

称号及び氏名 博士(理学) 入江 隆行

学位授与の日付 2022年3月31日

論文名 プロテインキナーゼ指向性化合物ライブラリを基盤とした選択的阻害剤の創出

論文審査委員 主査 藤井 郁雄
副査 円谷 健
副査 木下 誉富

プロテインキナーゼ指向性化合物ライブラリを基盤とした選択的阻害剤の創出

入江 隆行

プロテインキナーゼ（以下、キナーゼと略す）は有望な創薬ターゲットである。数多くのキナーゼ阻害薬が各国で医薬品として認可を受け使用されており、さらに千以上の臨床試験が進行中である。当初は、分子標的薬として、がん疾患の原因となる特定のキナーゼをターゲットとしていたが、キナーゼが様々な疾患との関連が明らかになるにつれ、自己免疫疾患や中枢神経系疾患など対象疾患も増え、キナーゼ阻害剤開発競争は益々激しくなっている。

キナーゼは、ATP の γ リン酸基を基質となるタンパク質に転移する酵素である。触媒活性をもつキナーゼドメインには、ATP 結合領域が存在し、キナーゼ間の相同性が高い。そのため、その領域に結合するキナーゼ阻害剤 (Type I) は、特定の相互作用を狙えば活性を確保しやすい反面、意図に反して他のキナーゼをも阻害する傾向がある。キナーゼ選択性を確保するために、ATP 結合部位以外の隣接部位 (Type II / III 阻害剤) や全く離れた部位 (Type IV、アロステリック阻害剤) のそのキナーゼに特徴的な相互作用を利用した成功例がある。また、最近では、詳細な構造比較や構造活性相関等の知見の蓄積により、ATP 結合部位をターゲットとした Type I 阻害剤でも精密なデザインで選択性を獲得した報告もあるが、どちらの場合も全てのキナーゼに対して同様にアプローチするのは難しい。

そこで、本研究では、キナーゼ一般に適用可能な、キナーゼ指向性化合物ライブラリを基盤とした選択的阻害剤探索法を構築し、ヒットやリード化合物を簡便かつ迅速に見出した。

第1章では、基盤となるキナーゼ指向性化合物ライブラリの開発について述べる。キナーゼ結合性フラグメントと多様性フラグメントをクリックケミストリーで簡便に連結させ、キナーゼ阻害剤開発の出発点となるヒット化合物を生み出す Kinase Focused Evolved Fragment (KFEF) ライブラリを作成した。第2章では、高効率なキナーゼ結合性フラグメントである 7-アザインドールを基にしたリード探索法について述べる。KFEF ライブラリから見出した HGK キナーゼのヒット化合物 (7-アザインドール誘導体) から、7-アザインドールを足がかりにクリック合成法で簡便に構造展開し、100 倍以上の活性増強や、異なる選択性プロファイルを有する誘導体を迅速に見出した。第3章では、上述の KFEF ライブラリやリード探索法を活用して得た CDC7 キナーゼのリード化合物 (7-アザインドール誘導体) の最適化研究について述べる。ADME の課題を克服して経口投与可能な CDC7 選択的阻害薬 AS-0141 を創製した。

第1章 キナーゼ結合性フラグメントを用いた Kinase Focused Evolved Fragment (KFEF) ライブラリの開発

近年、フラグメントリード探索という、小さなフラグメントヒットからリードへ導く探索法が着目されている。B-RAF キナーゼ阻害薬 Vemurafenib など、この手法を元に開発された医薬品も出てきている。キナーゼは ATP 結合部位の相同性が高く、キナーゼ阻害剤 (Type I) はヒンジと呼ばれる配列との水素結合を結合の基盤としている。そこで、蓄積されているキナーゼ阻害剤の結合構造情報からヒンジと相互作用している部分構造をキナーゼ結合性フラグメントとして抽出した (Figure 1)。フラグメント単体では結合活性が非常に弱いため、クリックケミストリーを利用して別の多様性フラグメントと簡便に連結させた。この Kinase Focused Evolved Fragment (KFEF) は、相互作用の増加による結合活性の増強に加え、多様性フラグメントの選択次第で物性や選択性を調整することも可能である。

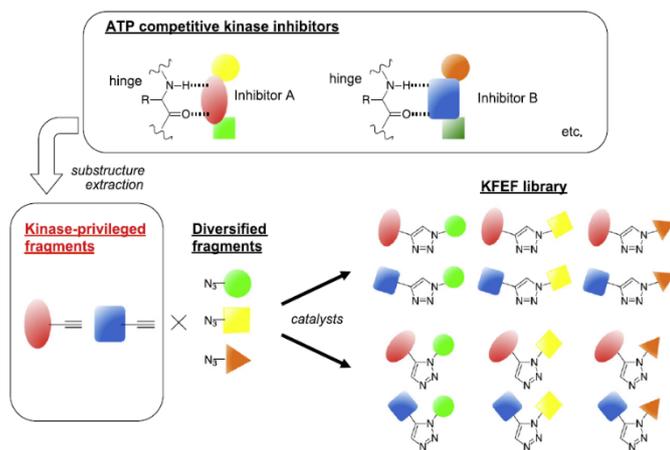


Figure 1. KFEF ライブラリデザインのコンセプト

本コンセプトの有用性を検証するため、キナーゼ結合性フラグメントのアルキン化合物5つと多様性フラグメントのアジド化合物8つを組み合わせるクリックライブラリを作成した。その際、クリック反応で構築されるトリアゾール環は、触媒の選択により容易に1,4置換体 (Cu) と1,5置換体 (Ru)を作り分けることができる。80 (5×8×2) の組み合わせのうち、合成に成功した76個のトリアゾール誘導体に対しキナーゼ阻害活性を測定した。チロシンキナーゼ (TK) とセリンスレオニンキナーゼ (STK) からそれぞれ FLT3 と GSK3βを評価キナーゼとして選抜したが、両者でヒットするリガンド種に大きな違いがあった。最も阻害活性が強い誘導体は、FLT3で **4C4** ($IC_{50} = 1.1 \mu M$)、GSK3βで **4C5** ($IC_{50} = 0.49 \mu M$) であり、ヒットとして十分な活性を有していた。興味深いことに、2つのヒットは一方のキナーゼに対しては活性が弱く10倍以上の選択性を確認できた。

以上より、KFEF ライブラリは、選択的キナーゼ阻害剤のヒット化合物取得に有用であることが示された。

第2章 7-アザインドール：高効率なキナーゼ結合性フラグメントを活用したリード探索

前章で述べた KFEF ライブラリを拡充し、HPK/GCK like kinase (HGK) に対しスクリーニングを実施した。HGK は細胞の浸潤、吸着、移行などに関与する STK で、HGK の過剰発現ががんの転移リスクと相関があることが示されている。

得られたヒット 1 (HGK IC₅₀ = 0.92 μM) に含まれる 7-アザインドール構造は、様々なキナーゼ阻害剤に存在する kinase privileged fragment として知られている。HGK との *in silico* 結合実験では、ヒット 1 の 7-アザインドールの 2 つの窒素原子とキナーゼのヒンジ配列との間で bidentate な水素結合が示唆された。得られた結合様式を基

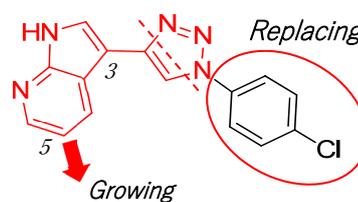


Figure 2. ヒット 1 の構造展開

に、リード創出への構造展開方針を決定した (Figure 2)。クリック反応で構築可能な 3-トリアゾロ-7-アザインドールを基本骨格とし、新たな相互作用を期待して 7-アザインドールフラグメントの 5 位に置換基を導入することとした。また、今回も 1,4 と 1,5 置換の 2 種のトリアゾールを合成した。合成した 24 化合物のうち、最も阻害活性が強い誘導体は IC₅₀ が 2.4 nM であり、ヒット化合物から 2 桁も活性が向上した。また、活性は少し低め (23 nM) だがキナーゼ選択性が改善した誘導体も取得できた。

以上より、7-アザインドールフラグメントとクリックケミストリーの活用により、簡便かつ迅速に特徴のあるリード化合物を取得できることが示された。

第 3 章 選択的 CDC7 阻害薬 AS-0141 の創出

CDC7 は、DNA 複製に関与する STK である。細胞周期の S 期において活性化され、基質の MCM タンパク質をリン酸化することで一連の DNA 複製プロセスが開始される。様々ながん種において高発現し、その発現度ががん患者の予後の悪さと相関していることから、CDC7 阻害薬は新規メカニズムの抗がん剤として開発されている。

しかしながら、CDC7 は ATP の親和性が非常に高く ($K_m = 2.8 \mu\text{M}$)、ATP と拮抗するタイプの阻害剤は生理条件の高濃度 ATP では大幅に活性が減弱するため、細胞活性を示す CDC7 阻害剤を見出すのは困難であった。そこで、高濃度 ATP 条件下で CDC7 阻害スクリーニングを実施し、同条件でも活性を示す 7-azaindole 誘導体のヒット化合物を見出した。この高効率キナーゼ結合性フラグメントを固定し、様々な母核を探索することで、新規フラノン誘導体リードへ導いた (Figure 3)。

本誘導体は、ヒンジ配列結合性の 7-アザインドールを含むことから想定される通り、ATP 濃度依存型の阻害を示したが、興味深いことに CDC7 とプレインキュベーションすると ATP

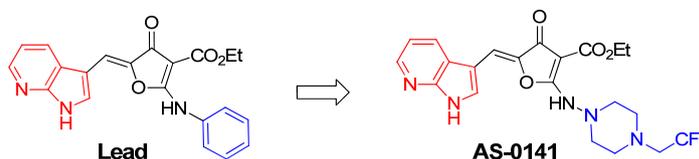


Figure 3. リードから AS-0141 への最適化

依存性を失うというユニークな特徴を示した。また、Rapid dilution 法で酵素活性の再生 (リガンド結合可逆性) を調べたところ、化合物は緩やかに酵素から乖離することがわかった。その時間依存的な阻害様式は、細胞内においても確認された。基質の MCM2 のリン酸化阻害効果は、化

化合物を除去してから 24 時間続いていた。構造最適化研究では、各パーツの構造活性相関を取得した。7-アザインドールからフラノンに至る骨格は CDC7 阻害活性発現に重要であったが、アニリン部分の変換については許容性が認められたため、様々なタイプのアミンに置換し、活性だけでなく ADME/PK も良好な化合物を探索した。最終的に選抜した AS-0141 は、高いキナーゼ選択性に加え、各種試験動物で良好な PK プロファイルを示し、マウスの抗腫瘍モデル (SW-620 xenograft) で高い抗腫瘍活性を示した。本剤は、前臨床試験を完了し、現在、臨床第 1 相試験を実施中である。

以上述べてきたように、キナーゼ指向性化合物ライブラリを基盤としたキナーゼ阻害剤探索法は、迅速なヒット・リード開発を可能とし、得られたリード化合物で臨床開発化合物を創製できることを実証した。また、キナーゼ阻害剤に特有の難題である選択性についても、Kinase Focused Evolved Fragment (KFEF) ライブラリから選択的なヒットを取得可能で、キナーゼ結合性フラグメントを基にした誘導体合成で更なる選択性向上が可能であることが示された。様々なキナーゼターゲットに対し本法を活用できると期待している。

原著論文

1. Irie, T.; Fujii, I.; Sawa, M. Design and combinatorial synthesis of a novel kinase-focused library using click chemistry-based fragment assembly. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (1), 591-596.
2. Irie, T.; Asami, T.; Sawa, A.; Uno, Y.; Hanada, M.; Taniyama, C.; Funakoshi, Y.; Masai, H.; Sawa, M. Discovery of Novel Furanone Derivatives as Potent Cdc7 Kinase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 130, 406–418.
3. Irie, T.; Sawa, M. 7-Azaindole: A Versatile Scaffold for Developing Kinase Inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2018**, 66(1), 29-36.
4. Irie, T.; Asami, T.; Sawa, A.; Uno, Y.; Taniyama, C.; Funakoshi, Y.; Masai, H.; Sawa, M. Discovery of AS-0141, a Potent and Selective Inhibitor of CDC7 Kinase for the Treatment of Solid Cancers. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (19), 14153–14164.

学位論文草稿提出者氏名：入江 隆行

学位論文草稿題目：プロテインキナーゼ指向性化合物ライブラリを基盤とした
選択的阻害剤の創出

ヒトには 500 種類以上のプロテインキナーゼ（以下、キナーゼと略す）が存在することがゲノム情報から判っており、有望な創薬ターゲットになっている。触媒活性をもつキナーゼドメインには、ATP 結合領域が存在し、キナーゼ間の相同性が高い。そのため、その領域に結合する化合物（Type I）は、阻害活性を確保しやすい反面、意図に反して他のキナーゼをも阻害する傾向がある。キナーゼ選択性を確保するために、ATP 結合部位以外の隣接部位（Type II / III 阻害剤）や全く離れた部位（Type V、アロステリック阻害剤）などの個々のキナーゼに特徴的な領域に作用する阻害剤の研究が行われているが、選択的キナーゼ阻害剤の開発は、未だ難易度の高い研究課題である。そこで、本研究では、キナーゼ一般に適用可能な手法として、キナーゼ指向性化合物ライブラリを基盤とした選択的阻害剤探索法を構築した。

第 1 章では、基盤となるキナーゼ指向性化合物ライブラリを開発を検討した。キナーゼ結合性フラグメントと多様性フラグメントをクリックケミストリーで簡便に連結させ、キナーゼ阻害剤開発の出発点となるヒット化合物を生み出す Kinase Focused Evolved Fragment（KFEF）ライブラリを構築した。第 2 章では、高効率なキナーゼ結合性フラグメントである 7-azaindole を基にしたリード探索法について検討した。KFEF ライブラリから見出した HGK キナーゼのヒット化合物（7-azaindole 誘導体）を足がかりにクリック合成法で簡便に構造展開し、100 倍以上の活性増強や、異なる選択性プロファイルを有する誘導体を迅速に見出した。第 3 章では、上述の KFEF ライブラリやリード探索法を活用して得た CDC7 キナーゼに対するリード化合物（7-azaindole 誘導体）の最適化を行った。その結果、ADME の課題を克服し、経口投与可能な CDC7 選択的阻害薬 AS-0141 の創出に成功した。

以上のように、申請者は、キナーゼ指向性化合物ライブラリを基盤としたキナーゼ阻害剤探索法を開発し、この手法が迅速なヒット・リード化合物の開発を可能とし、臨床開発化合物を創製できることを実証した。また、キナーゼ選択性についても、Kinase Focused Evolved Fragment（KFEF）ライブラリから選択的なヒット化合物を取得可能で、キナーゼ結合性フラグメントを基にした誘導体合成で更なる選択性向上が可能であることが示された。CDC7 キナーゼに対する阻害剤 AS-0141 は、マウスの抗腫瘍モデル（SW-620 xenograft）で高い抗腫瘍活性を示し、前臨床試験を完了し、現在、臨床第 1 相試験を実施中である。本手法が、様々なキナーゼターゲットに対し活用可能になり、今後の医薬品の研究開発に大きく貢献することが期待する。本学位論文には、顕著な新規性と独創性があり、申請者を博士（理学）の学位に値する能力を持つものと判断する。