

## 創薬支援ツール

# バーチャルライブラリー高速探索ツール infiniSee

独 BioSolveIT 社から、膨大なバーチャル化合物群の中より類似構造を高速に探索するソフトウェア infiniSee がリリースされました。infiniSee はフラグメント構造と反応ルールの膨大な組み合わせから考えられる数十億を超えるバーチャル化合物群の中から、クエリー構造が持つ化学的な特徴とその結合トポロジーが類似した構造を高速に構築し提案します。GUI を用いて誰でも簡単に構造探索ができ、ヒット構造は合成の容易性も考慮されているため創薬研究の高速化とコスト削減が図れます。詳細は 6 ページをご覧ください。

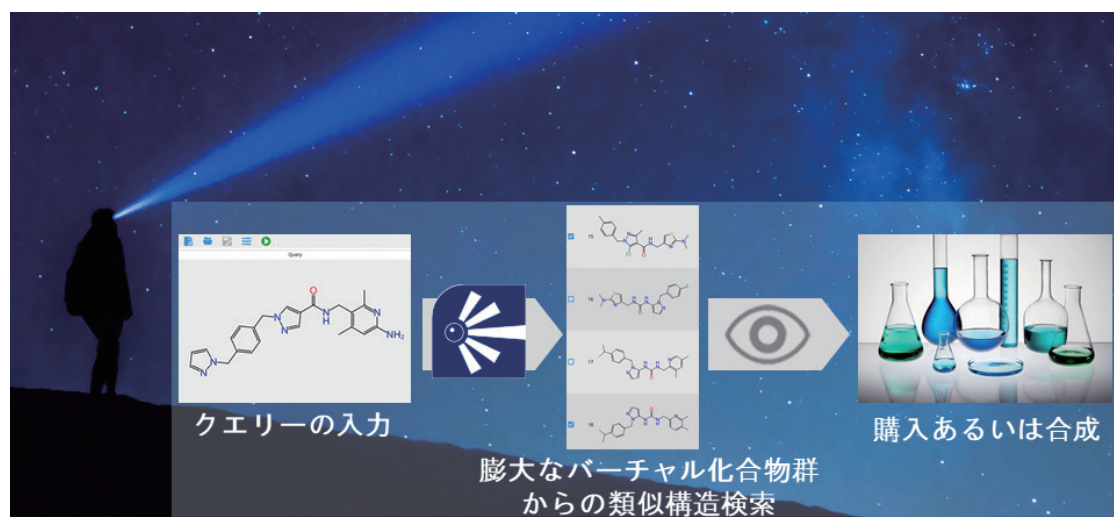


図1. infiniSee: 大規模なバーチャルライブラリーから類似構造を高速検索

## CONTENTS

### 新製品情報

熱力学物性推算ソフトウェア	COSMOtherm バージョン19リリース	2
自己組織化構造予測ソフトウェア・分子膜透過性推算ソフトウェア	新製品 COSMOplex・COSMOperm リリース	4
創薬支援ツール	バーチャルライブラリー高速探索ツール infiniSee	6

### 技術情報

医薬品安全性情報サービス	OFF-X: 臨床研究における遡及的情報の重要性	7
ライフサイエンス向けインフォマティクス・ソフトウェア	Scilligence Inventory 製品紹介	8
遺伝子発現データベース	解析事例: がん免疫療法の新規標的遺伝子の探索	9
統合計算化学システム	MOE による環状ペプチドの配座解析と相互作用解析	10
創薬支援ツール	リード化合物最適化ツール SeeSAR 9.0 リリース	12

## 熱力学物性推算ソフトウェア

## COSMOtherm バージョン19リリース

本年2月に熱力学物性推算ソフトウェア COSMOtherm の新バージョン19がリリースされました。本稿では、新バージョンに搭載された新機能や改良された機能を紹介いたします。

## ■新バージョンのトピックス

今回のバージョンアップのトピックスは次のとおりです。

- ・状態方程式 (EoS) を用いた物性推算機能の追加
- ・液液平衡探索と共晶点探索機能
- ・BP-TZVPD-FINE レベルの物性推算精度の向上
- ・活量係数モデルへのフィッティング機能の強化
- ・COSMO-RS-DARE 機能

このほかにも、既存機能の改善や改良が図られ、推算精度と計算速度が向上しています。以降では、上述の5つのトピックスについて紹介します。また、COSMOtherm のバージョンアップに合わせて新モジュール COSMOplex と COSMOperm が正式リリースされました。新モジュールの詳細は本紙 p. 4-5 をご参照ください。

## ■状態方程式 (EoS) を用いた物性推算機能の追加

非圧縮液体として液相を近似する COSMO-RS 法では、高温高压条件の物性推算は難しく、その解決策として EoS と組み合わせた予測機能が COSMOtherm に搭載されています。これまで、その機能は、気液・液液平衡予測に限定されていましたが、今回のバージョンアップによって以下の物性にも対応しました。

- ・蒸気圧
- ・密度・体積
- ・ヘンリー定数
- ・溶媒和自由エネルギー

EoS を用いた物性推算を行うためには、臨界定数 (臨界圧、臨界温度等) が必要になりますが、COSMOtherm の機能を用いて、それらの推算も可能です。しかしながら、臨界定数を精度良く推算することが難しいため、出来る限り実測値の入力が推奨されます。

## ■液液平衡探索と共晶点探索機能

COSMOtherm の用途として、液液平衡 (LLE) 計算で得られる相分離組成から、上部・下部臨界溶液温度 (UCST・LCST) を推定したり、2成分固液平衡の結果から共晶点を推定したりすることが行われます。しかし、どちらの推算も探索する温度範囲を試行錯誤で特定する必要があり、操作が面倒でした。新バージョンではこれらの操作を自動化し、簡単に UCST・LCST や共晶点が得られるようになりました。

一例として、水-3-メチルピリジンの2成分系の UCST・LCST を求めた結果を図1に示します。操作としては、化合物の選択後、UCST等の探索を指定した LLE 計算を実行するのみとなります。本計算は6分程度で終わります。

計算結果として LCST から UCST までの相分離組成が得られます。実測値と計算値を比べると、2相の組成のギャップが過大評価されていますが、実測値が示すように組成のギャップが小さい系であるため推算が難しい系と考えられます。また、UCST や LCST の計算値が、それぞれ高温側、低温側にシフトしていますが、これは溶液相を均一の組成として仮定する COSMO-RS 法などの計算方法で一般的に起こる現象です。臨界温度付近で生じる熱ゆらぎに起因しますが、現時点では熱ゆらぎの正確な取り扱いが難しく、誤差が大きいことを想定して使用する必要があります。

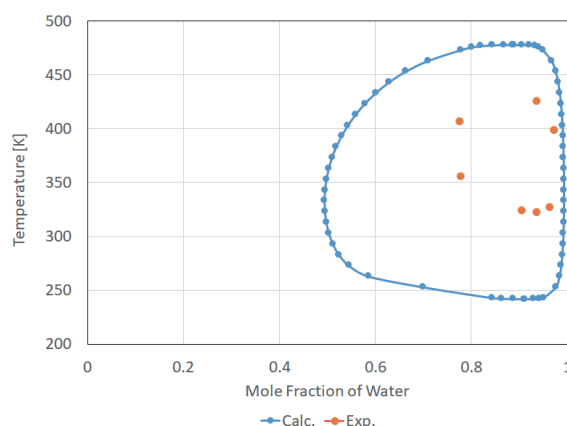


図1. 水-3-メチルピリジンの液液平衡

## ■BP-TZVPD-FINE レベルの物性推算精度の向上

今回のバージョンアップでは、BP-TZVPD-FINE レベルの物性推算方法が改善されました。主な改善点は、以降の3点です。これらの改善により、物性推算精度が向上しました。特に、シロキサン、エステル、ポリオールの蒸気圧の予測精度が向上しています。一例として、図2にシロキサン系化合物の蒸気圧推算の結果を示します。バージョン19の推算値がより実測値を再現することが確認できます。

1. 分子内の分散力の補正：従来、溶液中の分子間の分散力を Grimme の D3 レベルの補正にて取り扱っていましたが、分子内の分散力に関しては考慮していませんでした。新バージョンでは、量子化学計算で COSMO ファイルが作成された際に分散力が考慮されていない場合、Grimme の D3 レベルの分散力補正されたエネルギーとなるように修正します。

2. 分子内水素結合に起因するエントロピー減少の考慮：分子内水素結合がある分子においては、配座空間の減少に伴うエントロピー減少を考慮する補正項が追加されました。

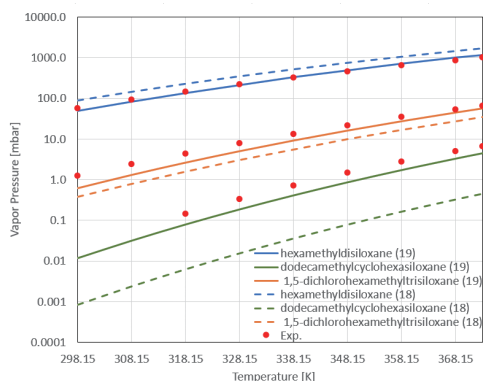


図2. シロキサン系化合物の蒸気圧。化合物名の後ろの数値はバージョンを示す。

3. 相変化に伴う分子振動変化の考慮：気相から液相への相変化に伴う分子振動の変化を考慮するためのパラメーターが新たに追加されました。

### ■ 活量係数モデルへのフィッティング機能の強化

従来から COSMOtherm には 2 成分混合系の活量係数を以下の活量係数モデルにフィッティングする機能が用意されていました。

- NRTL
- WILSON
- UNIQUAC

しかしながら、2 成分系、かつ定温におけるパラメーターの算出に限られていたことから汎用性に欠け、当該機能が活用される状況が限られていました。新バージョンでは、温度依存性のあるパラメーターが算出できるようになると共に、多成分系にも対応しました。これにより、COSMOtherm で得られるパラメーターを用いて、活量係数の結果をプロセスシミュレーター等の外部プログラムに受け渡すことが容易になりました。

### ■ COSMO-RS-DARE 機能

COSMOtherm には、Interaction Energy Index (IEI) として、複数分子の会合を考慮する機能が用意されていました。この機能は、分子会合による分子のエネルギー変化や表面電荷の変化を考慮します。例えば、酢酸分子は極性が低い溶媒環境においては、図 3 のように二量化します。このとき、反応自由エネルギーに応じて分子の安定性が変化すると共に分子の表面電荷も変わります(図 3 下)。この両方を IEI では考慮しますが、その入力設定が複雑なことが課題でした。新バージョンでは、IEI を使いやすく改良した COSMO-RS-DARE (COSMO-RS with Dimerization, Aggregation and Reaction Extension) が搭載されました。COSMO-RS-DARE では、IEI の設定に必要な化合物 ID の定義が不要になり、化合物名、あるいはその番号を指定することで反応式を簡単に定義できます。

COSMO-RS-DARE を使用した計算例として、酢酸とオクタン混合系の気液平衡を図 4 に示します。二量体を考慮しない場合 (No DARE) は実測値と大きく異なる P-xy 図や活量係数変化が算出されます。一方、二量体を考慮した場合 (DARE) は実測値を良く再現します。このように、分子会合が生じる系ではその考慮が必要で、COSMO-RS-DARE を使用することで精度良く推算が行えます。

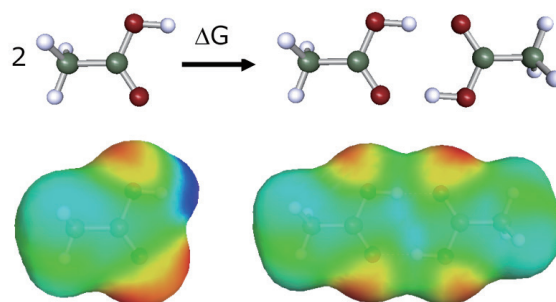


図3. 酢酸の二量化反応(上)と酢酸分子の表面電荷(左下)と二量体の表面電荷(右下)

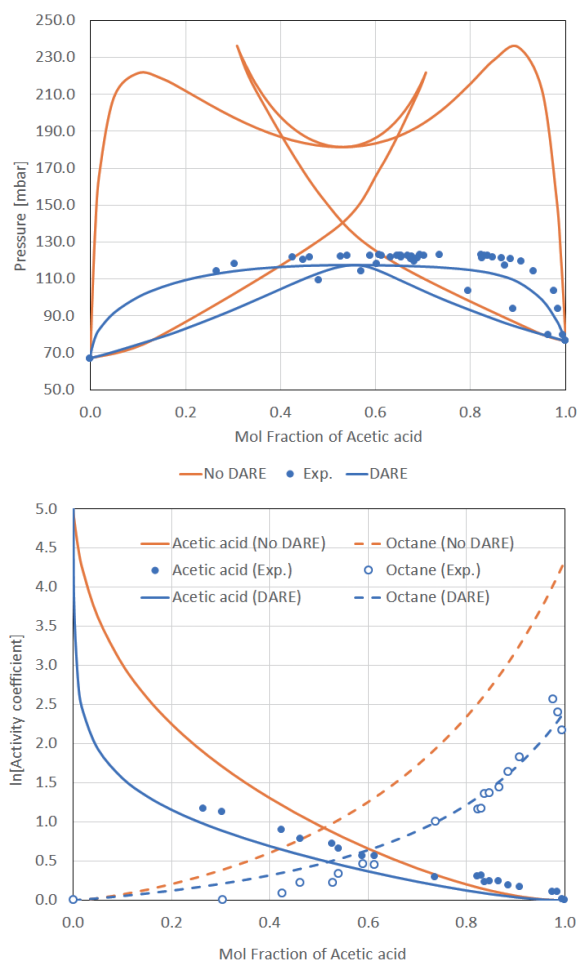


図4. 酢酸—オクタンの50°Cにおける気液平衡のP-xy図(上)と活量係数(下)



自己組織化構造予測ソフトウェア・分子膜透過性推算ソフトウェア

# 新製品 COSMOplex・COSMOperm リリース

本年2月の COSMOtherm のバージョンアップと共に新製品 COSMOplex・COSMOperm が正式リリースされました。両製品は、これまで分子膜・ミセル内分子分布シミュレーターとして提供されていた COSMOmic を改良・発展させた製品です。COSMOplex は、ミセルや分子膜などの自己組織化構造を COSMO-RS 法に基づき、高速に予測することが可能です。一方、COSMOperm は、低分子の分子膜や細胞膜透過性を予測することができます。本稿では、両製品の概要と応用事例を紹介します。

## ■ COSMOmic と COSMOplex

自己組織化構造のように、不均一で構造化した溶液系を COSMO-RS 法で取り扱うためのツールとして、これまで COSMOmic が提供されていました。COSMOmic では、ミセルや分子膜を層状の溶媒として取り扱い(図1)、各層はそれに含まれる分子の部分構造からなる仮想的な液相として取り扱います。そして、溶質分子の各層における無限希釈時の自由エネルギーや化学ポテンシャルを計算します。得られた結果から、ミセル(分子膜) - 水間の分配係数やミセル・分子膜中の位置に依存した自由エネルギープロファイルが得られます。

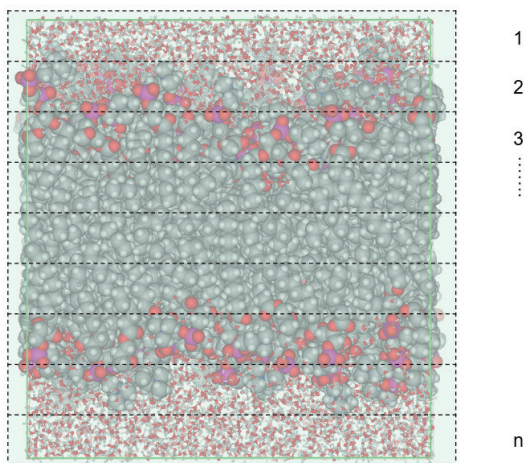


図1. COSMOmicで分子膜を層状(n層)の溶液として考慮するときのイメージ

COSMOmic を用いて、ミセル・分子膜中の溶質の存在確率分布を求めるだけでなく、自己組織化する界面活性剤分子や膜形成分子の位置分布も求めることが検討されましたが、COSMOmic ではミセル・膜中の分子間の立体反発が考慮されないため、各層に存在可能な分子数を正しく評価できず、自己組織化構造を求めることができませんでした。

そこで、各層の圧力を計算することで分子間の立体反発を評価する方法が考案されました。各層の圧力が、層内に存在する分子数が過剰であることを表します。そして、圧力分布と分子の存在確率分布が釣り合う状態において、自己組織化構造が形成されると仮定し、構造や分子の自由エネルギーを求めます。この新しい方法を COSMOplex (COSMO と Complex からの造語) と名付け、製品名にも同じ名前を用いています<sup>1)</sup>。COSMOplex では、ミセル、液界面、マイクロエマルジョンなど幅広い自己組織化モ

デルを取り扱うことが可能です。また、これまでの COSMOmic で計算可能な以下の物性も計算できます。

- ・自己組織化構造中の低分子の位置分布
- ・自己組織化構造中の低分子の自由エネルギー
- ・自己組織化構造 - 溶媒間の低分子の分配係数

## ■ COSMOperm

COSMOperm は、COSMOmic の機能を拡張し、低分子の分子膜透過性予測に対応した製品です。COSMOmic では、前述のように分子膜を層状に分割し、各層(z)における低分子の化学ポテンシャル差  $\Delta\mu_s(z)$  や分配係数  $K(z)$  を次式より計算します。

$$K(z) = \exp(-\Delta\mu_s(z)/RT)$$

COSMOperm では、この  $K(z)$  と COSMOtherm の拡散係数予測で得られる各層の拡散係数  $D(z)$  から、次式に基づき分子膜透過性  $P$  を予測します。

$$P = \frac{1}{\int \frac{dz}{K(z)D(z)}}$$

また、COSMOperm には以下の細胞膜モデルを搭載し、多段階の細胞膜の透過や複数の透過経路を考慮した透過係数の推算も行えます。

- ・ *In vitro* Skin<sup>1)</sup>
- ・ Human colorectal carcinoma cells (Caco-2)<sup>2)</sup>
- ・ Madin - Darby Canine Kidney cells (MDCK)<sup>2)</sup>

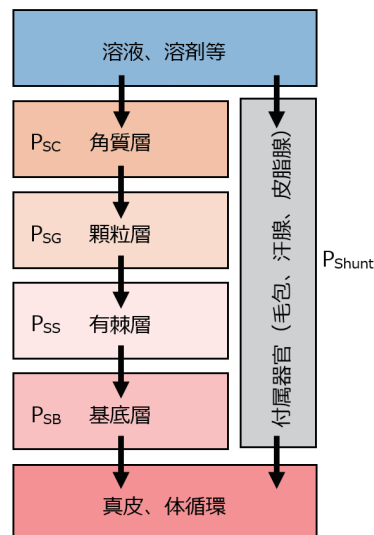


図2. 上皮透過予測のモデルと各層・経路の透過係数(Pi)

例えば、*In vitro* Skin モデルでは、図2のように上皮を4層構造としてモデル化し、各層や経路の透過係数を推算すると共に次式に基づき、上皮全体の透過係数  $P_{skin}$  を算出します。

$$\frac{1}{P_{stratified-cell}} = \frac{1}{P_{SC}} + \frac{1}{P_{SG}} + \frac{1}{P_{SS}} + \frac{1}{P_{SB}}$$

$$P_{skin} = P_{stratified-cell} + P_{shunt}$$

これらの細胞膜モデルでは、溶質の pKa や膜内の pH の考慮も可能です。

### ■ 応用事例：ミセル構造予測とミセル内の分布予測

COSMOplex を用いて代表的な界面活性剤 SDS (Sodium dodecyl sulfate) の水中でのミセル構造を予測した例を図3に示します。図3は、ミセル構造中の SDS の硫黄と酸素原子のミセル中心からの距離と存在確率を示します。図3から、極性部位を構成する S や O が約 22 Å 付近に分布することが分かり、ミセル半径が 22 Å 程度であると推定されます。この値は、報告されている SDS のミセル半径 18.4 Å に 10% の誤差で一致しています。

次に、SDS ミセル中の低分子の分布を予測した結果を図4に示します。油脂汚れのモデル分子として、パルチミン酸とオレイン酸、ならびに水溶性汚れのモデルとしてグルコースの分布を検討しました。図4のように、パルチミン酸やオレイン酸はミセル内に分布し、一方、水溶性のグルコースは水相に分布することが分かります。このように COSMOplex を用いてミセルに取り込まれる分子種のスクリーニングを容易に行えます。

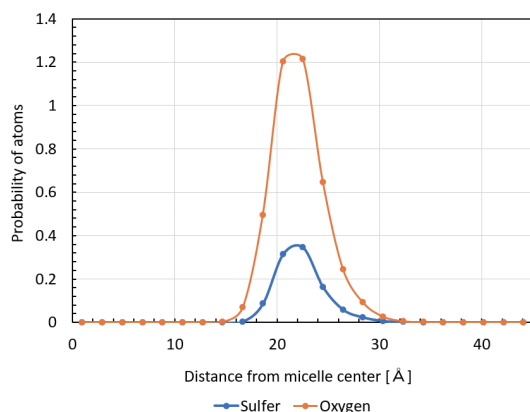


図3. ミセル中の SDS の硫黄・酸素原子の分布

### ■ 応用事例：低分子の上皮透過性予測

COSMOperm を用いて表1の39種の化合物の皮膚透過性を予測し、計算値と実測値<sup>4)</sup>を比較した結果を図5に示します。予測には、*in vitro* Skin モデルを使用しています。計算値と実測値の相関性 ( $r^2$ ) と平均二乗誤差 (RMSE) は、それぞれ 0.66 と 0.70 で、概ね実測の傾向を再現できることを示しています。このように COSMOperm を使用することで、化合物の皮膚や細胞膜透過性をスクリーニングすることが可能です。

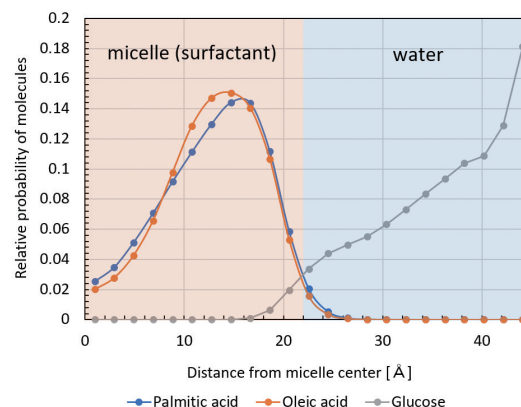


図4. SDS ミセル中の低分子の体積分布

表1. 検討対象の化合物

1,3-dihydroxybenzene	corticosterone	n-octanol
1,3,7-trimethylxanthine	cortisol	nicotinic acid
1,3,7-trimethylxanthine	cortisone	o-cresol
1,4-dihydroxybenzene	demerol	p-bromophenol
$\beta$ -estradiol	estriol	p-chlorocresol
17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	estrone	p-cresol
2-naphthol	fentanyl	phenol
3,4-dimethylphenol	hydromorphone	pregnenolone
4-chloro-3,5-dimethylphenol	m-cresol	progesterone
aldosterone	m-nitrophenol	sufentanil
benzene	mannitol	testosterone
codeine	methanol	thymol
cortisolone	morphine	water

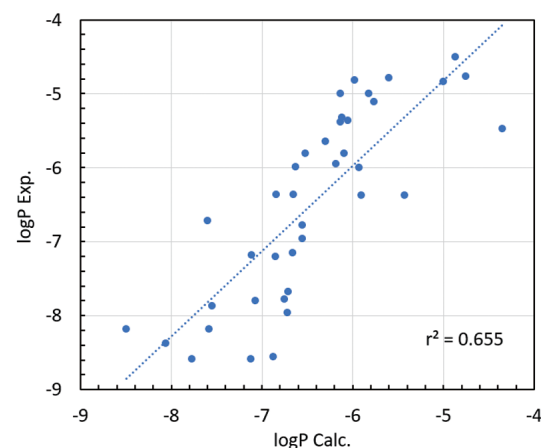


図5. 皮膚透過性の計算値と実測値の比較

- 1) A. Klamt, J.A.H. Schwöbel, U. Huniar, L. Koch, S. Terzi, T. Gaudin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2019, 21 (18), 9225–9238.
- 2) J.A.H. Schwöbel, A. Klamt, *Computational Toxicology*, 2019, 11, 50–64.
- 3) K. Bittermann, K.-U. Goss, *PLOS ONE*, 2017, 12(12), e0190319.
- 4) F.M. Williams, S. Soyey, *EDETOX*, University of Newcastle, UK, 2014, <http://edetox.ncl.ac.uk/>

創薬支援ツール

# バーチャルライブラリー高速探索ツール infiniSee



独 BioSolveIT 社から、膨大なバーチャル化合物群の中よりクエリーと類似する構造を高速に探索するソフトウェア infiniSee がリリースされました。infiniSee は、フラグメント構造と反応ルールにより定義されたフラグメントスペースを用いて、膨大な組み合わせより得られるバーチャル化合物群の中より、薬物候補化合物となる類似構造を高速に構築します。フラグメントスペースは、BioSolveIT 社から提供されるもの以外にも、自社で用意したフラグメントスペースを使用できます。infiniSee を用いて、通常では閲覧が難しい数十億を超えるバーチャル化合物群の中より、合成可能性の高い新規構造を数分という短い時間で提案できます。

## infiniSee の概要

化合物ベンダーが在庫として持つ実化合物以外にも、合成可能なバーチャル化合物は膨大に存在します。無限に近いバーチャル化合物群から研究者が興味のある構造を高速に検索することは従来の方法では困難です。infiniSee は、クエリーに類似している構造を、フラグメントと工業的によく利用される化学反応ルールから高速に構築するソフトウェアです。以下の特徴があります。

- ・ 膨大なケミカルスペースから超高速探索
- ・ 母核置換された興味深い化合物群を探索
- ・ 遠縁の類似構造の発見
- ・ 合成可能な構造を提案

合成研究者が使いやすいように GUI が設計されており、infiniSee を用いることで、合成展開、SAR 探索、母核置換、バーチャルスクリーニングなど創薬研究プロセスの効率化を支援します。

## 探索アルゴリズム

infiniSee の探索アルゴリズムは、同社の FTrees-FS アルゴリズムを採用しています(図 1)。FTrees-FS の特徴は、事前に用意されているバーチャル化合物の中から探索するのではなく、その都度類似構造を高速に構築することです。FTrees-FS は、まずクエリー化合物をドナー性 / アクセプター性 / 疎水性等の化学的特徴とそのトポロジーを持つ Feature Tree に変換します。計算に使用されるフラグメントスペースには、フラグメント構造とそれに対応する Feature Tree、フラグメントの結合の組み合わせを定義した反応ルールが収録されています。クエリーの Feature Tree を再現するように、フラグメントスペースの中より類似したフラグメントを選出し、結合させ類似構造を出力します。化学反応ルールには、実際に良く使用されるルールが用いられており、高い合成可能性を持つ構造がヒットします。

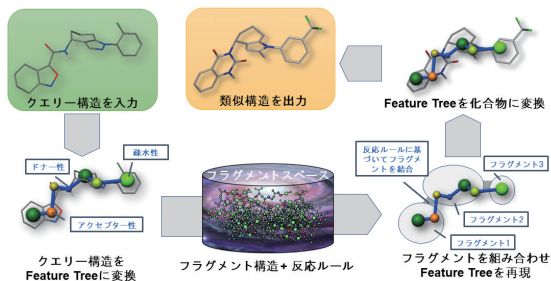


図1. infiniSeeの探索アルゴリズム

## 操作の流れ

infiniSee の GUI 上に、クエリー構造を読み込みフラグメントスペースを選択します(図 2)。類似度、出力数、多様性、拘束する官能基を指定できます。数分でヒットした類似構造とともにその類似度がスプレッドシートとして可視化されます。得られた結果はクエリー構造とともに SDF あるいは CSV 形式でファイルに保存できます。

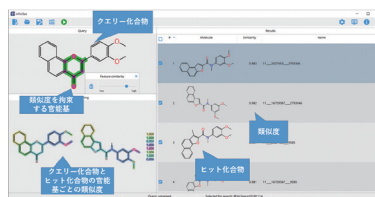


図2. infiniSeeのメインパネル

## infiniSee と REAL Space Navigator

類似製品として、REAL Space Navigator (RSN) が同社よりリリースされています。RSN は、検索対象のフラグメントスペースが Enamine REAL Space に特化しており、Enamine 社が 80% 以上の確率で合成可能な、51 億個のバーチャル化合物の中から類似構造を探索します。

infiniSee では、Enamine REAL Space や、 $6 \times 10^{15}$  個のバーチャル化合物群に対応する KnowledgeSpace<sup>1)</sup> や、自社のフラグメントスペースからの検索に対応しています。

## 解析事例

ヒトの ABC トランスポーターである ABCC や ABCB1、ABCG2 は、がんの薬剤耐性に起因する膜タンパク質です。Silbermann らは、既知の ABC トランスポーター阻害剤をもとに、ZINC データベースから類似構造検索と 3D ファーマコフォア検索等を組み合わせて新しい骨格を持つ阻害剤を発見しました<sup>2)</sup>。ここでは既知の阻害剤(図 3 左)をクエリーに設定し、フラグメントスペースとして Enamine REAL Space を用いて 51 億構造の中から infiniSee による類似構造探索を行いました。クエリーとの類似度が 0.84 の構造を得ました(図 3 中)。この構造は、Silbermann らがバーチャルスクリーニングにより得た 4 種の活性化合物のうち 2 種に類似(図 3 右)しており、Enamine 社に合成依頼が可能な構造です。infiniSee は、より少ないステップと短い時間で Silbermann らが提案した構造に類似する分子を得ることができました。

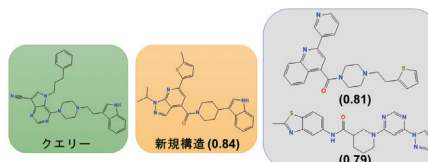


図3. 既知の阻害剤(左)をクエリーとして infiniSee により構築した新規構造(中、数字はクエリーとの類似度)。バーチャルスクリーニング<sup>2)</sup>により得られた活性化合物(右、数字は新規構造との類似度)。

## まとめ

infiniSee は、膨大なバーチャル化合物群の中よりクエリー構造に類似する化合物候補を高速に提案します。合成化学的に妥当な構造が得られるため、infiniSee は、創業の高速化と低コスト化を実現する上で強力なツールとなります。

1) <https://www.biosolveit.de/CoLibri/spaces.html>

2) Silbermann, K.; et al. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (9), 4383–4400.




**bioinfogate** OFF-X: 臨床研究における遡及的情報の重要性  
advancing data science for health

BioInfoGate 社製 OFF-X は、医薬品のターゲットと分子作用機序、有害事象、医薬品で分類された包括的に他に類を見ない医薬品安全性情報のクラウドサービスです。2019 年 6 月末時点で、7 千件以上の治療ターゲットおよび 6 千件の関連タンパク質について約 30 万件のアラート情報が掲載されています。OFF-X には、探索から前臨床、臨床、市販後までの安全性に関する情報が掲載され、前臨床における遺伝子実験データなども含まれます。ここでは、臨床試験で重篤な安全性の問題により開発が中止された 2 つの例を用いて、臨床研究の初期段階で医薬品の安全性を予測的に評価する上で、遡及的に情報を解析することの重要性を示します。

### ■ 予期せぬ安全性の問題へのアプローチ

安全性の問題は臨床研究において重大な影響を及ぼすため、根底にある潜在的なオフ・ターゲットを迅速に特定することが、意思決定プロセスの効率化につながります。開発プロセスのできる限り早い段階でコストでの損失を回避し、患者の負担を軽減するために、OFF-X による前臨床段階から臨床研究における安全性の問題に対するアプローチは、利用価値の高いソリューションです。ここで紹介するケーススタディは、遡及的情報から安全性のリスクを予測し、最小化するためにどのように OFF-X が利用できるかを示したものです。

### ■ フィアルリジン (核酸系逆転写酵素阻害剤) の場合

1993 年 6 月に、慢性 B 型肝炎患者におけるフィアルリジンの安全性と有効性を評価する第 II 相試験が、突然中止されました。15 人のうち 7 人の患者が、終了後の追跡調査評価の間に程度が異なる肝不全および乳酸アシドーシスを示し、5 人の患者が死亡し、2 人の患者には肝移植が必要でした。また、3 人の患者で軽度の肝毒性が発生し、ほとんどの患者は、肺炎、神経障害(感覚異常)、ミオパチー、腹痛、疲労感および吐き気を引き起こしたことが報告されています<sup>1)</sup>。肝不全は、体内で大量の乳酸が生成され、十分な速さで代謝できないことで発生した乳酸アシドーシスが原因です。

フィアルリジンの治験中止は 1993 年 6 月ですが、1989 年には、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) の有害事象として、ミトコンドリア毒性に関連して乳酸アシドーシスを引き起こしたことが報告されていました<sup>2)</sup>。

このケースでは、1989 年の報告を慎重に検討することにより第 II 相試験のリスクを未然に防ぐことができた可能性があります。今日、乳酸アシドーシスは、NRTI での治療と関連した有害事象として認識されており、生命を脅かす安全性の問題を予測することに、血液電解質の精緻なモニタリングが利用されています。

2019 年 6 月末時点で、OFF-X には、市場撤退した医薬品も含めて 14 個の NRTI について、33 件の乳酸アシドーシスのアラート情報が掲載されています。

### ■ BIA 10-2474(脂肪酸アミド加水分解酵素阻害剤) の場合

2016 年 1 月に、慢性疼痛治療薬として内在性カンナビノイド系に作用することを意図した脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) 阻害剤である BIA 10-2474 の第 I 相試験中に、1 人が脳障害により死亡し、5 人の参加者に重大な有害事象が発生しました<sup>3)</sup>。マウス、ラット、イヌ、およびサル の 4 種で実施された前臨床試験では、有意な神経毒性は示されていませんでした。また、FAAH をター

ゲットとした他の臨床試験の安全性プロファイルを考慮すると、BIA 10-2474 のオフ・ターゲットが影響していると考えられました<sup>3)</sup>。1 次ターゲットを阻害する為に必要以上の BIA 10-2474 が投与されており、第 I 相試験における投与計画の検討が重要であることも報告されています<sup>4)</sup>。その後、BIA 10-2474 のオフ・ターゲットに関する研究が進められ、2017 年には、BIA 10-2474 が幾つかのリパーゼを阻害し、神経系において代謝調節異常を引き起こす可能性があることが報告されました<sup>5)</sup>。

神経毒性に関しては、2013 年に活性ベースのタンパク質プロファイリングにより薬剤によるリパーゼの阻害が代謝調節異常を引き起こし、そして最終的には脂質ネットワークの多くの変化が原因となり、神経毒性を引き起こすことが報告されていました<sup>6)</sup>。

このケースでは、前臨床試験では観察されず臨床試験開始直後に観察された神経毒性について遡及的に情報を解析することにより、早期にオフ・ターゲットの特定や有害事象のリスク評価ができた可能性があることを示唆しています。

### ■ 遡及的情報の重要性

紹介したケーススタディでは、臨床研究の初期段階において、遡及的情報の解析が重要であることが示されています。もし、遡及的情報をもとにして *in silico* スクリーニングや副次的薬理学スクリーニングにより事前にオフ・ターゲットの活性が検出されていれば、第 I 相試験で観察された有害事象は回避できたか、または、最小限に抑えられた可能性があります。OFF-X には、4000 件以上の有害事象のエンドポイントについて、最新情報ばかりではなく過去の安全性情報も逐次登録されています。遡及的情報は、ファースト・イン・クラスや早期承認の対象となる医薬品の安全性評価に重要な情報を提供する可能性があります。また、前臨床・臨床研究の意思決定プロセスの効率化の観点からも遡及的情報の利用価値は高いと考えられます。

- 1) McKenzie R.; *et al. N. Engl. J. Med.* **1995**, 333(17), 1099-1105.
- 2) Chen C. H.; Cheng Y. C. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264 (20), 11934-11937.
- 3) Zachary Brennan, *Regulatory Focus (www.raps.org/news-and-articles)*. 15 January **2016**.
- 4) Kerbrat, A.; *et al. N. Engl. J. Med.* **2016**, 375 (18), 1717-1725.
- 5) van Esbroeck, A. C. M.; *et al. Science* **2017**, 356 (6342), 1084-1087.
- 6) Richardson, R. J. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, 203 (1), 238-244.

# Scilligence Inventory 製品紹介



Scilligence 社のライフサイエンス向けインフォマティクス・ソフトウェアは電子実験ノート、分子情報およびアッセイデータ登録システム、在庫管理システム、プロジェクト管理システム、実験データ管理システムなどの製品から構成されています。お客様のご要望に合わせてこれらの製品群を組み合わせることで最適なソリューションを提案します。今回は在庫管理システムである Scilligence Inventory(以下 Inventory) について紹介します。

## ■ Scilligence 社製ソフトウェアの特長

Scilligence 社のライフサイエンス向けインフォマティクス・ソフトウェアは、低分子からペプチドや核酸などの中分子、抗体や抗体薬物複合体 (ADC) などの高分子までの情報を 1つのプラットフォームで扱えることが大きな特長です。そのため、低分子医薬品から生物学的製剤まで幅広い研究分野に活用できます。

Scilligence 社製ソフトウェアはウェブアプリケーションなので、ユーザーは居室や実験室などにあるどのパソコンからも利用できます。さらに、アマゾンウェブサービス (AWS) によるクラウドサービスとして提供されるため、管理者はサーバーなどのハードウェアを用意する必要はありません。

## ■ Inventory での在庫管理

Inventory では化合物・ペプチド・核酸・タンパク質・ADC・細胞株・プレート・生体組織など様々な種類のサンプルの在庫を管理し、追跡できます。Inventory ではサンプルのカタログ情報である Product、サンプルの入手(合成、採取、購入など)の単位である Lot、保管に際して Lot を小分けした Container の階層で情報を管理します(図 1)。

### ■ 残量と保管場所の管理

Container は残量、保管場所、濃度(溶液サンプルの場合)などの情報を持ちます。Container に対しては、使用、保管場所の変更、分割、統合などを行うことができ、それらは履歴として記録されます。また、複数種類のサンプルの在庫をまとめてプレートとして管理することもできます。

保管場所は「サイト > 建物 > 部屋 > 棚 > 箱」のような階層構造で管理します。チューブ立てのような格子状の保管場所も作成できるので、細胞株などの液体窒素タンク内で目視確認が困難なサンプルの保管場所も正確に管理できます。

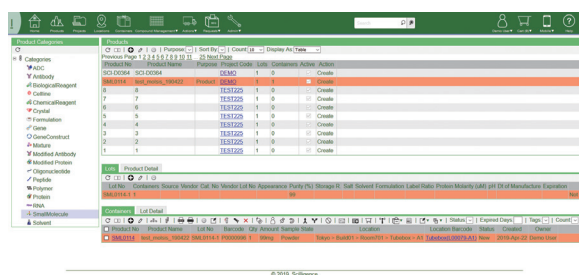


図1. Inventoryでのサンプルの在庫管理

### ■ 在庫の検索

登録されているサンプルと在庫は、プロジェクト・サンプルの種類・キーワード・構造式・配列で検索可能です(図 2)。

構造式での検索は、部分構造検索、完全一致検索、類似構造検索(95%、90%、80%、60%)を選択できます。

構造式は組み込みのエディターを用いて、ブラウザー内で描画できます。ペプチドや核酸の配列はエディターで描画するほか、1文字表記の略号を用いた文字列で入力することもできます。

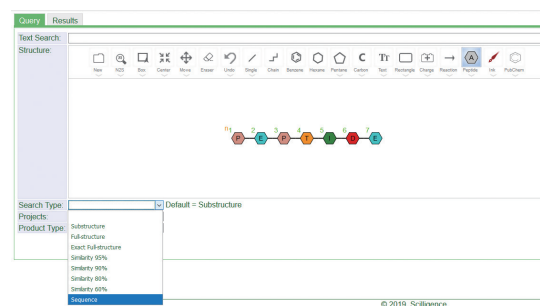


図2. 検索画面

## ■ Scilligence 社の他製品との連携

Inventory は、Scilligence RegMol (サンプル情報およびアッセイデータ登録システム)や Scilligence ELN(電子実験ノート)、Scilligence PMF(プロジェクト管理)などの他の Scilligence 製品と密に連携しています。

### ■ RegMol および ELN との連携

RegMol で登録したサンプルとそのバッチは、Inventory への預け入れ操作で Product と Lot になります。この Lot に追加された Container は、RegMol から参照可能です。

また、ELN で出発物質 (Reactants) や試薬 (Reagents) を追加する際に、Inventory の Product 名を指定して構造を呼び出すことが可能です。ELN の生成物 (Products) は RegMol 経由で Inventory に在庫として登録できます。

### ■ PMF との連携

PMF と連携すると、在庫の利用および取り寄せや、試薬の購入などの申請ワークフローが利用できます。ワークフローでは承認/却下などのユーザーによる手続きを組み込めるほか、取り寄せ時の梱包・発送や購入時の注文・入荷などの申請の進捗状況も管理できます。

## ■ ご評価

Scilligence 社製ソフトウェアは、無償でご試用いただけます。Inventory に限らず Scilligence 社製品にご興味がある方はぜひトライアルをご検討下さい。トライアルをご希望の方は弊社ウェブサイトよりお問い合わせ下さい。



# NEBION 解析事例：がん免疫療法の新規標的遺伝子の探索

GENEVESTIGATOR は遺伝子発現データベースのオンライン解析ツールです。公共データベースに登録されたマイクロアレイや次世代シーケンサーの膨大な遺伝子発現データをキュレートすることで、様々な研究者により登録された大量の実験結果を統合して解析可能にします。また、GENEVESTIGATOR は使いやすいインターフェースと高速な検索エンジンを搭載しているため、研究者が標的遺伝子の探索などの遺伝子発現解析を行う際に、注目する遺伝子の同定や発現変動遺伝子の優先順位付けなどを簡単かつ正確に行うことができます。今回は、マウスがん細胞の遺伝子発現データを使ったがん免疫療法の新規標的遺伝子の探索事例を紹介します。

## はじめに

がん細胞は抑制性の免疫チェックポイントシグナルを利用することで免疫応答から逃れる機構を持っています。免疫チェックポイントシグナル制御に重要である PD-1 (Programmed cell death1) はがん免疫療法の標的遺伝子ですが、すべての患者やがん種で PD-1 を標的とした医薬品の治療効果が得られるわけではありません。そのため、より治療効果の高いがん免疫療法の開発のために、新規標的遺伝子の探索が行われています。

GENEVESTIGATOR では目的に合わせて複数の解析ツールを利用できます。例えば注目する遺伝子が発現している実験条件を調べたい場合には CONDITION SEARCH TOOLS を、注目する遺伝子の発現パターンから共発現する遺伝子やよく似た発現パターンの実験条件を調べたい場合には SIMILARITY SEARCH TOOLS を使います。

## PD-1 の遺伝子発現

GENEVESTIGATOR を起動して解析対象のデータベースとして mRNA-Seq Gene Level Mus Musculus を選択します。CONDITION SEARCH TOOLS の Anatomy ツールを選択して、PD-1 の発現が高いマウスの組織/細胞を検索します。

PD-1 は、がん組織由来の T 細胞、脾臓中の T 細胞、腫瘍排出リンパ節から単離した T 細胞などの免疫系細胞で高い発現がみられます(図1)。また、Perturbations ツールを使ってどんな疾患や刺激によって PD-1 の発現が変動するか確認したところ、PD-1 は肝細胞癌、神経膠腫、T 細胞の活性化などで発現が上昇していました。

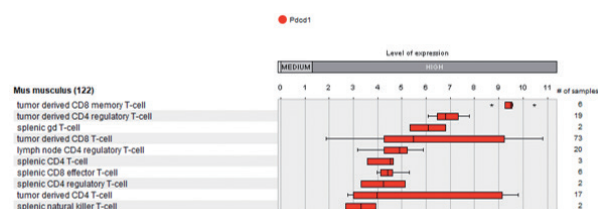


図1. PD-1の発現が高い細胞

## PD-1 と共発現する遺伝子

SIMILARITY SEARCH TOOLS の Co-Expression ツールを選択して、腫瘍浸潤免疫細胞を含む遺伝子発現データに対して PD-1 の発現パターンと相関が高い 50 種の遺伝子を検索します(図2)。その結果、LAG-3、Tigit、Litaf、Tnfrsf9 などの既知の免疫チェックポイント関連遺伝子が見つかりました。この結果は今回の解析手法の妥当性を示しています。また、がん免疫療法の標的となる新規

候補遺伝子も得られました。

図2の赤で囲んだ6つの遺伝子は、サイトカイン産生調節やアポトーシスに関連しています。黄色で囲んだ11個の遺伝子の多くは細胞膜タンパク質です。青で囲んだ遺伝子は顆粒球の走化性に関連する遺伝子を多く含みます。

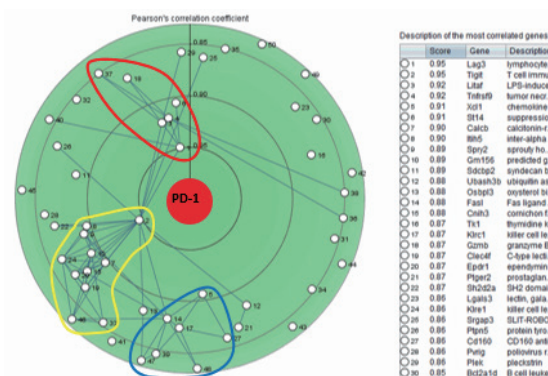


図2. PD-1と発現パターンが類似した遺伝子

## 細胞ごとの発現パターン

PD-1 と発現パターンが類似している遺伝子の発現パターンを T 細胞の種類ごとに調べるため、SIMILARITY SEARCH TOOLS の Hierarchical Clustering ツールを利用します。

Litaf、Lgals3、Mgst1 はさまざまな種類の T 細胞である程度均一の発現を示すのに対して、Cnih3、Tnfrsf4 は特定の種類の細胞に限定して発現しています(図3)。青い線で囲まれた遺伝子は、PD-1 と細胞の種類ごとの発現パターンが一致しないことがわかります。

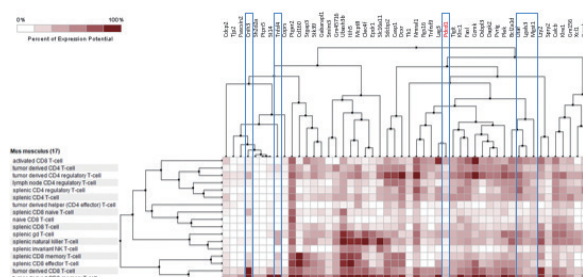


図3. PD-1と共発現する遺伝子のT細胞での発現パターン

## ご評価

GENEVESTIGATOR は、無償トライアルにより 30 日間ご評価いただけます。遺伝子発現解析をされている方はぜひ GENEVESTIGATOR をお試しください。トライアルをご希望の方は弊社ウェブサイトよりお問い合わせ下さい。

## 統合計算化学システム

## MOEによる環状ペプチドの配座解析と相互作用解析

環状ペプチドは低分子や抗体のそれぞれの短所を克服可能な中分子医薬品として注目されています。環状ペプチドは配座の自由度が制限されるため、標的タンパク質との親和性や選択性の向上、物性の改善が期待されています。MOEは、低分子・ペプチド・タンパク質・抗体・核酸等の医薬品のモデリングに対応した統合計算化学プラットフォームです。MOEを用いることで、広範なスケールの分子を同一環境で取り扱うことができ、環状ペプチドの配座解析、物性予測、相互作用解析などさまざまなアプローチでの設計が可能です。ここでは環状ペプチドにフォーカスしたMOEを用いた解析事例を紹介します。

## ■環状ペプチドの概要

ペプチドは、低分子医薬とバイオ医薬(タンパク質・抗体・核酸)との間のギャップを埋めつつ、かつ両方の長所を兼ね備える可能性のある中分子医薬品として注目されています。特に主鎖や側鎖を共有結合させた環状ペプチドは、その立体配座を大きく制限できるため、標的タンパク質との特異性の向上、血中安定性や膜透過性の向上等のメリットがあります。

*in silico* で予測された環状ペプチドの立体配座は、水や生体膜中での物理化学的な性質の予測や標的タンパク質との相互作用の理解、新規ペプチドの設計に利用できます。

## ■環状ペプチドのモデリング

ペプチドは、アミノ酸残基の種類、残基数、環状化条件により多様な構造を取りえます。適切なペプチドモデリングは、計算時間の短縮や精度の向上にも寄与します。

MOEは、MOE Peptide Language (MPL) と呼ばれる独自の言語を搭載したMPL-Builder<sup>1)</sup>により多様なペプチドを簡単に構築できます(図1)。MPL-Builderは、登録されたアミノ酸を名前、クラス、IUPAC名、カタログ番号等で検索でき、新規特殊アミノ酸の登録もできます。図2はMPL-Builderによる構築例です。環状、鎖状、枝状、複数分子鎖にわたるペプチド、網羅的なペプチドのモデリングを、MPLを記述することで簡単に行えます。これらのペプチド構造を入力として多くの解析を実行できます。

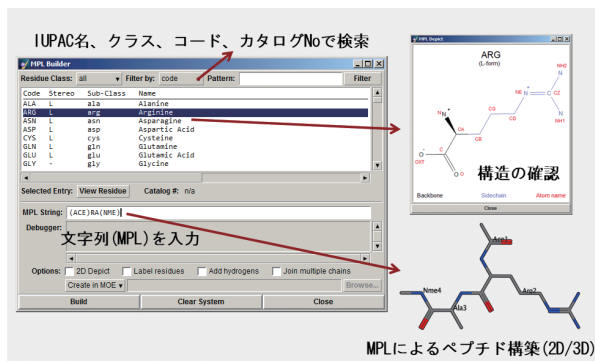


図1. MPL-Builderパネル

種類	MPLの記述例
鎖状ペプチド	CYIGAGP
環状ペプチド①	cyclic-((DAL)(MLE)(MLE)(MVA)(BMT)(AA3)(SAR)(MLE)V(MLE)A)
ジスルフィド結合②	(C,SG&1)YIQN(C,SG&1)PLG
枝状やチェーン分割③	{AAAA(G,CA&1)A}{AAA(G,CA&1)AAA}
網羅的トリペプチド	[X][X][X] Xは20種の天然アミノ酸を意味

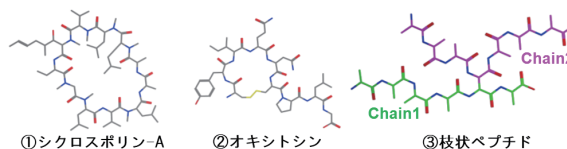


図2. MPLの記述例とMPL-Builderによるペプチド構築

## ■環状ペプチドの配座解析

ペプチドの立体配座は、物理化学的性質や構造安定性、標的タンパク質との相互作用にも影響し、環状化させることでそのコントロールが可能になります。MOEのLowModeMDは、低振動モードに重み付けし、結合二面角をMDにより振動させ環状ペプチドの安定配座を効率的に探索するアプリケーションです。図3は、エンドセリン受容体拮抗薬であるBQ123に対してLowModeMDを用いて仮想溶媒中での配座予測を行った結果です。NMRで観測された原子間距離やターン構造、疎水性接触を再現できました。

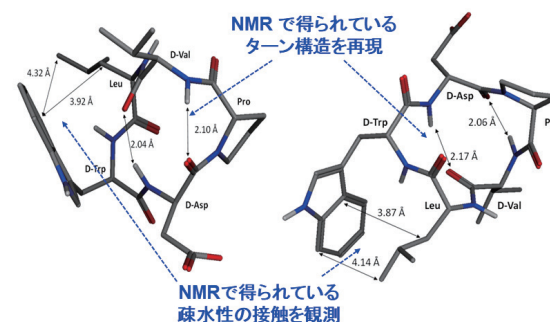


図3. LowModeMDによる配座解析の結果。左は最安定配座、右は11番目に低いエネルギーを持つ配座。数字はNMRで得られた結果に対応する原子間距離。

## ■環状ペプチドの安定性予測

ペプチドやタンパク質はさまざまな化学的修飾を受け可能性があります。化学的修飾は、側鎖の機能変化や高次構造変化を伴い、標的との相互作用や安定性に影響を

及ぼします。糖鎖の修飾は、ペプチドの凝集性の低下や溶解性の向上に繋がります。MOEを用いて、アミノ酸配列モチーフと原子の溶媒露出度より表1のような修飾部位が検出できます。NMRで構造決定されたIGF-1アンタゴニストの20配座について修飾部位を検出すると、立体配座により修飾の影響が異なることがわかりました(図4)。

表1. 予測できる化学的修飾部位リスト

Met, Cys, Trpの酸化	Aspの異性化	Asnの脱アミド化
Gluのピロロール化	N結合糖鎖修飾	細胞接着モチーフ
ペプチド結合切断モチーフ (35種のタンパク質分解モチーフ)		

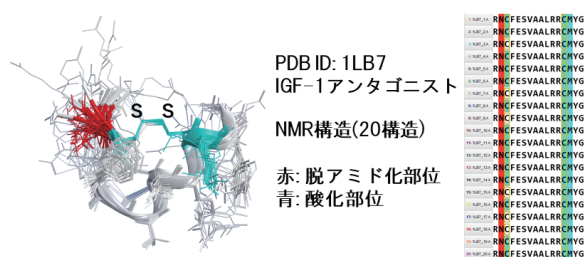


図4. MOEを用いた化学的修飾部位の検出。化学的修飾部位の検出にはBio-MOE<sup>2)</sup>を使用。

## ■ 環状ペプチドの膜透過性予測

ペプチドは細胞膜透過性の問題がしばしば起こります。ここではQSPRモデルによる膜透過性予測を検討しました。6から7残基の11種の環状ペプチド配列<sup>3)</sup>を用いました。LowModeMDを用いてクロロホルム中(誘電率4.8)での配座を多数発生し、各配座について計334種類の2Dおよび3D記述子を計算しました。人工膜透過性試験( $\log Pe$ )の結果を目的変数として、MOE-AutoQuaSAR-GAにより記述子を組み合わせながら予測モデルの自動構築を行いました。図5は構築したモデルから得られた予測値と実験値との相関図です。二面角エネルギー( $E_{tor}$ )と溶媒和相互作用エネルギー( $E_{sol}$ )の2つの記述子から予測性の高いモデル( $r^2$ は0.85, 交差検定済み $r^2$ は0.76)が得られました。このモデル以外にも同精度のモデルが多数得られており、記述子の出現頻度より原子間相互作用エネルギー記述子や、ADME予測に最適なVolSurf記述子がこの分子系においては重要であることがわかりました。

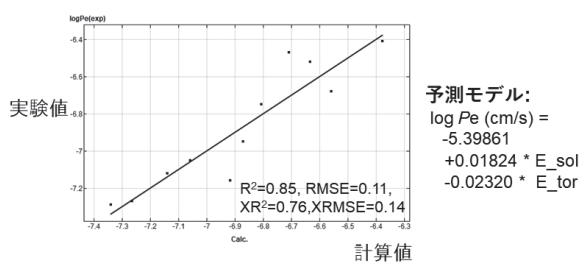


図5. 膜透過性の実験値と予測値の相関図

## ■ 環状ペプチドの相互作用解析

MOEのProtein Design機能は、受容体との相互作用解析や新規ペプチド設計に適用できます。

ここでは、PDB ID: 4Q1Qで登録されているhuPA-H99Yとその阻害剤である環状ペプチド(名称: Mupain-1, 配列: CPAYSRYLDC)を用いました<sup>4)</sup>。受容体には親水性のS1ポケットが存在し、Mupain-1のアルギニンがS1ポケット中の原子と主に水素結合で相互作用しています。Protein Designを用いてこのアルギニンをアラニンに変異させ、受容体と阻害剤間の相互作用エネルギーを評価しました(図6左)。Mupain-1の変異前と変異後の相互作用エネルギー差を $\Delta$ Affinityで評価します。R2Aに変異させたMupain-1の $\Delta$ Affinityは+18.0 kcal/molで、相互作用は低下しました。実験でもR2Aへの変異により $K_i$ 値は、15.3  $\mu$ Mから1000  $\mu$ Mになり活性は低下しています。

同様にProtein Designを用いて、同じアルギニン等特殊アミノ酸である4-GPAに変異させました(図6右)。4-GPAはアルギニンと同様の水素結合を形成しその $\Delta$ Affinityは-9.0 kcal/molで、相互作用は増加しました。実験による $K_i$ 値も、15.3  $\mu$ Mから1.86  $\mu$ Mとなり活性は増加しました。どちらの変異体構築の結果も実験と同様の結果を得ることができました。

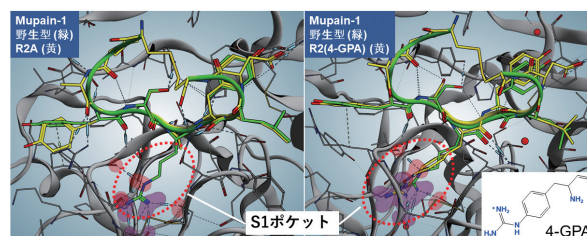


図6. huPA-H99YとMupain-1の複合体と変異体の相互作用解析。緑が野生型、黄が変異体の各構造。

## ■ MOE フォーラム 2019 開催告知

7月24日(水)にMOEフォーラム2019を開催いたします。開発元からのMOEの最新機能とユーザーからのMOEの活用事例の紹介の他に、本記事の環状ペプチドにおける解析事例も紹介します。詳細はウェブページ<sup>5)</sup>をご参照ください。皆様のご参加をお待ちしております。

- 1) MPL-Builderをご希望の方は弊社までご連絡ください。
- 2) [https://www.molsis.co.jp/wp-content/themes/molsis/pdf/moe\\_biomoe.pdf](https://www.molsis.co.jp/wp-content/themes/molsis/pdf/moe_biomoe.pdf)
- 3) Rezai, T.; *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14073-14080.
- 4) Zhao, B.; *et al. PLOS ONE* **2014**, *9* (12): e115872
- 5) [https://www.molsis.co.jp/seminar/moe\\_forum2019/](https://www.molsis.co.jp/seminar/moe_forum2019/)



## 創薬支援ツール

## リード化合物最適化ツール SeeSAR 9.0 リリース



独 BioSolveIT 社の SeeSAR は、メディシナルケミストのためのリード化合物最適化ツールです。SeeSAR は、リガンド原子の結合自由エネルギーへの寄与や結合二面角の妥当性、物性値等を総合的に評価しながら受容体の結合部位内での分子設計が可能です。SeeSAR は 2019 年 4 月にバージョン 9.0 に更新されました。ここではバージョン 9.0 での更新点である GUI の刷新とテンプレートドッキングを中心に紹介します。

### ■ GUI の刷新

SeeSAR の持つ機能を大きく 6 つのモードに分け、ボタンのクリックによりモードの切り替えが可能になり、より直観的な操作が可能になりました。

モードは次のように分類されます。

1. Proteins … タンパク質構造を読み込み、共結晶リガンド分子の指定
2. Binding Site … リガンド結合部位の設定
3. Analyzer … ドッキングに基づき得られたリガンド配座をファーマコフォア、プロパティによりフィルタリング
4. Molecular Editor … リガンド分子の編集
5. Inspirator … フラグメントベースの自動的な分子デザイン(母核置換、フラグメント付加)
6. Docking … リガンド分子のタンパク質ポケットへのドッキングシミュレーション

それぞれのモードは連携して動作します。例えば Binding Site でリガンド結合部位を設定し、Molecular Editor で設計したリガンドを Docking で結合予測するという一連の操作で段階を追って実行できます。これまでは操作が煩雑になりがちな 1 つ前の段階に戻して検討しなおすことが容易にできます。

### ■ テンプレートドッキング

ドッキング計算において、類似する化合物が同様の母核を持っている場合、参照リガンドをテンプレートとして、受容体ポケットに対してリガンド配置を行う手法が有効です。バージョン 9.0 ではテンプレートベースのドッキングアルゴリズムを使用できるようになりました。テンプレートを設定しない従来のドッキング手法に比べて、ユーザーが意図した 3 次元配置の構造を高速に得られやすくなります。テンプレートは Molecular Editor モードから指定します。母核のみの分子フラグメントを作成し、Docking モードに切り替え、テンプレートドッキングを

行います。例として EGFR (PDB ID: 1M17) を受容体とし、この複合体に含まれる Erlotinib のキナゾリン骨格をテンプレートとして EGFR に結合するいくつかのリガンドをドッキングしました(図 1)。ヒットした化合物の中で Dacomitinib の結合親和性は 10-1000 nM と推算されました。Dacomitinib を含む EGFR 複合体は PDB ID: 4I23 で登録されており、得られたリガンド配座と重ね合わせた結果、RMSD は 0.563 Å と結晶構造をよく再現していることがわかりました。

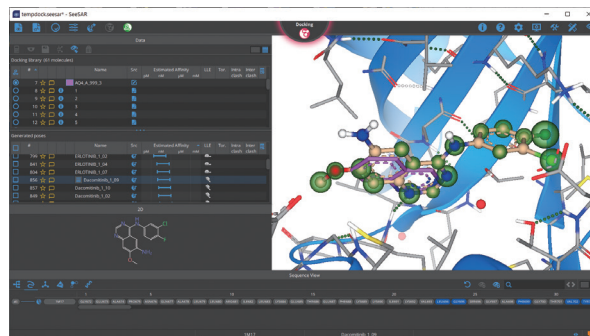


図1. テンプレートドッキング例。紫色のキナゾリン骨格をテンプレートとし、Dacomitinib をドッキング。

### ■ そのほかの更新機能

Binding Site モードでは、リガンドが存在しない受容体に対して DoGSite<sup>1)</sup> のアルゴリズムを用いて結合サイトの定義が行えます。また、クラスターもしくはクラウドで並列計算が可能な Docking 専用ソフトウェアである FlexX 4.0 用の入力データの生成ができるようになりました。

1) Volkamer, A.; Kuhn, D.; Rippmann, F.; Rarey, M. DoGSiteScorer: A Web Server for Automatic Binding Site Prediction, Analysis and Druggability Assessment. *Bioinformatics* **2012**, *28* (15), 2074–2075.

- ・弊社ウェブサイトには、取り扱い製品、最新のニュース、お客様向けサポート情報、他のサイトへのリンクなどを掲載しております。
- ・電子媒体でのニュースレターおよびバックナンバー (RSI ニュースレターを含む) は、弊社ウェブサイトをご覧ください。
- ・本ニュースレターは、弊社取り扱い製品をご購入いただきましたサイトのご担当者様にお送りしています。その他に発送をご希望がございましたら弊社までご連絡ください。
- ・記載されている会社名及び商品名は、各社の商標または登録商標です。

MOLSIS ニュースレター

No. 10, 2019

2019 年 7 月 1 日 発行

発行所 株式会社モルシス

Copyright© 2019 MOLSIS Inc.



株式会社モルシス

URL: <https://www.molsis.co.jp/>

TEL: 03-3553-8030 FAX: 03-3553-8031 E-mail: [sales@molsis.co.jp](mailto:sales@molsis.co.jp)