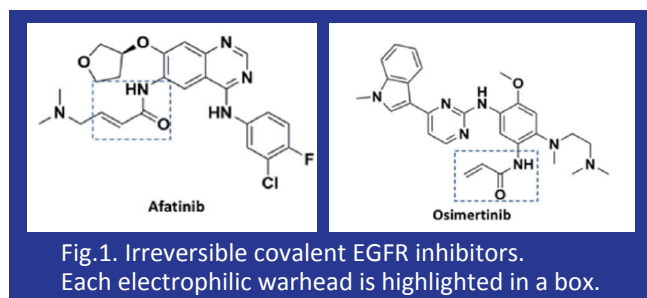


不可逆的共有結合型阻害剤のカイネティクス評価

共有結合形成型の酵素阻害剤は求電子構造を持ち、標的蛋白質上のセリン、リジン、ヒスチジン及びシステインといった求核性アミノ酸残基と反応し共有結合を形成します¹⁾。1928年に発見された世界初の抗生物質であるペニシリンは有名な共有結合型阻害剤の一つです。ペニシリンの β -lactamが細菌酵素であるDD-transpeptidaseの活性化部位にあるセリン残基と共有結合することによってDD-transpeptidaseを不活化し、細菌の細胞壁の合成を阻害します²⁾。近年この分野は著しい進歩を遂げ、現在市販されている医薬品の約30%が共有結合型阻害剤です。

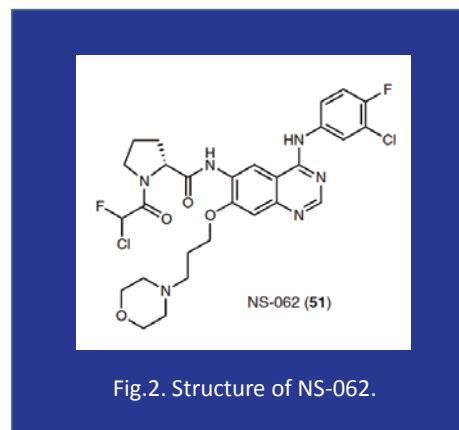
共有結合型阻害剤は可逆的阻害剤と比べて、親和性の向上が期待でき³⁾、また不可逆的であるため長期的な効果が得られます。しかし一方で、標的以外の蛋白質にある求核性アミノ酸残基と反応した場合、強い毒性を誘発してしまうという大きな問題が存在します。

古くから知られるアスピリンやペニシリンといった共有結合型阻害剤は、作用機序が不明なまま表現型スクリーニングから偶然見つかった産物でした。しかし、近年の共有結合型阻害剤開発においては、標的蛋白質に対する選択性を高めるデザインを採用することによって、非特異的反応性を抑えたより安全性の高い薬剤の研究にシフトしてきております。この手法で成功した共有結合型キナーゼ阻害剤の代表例が非小細胞肺癌(NSCLC)治療薬のEGFR阻害剤、afatinibとosimertinibです。いずれの薬剤も、自身が持つアクリルアミド(マイケルアクセプター: α, β -不飽和カルボニル基)がEGFRの活性化部位にあるCys797との間で共有結合を形成することにより不可逆的にEGFRを阻害します⁴⁾(Fig.1)。



Afatinibは2013年にFDAに承認された最初の共有結合型キナーゼ阻害剤です。また、osimertinibは従来のEGFR阻害剤に対して、無増悪生存期間(PFS)を延長させ、かつEGFR阻害剤耐性変異T790Mに対して高い有効性を示し2015年FDAに承認されました。

現在治療薬として承認されている共有結合型キナーゼ阻害剤の多くに、システインと共有結合する反応基としてアクリルアミドが利用されていますが、アクリルアミドをベースとした阻害剤の中にはオフターゲット蛋白質と非特異的に反応するものがあると報告されています⁵⁾。九州大学の王子田先生らのグループは、Cys残基に反応する新たな求電子性反応基としてCFA(α -chlorofluoroacetamide)(Fig.2)を見出しました。彼らはafatinibに含まれているキナゾリンをベースとしCFAを付加させたキナゾリン誘導体を合成し、この誘導体がマイケルアクセプター型阻害剤より高選択的にEGFRと相互作用することを報告しました⁶⁾。CFAとCysとの共有結合においては、中性の水溶液中では加水分解を受けやすいのに対し、溶媒から遮蔽されたEGFRのATPポケット内では安定していたため選択性が高められたのです。マウス腫瘍モデルの試験では、開発されたCFA誘導体NS-062がafatinibと同程度の抗腫瘍効果を発揮する一方でafatinibに認められるような体重減少を生じませんでした。CFAは有望な反応基であり、疾患治療のためにやがては臨床にまで進められるような新しい低分子化合物に組み込まれる可能性があります。



多くの場合、薬物は阻害有効度を示す IC₅₀ 値を用いて評価されていますが、この評価は可逆的阻害剤の結合親和性を平衡状態において見る場合に適しています。しかし、不可逆的阻害剤は標的酵素に永続的に結合するため、反応系の酵素量は時間の経過とともに減少し、その結果、不可逆的阻害剤の IC₅₀ 値は、反応時間が長くなるにつれて低下してゆきます⁷⁾⁸⁾ (Fig.3)。また IC₅₀ 値の下限値は酵素濃度の半分の濃度に制限されるため、下限値を下回るような強い酵素阻害活性を持つ化合物については真の効力が正しく評価されない恐れがあります。

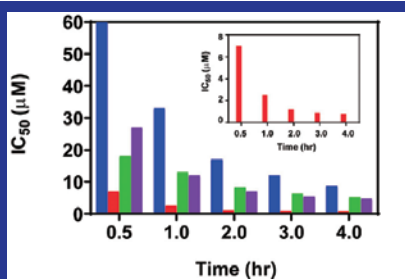


Fig.3. Time-dependence of IC₅₀ values for tirabrutinib (blue), ibrutinib (red), acalabrutinib (green), and spebrutinib (purple). Inset graph: magnified view of IC₅₀ values for ibrutinib (red).

そこで注目されるのが酵素速度反応による評価です。酵素速度反応論においては不可逆的阻害剤の酵素反応は Scheme 1 のように表わされ、不可逆的阻害剤の性質をより正確に評価することが可能となります。



Scheme 1. Reaction scheme for irreversible inhibition. E reflects the target enzyme, I is the inhibitor, E-I is the reversibly bound protein inhibitor complex, and E-I* reflects the formation of a covalent bond between the target enzyme and inhibitor.

第 1 ステップの酵素と阻害剤の可逆的な結合は K_i によって特徴づけられ、第 2 ステップの不可逆的な共有結合形成は最大酵素不活性化速度定数、 k_{inact} によって表現されます。そして k_{inact}/K_i が Scheme 1 の全体を表す 2 次反応速度定数であり、異なる不可逆的な共有結合型阻害剤の不活性化効率を比較する指標となります⁸⁾。Gilead Sciences 社の研究グループは、自社の不可逆的 BTK 阻害剤 tirabrutinib 及び他の不可逆的 BTK 阻害剤の選択性について、弊社の協業先である AssayQuant Technologies 社のカイネティクス測

定技術を用いて k_{inact}/K_i を求め、IC₅₀ 値による評価結果が k_{inact}/K_i の結果に対して、選択性をより過大に評価する傾向であったことを報告しました⁸⁾。

弊社では AssayQuant Technologies 社との協業にて PhosphoSens™ 技術を使った酵素アッセイによるリアルタイムカイネティクス測定サービスを提供しております (Fig.4)。PhosphoSens™ 技術は、Mg²⁺ をキレートリングすることで蛍光を発する (Chelation-enhanced fluorescence: CHEF) Sulfonamido-Oxine (Sox) をペプチドなどの基質に結合させ、キナーゼによる基質のリン酸化を蛍光強度の増加として経時的に検出することを可能にしました。受託サービスと併せて PhosphoSens™ 技術を用いたキットの販売も承っております。

また、弊社ではお客様の化合物の阻害様式を調べるツールとして、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法またはセルベースアッセイによる結合実験を利用した Residence Time 測定サービスもご提供しております。ご興味のある方はお気軽にお問い合わせ下さい。

- カイネティクス測定アッセイサービス
- ResidenceTimer™ キナーゼ蛋白質相互作用解析サービス
- NanoBRET™ TE Intracellular Kinase セルベースアッセイサービス

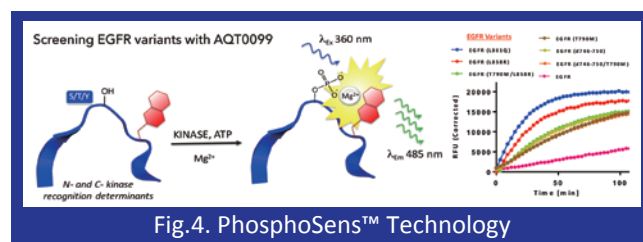


Fig.4. PhosphoSens™ Technology

引用：

- 1) Eur J Med Chem. 2017; 138:96-114. De Cesco S.
- 2) RSC Med Chem. 2020; 11:876-884. Sutanto F.
- 3) J Med Chem. 2009; 52(2):225-33. Smith AJ.
- 4) ChemMedChem. 2019; 14(9):889-906. Ghosh AK.
- 5) Nat Chem Biol. 2014; 10(9):760-767. Lanning BR.
- 6) Nat Chem Biol. 2019; 15(3):250-258. Shindo N., Ojida A.
- 7) J Biomol Screen. 2009; 14(8):913-23. Krippendorff BF.
- 8) Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2020; 1864(4):129531. Liclican A.

このニュースレターの中で論文から引用した情報の日本語翻訳文はカルナバイオサイエンス社が作成しました。