

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

「ヒット化合物の迅速プローブ化技術の高度化による創薬・生命科学研究支援」

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

"Promotion of drug discovery and life science researches through advancement of synthetic technologies for expeditious development of molecular probes from screening hit compounds"

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）細谷 孝充

（英語）Takamitsu Hosoya

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立大学法人東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

（英語）Tokyo Medical and Dental University, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Professor

II 補助事業の概要

（1）支援

本研究開発課題では、1) スクリーニング等から見出されたヒット化合物の構造最適化に加え、2) 被支援者の目的に応じたプローブ分子の開発を合成支援した。具体的には、ライブラリー・スクリーニング領域の支援等を経て得られたヒット化合物を、構造活性相関研究を経た構造最適化により活性向上させることに加え、創薬・基礎生命科学研究にも重要な知見をもたらす、標的同定プローブやPETプローブ等のイメージングプローブの開発を通じて、被支援者の研究を一気通貫に合成支援した。2017年4月から2022年3月までの間に、11名の被支援者に対して、12件の課題に関する合成支援に取り組み、東京医科歯科大学及び理研BDRにおいて、のべ419種類の新規化合物を合成し、これらを提供した。4件については被支援者の目的を達成できたことから支援を完了とし、1件については継続困難と判断し支援を終了した。スクリーニングで見出された多くのヒット化合物の確定ヒットの取得に成功するとともに、高度化研究で開発したジアジドビルディングブロックを利用することで標的未知のヒット化合物について活性を維持した標的同定用プローブ候補化合物の開発に成功した。これまでに3種類の化合物に

ついて標的同定に成功するとともに、さらに4種類の化合物について活性を維持した標的同定用ジアジドプローブ候補化合物の開発に成功し、現在、それらを用いて標的同定研究が進められている。以下に代表的な支援終了課題の支援内容について述べる。

1) ケミカルシーズ・リード探索ユニット ライブラリー・スクリーニング領域の京都大学大学院 医学研究科の萩原正敏教授への支援：栄養枯渇状態での細胞死を抑制するヒット化合物の高活性化を目的とする合成支援を行った。最も高活性なラセミ体の化合物において、両エナンチオマーが示す活性に差があり、一方のエナンチオマーがより顕著に高い活性を示すことが分かった。その化合物のX線結晶解析によって絶対立体配置を明らかにした。また、構造活性相関研究のための類縁体の合成経路を確立した (Cell Chem. Biol. 2021, 28, 1132–1144)。

2) 徳島大学 先端酵素学研究所の親泊政一教授の小胞体ストレス応答に関する化合物の支援：分子シャペロンとして機能するヒット化合物について、標的同定プローブの合成に応用できる合成経路を確立し、提示されたヒット化合物を2種類合成した。それがライブラリー収蔵化合物と同等の活性を示したことから確定ヒットを取得できた。さらに、高度化研究において開発したジアジドビルディングユニットを利用し、アジド基を損なわないヘテロ環構築法により対応するジアジドプローブを合成した。これを用いた光親和性標識実験により、標的候補タンパク質の同定に成功した。また、確定ヒット化合物からの構造展開も行い、より高い活性を示す化合物の合成にも成功した (eLife 2019, 8, e43302)。

(2) 高度化

ヒット化合物の構造最適化、各種分子プローブの迅速な開発、独自性の高いケミカルライブラリーの充実等を目的に合成基盤技術の高度化に取り組んだ。とくに、1) 独自の標的分子同定技術であるジアジドプローブ法をさらに発展させ、より実用的な技術にするとともに、2) アライン活性種等を利用した多様な芳香族化合物の合成法の開発、並びに特徴的な疎水性ファーマコフォアやペプチドイソスター部位を有する化合物の効率的な合成法等の開発に成功し、多様性に富んだドラッグライクネスの高い化合物開発やケミカルスペースの開拓につながる独自性の高い合成手法を開発した。さらに、3) PET プローブ等のイメージングプローブ開発に役立つ新しい合成技術も開発した。これまでに本補助事業課題における高度化研究として、以下の3大項目に関する研究に取り組み、いずれの項目においてもマイルストーンを達成し、当初の計画を大きく上回る成果を挙げることができた。これらの成果は、125報の論文、249件の学会発表として公表した。以下に、得られた成果について述べる。

1) ジアジドプローブ法の高度化研究

1-1) 新しいジアジドビルディングブロックの開発

合成支援での利用を念頭に、ヒット化合物のジアジドプローブ化を迅速かつ確実に実施し、標的分子の同定支援を速やかに実施するため、2種のアジド基を予め配置した3-アジド-5-(アジドメチル)ベンゼン類の効率的合成法の開発に取り組んだ。その結果、44種の新しいジアジドビルディングブロックの開発に成功した。これらのビルディングブロックは、実際に支援研究においてジアジドプローブ開発に役立っている。また、新しい置換形式のジアジドビルディングブロックの開発も進めた。今後、これらの活用により、活性を保持したジアジドプローブ開発のさらなる効率化が期待される。

1-2) ジアジドビルディングブロックを利用する結合形成に関する高度化

ジアジドプローブ合成のために、ジアジド部位を損なうことなく誘導体化できる手法開発に取り組んだ。具体的には、脂肪族アジド基を損なうことなく、アミノキノリン類を合成する手法、ならびにジアジドビルディングブロックと様々なアミン類とのPd触媒を用いるカップリング反応が進行する温和な条件を開発した。本反応は新たなジアジドビルディングブロックの合成や市販の医薬品アミン類のジアジドプローブ化に適用可能であり、今後、既存医薬品の新たな標的同定により、ドラッグリポジショニ

ングの促進につながると期待される。

1-3) クリック反応などに関する高度化研究

ジアジドプローブを用いた光親和性標識後のアジド化タンパク質への検出用官能基の導入をはじめとして、幅広い用途で重要な役割を果たすクリック反応に関して高度化研究を進めた。具体的には、ジアジドプローブの2種のアジド基のうち、芳香族アジド基を光反応による共有結合形成に利用した後、脂肪族アジド基に高効率で検出用官能基を導入する手法の開発に加え、複数のリガンドを連結してタンパク質の結晶化等を促進する支援への展開も見込めるマルチクリックケミストリーについて検討を行った。この取り組みにより、以下の10種の分子連結法を新たに開発できた。

- i) チオフェンジオキシド類のシクロオクチン類に対する高い反応性を明らかにした。これに基づき2種のアジド基とチオフェンジオキシドを併せ持つプラットフォーム分子を開発した。
- ii) アルケニルアジド基の環状アルキンとのクリック反応における特徴的な反応性を明らかにし、これを基盤に多成分連結法の開発に成功した。
- iii) リンの特性を利用した新しいクリック反応の開発に成功した。具体的には、2,6-ジクロロフェニルアジド誘導体がトリフェニルホスフィン類と速やかに反応し、水や各種生体分子に含まれる求核性アミノ酸等に対して十分な安定性を示すアザイリドを形成することを明らかにした。
- iv) 芳香族アジド基、脂肪族アジド基、かさ高い芳香族アジド基がそれぞれ大きく異なる反応性を示し、これらを併せ持ったプラットフォーム分子を用いて、形式の異なるクリック反応を順に行うことで、多機能性分子の効率的な合成に成功した。本手法をさらに発展させ、第4のアジドとしてかさ高い脂肪族アジド基を用いることで、4種の区別できるアジド基を併せ持ったテトラアジドプラットフォームの開発とその応用に成功した。
- v) かさ高い芳香族アジド基は高い反応性を示すが、パラ位にアミノ基を配置することでクリック反応をさらに高速化できることを発見し、高選択的クリック反応への応用に成功した。
- vi) アジド基の反応性を一時的に抑制する手法を発見し、これを利用することで、複数のアジド基を併せ持つ化合物において、狙ったアジド基のみを選択的にクリック反応に用いる手法を開発した。
- vii) シクロオクチン類を銅塩によって保護する独自の手法を基盤として、末端アルキン選択的反応によって入手容易な様々な機能性アジドを機能性環状アルキンに簡便に変換できることを明らかにした。本手法はタンパク質への応用も可能であり、実際、抗体等のタンパク質上のアジド基をシクロオクチン部位へと変換することができた。
- viii) オキサジアジノンがシクロオクチン類と良好に反応する部位として利用できることを見出した。
- ix) 異なる環境下にある3種類のアルキン部位を有するトリアルキンプラットフォーム分子の設計・簡便合成に成功し、これを用いた3種類のアジド化合物の逐次3分子集積法の開発に成功した。今回開発したプラットフォーム分子は、極めてコンパクトであり、小～中分子ライブラリーの構築に有効である。
- x) クリック連結に有用なシクロオクチンの簡便合成法の開発に成功した。具体的には、アルキンのコバルト (Co) との錯形成による保護により分子内環化が促進される反応及び、Co 錯体の効率的な脱保護条件を見出し、短工程でのシクロオクチン合成経路を確立した。

2) 生物活性化合物の効率的開発に関する高度化研究

2-1) 逐次連結に利用できるプラットフォーム骨格の簡便構築法の開発

アライン活性種は多様な芳香族化合物の合成に有用な中間体であり、多様性に富んだ化合物ライブラリーの構築に有用であることから様々なアライン変換法の開発に取り組んだ。まず、アライン発生部位及びアルキン部位を併せ持つ、多成分連結に役立つプラットフォーム分子の開発に成功した。また、多様性に富んだヘテロ環化合物を効率的に合成できる手法として、ベンゾチオフェン骨格をもった *o*-シリ

ルアリートリフラート型のアライン前駆体の開発、リン原子の特性に着目したアライン発生法の開発、アラインや環状アルキン類を2度連結することでアントラセン等の類縁体を合成できる手法の開発、炭素-炭素結合の切断を経る、1,3-ジカルボニル構造を含むアライン発生法をそれぞれ開発した。さらに、アジド基を有するアライン前駆体の簡便合成法を確立した。3-アジドアライン活性種を経る逐次連結により、多様性に富んだヘテロ芳香族化合物を迅速に合成できる手法の開発に成功した。

2-2) 疎水性ファーマコフォアを利用する創薬手法の高度化

新たな疎水性ファーマコフォアの生物活性化合物創製における有用性を検証し、応用展開を目指した。これまでのホウ素クラスター・カルボランに加えて、高周期 14 属元素であるケイ素原子やゲルマニウム原子を含む置換基、六配位フッ化硫黄構造を有する置換基、有機金属化学種、及び含リン官能基に関して、これらを含む核内受容体リガンドを中心とした生物活性化合物を設計、合成、活性評価した。

2-3) ペプチドイソスターを利用する創薬手法の高度化

ペプチドミメティックであるクロロアルケン型ジペプチドイソスター (CADI) の収束的合成法を開発した。本手法は、ペプチド固相合成法に適用でき、CADI 含有ペプチドミメティックが効率的に得られることが明らかとなった。さらに、CADI の生物学的及び創薬化学的応用として、高い生物活性を示す CADI 導入型環状ペプチドの創製にも成功した。

3) プローブ化に関する高度化研究

3-1) 蛍光プローブ開発に関する高度化研究

以前開発した、3-アミノアラインを利用する独自の手法によって、黄～橙色といった比較的長波長で蛍光発光する 12 種の 5-アミノクマリン類を合成し、構造と物性の相関を明らかにした。また、5-チオクマリン類の合成にも成功し、これらが緑色蛍光を示すことを明らかにした。さらに、新規複素環構築法とアライン発生を組み合わせた縮環型化合物合成法の開発にも成功し、6 種の新規蛍光化合物の合成を達成した。加えて、合成容易なアライン前駆体であるヨードアリートリフラートについて、アライン発生の新しい条件を見出し、この変換を用いることで多様な多置換蛍光化合物を合成した。

3-2) 光親和性標識プローブ開発に関する高度化研究

- i) トリフルオロメチルジアジリン部位を有する 2 種のビルディングブロックを開発した。合成した化合物は一般的な光反応性を示すことから、光親和性標識プローブの開発に有効であることが分かった。
- ii) 長波長光照射により結合切断できる、インドリジン骨格を基盤とする光切断素子の開発に成功した。光増感剤共存下、空気中で赤色 LED (波長 660 nm) を短時間照射するだけで、一重項酸素による光酸化反応が進行し、3 位の置換基がカルボン酸もしくはアルコールとして放出された。この光切断素子を用いることで、長波長光照射をトリガーとするケージド化合物の合成に成功した。

3-3) PET プローブ開発に関する高度化研究

- i) 合成中間体として有用なアルケニルホウ素化合物を対応するカルボン酸から合成する手法の開発に成功した。得られたホウ素化合物を標識前駆体とする ^{11}C -カルボキシ化を組み合わせることで、医薬品や天然物等によく見られるカルボン酸の迅速な ^{11}C -標識 PET プローブ化が可能となった。
- ii) アミド結合の代謝安定なイソスターとして注目されているモノフルオロアルケンの有用な合成中間体であるボリル(フルオロ)アルケンの新たな合成法を開発した。本手法を用いてアトルバスタチンのフルオロアルケンミミックの合成も達成し、その有用性を明らかにした。さらなる効率化を目指し、モノフルオロアルケンの収束的合成に利用できる合成素子を開発した。これらに加え、 ^{18}F モノフルオロアルケンの標識前駆体になりうるボリルアルケンの新規合成法を開発した。
- iii) 鈴木・宮浦クロスカップリング反応では、基質によってホウ素部位の脱ホウ素が非常に進行しやすい。これに対し、塩基の代わりに亜鉛錯体をルイス酸として添加する新たな反応条件を見出した。

iv) シアノ基を有する芳香族化合物が様々な生物活性化合物や医薬品によく見られることから、入手容易な芳香族ボロン酸を標識前駆体とする ^{11}C -シアノ化反応を開発した。本手法を用いて3種類の生物活性化合物の cyano- ^{11}C -標識を達成した。

Our developing research project has covered the structural optimization of hit compounds found by high-throughput screening and synthetic supports for developing molecular probes on demand. Specifically, we improved the bioactivity of hit compounds obtained through the library screening by structural optimization via structure-activity relationship (SAR) study. We also supported the synthesis of functional probes, such as photoaffinity probes and PET probes, which provided essential knowledge in drug discovery and basic life science research. During the period of this project since Apr. 2017 until Mar. 2022, we conducted 12 projects according to the needs proposed by 11 researchers and provided 419 novel compounds by synthesizing them at Tokyo Medical and Dental University and RIKEN BDR. We have completed four projects with successful achievement of the researchers' purposes, while canceled one project after discussion with the corresponding researcher. Through these synthetic supports, we successfully confirmed many hit compounds obtained from screening studies. Moreover, by utilizing our original diazido building blocks developed in this program, we designed promising molecular probes for the target identification of the target-unknown screening hit compounds and synthesized them without losing the original bioactivity. At present, we revealed three target proteins of the original hit compounds, and the target identification studies have been still undergoing using the other four probes that we developed.

In parallel with the supportive research, we made a lot of efforts to advance our original and basic synthetic methodologies to expand the available scope of a chemical library, expedite the structural optimization of hit compounds, and develop various molecular probes. Specifically, we advanced mainly three technologies, including the "diazido probe" method, the efficient synthetic method for bioactive molecules, and methods for designing and preparing molecular probes. To improve the practicality of the "diazido probe" method, our original target identification methodology, we expanded the scope of the available diazido building blocks. We also developed new reactions to connect them with hit compounds, mainly involving click reactions using various organic azides and strained- and non-strained alkynes. We also improved the synthetic efficiency of bioactive compounds by developing sequential synthetic methods using newly developed platform molecules, wherein multi-component coupling reactions utilizing highly reactive intermediates, such as arynes, are involved. Moreover, we focused on unique hydrophobic pharmacophores and peptide isosteres and applied them for synthesizing bioactive compounds, expanding the diversity of available drug candidates. We also developed efficient synthetic methods for molecular probes, such as fluorescence probes having a coumarin skeleton, photoaffinity probes with a trifluoromethyldiazirine moiety, and PET probes labeled with short-lived radionuclides. Through the advancing research described above, we developed many synthetic methodologies applicable for preparing highly diverse and drug-like compounds and chemical spaces. During this project, we have achieved all milestones and outstanding results over the original plan. These outcomes were published as 125 research papers and 249 academic presentations at domestic and international conferences.