行った。その結果、後者においては酸化代謝後様々な反応性代謝物が生成することが明らかになった。また、後述する TC-HepG2 を用い「Nrf2 モジュレーターの開発」の代表的化合物の代謝活性化評価を行った。
  - 支援課題「放射線防護剤の創製」の代表的化合物についてトラッピング剤を用い評価を行い、反応性代謝物が生成することを明らかにした。
  - 拠点間連携の一環として理化学研究所で開発中の化合物の反応性代謝物評価を行い、フェノール由来の代謝活性化が起きることを明らかにした。
3. 細胞毒性評価
- 支援課題で合成した 257 化合物の細胞毒性評価を行った。
4. 支援プログラム開発ステージのステップアップ
- 支援課題「パーキンソン病治療薬の創製」に関し 2019 年に特許を出願し、さらにその特許を強化するため化合物を合成し実施例を追加した。それにより請求項範囲の拡大も達成し PCT 出願も行うことができた。その後、構造展開を続け数化合物の候補化合物に絞った。前臨床開発候補品として選択した化合物の高次薬物動態評価として、脳内移行性、血漿タンパク結合率、主要 CYP に対する阻害能などの評価を行った。また、ビオチン標識体を合成し、本化合物の作用機序解明のために標的タンパク質の同定を行った。
5. 臓器標的型プロドラッグの創製
- 支援課題「パーキンソン病治療薬の創製」に関し、薬物トランスポーターの基質にし脳内移行性を向上させることを目的に、チロシン結合型誘導体の合成に成功した。
  - 支援課題「胆道がん・膵臓がん治療薬の創製」に関し、肝臓に特異的に発現しているトランスポーターの基質にし肝臓・胆道への移行性を向上させることを目的に、カルボキシ基結合型プロドラッグの合成に成功し、それらの評価を行った。

## (2) 高度化

1. 新規反応性代謝物検出用トラッピング剤の創製
- 分子内に蛍光団を有し広範な反応性代謝物を捕捉できる新規トラッピング剤をデザイン・合成し評価を行った。そのうち 1 つは高濃度でも CYP を阻害することなく、ソフトおよびハードな反応性代謝物を効率的に捕捉できることが示された。それを用いて毒性が原因で市場撤退となった医薬品の評価を行い、本トラッピング剤の反応性代謝物リスクの評価ツールとしての有用性を示した。
  - アシルグルクロニドを効率的に捕捉できる新規トラッピング剤の創製に成功した。アシルグルクロニド由来の毒性を示す医薬品を完璧に判別することができ、毒性予測性が極めて高い創薬支援ツールになると考えられた。
  - 反応性が極めて高いアシル CoA 代謝物を特異的かつ効率的に捕捉できる新規トラッピング剤の創製に成功した。アシル CoA 代謝物を検出する方法はこれまで知られておらず、本トラッピング剤は安全性が高い医薬品創製をする上で強力な支援ツールになることが期待された。
2. 薬物代謝を考慮した構造展開技術の高度化
- 我々は、これまでに、肝毒性を引き起こすことが知られている高尿酸血症治療薬ベンズブロマロン

の代謝活性化機構を明らかにしている。この活性化を回避することを目指し、誘導体をデザイン・合成し、これらの肝細胞及びミトコンドリアに対する毒性を検討した結果、全ての誘導体はベンズブロマロンに比べて毒性が軽減した。また、尿酸トランスポーター阻害活性を検討したところ、阻害能は若干弱くなったものの活性は維持した。以上のように、ベンズブロマロンの毒性を回避した改良型誘導体の創製に成功した。

- 抗 HIV 薬であるネビラピンの代謝活性化を回避した誘導体をデザイン・合成し、それらの評価を行い、CYP 阻害や肝毒性と構造の関連性を示すことができた。
- 抗炎症薬ジクロフェナクのアシルグルクロニドの生成を抑えるために様々な誘導体を合成し、フッ素を導入した化合物は反応性代謝物の生成が抑えられることをトラッピング剤を用いて示し、ヒト肝細胞の毒性も減弱することを明らかにした。
- 抗肥満薬リモナバンの代謝活性化を回避するためにピペリジンを様々な含窒素複素環に変換し不可逆的 CYP 阻害活性を検討した。
- 抗リウマチ薬トファシチニブからの反応性代謝物生成を回避した誘導体を合成し、一部の誘導体でエポキシド生成が回避されヒト肝細胞の毒性も減弱した。
- 抗がん剤スニチニブの基本骨格でもある 5-ハロゲノ・2-オキシインドールからの反応性代謝物生成機構やその構造要件を明らかにし、新たな忌避構造を提唱することができた。
- シアノ基を有する様々な化合物の蛍光標識システインに対する反応性について検討し、反応性が高まる構造的要件を一部明らかにした。毒性につながる新たな忌避構造を提唱できる可能性があり、今後が期待される研究成果である。

### 3. 代謝活性化評価系の高度化

- 鳥取大学から CYP 発現 HepG2 細胞 (TC-HepG2) を供与してもらい、代謝活性化を細胞レベルで評価する新しい系を構築しネビラピン、ベンズブロマロン等様々な既存薬を用いて検証を行った。

### 4. 代謝部位同定法の高度化

- LC-MS における移動相に重水を使うことで、代謝物がヒドロキシ体あるいはオキシドなのかを簡便に判定する手法を確立し、クロルプロマジン等様々な既存薬を用いて検証を行った。
- インシリコユニットと連携をし、これまで高度化研究で扱ったネビラピン誘導体の代謝部位予測を行った。

## **(1) Support for drug discovery projects**

### **1. Identification of metabolic sites**

- With regard to the project "Drug Discovery for Parkinson's Disease", we conducted metabolite analysis of the lead compound, and identified the metabolites by chemical synthesis of the authentic standards and LC/MS analysis. Based on the results, various derivatives with improved metabolic stability were successfully synthesized.
- In the project "Drug Discovery for Biliary Tract and Pancreatic Cancer", it was found that CYP inhibition can be almost completely avoided by changing the imidazole of the hit compound to pyrazole or methylimidazole.
- In metabolite identification analysis, we verified whether the results were consistent with those predicted by the commercially available metabolite prediction software, and showed that the results were practically feasible.

### **2. Evaluation of reactive metabolites**

- As part of the collaboration with RIKEN, we evaluated reactive metabolites of compounds under development at RIKEN, and found that phenol-derived metabolic activation occurs.

### **3. Evaluation of cytotoxicity**

- Cytotoxicity of 257 compounds synthesized in the supported projects was evaluated.

### **4. Step-up of the development stage of the supported program**

- In 2019, we filed a patent application for the project "Drug Discovery for Parkinson's Disease", and to strengthen the patent, we synthesized compounds and added examples. The compounds selected as candidates for preclinical development were evaluated for detailed ADMET profiles. In addition, we synthesized a biotin-labeled compound and identified target proteins to elucidate the mechanism of action of the compounds.

### **5. Drug discovery of organ-targeted prodrugs**

- With regard to the project "Drug Discovery for Biliary Tract and Pancreatic Cancer", we succeeded in synthesizing prodrugs as substrates for transporters specifically expressed in the liver to improve their distribution to the liver and biliary tract.

## **(2) Technology development**

### **1. Development of novel trapping agents for the detection of reactive metabolites**

- We designed, synthesized, and evaluated fluorescent trapping agents that can trap a wide range of reactive metabolites. One of them was shown to efficiently trap soft and hard reactive metabolites without inhibiting CYPs even at high concentrations. We used it to evaluate drugs that were withdrawn from the market due to toxicity, demonstrating the usefulness of this trapping agent as a tool for assessing reactive metabolite risk.
- We succeeded in developing another new trapping agent that can efficiently trap acyl glucuronides. It was able to perfectly discriminate drugs showing acyl glucuronide-derived toxicity, and was considered to be a drug discovery support tool with extremely high predictability.
- We succeeded in developing a new trapping agent that can specifically and efficiently trap acyl CoA metabolites with extremely high reactivity. Since there is no known method to detect acyl-CoA metabolites, this trapping agent is expected to be a powerful tool to support the creation of safe drugs.

## **2. Structure modification strategy considering drug metabolism**

- We designed and synthesized derivatives that avoided metabolic activation of benzbromarone, nevirapine, diclofenac, rimonabant, and tofacitinib.
- The mechanism of reactive metabolite formation from 5-halogeno-2-oxindole, which is also the substructure of sunitinib, and its structural requirements were clarified.
- The reactivity of various compounds with cyano groups toward fluorescently labeled cysteine was investigated, and the structural requirements for increased reactivity of cyano groups were clarified.

## **3. Improvement of evaluation system for metabolic activation**

- We constructed a new system to evaluate metabolic activation at the cellular level using CYP-expressing HepG2 cells (TC-HepG2) from Tottori University.

## **4. Improvement of identification method of metabolic sites**

- By using D<sub>2</sub>O as the mobile phase in LC-MS, we established a method to easily determine whether a metabolite is a hydroxy or an oxide, and verified it using various existing drugs such as chlorpromazine.
- In collaboration with the in silico unit, we predicted the metabolic sites of the derivatives of some existing drugs.