

NanoBRET™ テクノロジーを用いてキナーゼ阻害剤の細胞内における標的キナーゼへの結合を評価する



井上剛臣¹, 衣斐亜希¹, James D. Vasta², 宇野佑子¹, 中井良子¹, 澤匡明¹, Matthew B. Roberts², 川瀬裕介¹

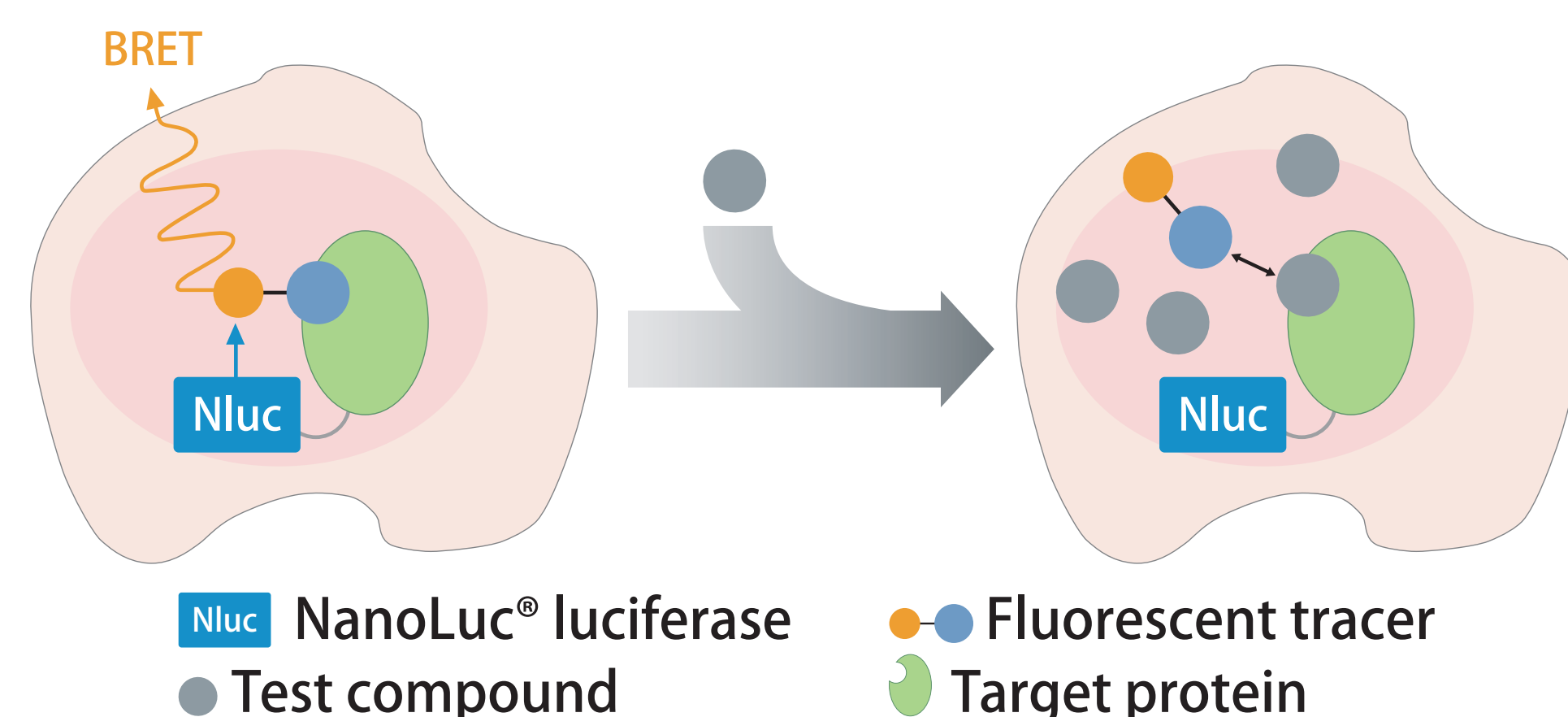
¹ カルナバイオサイエンス株式会社, ² Promega Corporation

Overview:

- 生細胞内における標的分子に対する薬剤の親和性およびカイネティックな結合特性は、薬剤の有効性、持続性および安全性を予測する上で重要な指標となる。
- NanoBRET™ Target Engagement (TE) Intracellular Kinase Assay を利用した細胞内キナーゼに対する薬剤の親和性および結合滞留時間(レジデンスタイム)の測定法を確立。
- 生細胞内でのターゲットエンゲージメントにより得られた薬剤強度は、単離酵素を用いた生化学的手法で得られた強度と比較し、フェノタイプ活性に対してより高い相関が得られた。
- NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay は多くのキナーゼをカバーしており、カルナバイオサイエンスではすでにおよそ 100 種のキナーゼのバリデーションを終えた。

Introduction:

薬剤のターゲットエンゲージメントを確認することは、創薬プロジェクトを成功に導くために欠かせない要素であり、加えて最近では、結合滞留時間から得られる薬剤の結合特性が *in vivo* におけるファーマコダイナミクスに関連することから、レジデンスタイム測定的重要性に注目が集まっている。



NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay は、生細胞内において発現させた NanoLuc® 融合キナーゼに NanoBRET™ トレーサーが近接することにより起こる共鳴エネルギー転移 (BRET) を検出するアッセイである。非標識薬剤がトレーサーと競合的に置換することで得られる見かけの親和性およびカイネティクスを定量解析することが可能。[1]

Results:

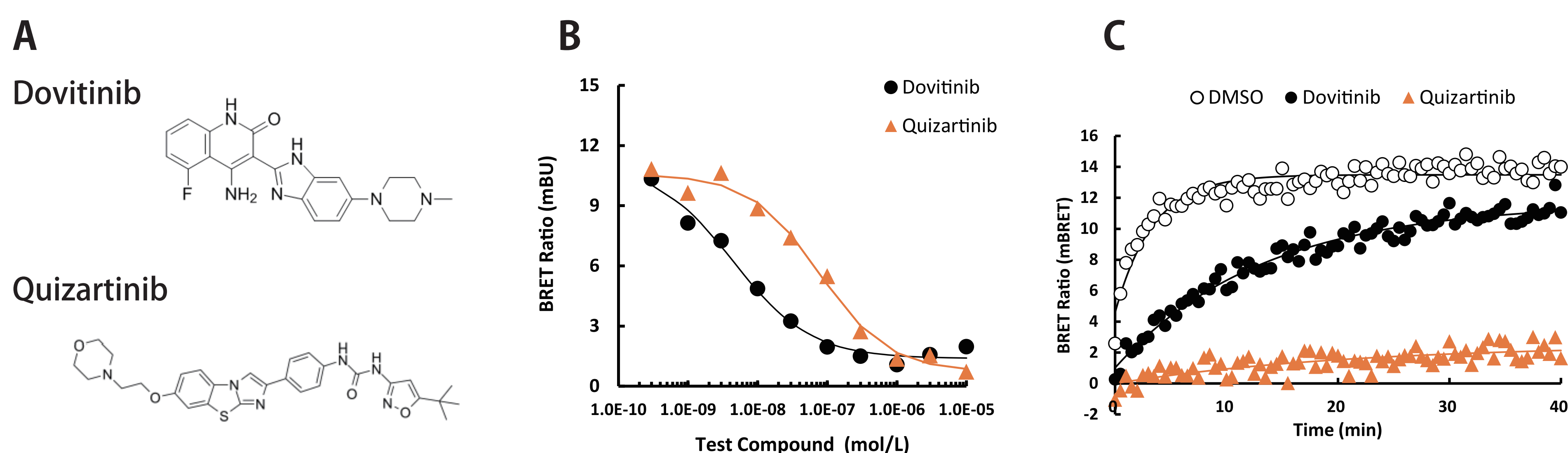
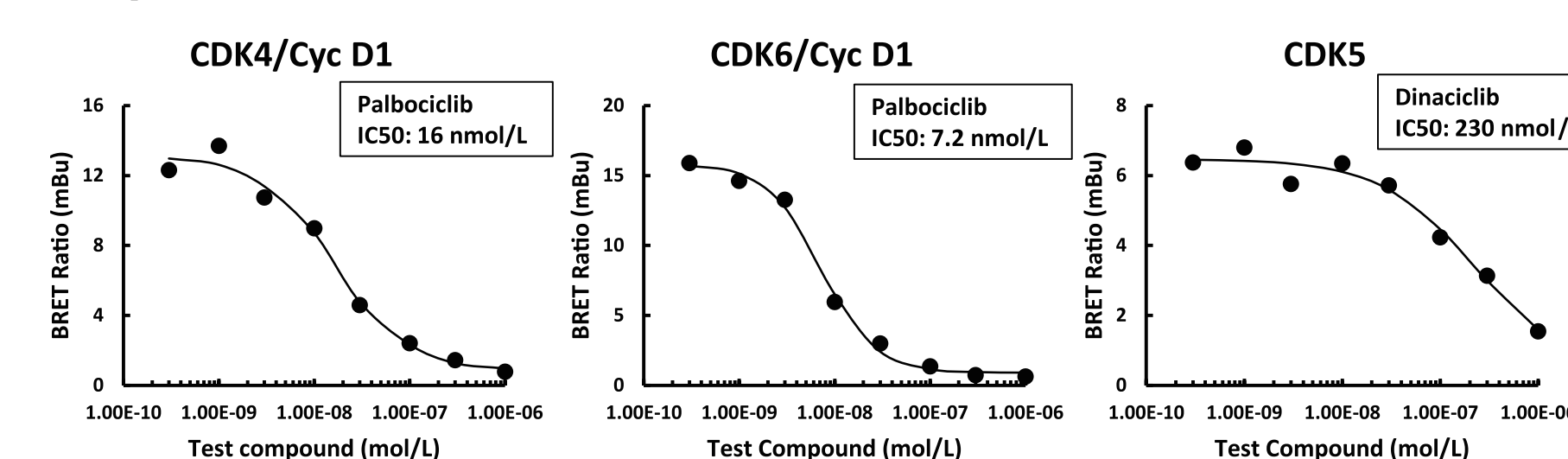
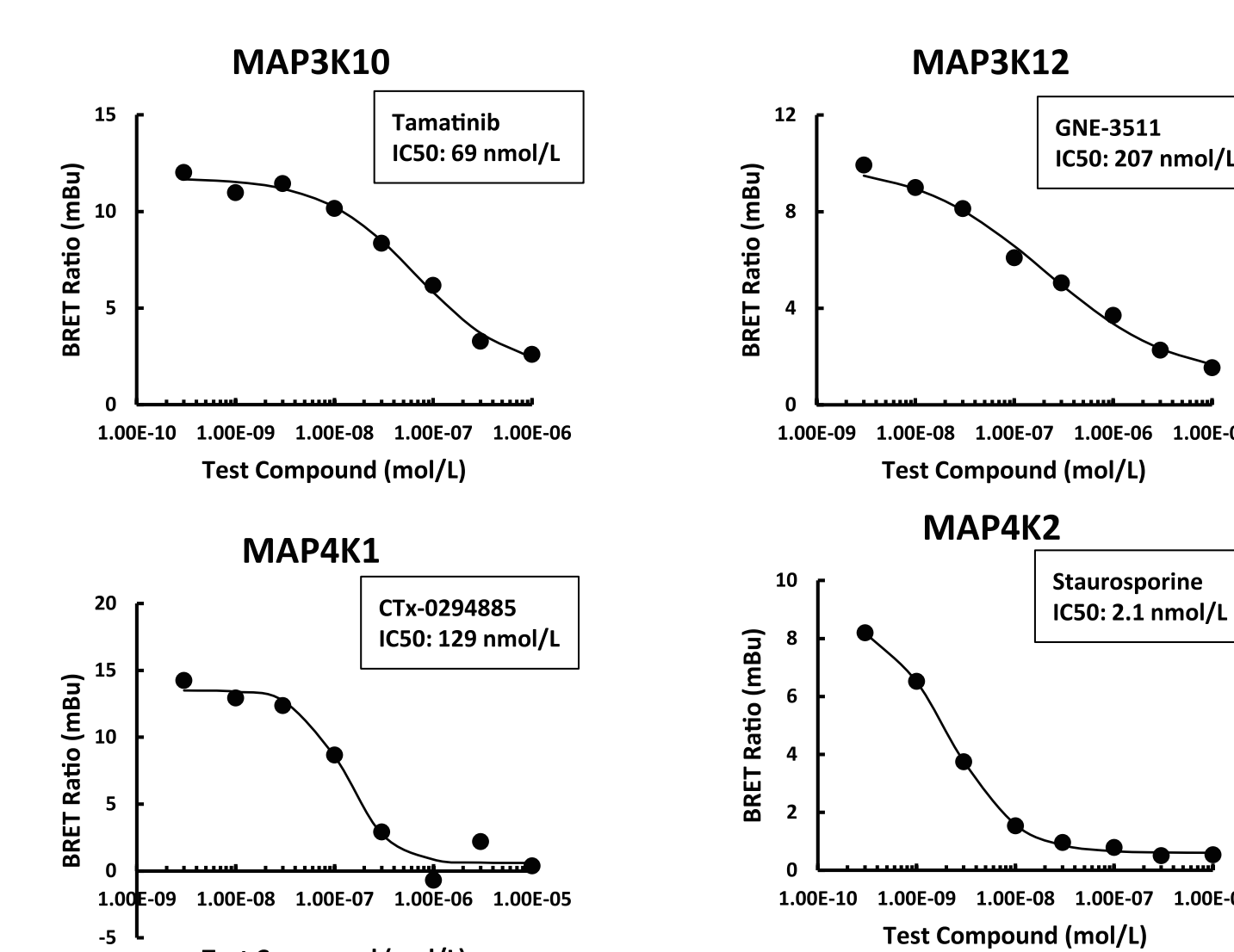


Figure 1. Quizartinib は Dovitinib と比較し、細胞内でより長時間の FLT3 に対する結合を示した。(A) Dovitinib (上) および Quizartinib (下) の化学構造。(B) NanoBRET™ assay を用いた Dovitinib (●) および Quizartinib (▲) の細胞内におけるターゲットエンゲージメント解析。FLT3 に対するトレーサーの結合に対し、Dovitinib は IC₅₀ 4.4nM、Quizartinib は IC₅₀ 77nM の阻害活性を示した。(C) HEK293 細胞における Dovitinib および Quizartinib のレジデンスタイム解析。Dovitinib のレジデンスタイムが 17.3 分であったのに対し、Quizartinib はより長い 144 分のレジデンスタイムを示した。

1) CDK



2) MAP3K/MAP4K



3) Immunity-related kinases

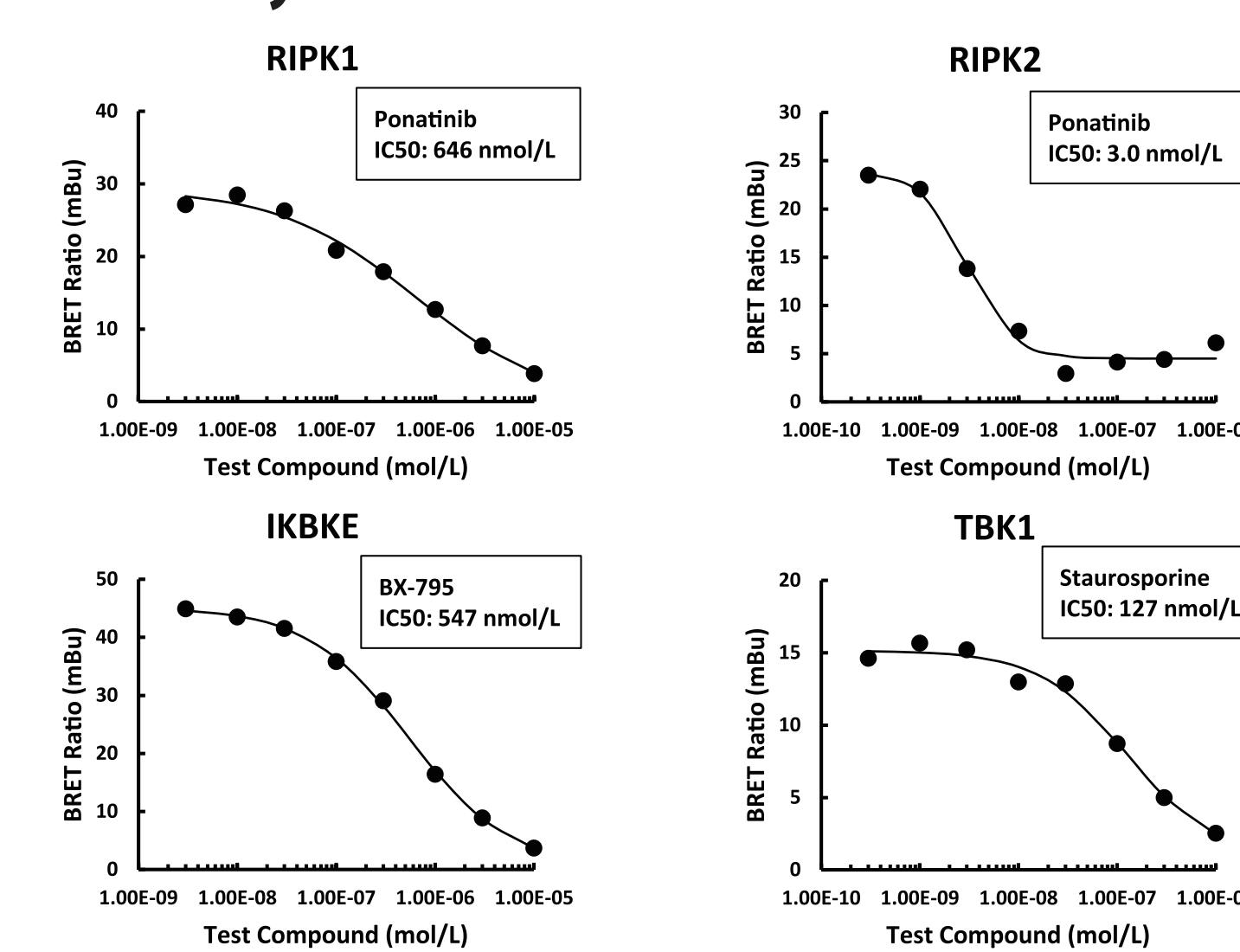


Figure 3. CDKs, MAP3K/4Ks および免疫関連キナーゼを含む幅広いキナーゼ阻害剤評価が NanoBRET™ TE assay で可能

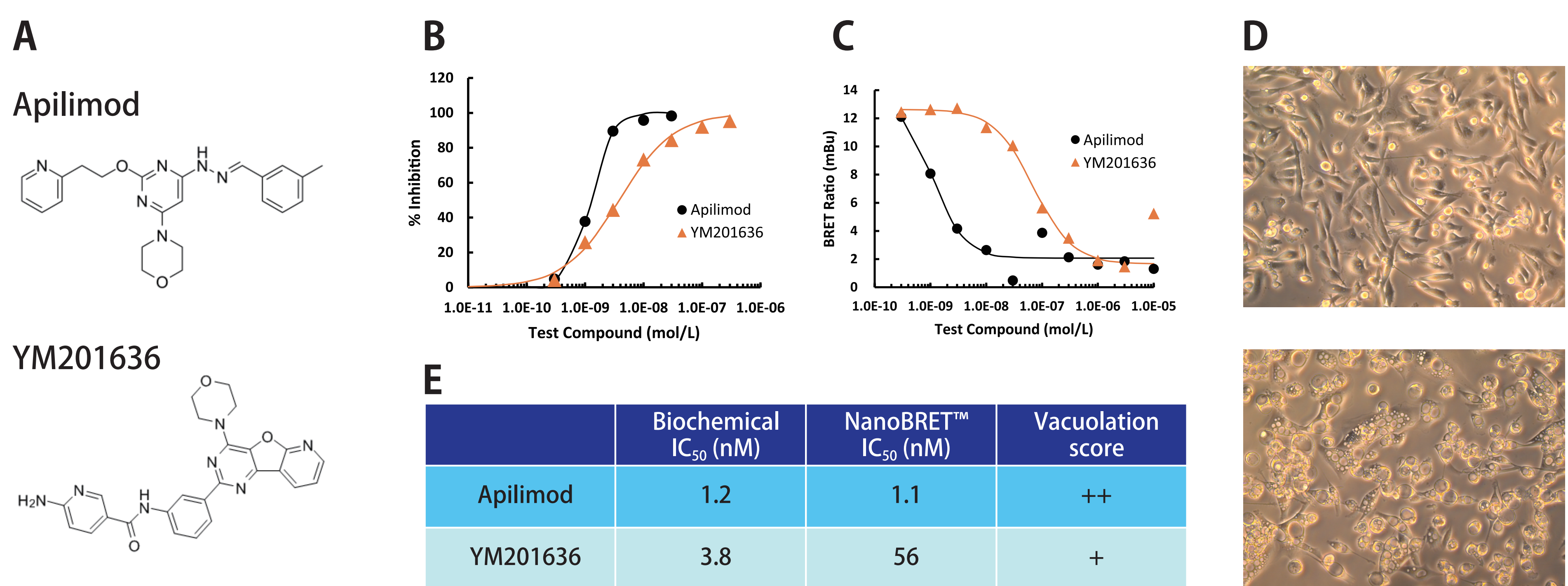


Figure 2. PIKFYVE 阻害剤による細胞質空胞化促進度は NanoBRET™阻害測定結果と良い相関を示した。(A) Apilimod (上) および YM201636 (下) の化学構造。(B) PIKFYVE キナーゼを用いた *in vitro* アッセイ (ADP-Glo®) における Apilimod (●) および YM201636 (▲) の阻害曲線。(C) The NanoBRET™ TE assay における Apilimod (●) および YM201636 (▲) の阻害曲線。Apilimod は YM201636 (▲) よりも10倍以上強い親和性 IC₅₀を示した。(D) PIKFYVE 阻害は細胞質空胞化を促進する。MDA-MB-231 細胞を 48 時間 DMSO (上) あるいは 0.3 μM Apilimod (下) 処理をした。(E) 細胞質空胞化スコアは NanoBRET™の IC₅₀ 値との良い相関を示した。細胞質空胞化スコアは、細胞に対する薬剤処理濃度を増加した際に視野内の細胞のほとんどにおいて空胞化が認められた濃度をスコア化した。(++) : ≥ 0.3 μM, (+) : ≥ 3 μM

References: [1] Vasta JD et al. (2018) Cell Chem Biol. 25(2): 206-214.e11.

Conclusions:

- 生体内に近い細胞内環境下でのキナーゼ阻害剤のターゲットエンゲージメントを評価する上で NanoBRET™ TE assay はパワフルなアッセイフォーマットである。
- キナーゼに対する親和性のみならず、結合滞留時間(レジデンスタイム)の様なカイネティック特性を測定することは阻害剤評価として重要である。
- カルナバイオサイエンスでは、複数のキナーゼに対する NanoBRET™ TE assay 測定および提供を実施する体制を整えた。

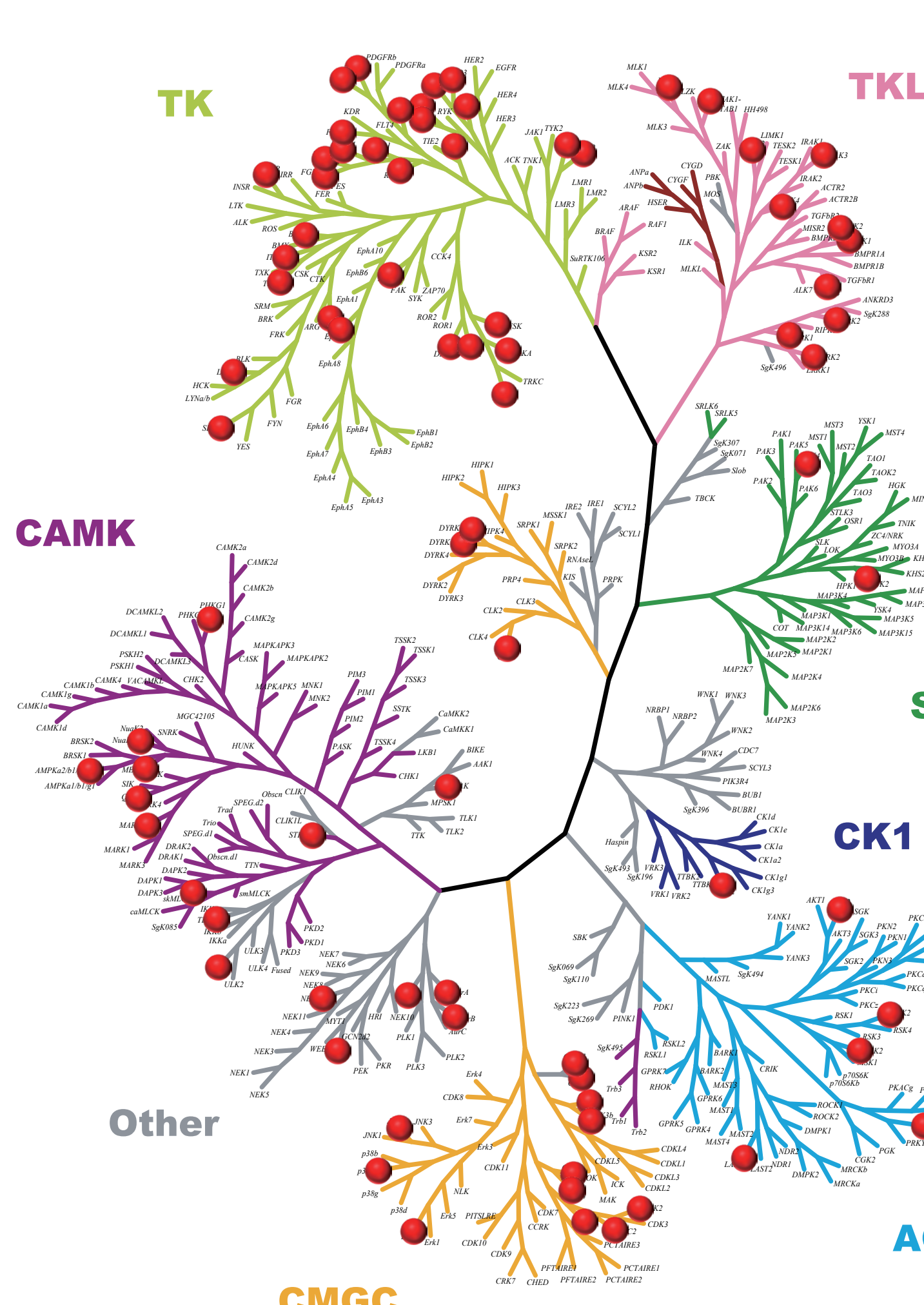


Figure 4. カルナバイオサイエンスでは既に 96 種のキナーゼに対する NanoBRET™ TE assay 評価済み