



技術解説

創薬とコンビナトリアルケミストリー

森 江 俊 哉*

Combinatorial Chemistry for Drug Discovery

Key Words : Library, Lead Compound, Split Synthesis, Parallel synthesis, Solid-Phase Synthesis

1. はじめに

コンビナトリアルケミストリーとは、組み合わせを利用して多くの化合物群(ライブラリー)を効率的に合成し、それらの化合物をさまざまな目的に応じて活用していく技術であり、創薬に限らず先端材料や配位子、触媒の開発等に利用されている。コンビナトリアルケミストリー技術は1980年代に開発され、欧米では1990年初頭以来、高速で生物活性を評価するHTS(High Throughput Screening)技術と共に製薬企業で爆発的なブームとなった。わが国においても数年前から、大多数の製薬企業がコンビナトリアルケミストリーを導入し、創薬研究に活用し始めている。

図1に創薬研究のプロセスを示す。創薬研究はまず、疾患とかかわりがあると考えられるたんぱく質等の標的分子を同定することから始まる。創薬標的分子が決まると、まず標的分子に作用する化合物評価のための生物スクリーニング系を作成し確立する。作成されたスクリーニング系で、さらに高速化したHTSで化合物のスクリーニングを行い、その蛋白に作用して生物活性を発現する化合物(リード化合物)を探索することになる。リード化合物が見出されると次は有効性、吸収、代謝、毒性等を考慮してリード化合物の最適化を行い開発候補化合物へと導く。

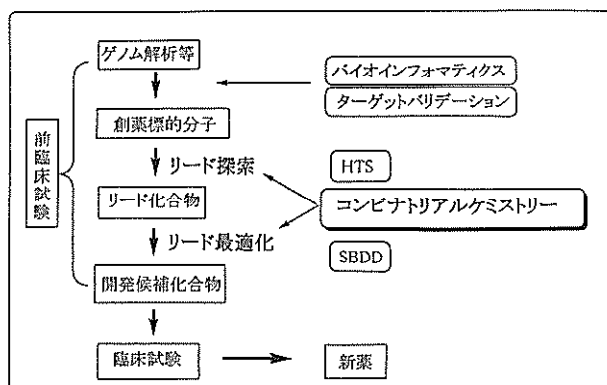


図1 創薬のプロセスとコンビナトリアルケミストリー

従来法(化合物を一個ずつ合成する手法)に変わり、自動合成装置を用いて一度に多数のライブラリー合成が可能なコンビナトリアルケミストリー技術は、リード探索とリード最適化の過程において、HTSやSBDD(Structure Based Drug Design)の技術を共に利用することにより、研究開発のスピードアップ、効率化に大きく貢献する重要な創薬基盤技術のひとつである。本稿ではコンビナトリアルケミストリーの基本技術と創薬における最近の動向について概説する。

2. コンビナトリアル合成

コンビナトリアル合成によりライブラリーを構築する方法としては、スプリット合成とパラレル合成に大別できる。また、ライブラリー合成に利用する反応相には、固相合成法と従来から伝統的に使用されてきた液相合成法があり、それぞれに長所と短所がある。スプリット合成は固相合成法で適用されるのに対してパラレル合成は固相合成法でも液相合成法でも行うことが可能である。以下にそれぞれに関して簡単に説明する。

* Toshiya MORIE
1960年3月7日生
1984年大阪大学大学院薬学研究科修士課程修了
現在、大日本製薬(株)創薬研究所・化学第1研究部、主任研究員、薬学博士、医薬品化学
TEL 06-6337-5901
FAX 06-6338-7656
E-Mail toshiya-morie@dainippon-pharm.co.jp



2.1 スプリット合成

樹脂に担持した化合物を用い、反応、混合、等分を繰り返してライブラリーを構築する方法で、膨大な数の化合物を簡単に合成することができる利点があり、特にリード探索に適した方法である。図2にスプリット合成の原理を示した。3種類の試薬(A~I)を用いて3回反応させるだけで、 $3 \times 3 \times 3 = 27$ 個の化合物ライブラリーが調整できる。もし20種類の試薬を用いれば、3回反応させるだけで、 $20 \times 20 \times 20 = 8000$ 個もの化合物ライブラリーが得られることになる。しかし、得られるライブラリーは混合物であるため、活性物質の特定は容易ではない。そこで、化合物を識別するため、Still¹⁾らのタグをつける方法や記憶用チップを利用するIRORI社およびカイ

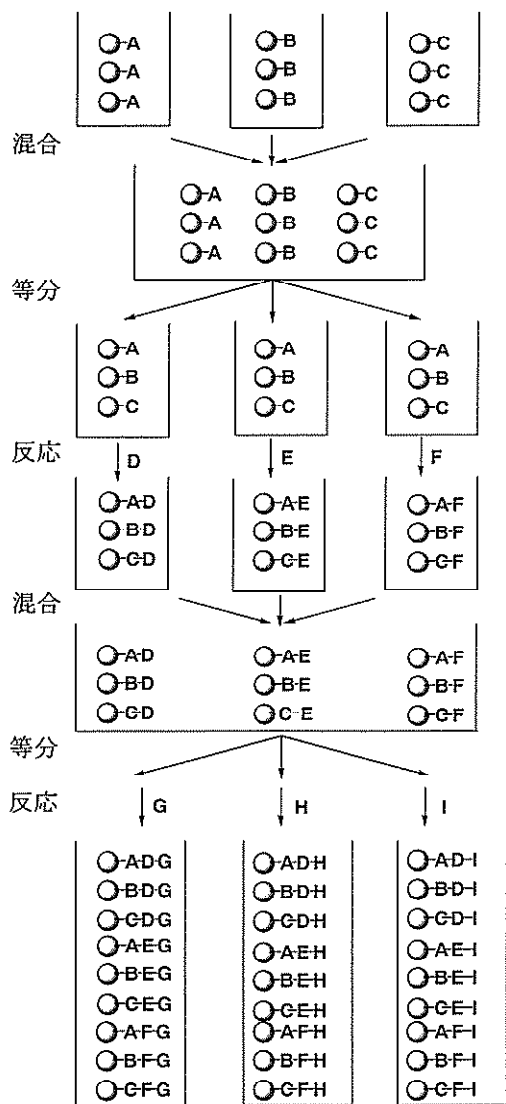


図2 スプリット合成の原理

ロン社の方法等が開発され利用されている。

2.2 パラレル合成

個々の化合物を混合物ではなく単一の化合物として別個の反応容器(セル, ウェル等)で合成を行いライブラリーを構築する方法である。合成できる化合物数はスプリット合成に比べれば少ないが、単一の化合物が得られ構造決定も容易で精製も可能であるため、リード最適化に適した方法である。コンビナトリアルケミストリーは当初、膨大な数の化合物が得られるスプリット合成が注目されたが、製薬企業においては、現在ではパラレル合成が主流となっている。

2.3 固相合成法

図3に固相合成法と従来の有機合成で用いられている液相合成法の操作法を示した。

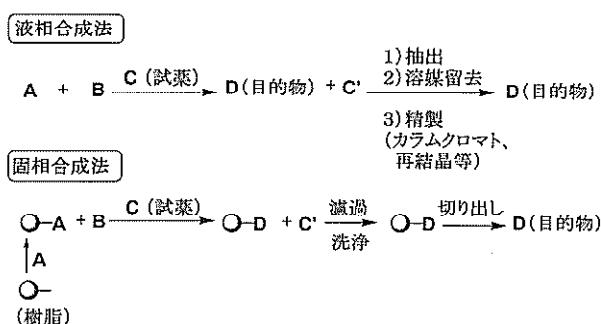


図3 液相合成法と固相合成法

コンビナトリアル合成は、基本的には固相、液相のどちらでも行うことが可能であるが、固相合成は液相合成に比べて以下に述べるような利点があるため、一般に固相合成法が多く用いられてきた。

- ① 操作が簡便で、過剰量の試薬を用いて反応を完結させることができる
- ② 未反応の試薬や過剰量の化合物を単に洗浄するだけで除去することができるため、各工程での精製の必要がない
- ③ 反応の自動化が容易で合成ロボットに適用しやすい

固相合成の手法はノーベル賞を受賞した Merrifield²⁾ によって開発された固相法、すなわち樹脂 (Merrifield樹脂) の表面上でペプチド誘導体を合成していく手法を基本にして、それを一般の有機合成反応に適用できるように発展してきたものであり、固相支持体(サポート)を官能基の保護基として用いる合成法と考える事ができる。固相合成用のレジソ

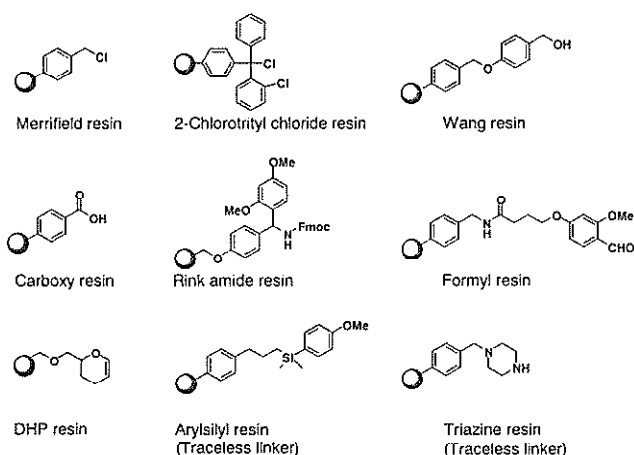


図4 固相合成用レジン

はサポートと官能基(Cl, OH, NH₂, COOH etc.)を有するリンカー部から構成されており、図4に示すように種々のレジンが試薬会社から市販されている。

固相合成を成功させるには、反応に最適な支持体とリンカーの選択をすることが非常に重要である。固相支持体としてはポリスチレンが汎用されているが、水を使用する反応(加水分解等)の場合には膨潤しないため、その欠点を克服したTentaGel, ArgoGel等の新しい支持体が開発されている。

固相合成の1例としてヘテロ環化合物ライブラリーの先駆的研究のひとつであるEllman³⁾らによる1,4-ベンゾジアゼピンライブラリーの合成経路を図5に示す。サポートとしてTentaGel樹脂、リンカーとして(4-ヒドロキシメチル)フェノキシ酢酸を選択し、まずアミノベンゾフェノンをフェノール基の部分で結合させる。Fmocアミノ酸を縮合し、続いてFmoc基を除去した後、閉環反応を行いベンゾジアゼピン環を構築する。次にアミドのNのアルキル化を行い、最後にTFAで固相から切り出し192個の化合物(アミノベンゾフェノン:アミノ酸:アルキルハライド・2×12×8=192)をパラレル合成している。なおこのライブラリーの中からコレシストキニンA受容体のリガンドが見いだされている。

上記の合成経路のように官能基(Cl, OH, NH₂, COOH etc.)でリンカーに結合させて合成を行うと、もとの官能基が残存した化合物しか合成できない。この問題を解決するため、traceless linker⁴⁾や環化反応と同時にレジンから切り出す方法などが開発された⁵⁾(図5)。

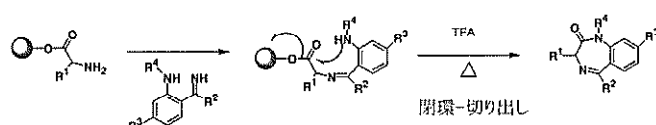
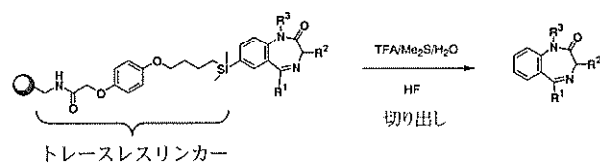
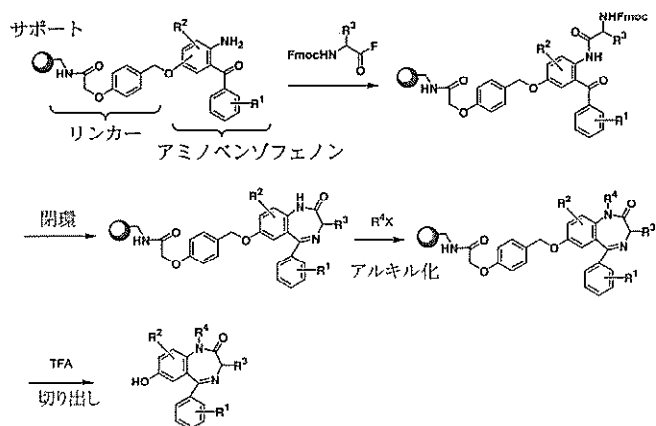


図5 1,4-ベンゾジアゼピンライブラリーの固相合成

低分子化合物の固相合成は、始まってまだ10年を経っていないが、ベンゾジアゼピンを始めすでに多種多様な複素環化合物の合成が報告されている⁶⁾。

2.4 液相合成法

固相合成は上述したように現在のところライブラリー合成法の主流となつてはいるが、利用できる合成反応に大きな制約があることや反応の追跡が困難であるため、合成ルートの確立・最適化に長時間を要することなどが大きなネックとなっている。

一方、液相合成法は従来の合成反応がすべて応用可能であるため適用範囲が広いが、各工程で処理・精製が必要であるため自動化が困難でコンビナトリアルケミストリーには不向きであると考えられてきた。しかし、最近、(1)固相抽出(2)スカベンジレジソ(3)固相支持試薬等を利用する固相合成法のメリットを液相合成法に融和させる方法が開発され、液相合成法にも大きな進展が見られた。以下にそれぞれについて例をあげて簡単に説明する。

(1) 固相抽出(Solid Phase Extraction: SPE)

による精製

液相反応を行った後、目的物を一時的に固体担体に結合させ目的物以外を洗い流した後目的物を溶

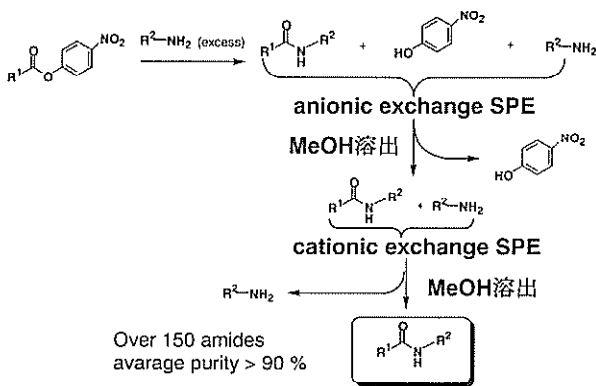


図6 固相抽出(SPE)による液相反応の精製

出して精製する方法であり、自動化も可能である。図6に1例を示す。Lawrence⁷⁾らはSPEを利用して150個以上のアミド化合物を90%以上の純度で合成している。

(2) スカベンジレジンによる不要物の除去

反応終了後に、過剰に用いた試薬(酸ハライド、塩化スルホニル、イソシアネート、アミン、アルキル化剤等)を補足し、ろ過して除くことにより目的物の純度を上げることを目的としたスカベンジレジンが種々開発され市販されるようになった。図7にスカベンジレジンの原理を示す。

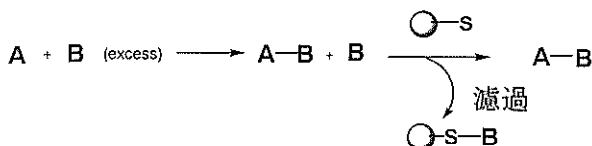


図7 スカベンジレジン

(3) 固相支持試薬

通常の手法では後処理が煩雑であったり、反応後に除去が困難である試薬を固相に担持することにより、ろ過のみで容易に除去できるようにしたレジンである。近年、数多くの固相支持試薬が開発され、コンビナトリアル合成に利用されるようになってきている。Ley⁸⁾らは固相支持試薬およびスカベンジレジンを巧みに利用したマルチステップのライブラリー合成を報告している(図8)。彼らは従来のワークアップを全く行うことなく5工程を経て5カ所のダイバーシティを有する化合物を90%以上の純度で合成することに成功している。

以上のように数多くの液相合成用のレジンの開発は、従来から積み上げられてきた多種多様な有機合

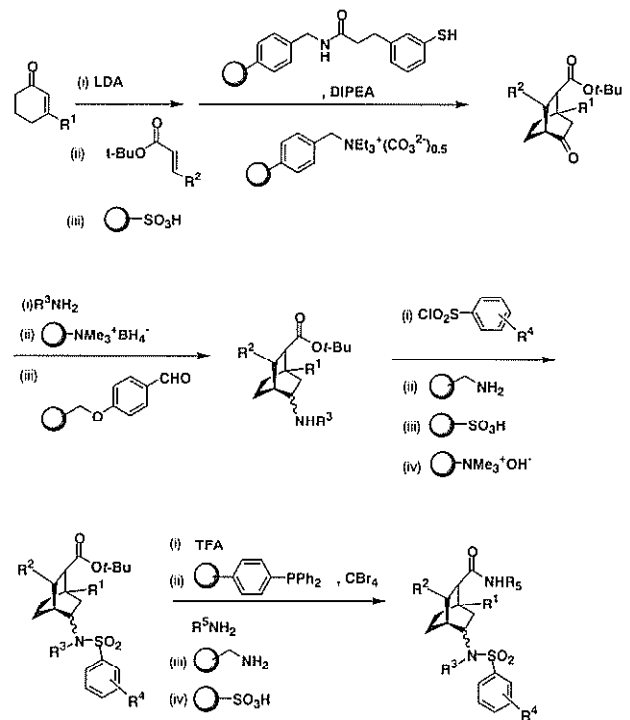


図8 固相支持試薬およびスカベンジレジンを用いた合成

成反応をコンビナトリアルケミストリーへ応用することを可能にした点で非常に価値がある。今後は液相合成法も固相合成法と同じくらいコンビナトリアル合成に有用な手法に発展していくものと考えられる。

3. 自動合成装置・精製装置・周辺装置

コンビナトリアル合成の主流がスプリット合成からパラレル合成になるに従い、マニュアル操作では対応不可能になった結果、自動合成装置や自動精製装置が不可欠になってきた。自動合成装置としては現在、ACT、アルゴノート、モリテックス、大日本精機、東京理化等から多くが市販されている。また記憶用チップを利用したスプリット合成用の装置もカイロン社やIRORI社から発売されている。

コンビナトリアルケミストリーをスムーズに推進するためには、合成された多数の化合物の分析・精製に関してもハイスループット化する必要があるのは明らかで、それらの目的でマルチチャンネルのHPLC(Biotage, 日立)やフラッシュクロマト装置(Isco, Biotage, 山善)が開発され市販されている。これらの装置を用いれば1日に100-500個の化合物の精製が可能である。

2年前、筆者が派遣されていた英国 Cambridge Discovery Chemistry社(現 Millennium Pharmaceutical Ltd.社)では全自動合成装置 ACT 496 MOSを中心に、4チャンネル自動精製 HPLC Biotage, LC/MS, 濃縮装置 GeneVac(30度で DMSOも留去可), 自動秤量装置などが統合されて配置されており、限りなく自動化されてライブラリー合成が行われていた。また、弊社においては、全自動合成装置 ACT 496 MOS と東京理化学の半自動合成装置 CCS-1200, CCL-1200 および スプリット合成用の IRORI Arque Tag を用途に合わせて使い分け、ライブラリー合成を行っている。精製装置としては、比較的多量の化合物を得るため、HPLCではなく、16チャンネルのフラッシュクロマト装置 CombiFlash SQ1600 を採用し、1日に30-50個程度の精製を行っている。

今後はさらに周辺装置を充実させ自動化を進め、研究者がライブラリーのデザインと合成経路の最適化に専念できるようにしていきたいと考えている。

4. 創薬におけるコンビナトリアルケミストリーの最近の動向

初期に作成されたライブラリーはペプチドやペプチドミメティクスおよびオリゴヌクレオチドがほとんどであり、経口吸収が悪かったり、代謝されやすかったりしたため、このようなライブラリーからは医薬品の候補化合物はほとんど得られて来なかった。そこで、最近では生理活性が出ることを期待され経口吸収もよさそうないわゆる“ドラッグライク”なライブラリーを構築する方向に進みつつある。実際1992-1997年の間に報告されたライブラリーの約50%はペプチド様のライブラリーであったが、1998-1999年ではその割合が約20%に減少しており“ドラッグライク”なライブラリーが増えていることが伺える⁹⁾。

前述したベンゾジアゼピンライブラリーは“ドラッグライク”なライブラリーの代表であり、Scaffoldであるベンゾジアゼピンにはもともとの抗不安作用の他にコレシストキニン阻害作用、血小板活性化因子阻害作用、インテグリン阻害作用等の多彩な薬理作用を示すことが明らかにされている。

経口投与医薬品は少なくとも、経口吸収が良いこと、薬物動態が良好なこと、毒性を示さないことが必要である。“ドラッグライク”なライブラリーを作成するためにはこれらの要件を満たすような Scaffold および Building Block を選択しなければいけない。

経口吸収性に関しては、Pfizer社のLipinskiが提唱した、“rule of 5”¹⁰⁾を考慮してライブラリーデザインが行われるようになってきている。“rule of 5”とは経口医薬品を見出すために既存の医薬品を統計的に処理して見出したルールであり、以下の性質を持つものは経口吸収や膜透過性が好ましくない傾向にあるというものである。

- (1) 5個以上の水素結合供与基(OH, NH)
- (2) 500以上の分子量
- (3) 5以上のClog P
- (4) 10個以上の水素結合受容基(O, N)

現在のところ過去に医薬品になった化合物の母核を Scaffold に選択し、“rule of 5”を考慮した Building Block を用いたライブラリー作成がドラッグライクなライブラリー作成の最も確実な方法と考えられる。

また、毒性に関しても、母核や官能基に由来することが分かっているものが知られているので、それ

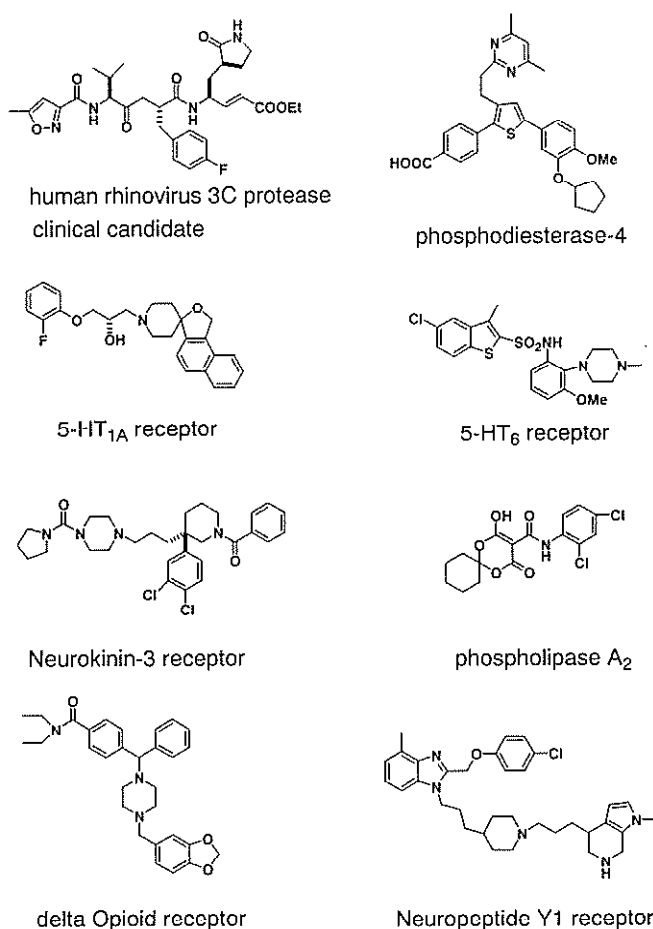


図9 コンビナトリアルケミストリーを利用して見いだされた生理活性化合物

らは最初からライブラリーの候補からはずしておくべきである。例えば、ビス(クロロエチルアミン)、ヒドラジンなどは癌原性を、アニリン類は変異原性を示し、反応性の高いエポキシ類やアジリジン類は生体内のたんぱく質と反応して毒性を発現しやすいので避けるべきである。最近では吸収性、毒性に加えてさらに薬物代謝酵素に対する作用をも含めたライブラリーデザインを考えて行かねばならない方向に進んでいる。

最近コンビナトリアルライブラリーを応用して見いだされた生理活性化合物の例を図9に示したが、構造を見れば判る様にペプチド様の化合物ではなく、非常に“ドラッグライク”な顔つきをしている。これらは1例であるが、その他多くの“ドラッグライク”なライブラリーが合成されており、近々その中から臨床試験に進む化合物が出てくるものと推測される。

5. おわりに

ここ数年でコンビナトリアルケミストリー技術は飛躍的に進歩し、創薬研究におけるスピードアップと効率化に大いに貢献してきた。近い将来、本技術を利用して見いだされた医薬品の上市が増加するものと推察される。

また、ヒトゲノムプロジェクトの進展により2003年にはヒトゲノムの全配列が解明されようとしている。それに伴いポストゲノムの研究が進展し、3000-10000個存在すると考えられている疾患関連遺伝子のすべてが特定され、リガンド未知の新たな創薬

標的分子が数多く発掘されるといわれている。従って迅速に効率よく化合物を合成できるコンビナトリアルケミストリーがますます重要で不可欠となり、今後はそれなくしては熾烈な医薬品開発競争には立ち向かえないと考えられる。

参考文献

- 1) M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wiegler, and W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10922 (1993)
- 2) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149 (1963)
- 3) B. A. Bunin, M. J. Plunkett, and J. A. Ellman., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 10997 (1992)
- 4) M. J. Plunkett and J. A. Ellman, *J. Org. Chem.*, 60, 6006 (1995)
- 5) S.H.Dewitt and A.W.Czarnik, *Acc. Chem. Res.*, 29, 114 (1996)
- 6) R.G.Franzen, *J. Comb. Chem.*, 2, 195 (2000)
- 7) R. M. Lawrence, *Synthesis*, 553 (1997)
- 8) S. V. Ley and A. Massi, *J. Comb. Chem.*, 2, 104 (2000)
- 9) R. E. Dolle, *J. Comb. Chem.*, 2, 383(2000)
- 10) C.A.Lipinski, F.Lombardo, B.W.Dominy, and P.J. Feeney, *Advan. Drug Delivery Rev.*, 23, 3 (1997)

