

FBDD におけるインシリコ手法

高橋 理, 増田吉昭, 室谷 歩, 古谷利夫*

In Silico Approaches for Fragment-based Drug Design

Osamu TAKAHASHI, Yoshiaki MASUDA, Ayumu MUROYA, and Toshio FURUYA*

Drug Discovery Department, PharmaDesign, Inc., 2-19-8 Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032, Japan

(Received September 1, 2009)

An important step to promote fragment-based drug design (FBDD) is to find high-quality fragment molecules. Therefore the design of the fragment library is the most crucial stage. In our fragment library, the main considerations are ligand efficiency (LE), diversity, and solubility with drug-like properties. We especially considered LE to raise hit probability in screening. We estimated LE of the fragment molecule based on known LE values of the active compounds. We also developed a docking program suitable for screening fragments rather than drug compounds. Furthermore, we explored fragment-linking program, which links together fragments that bind to adjacent sites on a target protein so as to promote FBDD *in silico*.

Key words—*in silico*; fragment; drug design; docking; ligand efficiency; fragment linker

1. はじめに

現在 FBDD (Fragment Based Drug Design) と呼ばれている手法は “SAR by NMR” と題して Fesik らが発表した¹⁾ 1996 年頃から, 新たな創薬手法として登場した. その後, 2000 年以降になってから X 線構造解析による成功例など²⁾ が示され, 急激に注目されてきた. FBDD が注目される理由の一つにフラグメントから創薬を始めることの意義の大きいことが挙げられる. 膨大な化合物を必要とする HTS はかならずしも十分なケミカルスペースをカバーしていないばかりか, ヒット率が低いこと³⁾ やその後の構造展開が容易でない場合が多い. 医薬品候補化合物の分子量を 450 (非水素原子の数が 30 程度) とするとケミカルスペースは 10^{60} 個と見積もられているが,⁴⁾ これに対して, 高々分子量が 250 (非水素原子の数がせいぜい 12) のフラグメント分子でカバーされるケミカルスペースは 10^7 個と見積もられている. したがって, HTS 用に所有している自社化合物の数が 100 万化合物とすると,

フラグメントから始める場合は 2 つのフラグメントをつなぎ合わせると考えれば, 1000 化合物のスクリーニングで, 自社化合物の 100 万化合物をスクリーニングするのと概ね同等の効果が見込める. このことから, 製薬企業はたくさんの化合物を集めなくても済むことになる. フラグメント分子は低分子量の単純な構造が多いので, ADME (薬物動態) も比較的良好, 活性も Ligand Efficiency (以下 LE と略す)⁵⁾ を考慮すると分子量が小さい割には高い. また, スクリーニング法はフラグメント分子の活性は原理的には弱くても (数十 μM –数 mM 程度) 構わないので, HTS のアッセイに比べるとより精度の高い方法が要求されるため, 一般的に 10 mM 程度までの結合活性が確認できる NMR 法や X 線結晶構造解析法によるスクリーニングが行われる. さらに, これらの方法では, フラグメントが標的タンパク質の立体構造上のどこで, どのように相互作用しているかの情報が得られる場合が多いので, フラグメント分子から医薬品リード化合物への展開がスムーズに進み易い. 小さいフラグメント分子からリード最適化に直接展開できることはメディシナルケミストにとっては格好の出番が待っていることにもなる.

このように魅力的な創薬手法である FBDD に注

株式会社ファルマデザイン (〒104-0032 東京都中央区八丁堀 2-19-8)

*e-mail: furuya@pharmadesign.co.jp

本総説は, 日本薬学会第 129 年会シンポジウム S29 で発表したものを中心に記述したものである.

目し、われわれは 2003 年頃から、NMR 法や X 線結晶構造解析法によらずにインシリコでフラグメントをスクリーニングし、スクリーニングされた隣接する異なる結合部位で相互作用する複数のフラグメント分子を最適なリンカーで結合することにより活性分子をデザインするプログラムの開発を行ってきた。最大の難関はフラグメント分子自体の活性が非常に弱いので、インシリコの docking プログラムで精度よくスクリーニングすることは容易ではないことである。今回、新たなスコアパラメータの最適化法を導入することにより、既知活性化合物を効率よく分離できることができたので、フラグメント同士を結合するリンカープログラムとともに報告する。また、FBDD を成功させるためには、よいフラグメントを用いることが極めて重要と考えられる。種々のフラグメントライブラリが報告されているが、LE を考慮したフラグメントライブラリは存在していない。LE を考慮したライブラリのデザインから紹介する。

2. フラグメントライブラリ

種々のフラグメントライブラリが開発されているが、質のよいフラグメントライブラリの要件は薬物分子としての化合物の物性値や多様性はもちろんのこと、最も考慮すべきことはヒット化合物の将来性を評価する効果的なパラメータである LE の高いフラグメントを集めることであろう。LE はリガンドを構成している個々の非水素原子 (Heavy Atom Count: HAC と略す) あたりでのリガンドと標的タンパク質との結合に伴う自由エネルギーと定義され、Eq. (1) で表される。

$$\begin{aligned} LE &= -\Delta G/HAC \\ &= -RT \ln(K_d)/HAC \end{aligned} \quad (1)$$

(G は自由エネルギー, R はガス定数, T は絶対温度, K_d は解離定数を示す)

そこで、Fig. 1 に示すスキームで市販の購入可能な化合物の中から、活性が報告されている既知化合物の情報を基に LE を見積り、溶解度などを考慮して分子量 250 以下の 3743 化合物からなるライブラリを開発した。具体的な手順を示す。まず、市販の購入可能な約 450 万の化合物データベース (以下 DB と略す) から分子量 250 以下、SlogP が 3 以下、水素結合の受容基が 3 以下、供与基が 3 以下で絞り込んだ DB を作製した。結果として 230411 化

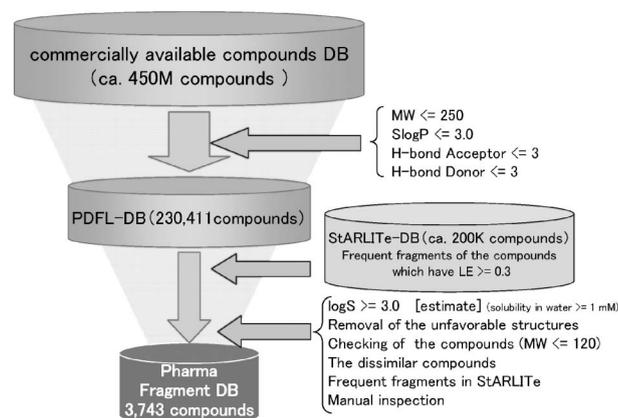


Fig. 1. Flowchart of the Construction of the Fragment Library DB

合物が DB に格納された (PDFL-DB と呼ぶ)。一方、Journal of Medicinal Chemistry などの雑誌に報告された化合物の構造と標的タンパク質に対する結合活性などの情報が格納されている DB (StARLite)⁶ について、LE 値を計算した DB (PDLE-DB と呼ぶ) を作製し、PDFL-DB のそれぞれの構造を有する化合物が PDLE-DB に存在するかどうかを部分構造検索した。この検索条件では複数の PDLE-DB 化合物に対してヒットする場合があります。最終の Fragment DB では、フラグメントの出現頻度がわかるように、それぞれの LE 値を保存して、LE 値の最大値や平均値を計算し参照できるようにした。そして、LE の最大値が 0.3 以上の化合物については StarDrop⁷ を用いて pH 7.0 における水に対する溶解度を計算し、1 mM 以上と予測された化合物を選択した。このほか、薬物分子として適切ではない忌避構造を持ったものを削除し、最終的にフラグメント化合物として 3743 化合物を選択した。

3. フラグメントスクリーニングプログラム PD-DOCK

フラグメントは分子量が小さいため結合活性は弱いので、分子量のより大きい一般的な医薬品候補化合物に比べてより正確な計算が求められる。特に弱い水素結合や CH- π 相互作用などを考慮する必要がある。しかし、通常の docking プログラムではこれらの相互作用は考慮されていない場合が多いので、フラグメントスクリーニング用にプログラムを開発する必要性を感じた。そこで、これらの弱い相互作用を含めた docking プログラム PD-DOCK を

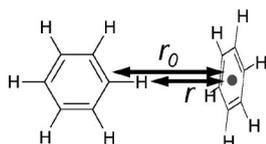
開発した。PD-DOCK の docking スコアには次の項を含む (Fig. 2)。ファンデルワールス項、クーロン項、水素結合項、ASA (接触表面積) の項、GB/SA 法の遮蔽項、回転結合数、定数項、トーション角の項である。ファンデルワールス項とタンパク質の部分電荷は Amber⁸⁾ 及び GAFF⁹⁾ のパラメータを用いた。リガンドの部分電荷は Gasteiger-Marsili 法¹⁰⁾ を用いて計算した。

ASA は、溶媒の半径を 1.4 Å として原子種毎に

Functional forms

Weak hydrogen bond

CH- π



r : Lennard-Jones-type 8-5 potential

r_0 : repulsive term of r_0^{-5}

Optimum distances are defined from crystallographic data
Well depth parameters are determined empirically

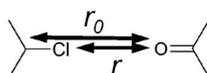
Other terms

vdW, coulomb, ASA, #rotatable bond
And intra ligand terms (vdW, coulomb, torsion)

Fig. 2. Functional Forms of PD-DOCK

Halogen bond

Cl-O



計算した。弱い相互作用を見積もるために、ファンデルワールス項を種々検討して、結晶構造を最もよく再現するパラメータを最適化した結果、Lennard-Jones 型 8-5 ポテンシャルをスコア関数に組み込んだ。

Docking 様式のサーチには、われわれがこの研究以前に開発した汎用スコアを用いた。このスコアは、Fig. 3 に示す既知の 31 個のタンパク質とリガンドの共結晶構造で、サンプリングされたデコイ結合様式に比べて天然の結合様式が最もスコアが低くなるように上記の各項の係数を定めた。この方法で求めたパラメータを用いて、パラメータの妥当性を検討したところ Fig. 4 に示すように Astex のテストセット¹¹⁾ 85 件中 60 件 (71%) で R.M.S.D. 2.0 Å 以下となり良好な成績であった。化合物順位付けには、上記の各項のうちリガンド分子内の項を除いた各項を用いた。

4. フラグメント間結合プログラム Fragment Linker

X 線構造解析法や NMR 法で 2 つのフラグメントが隣接する結合部位のポケットに結合していることが確認されたら、Fig. 5 に示すように、次はこれらのフラグメントを適切なリンカーで結合することが必要となる。この時に、フラグメント分子とリンカー分子が合成可能な組み合わせでなければ、その

Determination of potential parameters

PDP ID	Target	Ligand MW
20HK	BASE1	145.19
1EQG	COX1	205.28
1O4B	c-Src SH2	639.54
1O4P	c-Src SH2	178.14
1RS2	DHNA	195.18
1RS4	DHNA	430.28
1N1M	DPP-IV	171.28
2ADU	Methionine aminopeptidase	159.19
1GWQ	ER α	242.30
1NDE	ER β	486.06
1U3S	ER β	277.28
2JJC	hsp90	95.10
1QWC	neuronal nitric oxide synthase	179.27
1OUK	p38	507.58
1W7H	p38	200.24
1W83	p38	441.89
1W84	p38	222.29
1ZZ2	p38	472.56
1WCC	CDK2	129.55
1Y23	PNMT	203.09
1AAX	PTP1B	356.16
1C83	PTP1B	246.18
1NNY	PTP1B	716.72
1CIZ	stromelysin	502.61
1G4K	stromelysin	309.30
2C90	Thrombin	180.60
1O5G	Prothrombin	383.45
1C5Z	Urokinase	121.16
1FV9	Urokinase	149.15
1OWE	Urokinase	290.35
1S39	tRNA guanine transglycosylase	162.17

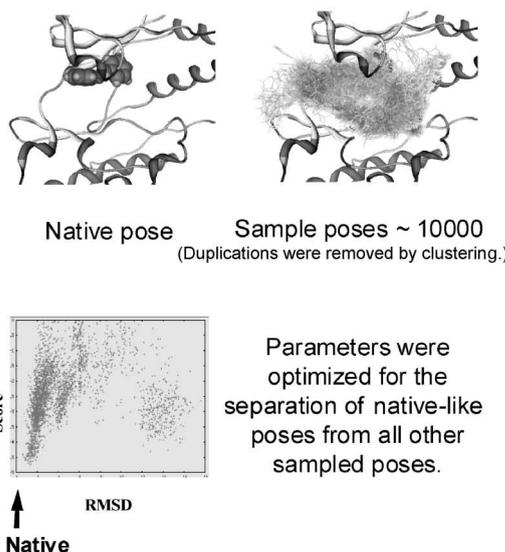
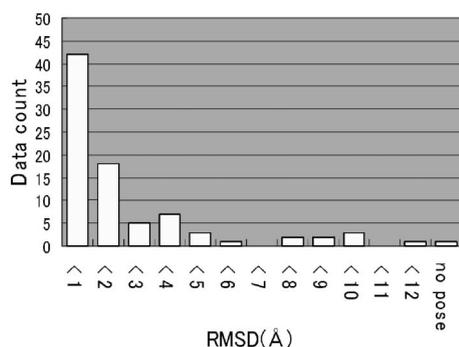


Fig. 3. The PDB Data Used for the Determination of Potential Parameters

Evaluation (Astex test set 2007*)



RMSD values of ligand atoms between crystal structure and top ranked pose by PD-DOCK with weak interactions¹¹⁾

Fig. 4. Result of the Evaluation of the Potential Parameters

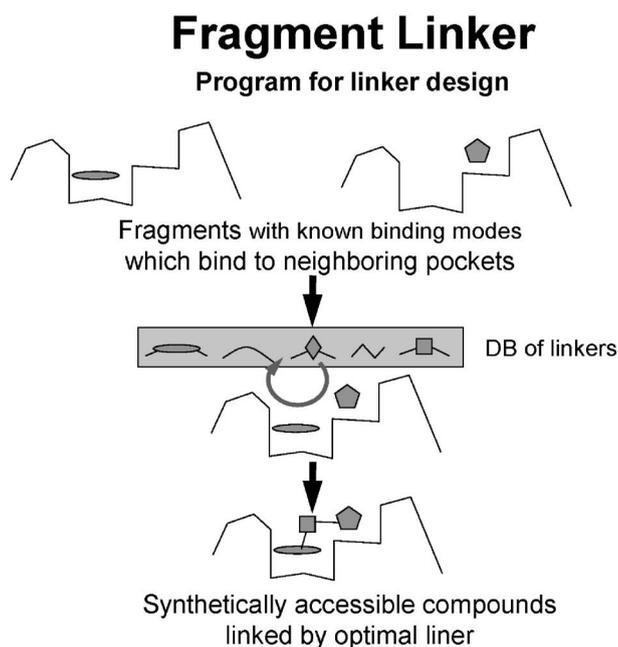


Fig. 5. An Outline of Fragment Linker Program

先の展開が難しくなる。このことを考慮に入れて、約 2000 種類のリンカー候補の DB を用意した。リンカー DB には、Fig. 6 に示すような、いわゆる name reaction のように代表的な反応が知られている官能基を末端に有する分子を中心に選んである。また、得意とする合成反応の蓄積がある研究者が特に指定するリンカー分子を追加することも可能で、DB は柔軟に対応できるように構築してある。

フラグメント分子同士をリンカーで結合する手順を説明する。まず、Fig. 7 に示す標的タンパク質の立体構造の中で、2 つのフラグメントのそれぞれに

Fragment Linker DB

flexibility

- Linker database can be changed by user.
- Definitions of chemical reactions are easily customized.

Grignard reaction (halogen / ketone, aldehyde)
 $R1-X + R2-C(=O)-R3 \rightarrow R1-C(R2)(-OH)-R3$
 Grignard reaction (halogen / halogen)
 $R1-X + R2-X \rightarrow R1-R2$
 Esterification (alcohol / carboxylic acid)
 $R1-OH + R2-C(=O)-OH \rightarrow R2-C(=O)-O-R1$
 Amidation (amine / carboxylic acid)
 $R1-NH2 + R2-C(=O)-OH \rightarrow R2-C(=O)-NH-R1$
 nucleophilic substitution of haloalkanes (amine / halogen)
 $R1-NH2 + R2-X \rightarrow R2-NH-R1$
 nucleophilic substitution of haloalkanes (alcohol / halogen)
 $R1-OH + R2-X \rightarrow R1-O-R2$
 Nucleophilic addition (ketone / amine)
 $R1-C(=O)-R2 + R3-NH2 \rightarrow R1-C(R2)=N-R3$

Fig. 6. Definitions of Chemical Reactions

ついて、リンカーを結合させる部位を立体構造が表示されている画面上で指定する。次に、指定された官能基と反応可能なリンカーの官能基を検索し、反応可能と判断されたリンカーの配座解析を行い安定なコンフォメーションを複数用意する。

これらのリンカーのコンフォメーションとフラグメント分子を結合させ、新たなリガンドとしての構造の最適化を行う。そして、標的タンパク質の立体構造に結合させた複合体構造としての構造最適化計算を行う。標的タンパク質とリガンドのそれぞれ単独の状態でのエネルギー値の和と標的タンパク質リガンドとの複合体のエネルギー値の差がフラグメント分子とリンカー分子をつなげ新たにデザインされたリガンドの標的タンパク質との結合に伴うエネルギー値となる。エネルギー値の計算には、Fig. 8 に示した評価関数を用いた。

フラグメントリンカープログラムを適用した例を Fig. 9 に示す。活性データが詳細に報告されているアセチルコリンエステラーゼとメチレン鎖を介して両端にタクリンを有する化合物の複合体構造 (PDB コード: 2CKM) の論文¹²⁾と今回作成したリンカープログラムの結果を比較検討した。Fig. 9 から $n=7$ の時に実測値の活性が最も高くなっているが、計算による最小値と一致していることがわかる。

5. FBDD の今後への期待

これまでに HTS や SBDD へ多額の投資をしてきた製薬企業であるが、2000 年以降、新薬の上市確率は低くなっている。上市確率に及ぼす要素はこれらの創薬手法だけの問題ではないが、少しでも性質のよい薬物候補分子を創出するためには、創薬手法の是非は重要な要素である。FBDD はそれに答え

Fragment Linker algorithm

Identify reactive groups in each linker in database

Conformation analysis of linkers

Multiple conformer

Linking and structural
optimization of the linker

structural optimization of
hole ligand and
surrounding protein residues

Calculation of
evaluation function

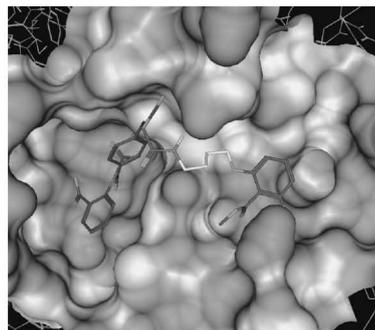
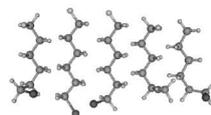


Fig. 7. Fragment Linking Process in Fragment Linker Program

Fragment Linker

Evaluation function

$$E \text{ (kcal/mol)} = \Delta vdw + \Delta \text{electrostatic} + \Delta \text{bond length} + \Delta \text{tortion angle} + \Delta \text{bond angle} + \Delta \text{solvation} + 0.7 * (\# \text{Rotatablebond})$$

Δvdw
 $\Delta \text{electrostatic}$
 $\Delta \text{bond length}$
 $\Delta \text{tortion angle}$
 $\Delta \text{bond angle}$
 $\Delta \text{solvation}$
 $\# \text{Rotatablebond}$

Difference of MMFF force field between the bound and unbound state
 Difference of solvation energy by GB/SA method
 Number of Rotatable bonds of linker

Coefficient of #rotatablebond was taken from Andrews' score¹³⁾

Fig. 8. Scoring Function for Fragment Linker Program

られる手法であると評価し、期待している。ただ、FBDD というだけでは質のよい薬物候補分子に到達するとは限らない。肝心なことは質のよいフラグメント分子から出発することである。このためわれわれは LE を考慮し、溶解度の高いフラグメント分子だけを集めたライブラリを開発した。ただ、ライブラリの LE の見積り方法は既知活性化合物の情報を基に算出したものであって、この妥当性は検証の

Fragment Linker

example

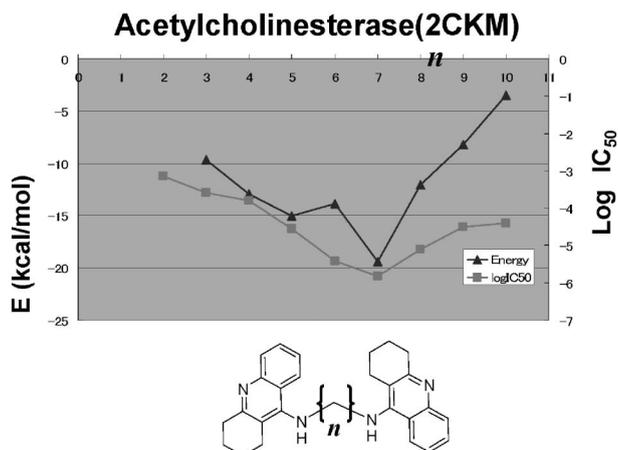


Fig. 9. Case study: Finding the Suitable Linker for Fragments Bound to Acetylcholinesterase¹²⁾

余地があると考えている。妥当性が明らかになれば、創薬の成功確率は飛躍的に向上すると期待している。

さらに指摘しておきたいことはタンパク質の立体構造情報が飛躍的に豊富になった現在、FBDD は単なる現状の FBDD に留まることのない大きな可

能性を秘めていると考えている。例えば、FBDDの概念はこれまでのメディシナルケミストが頭で考えていたことを具現化したものではないかともみることができる。メディシナルケミストは一連の合成した化合物の構造活性相関を考えるときに基本構造をいくつかに分ける。Head部分、Tail部分、Chain部分などとフラグメント化して、それぞれのパーツ（部分）が活性にどのように寄与しているかを考える。これまでは、このような考察を化合物側の構造だけで考えてきた。これからは、標的タンパク質の3次元構造の中に置きながら、これらのパーツとしてのフラグメントをLEという活性を反映したパラメータを合理的に判断しながら創薬を推進していくことができると考えている。LEを考慮したフラグメントライブラリとこれらのパーツをつなぎ合わせるFragment Linkerプログラムが創薬研究を効率化していくものと期待している。

なお、PD-DOCKとFragmentLinkerプログラムは、独立行政法人医薬基盤研究所による「平成18年度保健医療分野における基礎研究推進事業」の研究の一環として株式会社ファルマデザインが実施した研究内容の一部を含みます。

REFERENCES

- 1) Shuker S. B., Hajduk P. J., Meadows R. P., Fesik S. W., *Science*, **274**, 1531–1534 (1996).
- 2) Nienaber V. L., Richardson P. L., Klighofer V., Bouska J. J., Giranda V. L., Greer J., *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1105–1108 (2000).
- 3) Shoichet B. K., *Nature*, **432**, 862–865 (2004).
- 4) Congreve M., Chessari G., Tisi D., Woodhead A. J., *J. Med. Chem.*, **51**, 3661–3680 (2008).
- 5) Hopkins A. L., Groom C. R., Alex A., *Drug Discov. Today*, **9**, 430–431 (2004).
- 6) StARLITe: (<http://www.ebi.ac.uk/chembl/>), cited 21 October, 2009.
- 7) StarDrop™: (<http://www.optibrium.com/stardrop/>), cited 21 October, 2009.
- 8) Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M. Jr., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W., Kollman P. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5179–5197 (1995).
- 9) Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A., *J. Comput. Chem.*, **25**, 1157–1174 (2004).
- 10) Gasteiger J., Marsili M., *Tetrahedron*, **36**, 3219–3228 (1980).
- 11) Hartshorn M. J., Verdonk M. L., Chessari G., Brewerton S. C., Mooij W. T. M., Mortenson P. N., Murray C. W., *J. Med. Chem.*, **50**, 726–741 (2007).
- 12) Rydberg E. H., *J. Med. Chem.*, **49**, 5491–5500 (2006).
- 13) Andrews P. R., Craik D. J., Martin J. L., *J. Med. Chem.*, **27**, 1648–1657 (1984).