

3F04 酵素・受容体阻害剤開発のアプローチ

10月17日 (金) 14:00~16:00

第4会場(C-1)

オーガナイザー: 保川 清 先生(京都大学大学院農学研究科)

高橋 砂織 先生(秋田県総合食品研究センター)

様々な蛋白質間相互作用(PPI)の制御を
可能にする多面的創薬アプローチ

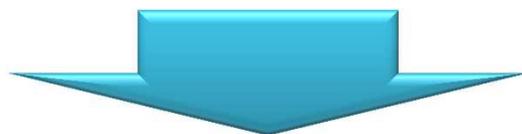
インタープロテイン株式会社

最高科学責任者 兼 事業開発本部長

小松 弘嗣

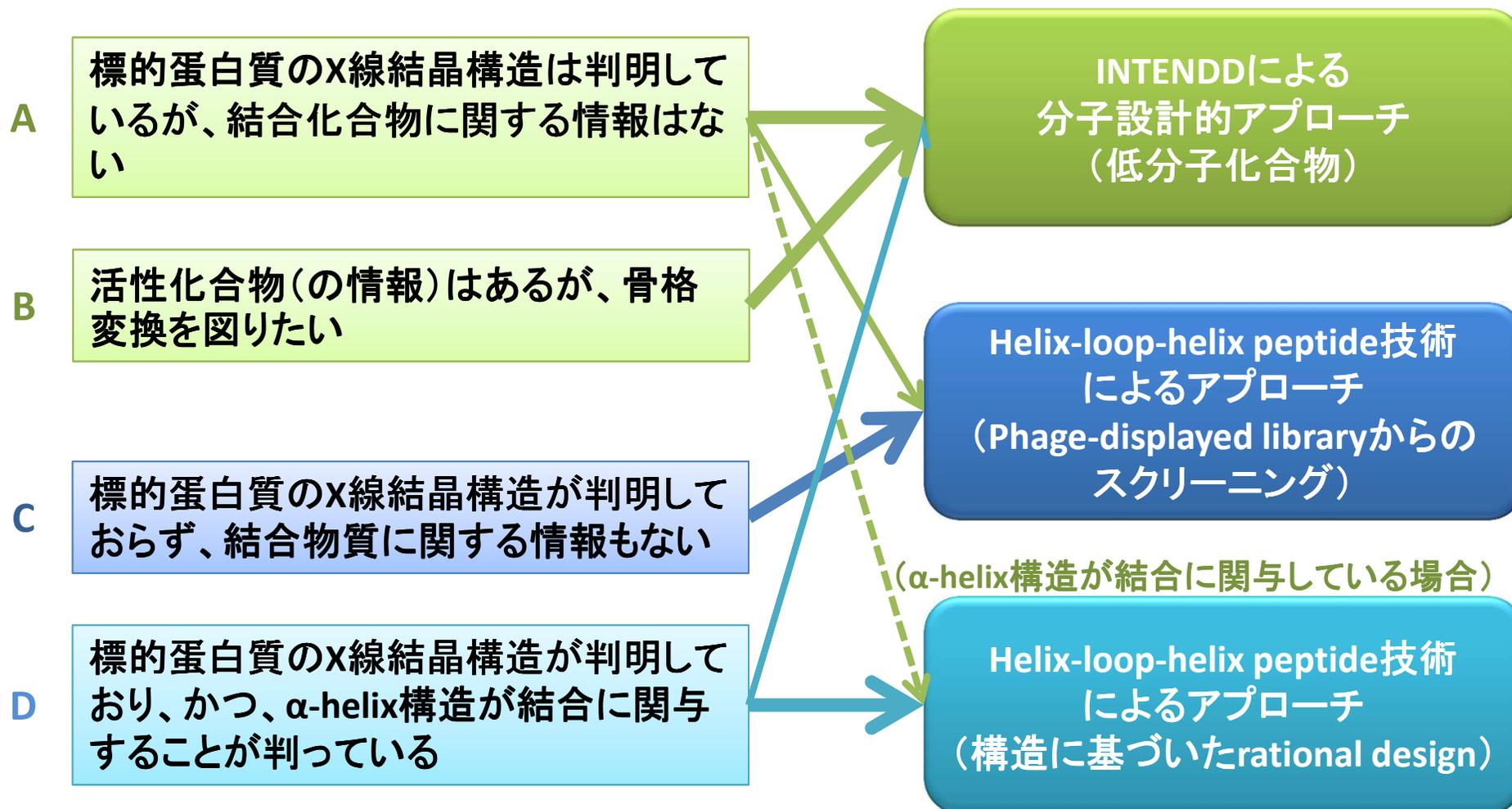
創薬研究の初期段階において、しばしば直面する問題

1. 興味深い創薬標的があるものの、創薬研究の出発点となる阻害物質等がない(阻害物質等に関する論文情報、特許情報等が見当たらない)。
2. High throughput screening (HTS) を実施したが、良いヒット化合物が見つからなかった。
3. 何らかの理由で、HTSを実施できなかった(できない)。
4. 活性化合物(の情報)はあるが、種々の理由により骨格変換を図りたい。
5. SBDD (structure-based drug design/discovery) を実施したいが、標的蛋白質の立体構造が明らかになっていない。



創薬のアイデアはあるものの、阻害物質(または作動物質)の探索に関し、実効性のある研究ステージに移行できない。

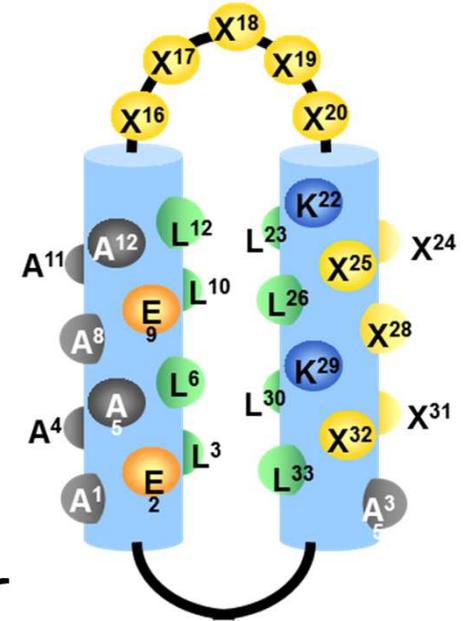
様々な状況に対応した創薬アプローチ



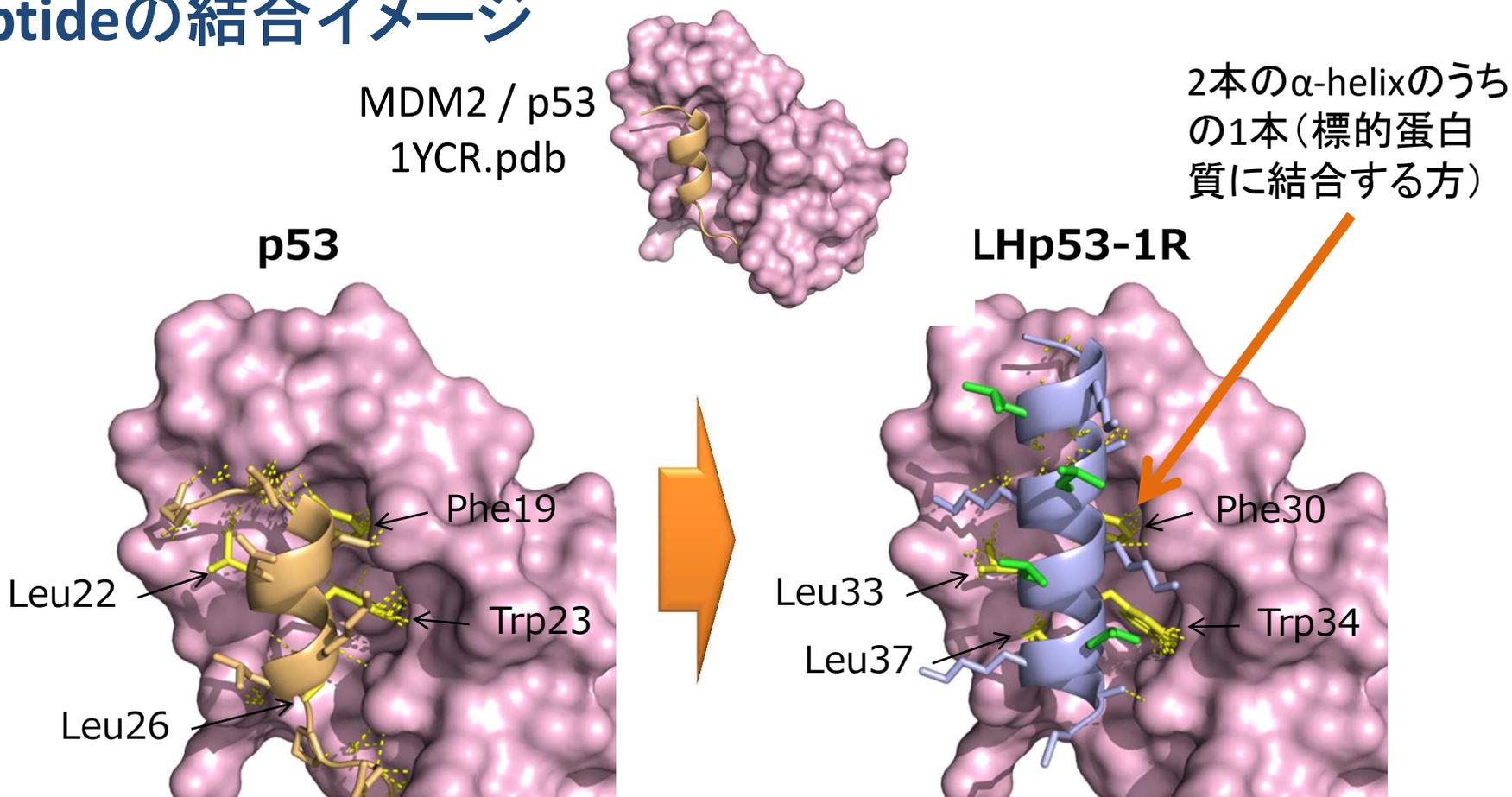
各種の酵素・受容体を含め、実質的に、ほぼすべての標的に対し、実践的な(実効性の高い)創薬研究をスタートさせることが可能である。

Helix-loop-helix peptideとは？

- ◆ 大阪府立大学 藤井 郁雄 教授によって考案された立体構造規制ペプチドの1種であり、「マイクロ抗体」とも呼ぶ。
- ◆ 右図のように、2本の α -helixが上部のloopで結ばれた構造を有し、総計約35個のアミノ酸からなる(右の α -helixの外側 又は上部のリンカー一部分が標的蛋白質に結合する)。
- ◆ 2本の α -helixの内側にはleucine間の疎水的相互作用が存在し、これにより、安定な構造が保たれている。下部も結合する(環状化することにより、安定性がさらに増大する)。
- ◆ 右の α -helixの外側の一部および上部のリンカー一部分のアミノ酸は自由に置き換えることが可能であり、 10^9 個程度のphage-displayed random peptide libraryからのスクリーニングにより、高い親和性で標的蛋白質に結合するペプチドを得ることができる。
- ◆ 標的蛋白質が α -helixを認識することが判明している場合には、その α -helix構造を模倣したペプチドをrational designにより取得することができる。



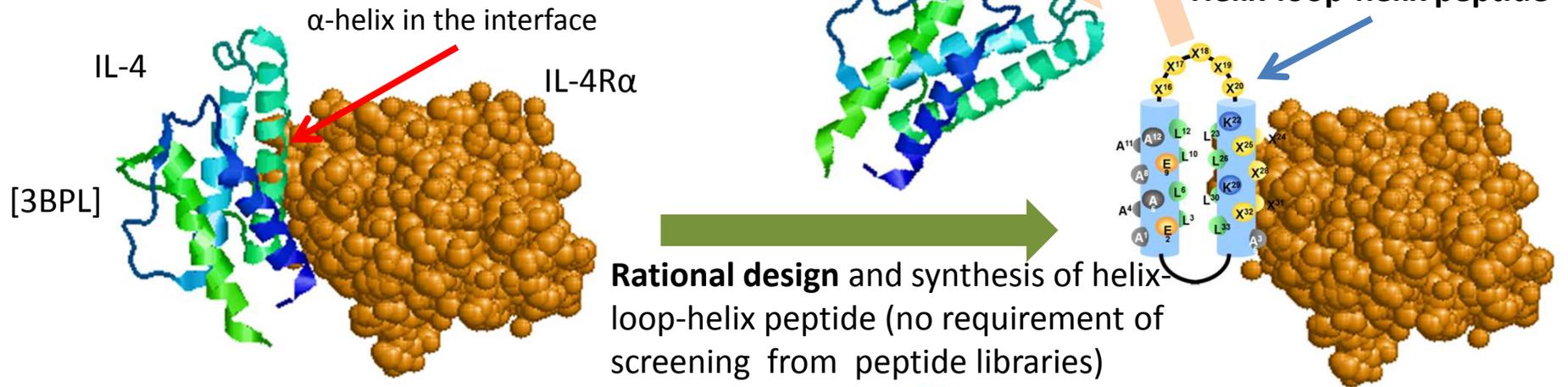
p53およびp53/MDM2 (HDM2) 結合阻害helix-loop-helix peptideの結合イメージ



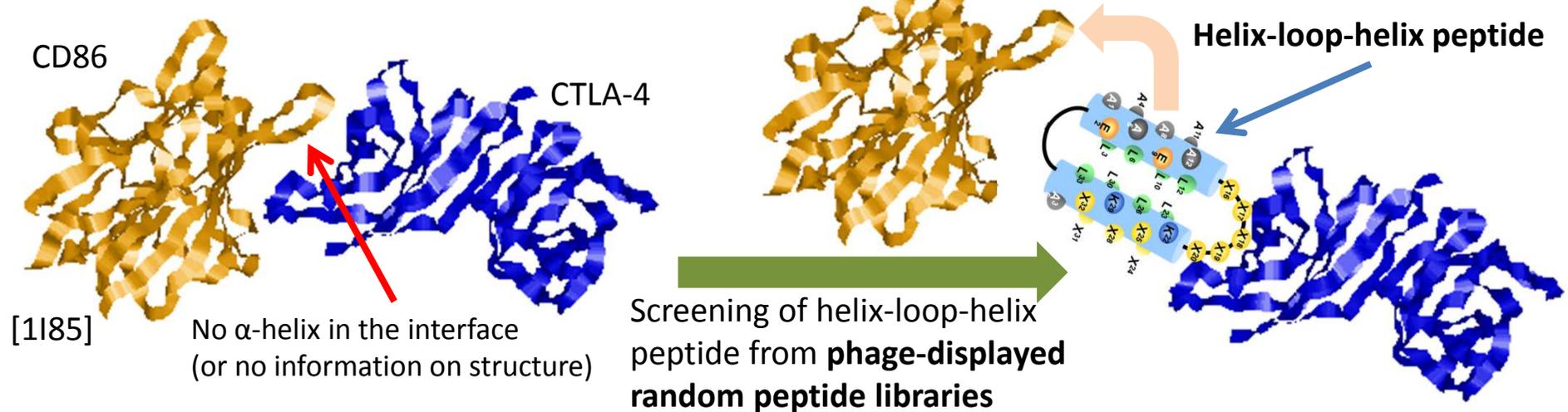
結合に寄与するp53のアミノ酸を、rational designによってhelix-loop-helix peptideの鑄型に載せることで高親和性(K_D 値 ≈ 10 nM)の結合阻害peptideを取得できた。

Helix-loop-helix peptideによるPPIs阻害の結合イメージ

Case A: α -helixが結合に関与する

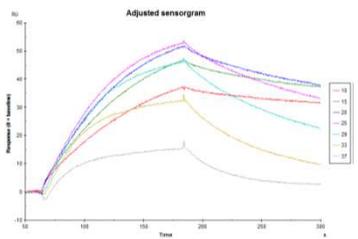
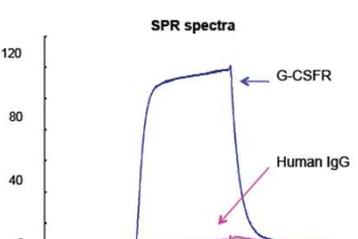
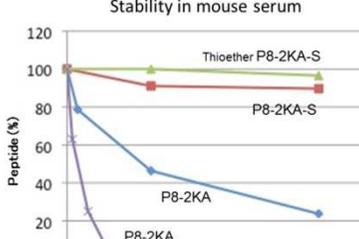
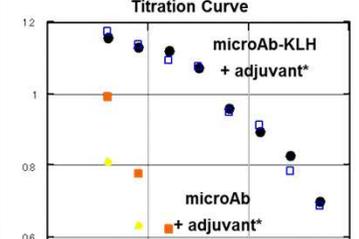
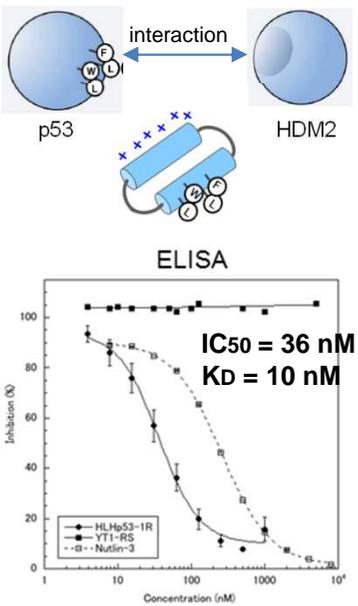


Case B: α -helixが結合に関与しない(立体構造が不明)



各種の酵素・受容体を含め、実質的に、ほぼすべての標的に対してhelix-loop-helix peptideを取得することが可能である。

Helix-loop-helix peptide (MicroAntibody) 技術の特徴

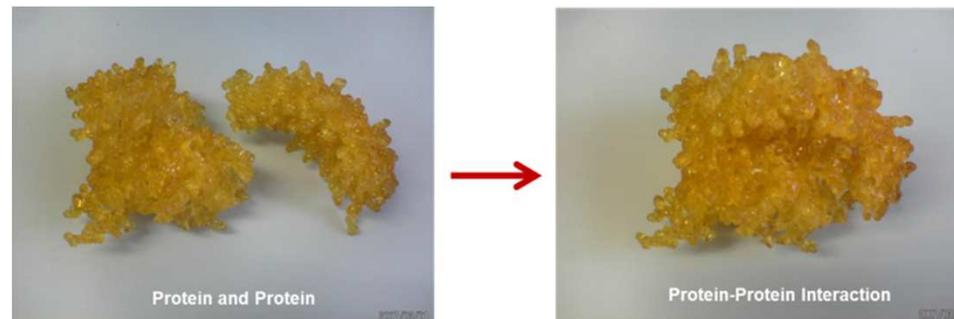
結合親和性	選択性	安定性	抗原性	汎用性										
<p>標的蛋白質に対して 高い親和性を示す (10 nM > KD値 > 0.5 nM)。</p>	<p>標的蛋白質に対して 高い選択性を有する。</p>	<p>血清中で 高い安定性を示す(環状化したペプチドの半減期は15日以上)。</p>	<p>マイクロ抗体単独では抗体産生を誘導せず、抗原性のリスクが低い。</p>	<p>α-Helixを認識しない 標的および細胞内の標的に対しても適応が可能である。</p>										
 <p>KD = 3 nM</p>	 <p>Peptide = 500 nM (BiaCore T-100)</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>peptides</th> <th>half life</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P8-2KA</td> <td>6.3 hour</td> </tr> <tr> <td>P8-2KA-S</td> <td>5.25 day</td> </tr> <tr> <td>ThioetherP8-2KA-S</td> <td>15.25 day</td> </tr> <tr> <td>P8-2KA C terminal</td> <td>0.5hour</td> </tr> </tbody> </table>	peptides	half life	P8-2KA	6.3 hour	P8-2KA-S	5.25 day	ThioetherP8-2KA-S	15.25 day	P8-2KA C terminal	0.5hour		 <p>ELISA</p> <p>IC₅₀ = 36 nM KD = 10 nM</p>
peptides	half life													
P8-2KA	6.3 hour													
P8-2KA-S	5.25 day													
ThioetherP8-2KA-S	15.25 day													
P8-2KA C terminal	0.5hour													

医薬品として必要とされる特性を有する「ペプチド」を多くの創薬標的に対して比較的容易に取得することができ、「ペプチド医薬」の新たな道を切り開く。

INTENDD (INTerprotein's Engine for New Drug Design) の概要

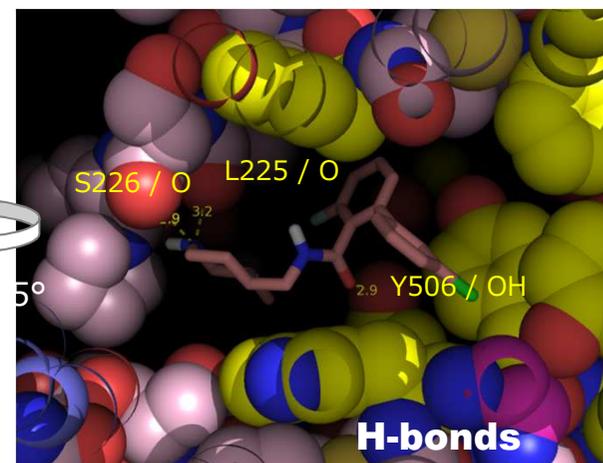
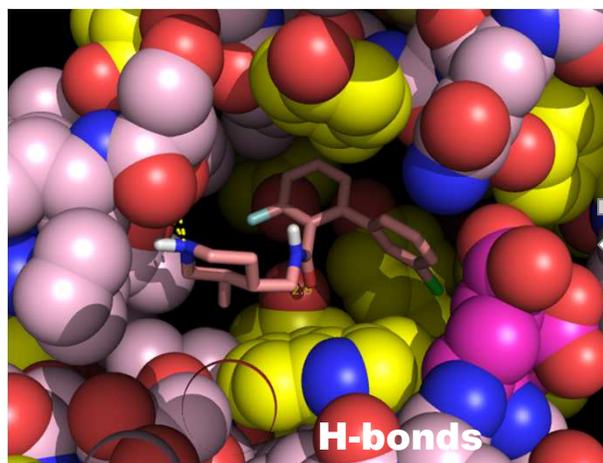
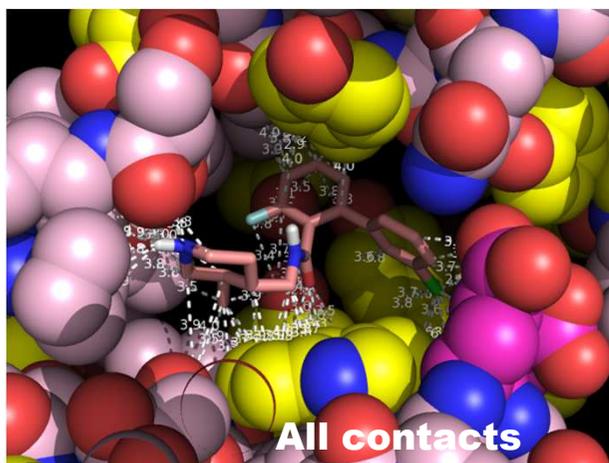
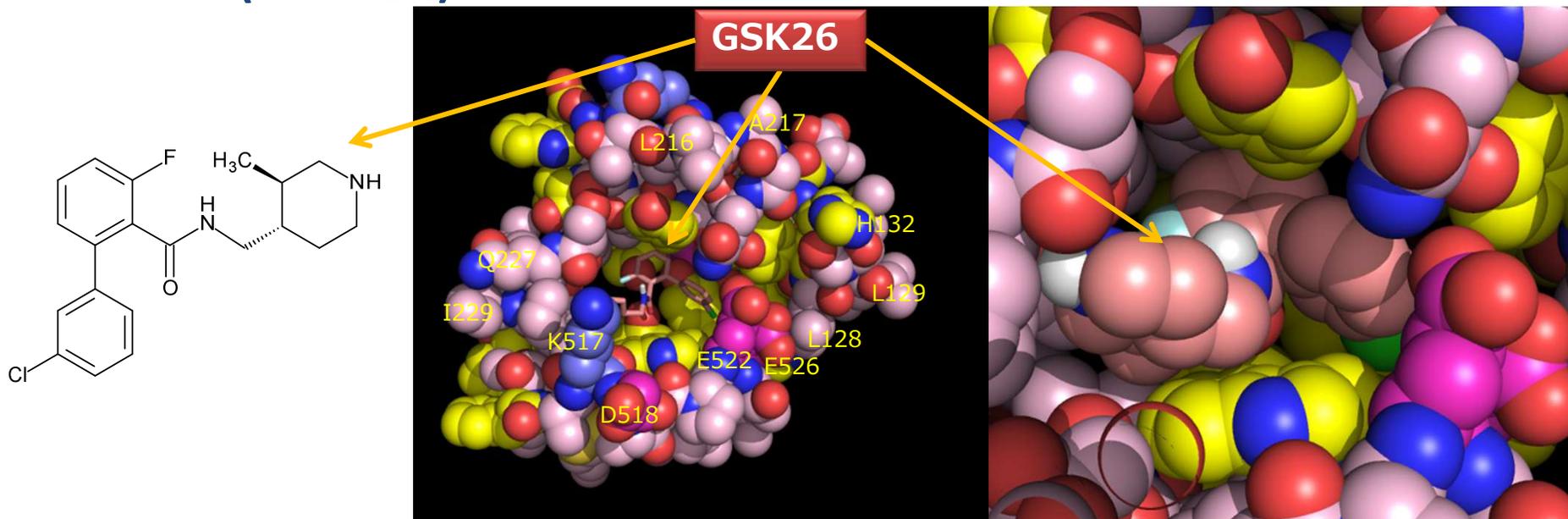
【主なステップと特徴】

1. 低分子結合部位の同定
 - a. 精密な立体分子模型を使用
 - b. 約1ヶ月で低分子結合部位を決定すると共に大まかな分子設計戦略も策定
2. SBSG (structure-based scaffold generation) 法による*in silico* screening
 - a. 期間は約3ヶ月
 - b. 通常、(約1000万個の市販化合物ライブラリーから)200-300個の化合物を提案(HTSは必要としない; 化合物購入費用も高額ではない)
 - ・1回の検討で複数の基本骨格を見出すことが可能
 - ・分子量、logP値などの観点からも、drug-likenessの高い化合物を選定可能
 - c. 各標的(結合部位)ごとにuniqueなアルゴリズムを作成する
 - d. ジグソーパズルと同様に、「形(結合部位の空間の形状と化合物の構造の相補性)」と「色(原子間の相互作用のメカニズム)」を合致させることを基本的戦略とする
 - e. 化合物選定の最終段階において、通常のドッキング法のような結合エネルギー計算(molecular dynamics)に依存した化合物の順位付けは行わない
 - f. 想定した「結合メカニズム」に合致する化合物のみを選定する



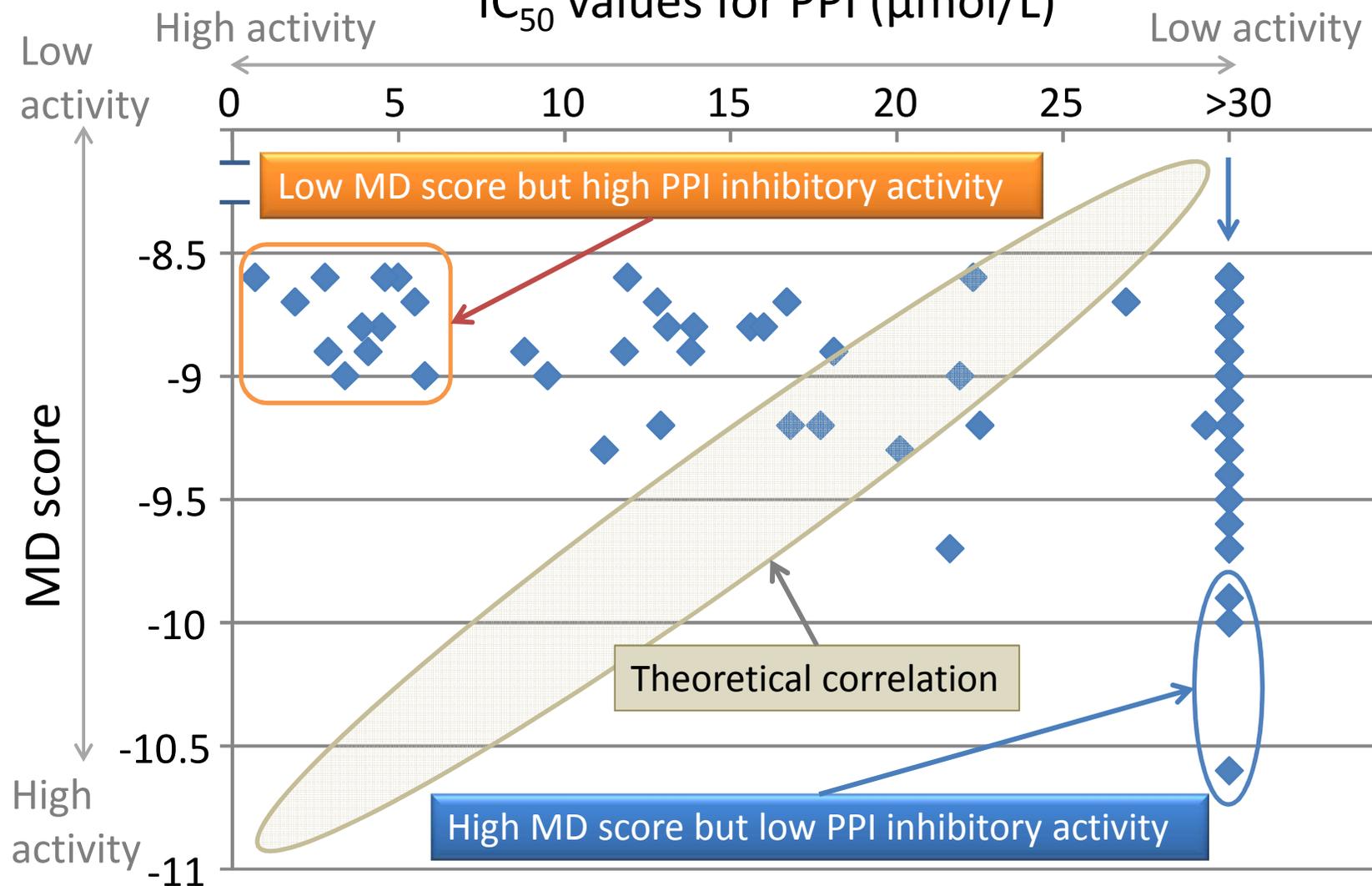
(立体分子模型は2-3時間で作製可能)

M1モデル (M3改変) とPAM-GSK26のドッキング・シミュレーション



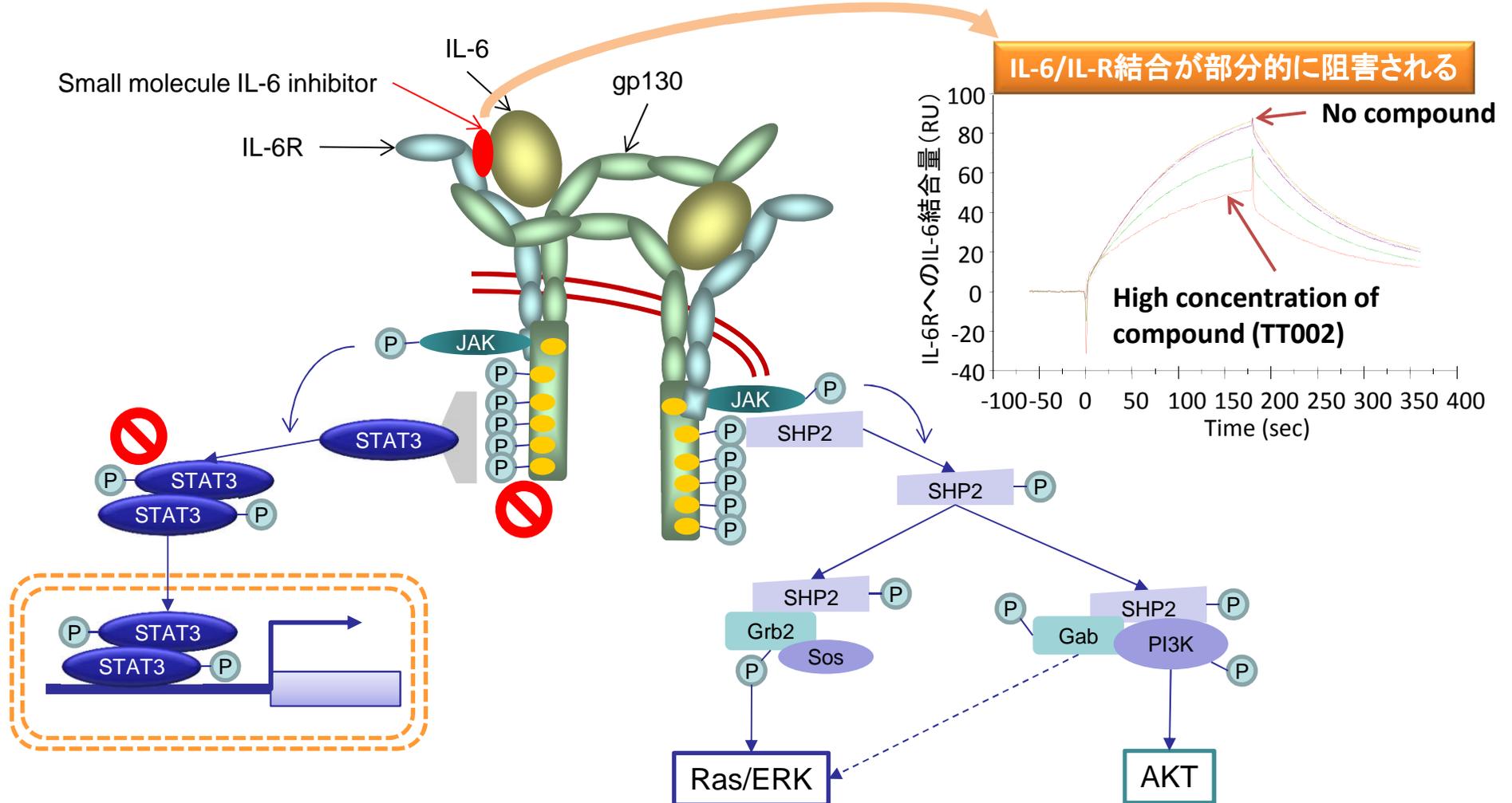
可能性のあるすべての相互作用を考慮するのではなく、ある特定の結合メカニズムのみを抽出し、それに合致する化合物を選定する。

MDに基づいた化合物の順位付とwet評価の結果との相関

IC₅₀ values for PPI (μmol/L)

Wet評価での活性とMDスコア上の順位が相関しないケースが数多く存在する(MDの計算結果には、false positiveが多数存在する)。

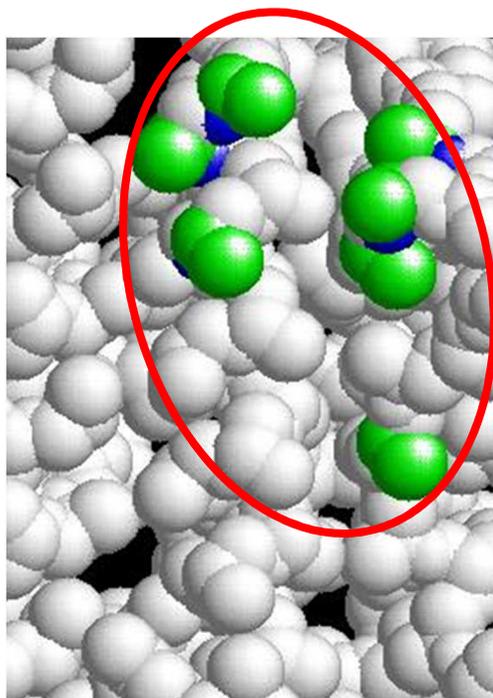
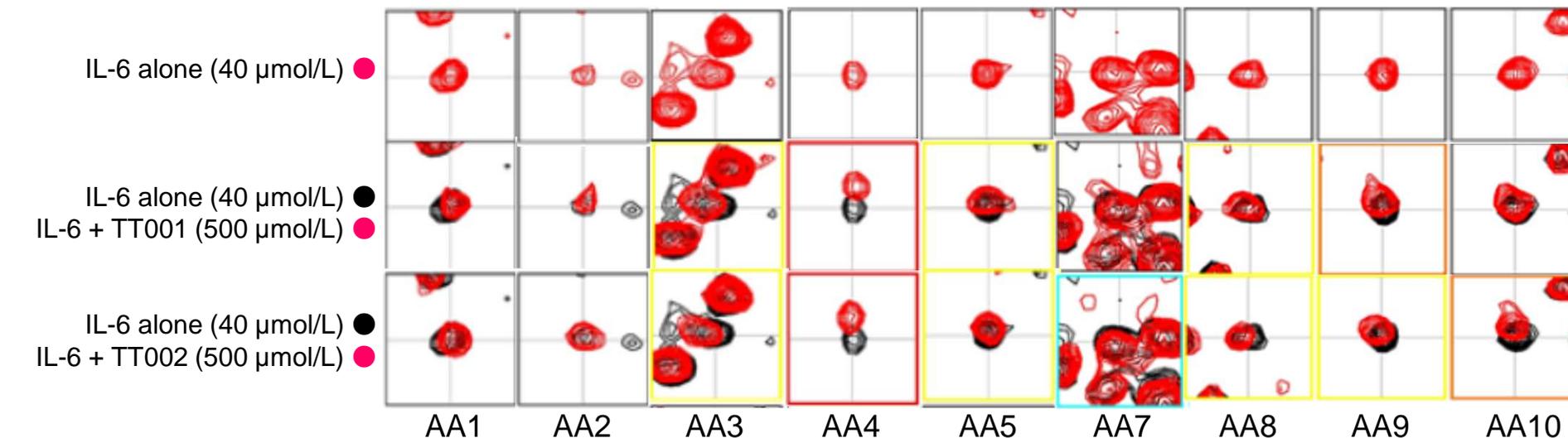
低分子IL-6/IL-6受容体間相互作用制御化合物の(作用機序面の)コンセプト



1. IL-6に結合することにより、IL-6/IL-6受容体間の相互作用を不完全(不安定)なものにする。
2. その結果、IL-6/IL-6受容体/gp130の複合体(6量体)からのシグナルを減弱させる。

備考: IL-6/IL-6受容体間の結合を完全に阻害する化合物群も同定されている。

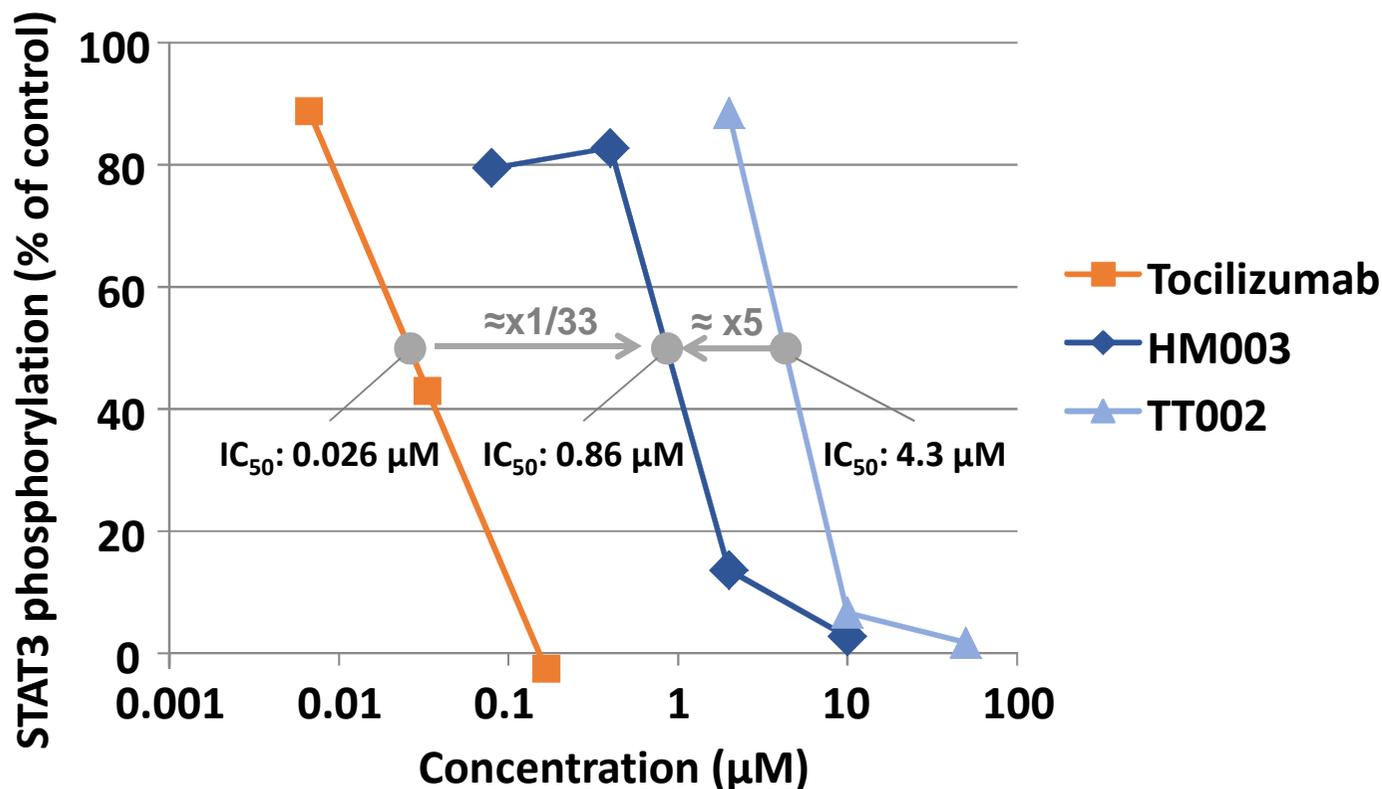
低分子IL-6/IL-6受容体間相互作用を制御する代表的化合物を用いたNMR解析



1. A binding site that consists of 10 amino acids (AA1 - 10) was proposed.
2. Compounds that are expected to bind to the binding site were designed and synthesized.
3. Experimental condition of NMR was carefully examined with TT001, which showed IL-6-binding activity and inhibitory effect on IL-6/IL-6R binding by SPR.
4. TT001 was clarified to interact with 5 amino acids (AA3, 4, 5, 8, 9) of 10 amino acids consisting of the binding site.
5. Under the same condition, TT002, more efficacious than TT001 in SPR, showed interactions with 7 amino acids (AA3, 4, 5, 7, 8, 9, 10).

代表的化合物の一つであるTT002(分子量 約430)は、NMR解析(¹⁵N-HSQC法)によって、IL-6表面上の想定結合部位と相互作用していることが強く示唆された。

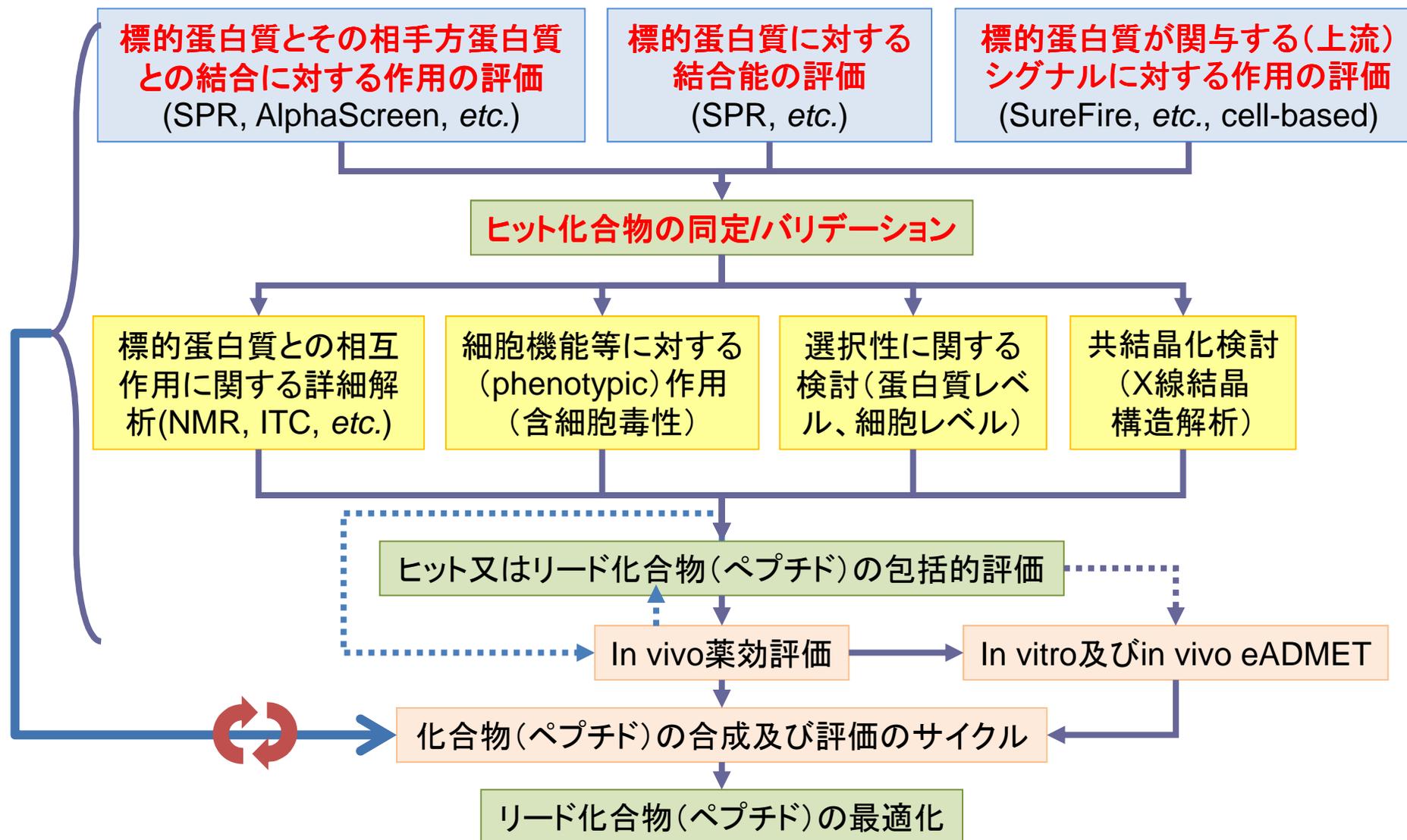
低分子IL-6/IL-6受容体間相互作用を制御する代表的化合物のSTAT3リン酸化阻害作用(ヒト肝臓系細胞株Hep3B細胞)



代表的化合物の一つであるHM003(分子量 約590)は、tocilizumabの約1/33のpotencyで、IL-6刺激時のSTAT3リン酸化(ヒト肝臓系細胞株Hep3B細胞; SureFire法)を阻害した。

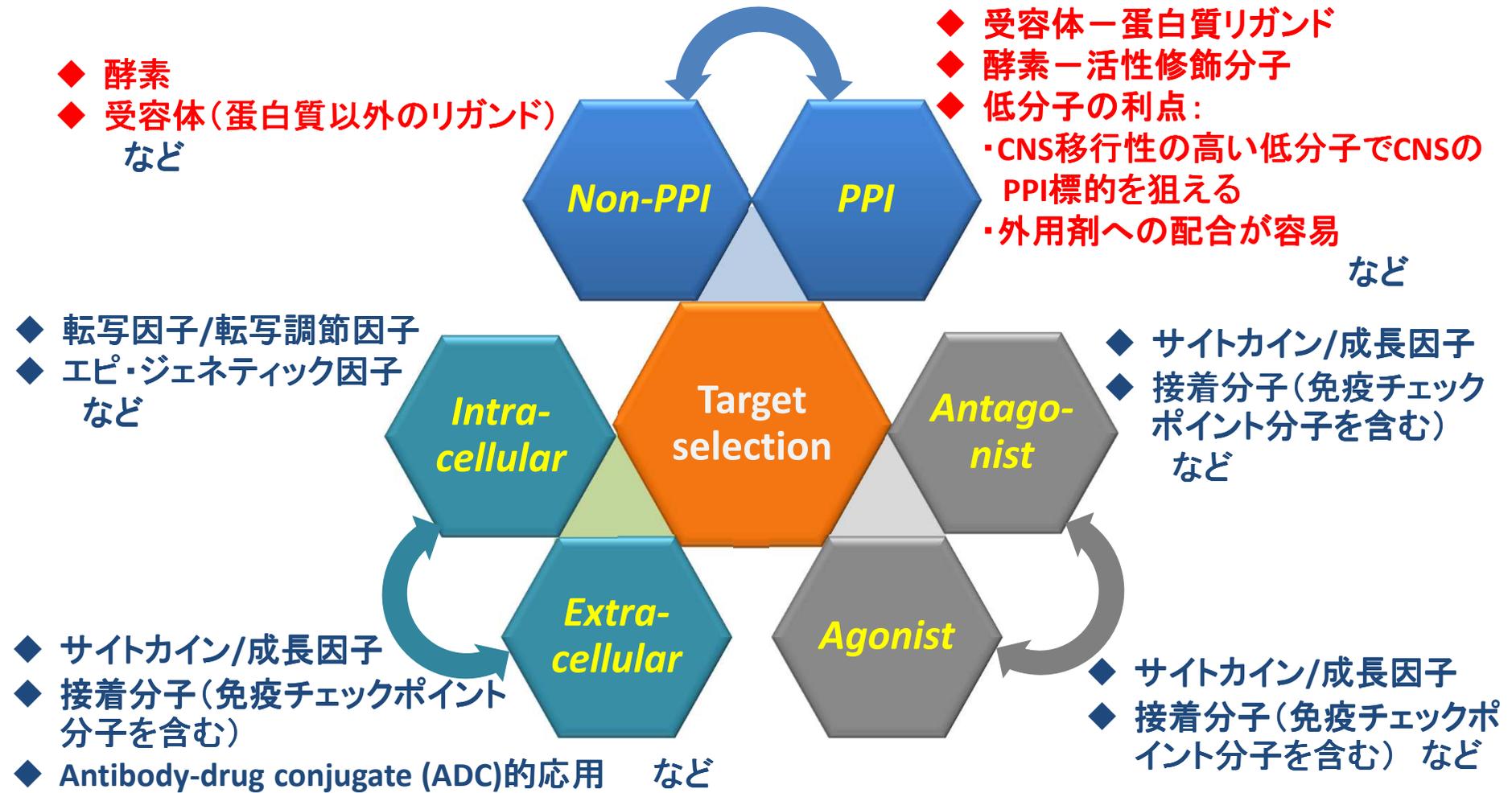
【備考】独立行政法人 科学技術振興機構(JST)の研究成果展開事業(A-STEP)採択課題「低分子IL-6阻害薬(IL-6/IL-6受容体間相互作用制御薬)の実用化研究」における研究成果

PPI制御薬を効率的に最適化するための戦略的評価システム(一例)



特に、注意深いfirst line評価による質の高いヒット化合物の同定及びバリデーションが重要。

様々な創薬標的に対する多面的アプローチ



創薬の研究開発における課題

- ◆ 標的分子へのアプローチ効率の低下
- ◆ 研究開発の生産性の低下

今後へ向けてのメッセージ

- ◆ 多くの標的分子への効率的なアプローチ
- ◆ 画期的新薬数の増大による生産性の向上