ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）に対する高選択的阻害剤の探索と臨床開発化合物の創製

称号及び氏名　　博士(理学)　川畑　亘

学位授与の日付　2022 年 3 月 31 日

論　文　名　　ブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)に対する高選択的阻害剤の探索と臨床開発化合物の創製

論文審査委員　　主査　　藤井　郁雄
副査　　円谷　健
副査　　木下　誉富

ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）に対する高選択的阻害剤の探索と臨床開発化合物の創製

論文要旨

川畑亘

序論

ブルトン型チロシンキナーゼ(Bruton's Tyrosine Kinase: BTK)は B 細胞受容体シグナル伝達において重要な役割を果たしており、B 細胞の分化・増殖に必須な分子である。また BTK は Fcγ RIII 下流において炎症誘発性サイトカインの産生に関与している。これらのことから BTK 阻害剤には B 細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、アレルギー疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患に対する治療効果が期待できる。現在、多くの製薬企業や研究機関において BTK 阻害剤の研究・開発が行われており競争が激化している。2013 年のイブルチニブ(Ibrutinib)の承認を皮切りに現在までに 4 剤の BTK 阻害薬が上市されているが、これらは BTK の ATP 結合サイト近傍の 481 番目のシステイン残基と共有結合を形成し BTK を不活性化させる不可逆的阻害剤である(Fig. 1)。これら不可逆的 BTK 阻害剤は非常に強力で持続的な薬効を発揮することができる一方で、さまざまな生体成分とも非特異的に結合してしまう事や BTK と同様にシステイン残基を有するオフターゲットキナーゼも阻害する。イブルチニブが阻害するオフターゲットの中でも特に EGFR の阻害が臨床において高頻度でみられる副作用、下痢の原因となっていることが報告されている。このような副作用への懸念から不可逆的 BTK 阻害剤の慢性疾患への適用は難しく、現在上市されている不可逆的 BTK 阻害剤 4 剤はすべてガン領域への適用に限られている。さらに、不可逆的 BTK 阻害剤の課題として、BTK のシステイン残基からセリン残基への変異(C481S 変異)とそれに伴う薬剤耐性が挙げられる。すなわち、システインがセリンに置き換わることにより不可逆的阻害剤が BTK に結合できなくなり、結果阻害活性が低下することになる。実際に臨床においてイブルチニブの長期間の投与によりイブルチニブが効かなくなる、再発するといった症例が多く報告されている。このような共有結合型の不可逆的 BTK 阻害剤の問題点から、非共有結合型の可逆的な BTK 阻害剤のニーズは高い。

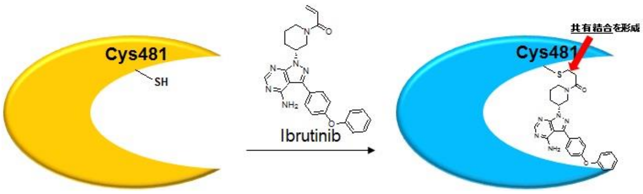


Fig.1 Ibrutinib の構造と BTK の不可逆的阻害の模式図

本研究ではターゲットキナーゼである BTK に対して選択性が高く、可逆的に BTK を阻害

する次世代のBTK阻害剤を探索し、現状のBTK阻害剤の課題を克服したAS-0871とAS-1763の2剤を臨床開発化合物として見出すことに成功した。実際に、イブルチニブと本研究にて見出したBTK阻害剤AS-0871のキナーゼ（310種）に対するパネルアッセイでは、イブルチニブが26種のキナーゼを阻害するのに対し、AS-0871は高い選択性を示し、2種キナーゼのみを阻害した。第1章では選択性の高いBTK阻害剤を取得するためのスクリーニング方法として、不活性型BTKに特有な疎水ポケットに選択的に結合する蛍光プローブをデザイン・合成し、そのプローブを用いた競合結合アッセイの開発について述べる。第2章では社内プロジェクトから見出されたリード化合物を基にした合成展開から見出したアミノトリアジン構造を有するBTK阻害剤AS-0871の創製について述べる。第3章では活性型BTKとリンパ腫由来細胞に対するスクリーニングにより見出したピロロピリミジン構造を有するBTK阻害剤AS-1763の創製について述べる。

第1章　高選択的BTK阻害剤取得のための競合結合アッセイ法の開発

これまでに報告されているキナーゼ阻害剤の多くはキナーゼのATP結合サイトに相互作用するようにデザインされているが、一般的に活性型キナーゼのATP結合サイトの構造はキナーゼ間で類似しており、各キナーゼに対する選択性を示す阻害剤を見いだすことは非常に困難である。しかし近年、不活性型キナーゼを阻害する化合物がより高いキナーゼ選択性を示すという報告がある。そこで本研究では高選択的なBTK阻害剤の創製を目的とし、不活性型BTKの阻害剤を探索する為の競合結合アッセイ法の構築を行なった。2011年に報告されたBTK阻害剤であるCGI1746と不活性型BTKとの共結晶構造の情報から、CGI1746の構造と環境依存型の蛍光団であるNBD(Nitrobenzoxadiazole)基を有する蛍光プローブ**1**をデザイン、合成を行なった(Fig.2)。この蛍光プローブ**1**は不活性型BTKに結合した際に蛍光を示し、不活性型BTKから乖離した際には蛍光が消失するという特性を示した。次にこの蛍光プローブを用いたBTK阻害剤のスクリーニングの可能性を検証した。不活性型キナーゼと親和性が高いと報告がある部分構造とキナーゼのヒンジ部分と相互作用する事が予想されるフラグメントを組み合わせた『キナーゼ阻害剤指向型化合物ライブラリ』に対し競合結合アッセイを実施したところ、t-ブチルフェニル基を有する化合物がヒット化合物として同定された。t-ブチルフェニル基はCGI1746および蛍光プローブ**1**に共通にみられる疎水性基であり、不活性型BTKに特異的に観測されるH3ポケットに相互作用することが報告されている。ヒット化合物も同様にt-ブチルフェニル基がH3ポケットに相互作用していると考えられる。このように蛍光プローブ**1**により、不活性型BTKのH3ポケットを特異的に認識する事により不活性型BTKの阻害剤をスクリーニングできることが示唆された。

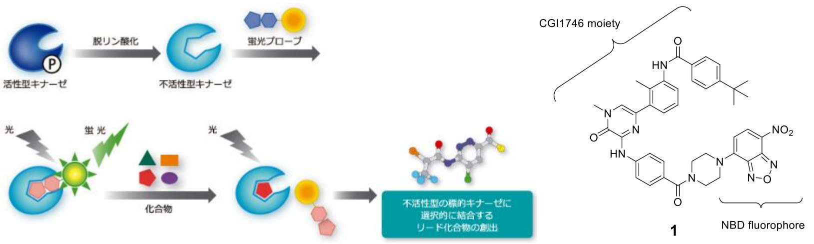
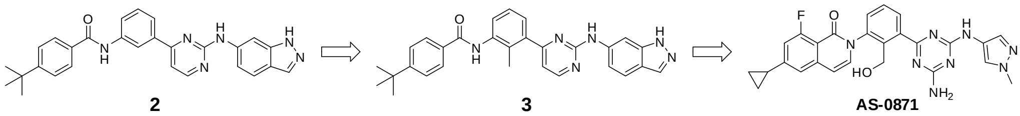


Fig.2 蛍光プローブを用いた競合結合アッセイの概念図と蛍光プローブ 1 の構造

第2章　自己免疫疾患の治療薬を目指した BTK 阻害剤 AS-0871 の創製

カルナバイオサイエンスにおける創薬プロジェクト『SYK/BTK デュアル阻害剤』の探索過程において見出されたアミノピリミジン化合物 **2** に対し BTK 選択的阻害剤への転換を試みたところ、ベンゼン環上へのメチル基の導入で SYK に対する阻害活性が消失し、BTK に対する阻害活性が大幅に向上した化合物 **3** が得られた。この **3** をリード化合物としてさらなる構造改変をおこなった。BTK に対する選択性が高い化合物を取得するために、活性型 BTK（BTK[A]）と不活性型 BTK（BTK[U]）の状態の異なる 2 種類の BTK を用いたモビリティーシフトアッセイ（MSA）にて化合物のスクリーニングを行った。中心環構造の変換、化合物と BTK[U]との共結晶構造に基づいた化合物デザイン、薬物動態および物理化学的パラメーターによるセレクションを経て、アミノトリアジン化合物 AS-0871 を見出した (Fig.3)。AS-0871 はマウスのコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて、60mg/kg、1 日当たり 2 回の経口投与にて強力に関節炎の発症を抑える効果を示した。また前臨床毒性試験においても安全性が確認されたことから、現在は第 I 相臨床試験を実施中である。



2　BTK IC_{50}: 7.3 μM　SYK IC_{50}: 0.36 μM

3　BTK IC_{50}: 0.44 μM　SYK IC_{50}: >10 μM

AS-0871　BTK[A] IC_{50}: 4.2 nM　BTK[U] IC_{50}: 0.39 nM

Fig.3 SYK/BTK デュアル阻害剤からの AS-0871 の創製

第3章　慢性骨髄性白血病の治療薬を目指した BTK 阻害剤 AS-1763 の創製

AS-0871 をはじめとするアミノトリアジン誘導体は不活性型 BTK（BTK[U]）に対してより強力に阻害を示すが、リンパ腫由来細胞(OCI-Ly10)に対する増殖抑制効果は高くない。一方で活性型 BTK（BTK[A]）を強力に阻害する化合物が OCI-Ly10 の増殖抑制効果が高いという事から、活性型 BTK（BTK[A]）および OCI-Ly10 を用いたスクリーニングにより慢性骨髄性白血病治療薬を目的とした BTK 阻害剤の探索を行った。アミノトリアジン化合物と BTK の共結晶構造およびドッキング実験からアミノトリアジン化合物 **4** の 1 位の窒素と 2 位のアミノ基を結びピロロピリミジンとする事により、BTK 阻害活性を損なうことなく構造改変することができた。さらに BTK[A]と OCI-Ly10 に対する阻害活性の向上を

目指し、ピロロピリミジンの 6 位の置換基を探索した結果、テトラヒドロピリジン構造を有する AS-1763 を見出した(Fig.4)。AS-1763 は BTK[A]の阻害のみならず、C481S 変異を有する BTK に対しても強力な阻害活性を示し、さらには C481S 変異をノックインしたイブルチニブ抵抗性の OCI-Ly10 細胞の増殖も強力に抑制した。AS-1763 は野生型の OCI-Ly10 細胞を移植したマウスゼノグラフトモデルにおいて経口投与にて強力かつ容量依存的な抗腫瘍効果を示し、またイブルチニブ抵抗性の OCI-Ly10 細胞を移植したマウスゼノグラフトモデルにおいても有意な抗腫瘍効果を示した。このことから AS-1763 は通常の慢性骨髄性白血病に対してだけではなく、既存の BTK 阻害剤の持続的な投与によって C481S 変異を起こした薬剤耐性株に対する治療薬としても期待される。AS-1763 もまた前臨床毒性試験において安全性が確認されたことから、現在は第 I 相臨床試験を実施中である。

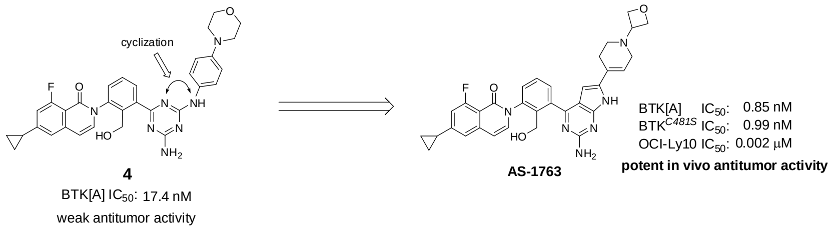


Fig.4 アミノピリミジン型 BTK 阻害剤からの合成展開による AS-1763 の創製

論文一覧

1. 'Turn On/Off' fluorescence probe for the screening of unactivated Burton's tyrosine kinase
   Wataru Kawahata, Tokiko Asami, Ikuo Fujii and Masaaki Sawa
   Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **25**, 2141-2145. (2015)
2. Design and synthesis of novel pyrimidine analogs as highly selective, non-covalent BTK inhibitors
   Wataru Kawahata, Tokiko Asami, Takayuki Irie, Masaaki Sawa
   Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **28**, 145-151. (2018)
3. Design and Synthesis of Novel Amino-triazine Analogues as Selective Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors for Treatment of Rheumatoid Arthritis
   Wataru Kawahata, Tokiko Asami, Takao Kiyoi, Takayuki Irie, Haruka Taniguchi, Yuko Asamitsu, Tomoko Inoue, Takahiro Miyake, Masaaki Sawa
   Journal of Medicinal Chemistry, **61**, 19, 8917–8933. (2018)
4. Discovery of AS-1763: A Potent, Selective, Noncovalent, and Orally Available Inhibitor of Bruton's Tyrosine Kinase
   Wataru Kawahata, Tokiko Asami, Takao Kiyoi, Takayuki Irie, Shigeki Kashimoto, Hatsuo Furuichi, Masaaki Sawa
   Journal of Medicinal Chemistry, **64**, 19, 14129-14141. (2021)

学位論文審査結果要旨

令和 4 年 3 月 1 日

学位論文草稿提出者氏名：川畑　亘

学位論文草稿題目：ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）に対する高選択的阻害剤の探索と臨床開発化合物の創製

ブルトン型チロシンキナーゼ(Bruton’s Tyrosine Kinase: BTK)は，B 細胞受容体シグナル伝達において重要な役割を果たしており，B 細胞の分化・増殖に必須な分子である。また BTK は FcγRIII 下流において炎症誘発性サイトカインの産生に関与している。これらのことから BTK 阻害剤には，慢性リンパ性白血病や自己免疫疾患などの治療効果が期待できる。現在までに 4 剤の BTK 阻害薬が上市されているが，これらは BTK と共有結合を形成し BTK を不活性化させる不可逆的阻害剤であり，さまざまな生体成分とも非特異的に結合してしまうため，オフターゲットキナーゼも阻害する。そこで，本研究ではターゲットキナーゼである BTK に対して選択性が高く，可逆的に BTK を阻害する次世代の BTK 阻害剤の探索を検討した。その結果，現状の BTK 阻害剤の課題を克服した AS-0871 と AS-1763 の 2 剤を臨床開発化合物として見出すことに成功している。

第 1 章では，高選択的な BTK 阻害剤の創製を目的とし，不活性型 BTK の阻害剤を探索するための競合結合アッセイ法の構築を行なった。BTK 阻害剤 CGI1746 と不活性型 BTK との共結晶構造から，CGI1746 と蛍光団 NBD(nitrobenzoxadiazole)基を有する蛍光プローブを設計・合成し，蛍光消光による BTK 阻害剤のスクリーニングが可能であることを実証した。第 2 章では，自己免疫疾患の治療薬を目指した BTK 阻害剤の開発を検討した。アミノピリミジン化合物を母核として， BTK 選択的阻害剤への転換を試みたところ，BTK に対する阻害活性が大幅に向上した化合物の獲得に成功した。 さらに，薬物動態および物理化学的パラメーターによる選別を行い，臨床開発化合物であるアミノトリアジン化合物 AS-0871 を見出した。第 3 章では，慢性骨髄性白血病の治療薬を目指した BTK 阻害剤の開発を検討した。アミノトリアジン化合物と BTK の共結晶構造およびドッキング実験から設計した各種誘導体を，リンパ腫由来細胞(OCI-Ly10)に対する増殖抑制効果でスクリーニングした結果，強力な活性型 BTK（BTK[A]）阻害化合物 AS-1763 の見いだした。

以上のように，申請者は，標的タンパク質である BTK に対して選択性が高く，可逆的に BTK を阻害する次世代の BTK 阻害剤を探索し，現状の BTK 阻害剤（イブルチニブなど）の課題を克服した AS-0871 と AS-1763 の 2 剤を臨床開発化合物として見出すことに成功している。実際に，イブルチニブと本研究にて見出した BTK 阻害剤 AS-0871 の各種キナーゼ（310 種）に対するパネルアッセイを比較したところ，イブルチニブが 26 種のキナーゼを阻害するのに対し，AS-0871 は高い選択性を示し，2 種キナーゼのみを阻害した。本研究で検討された特異的キナーゼ阻害の開発手法は，さまざまな疾患関連キナーゼに応用する事が可能で，今後の医薬品の研究開発に大きく貢献することが期待できる。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。