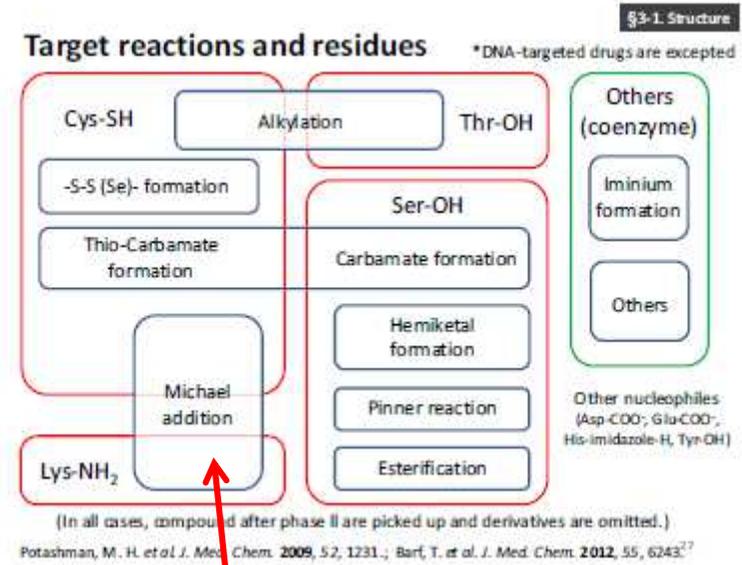
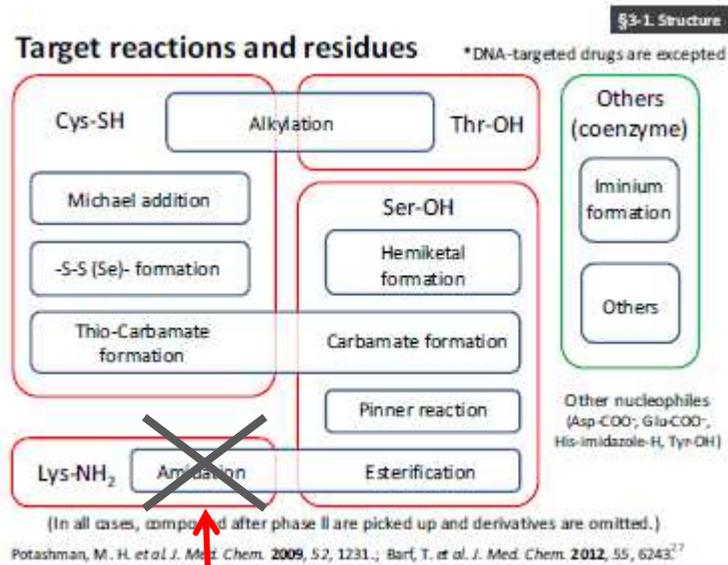
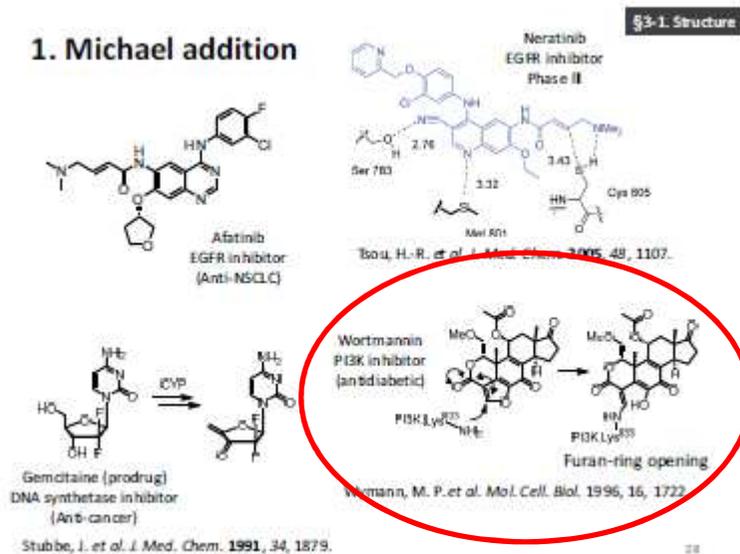


Revision



1. Michael addition



In previous version (and in my presentation) Wortmannin was Amidation type, but actually, Michael addition type. There are no amidation type.

Sorry to tell you mistakes.

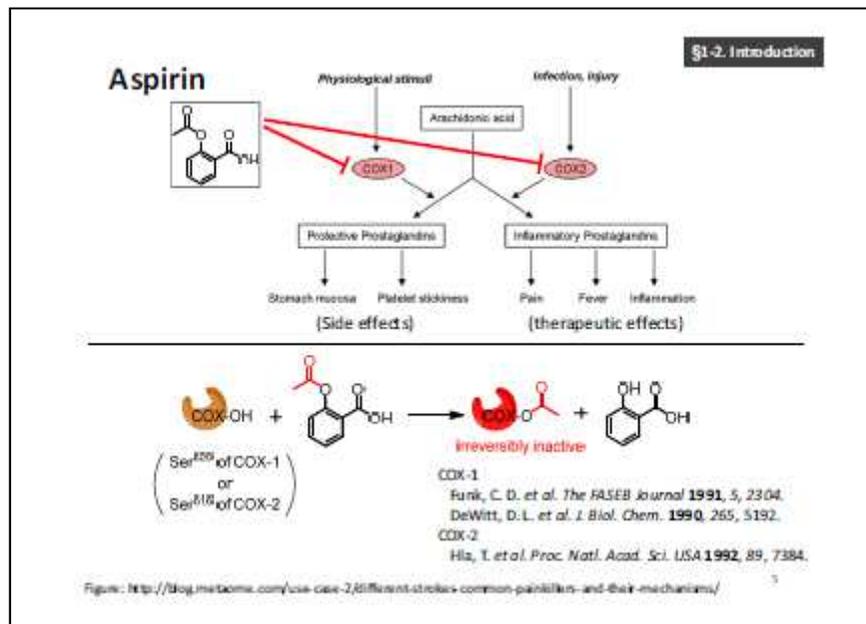
Q&A

Covalent drugs

Litelature seminar
2014.10.4
Takushi Araya

1

各項目に関する質問に関して、スライドとともに載せました。
一般的な質問は最後にまとめています。



Q. COXは細胞のどこに発現してる？

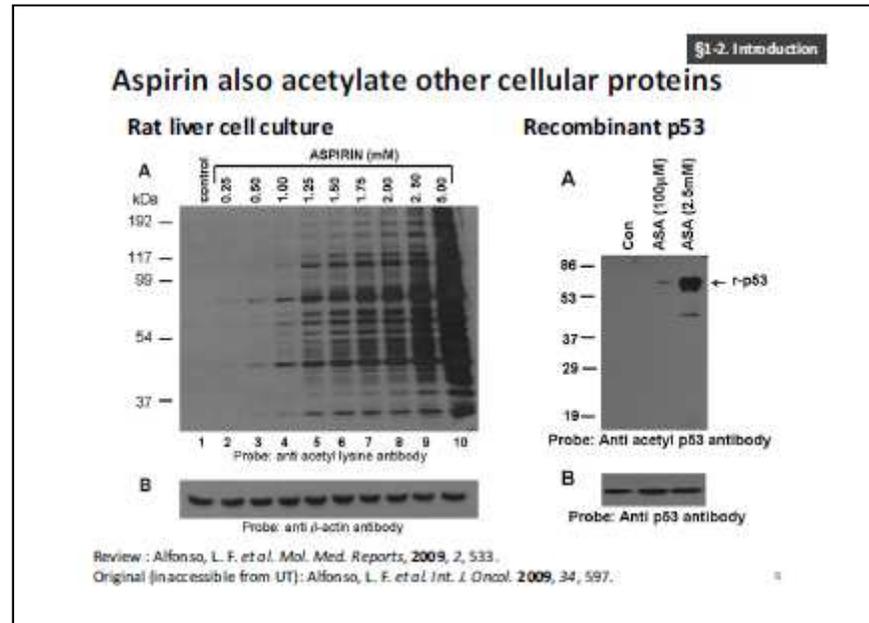
A. COX-1は小胞体の膜上に、COX-2は核膜上にある膜タンパク質です。

Q. どのようなタンパクが優先的にアセチル化される？

A. 求核性の高い部位がアセチル化されやすいと思います。酵素の活性ポケット内にあり周りの残基と相互作用してH⁺が別な残基の方に引っ張られていて活性化されてる残基等。タンパクの種類によって同じ側鎖でも反応性(pKaの値)が数オーダー違うことが知られています。込み入っている活性ポケットの深部に求核部位があると反応性は落ちると思います。抽象的な話になってしまいますが、それらのバランスです。

Q. アセチル化or他の薬剤が共有結合したタンパクの代謝はどうなるの？蓄積しない？

A. すみません、わかりません。



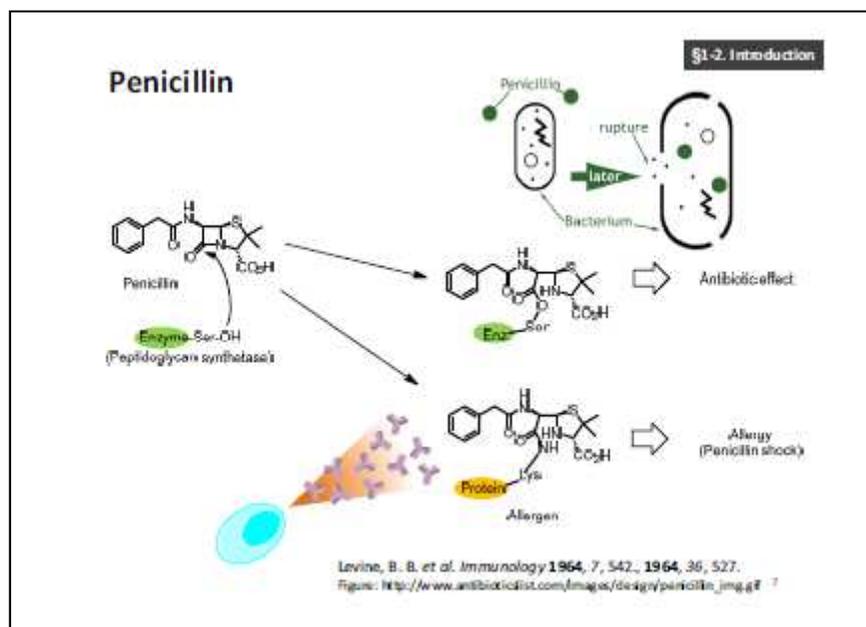
Q. アスピリンのような、選択性が出ないcovalentな薬を飲んでも案外悪影響がない、薬効が出るってことは、体内の多くの酵素はアセチル化されても機能に影響があまりないってこと？

A. そういうわけではないと思います。この条件はアスピリンをヒトに投与するよりはるかに高濃度で、培養細胞に対して処理しています(薄いアセチル化の程度がわからないので、わかりやすくするためだと思います)。処理による毒性の有無は元論文を開けなかったのだからわかりません(結果と図はReviewから取ってきたもの)。

説明不足でしたが、アスピリンはある程度COXに選択性があります。元々のサリチル酸はCOXの阻害薬で、それにアセチル基がついたアスピリンも元々のCOXへの結合能はある程度保持していると考えられ、生体に投与したときまずアセチル化がCOX-2に優先的に起こり、濃度を上げるに従ってCOX-1にもアセチル化が起こって副作用が出て、さらに高濃度になるとこの図のように他のタンパクのアセチル化も進行するのではないかと考えています。

Q. Covalent drugが抗原になる可能性を減らすにはどうしたらよい？

A. 非特異的なタンパク質との反応をなるべく少なくする、つまり共有結合部位の反応性を落として抗原として認識される可能性のあるタンパク質-阻害剤複合体がなるべくできないようにすると減るのではないのでしょうか。でも多少の反応性がないとcovalent drugとして使えないので、そのバランスになってくると思います。



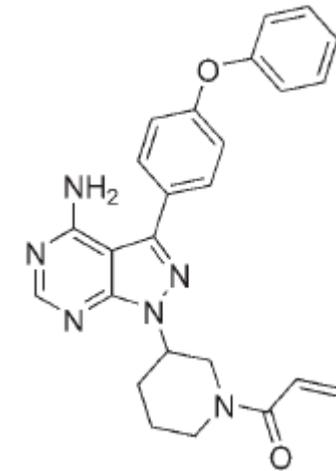
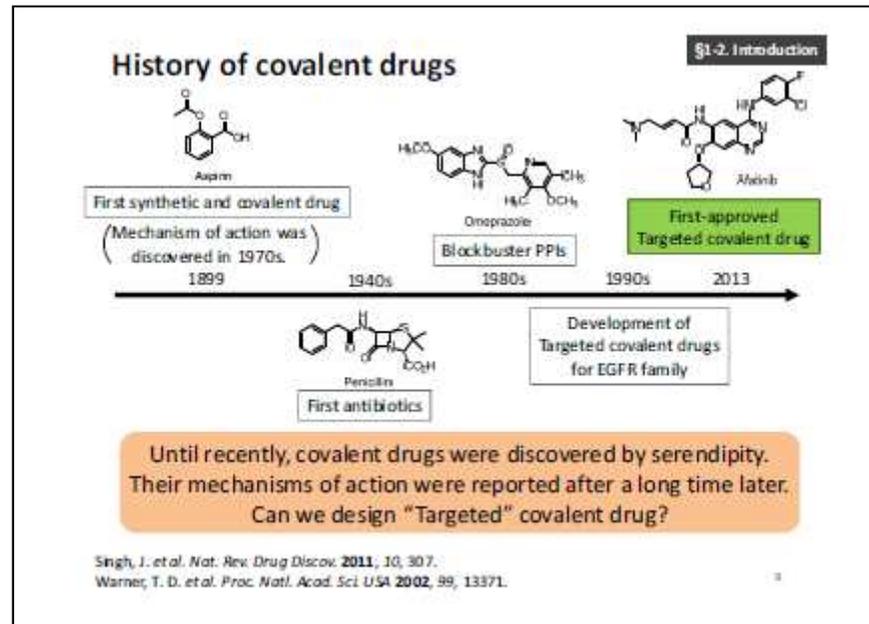
Q. 薬として狙って作った化合物が免疫原性を示す可能性は予想できる？

A. 難しいと思います。その化合物は初めて作るものなので、免疫原性になるかどうかはわからないのではないのでしょうか。どの構造が抗原になるかを判断するのは不可能で、試験してみて初めてどの程度危険かどうかわかるものだと思います。

Q. “故意の”covalent drugの開発が始まったのはいつ頃?

A. おそらくEGFRがtargeted-covalent drugの標的として最初の例で、調べた限りでは、その最初の報告はPD168393です(Fry, D. W. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12022. § 3-2の化合物2と同一)。

余談ですが、彼らは§ 2-1のPD153035(Science, 1994)を報告したのと同じグループです。この人たちはPfizerの研究者のようです。第一世代のEGFR阻害剤はPfizerから上市されておらず、最初からずっとcovalent drugに注力していたのではないかと推測しています。セミナー中もお話しましたが、先行していたPD168393はドロップしたのでその後研究を続けたNeratinibが現在承認待ちになっており、第二世代でも他社(Boehringer)に先を越されAfatinibが先に承認されたようです。この分野ではかなり熾烈な研究開発競争が起こっているようです。



Ibrutinib

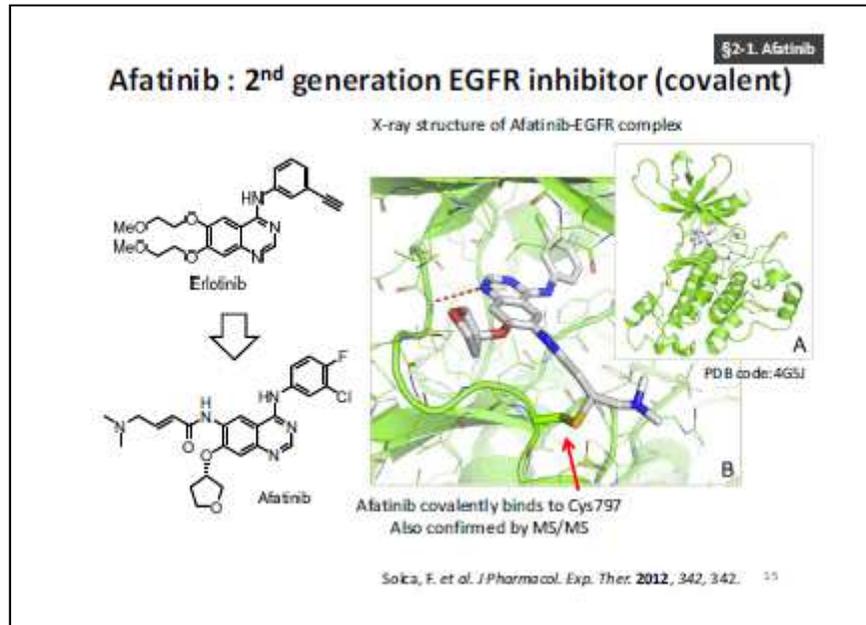
Q. EGFR以外ではどのくらい展開されている?

A. 2013年、Afatinibよりちょっと遅れて承認されたIbrutinib (Btk (Bruton's tyrosine kinase)の阻害による白血病治療薬。Cys481に共有結合する)があります。これはChemMedChem **2007**, 2, 58.に最初の報告があります。標的が異なるように見えて、相同性解析によると、狙ってる残基はEGFRのCys797と同じ部分で、阻害剤の結合する部位も同様にATP結合ポケットです。なので、EGFR変異型のNSCLCにもAfatinibと同程度効いたとの報告例もあります(J. Natl. Cancer Inst. **2014**, 106(9), dju204.)。いろいろな病気に効いて良いと見るか、ファミリー内の似たタンパク質にも結合してしまうのでリスクがあるんじゃないかとするか、どうでしょうかね？私は、やはり高確率で保存されている残基を狙うのはリスク高そうに見えますが。これら以外に関するtargeted-covalent drugは見かけませんでした。

Q. Erlotinib→Afatinibについて、共有結合部位以外も各置換基をいろいろ変えてるのはどういう意味がある？

A. 一般的な話になってしまいますが、芳香環の電子効果を調節したり、水素結合や疎水結合をより取りやすくするために置換基をいろいろいじっています。

これらの細かい点に関しては特に述べられていません。紹介した以外にもEGFR阻害剤の構造変換に関する論文は多々報告されており、それらの結果やモデリングによる周辺との置換基の相互作用を解析することを繰り返しているうちにこの構造になったと思います。

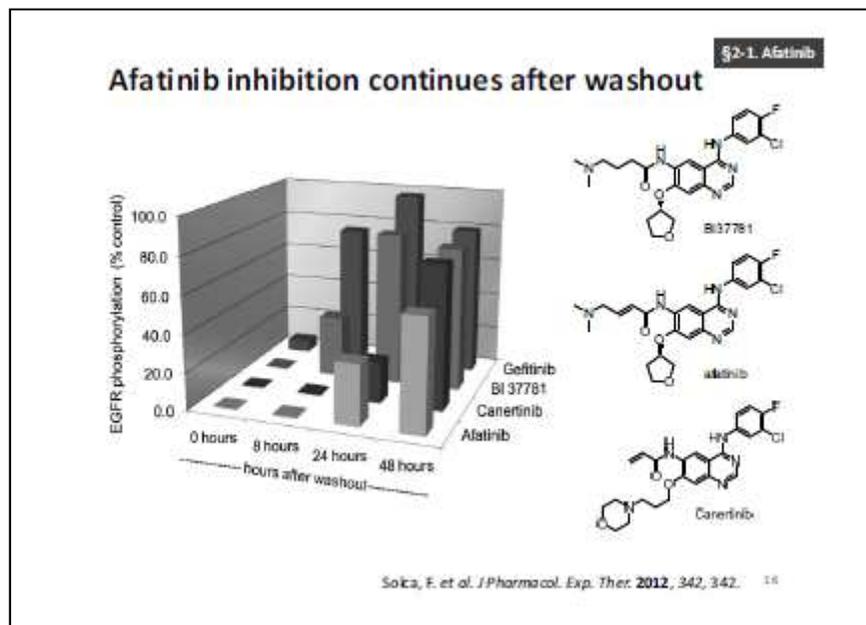


Q. 共有結合部位を入れる前に、非共有結合部位でaffinityを上げていますが、その非共有結合性の相互作用を化合物を作る前から計算化学によってデザインすることは難しそうに思います。それを計算化学で予想することは、どの程度の精度で可能なのでしょうか？

A. わかりません。計算によって、阻害剤部位を何も無い状態からデザインした話を聞いたことがないので、まだそのレベルの計算はマシンの能力的にできないのではないのでしょうか (もしかしたらやっている人もいないかもしれませんが)。

Q. 臨床でWash-outの実験はしている?

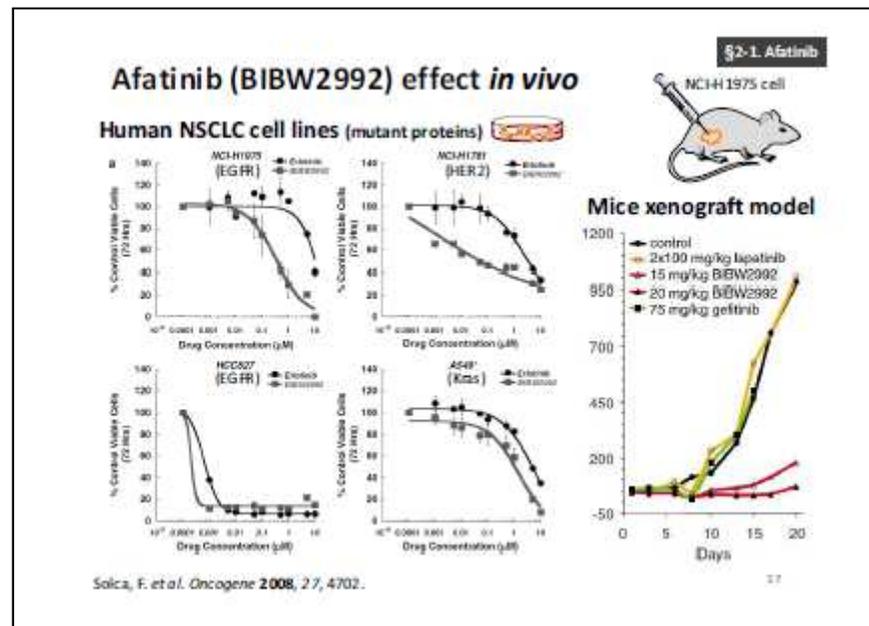
A. 見たことはありません。技術的にかなり難しいと思います。



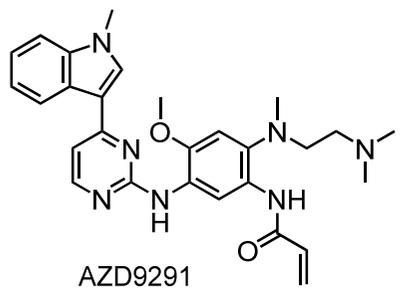
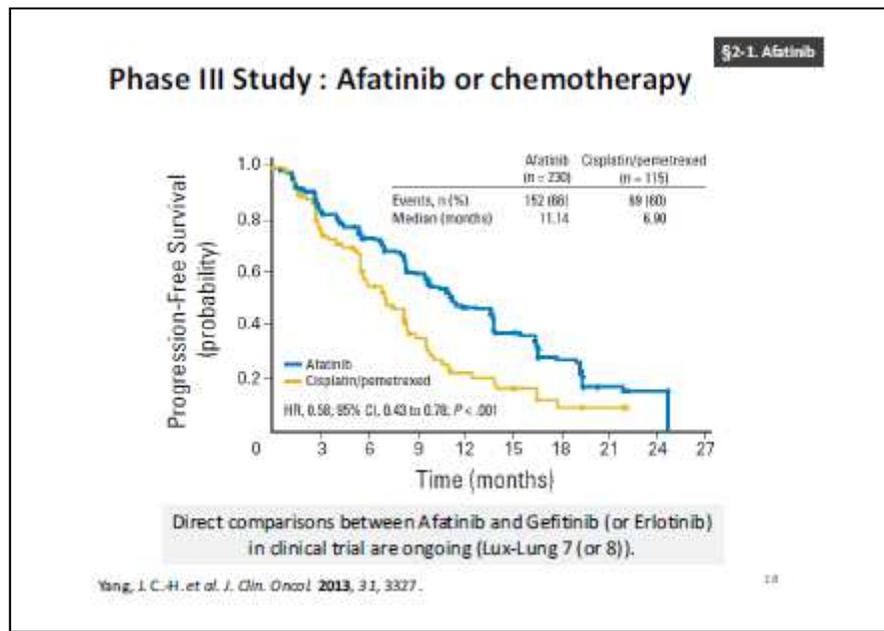
Q. AfatinibとCanertinibの活性が24時間後と48時間後で逆転しているのはなぜ?

A. 申し訳ありませんがわかりません。これを議論するためには1) 各covalent drugの付加の逆反応の速度、2) 細胞内で代謝される速度、3) 遊離したdrugが他のタンパクと反応するか再度標的と結合し直すかの選択性、他にもあるかもしれませんが、いろいろなファクターが絡んできます。これらに関するデータが見つからない(そもそも測る方法が不明)ので今回はなぜなのか結論づけられません。

- Q. この試験では、マウスのえさに薬剤を混ぜてるの？
 A. そうです。体重ごとに与える化合物量調節して、経口投与しています。



- Q. 右のグラフの縦軸は何？
 A. すみません、抜け落ちていました。Median Tumor Volume [mm³](腫瘍サイズ) です。



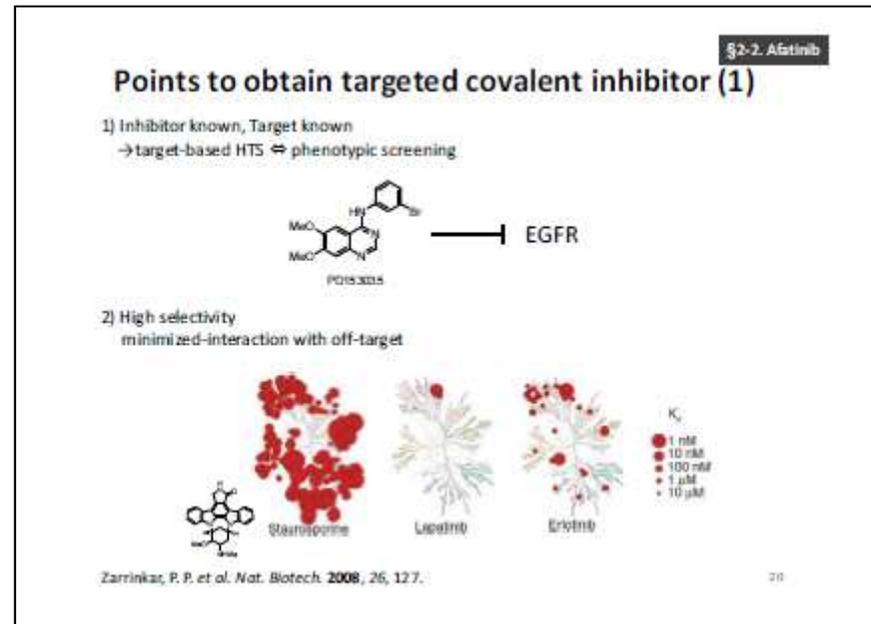
Q. 第一世代 (non-covalent) と比較して、薬効面で第二世代 (covalent) が優れている点は報告されていますか？

A. まだ報告がありません。スライドにも書きましたが、現在行われている治験 (Lux-lung7, 8) でそれを比較しており、過去に臨床で直接比較したデータはありません。

ちなみに、現在第三世代のcovalent drugとして、NSCLCの薬剤耐性株によくみられるEGFR変異型 (T790M) に結合するが野生型には作用しないAZD9291のPhase2が進行中です。野生型との選択性が高いので、毒性が低とされています。

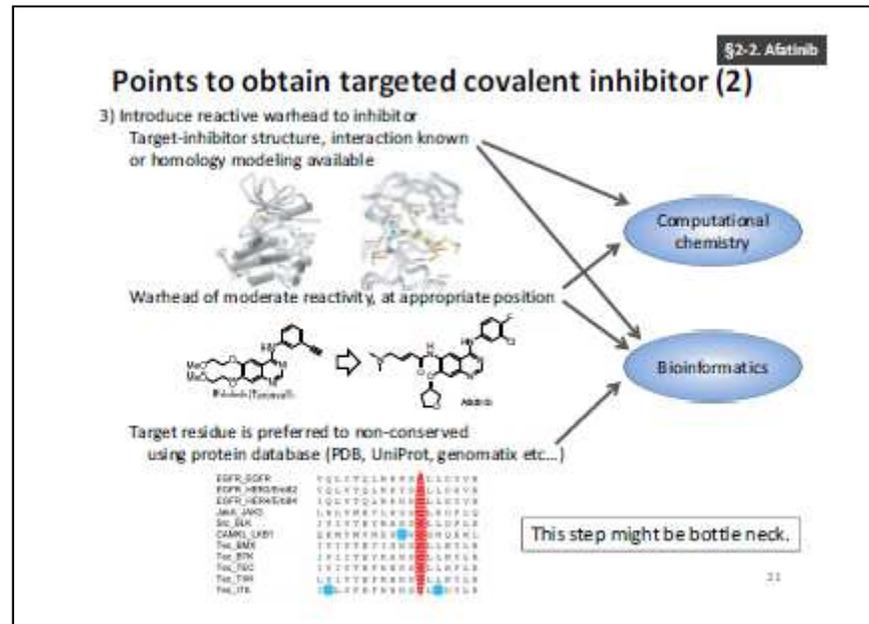
Q. Hitを見つけた段階で、高いポテンシャルを持っている必要があるが、そこからさらにCovalent drugにするかどうかの判断は、どういう点がポイントになる？

A. 強く持続した薬理効果 (完全な阻害) が第一に求められ、毒性は次点でも多少は許容されるターゲットかどうかという観点で見ているかと思いますが、研究者たちが実際何を考えてcovalent drugにしているかはわかりません。実際、ガンの治療として、標的 (増殖シグナル) がちょっとでも残っているとその増殖を防ぐことができないので、不完全な阻害が望ましくない例が知られています。



Q. ターゲットタンパクと阻害剤の結晶がとれてないと開発が難しい点は何とか改善できないのか？

A. 最低限、モデリングでタンパクのどこにどのように阻害剤が相互作用しているかの特定を行わないと、covalent drugは作れないと思います。ベースとなるタンパク質 (ホモログでも可) の結晶構造がわかっていない場合、現在のモデリングではタンパク質と阻害剤の高精度な相互作用を知ることは相当困難です。NMR等で、どの部位に結合しているか程度の情報はつかめますが、どのように結合しているか等covalent drugの設計に必要な詳細な情報は得られないと思います。



Q. 保存されていない残基をターゲットにすることで、選択性は本当に獲得できる？

A. 少なくともそのファミリー内においては、高い選択性を発現できると思います。もちろんファミリー外との交差性は予想不可能ですが、それは保存されている残基を狙う場合も同様です。保存されている残基を狙う場合よりは、選択性が高まると思います。

Q. 選択性を出すためにはアロステリック阻害もあるが、それでは活性が残っている可能性があり、完全に阻害するcovalent drugの利点を完全には生かせないのではないか。やはり非保存性の残基を狙うアプローチの方が良い？

A. 標的を完全に阻害したい場合は基質競合型の方が良いと思います。活性が弱くていい場合はアロステリックの方が選択性が高く、それによって毒性が減って良いのではないのでしょうか。

Q. 化合物自体に毒性がある場合、共有結合してしまうと体内から取り除かれにくくなって毒性が持続する?

A. 化合物が毒性を持っている場合、創薬の過程においてそれは最小限になるように誘導化されるはずなので、その心配は考えなくて良いと思います。ただし、非特異的にいろいろなタンパクの表面に化合物が共有結合した場合、ウイルスが感染した状態のように、いろんなところに異物が出てくるような状態になるので、アレルギー反応に対するリスクは持続し、起こりやすくなるかもしれません。

Q. Afatinib群が24 h以降に活性が回復しつつあるのは、EGFRが新生したからではなく結合がreversibleだからという可能性はないか?

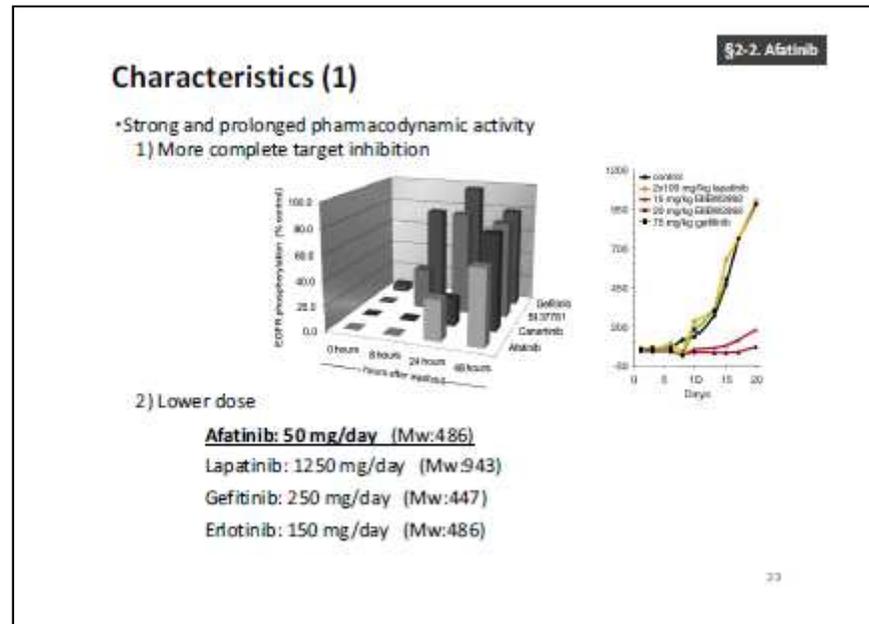
A. 彼らはAfatinibのcovalent complexの解離速度を実験で測って、言及もないのでわかりません。J. Biol. Chem. 1982, 257, 11489に、このwash-outの実験で使ったA431細胞株のEGFRのターンオーバー時間が記載されており、16時間だそうです。なので、16時間以降でも活性が半分以下なAfatinibはirreversibleな可能性が高いと考えられます。しかし、16時間後以降はEGFRの半分以上は新しい活性型に変わっててはるはずですが、活性が低いままなのはEGFRのリン酸化が遅いか、もしくはAfatinib-EGFRはその分解と新生を阻害している?不明です。

Q. 48 h後でリン酸化のレベルが下がっているものもあるのはなぜ?

A. わかりません。

Q. 24 h後と48 h後でAfatinibとCanertinibのリン酸化のレベルが逆転しているのはなぜ?

A. わかりません。



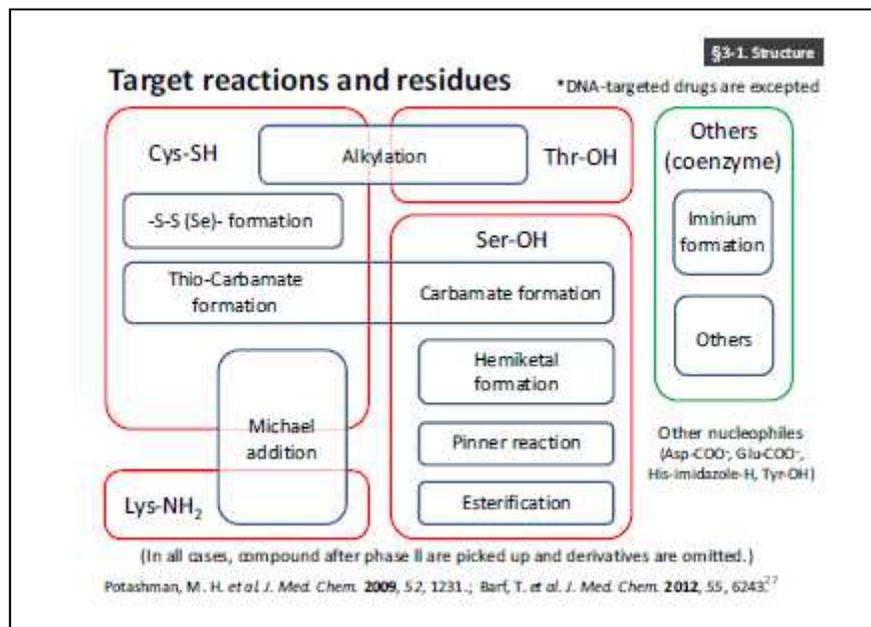
Q. 投与量のコントロールが難しいのは、製剤技術などで克服できないか?

A. 正確な投与量は確かにそれでかなり解決できると思います。セミナー中は調剤・投与量のミスによるものしか言いませんでした。それ以上に難しいこととして、covalent drugの場合は最初の投与量と2回目以降の投与量を変える必要があると思います(私の推測ですが)。2回目以降に阻害すべき標的の量は1回目より減っているはずなので、同じ量投与し続けてもそのうち薬が飽和して望みでないタンパクとの非特異的な共有結合をつくりだすはず。Afatinibの添付文書には、経過を見て毒性が出たら投与量減らしましょう、と書いてあるのでそういうところを意図して書いているのかな、と思います。

Q. Covalent drugの利点として、分子量をほとんど変えず活性が高まるということ?

A. そうです。その辺も、既存の阻害剤より長く強い活性が続く、という部分で説明しても良かったかもしれません。

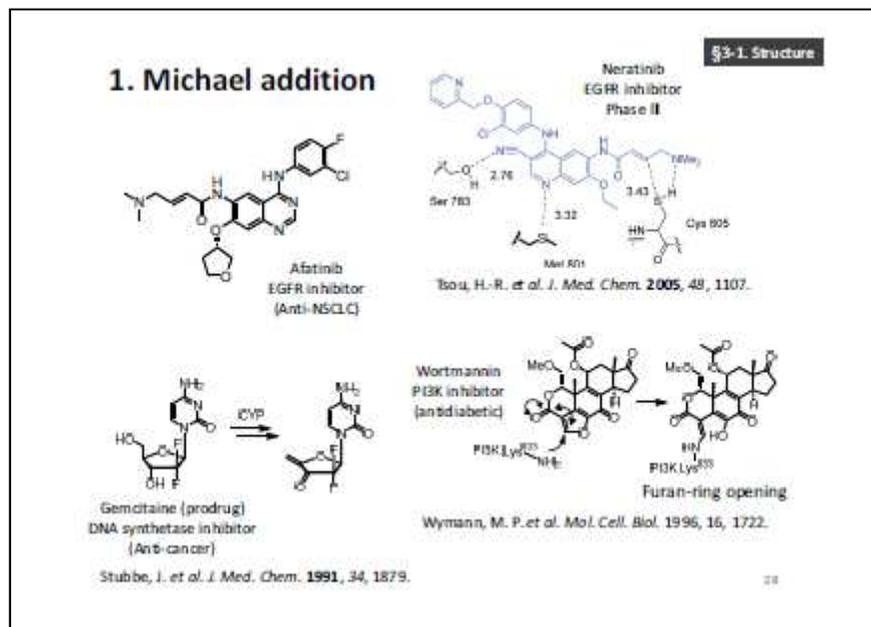
Q. 最近までは偶然covalent drugが見つかってきたという話でしたが、それらは最初は何をターゲットにしていたものだったのか？
 A. 1) 作用機序がわからないけど使っていて、covalentだとわかったもの、2) 同じターゲットをねらって非共有結合性の化合物を交換しているうちにいつの間にかcovalentになっていたもの、3) スクリーニングで偶然covalentな阻害剤がヒットしてきたもの、これらのタイプがあります。



Q. ここに書いた残基以外が反応した例で臨床以降に残っている化合物がないのはなぜ？
 A. そもそも反応性が低すぎて使えないからという理由が大きいのではないかと思います。Covalent bondをつくるためにはタンパク質側の反応性と阻害剤の反応性の両方の合計がある程度異常必要だと思います。反応性の低いタンパク質相手に結合を作るためには阻害剤側の反応性が高い必要がありますが、そうすると毒性も高くなってしまい、結果的に臨床で落ちていったのではないかと思います。

Q. Neratinibの左上部分の置換基はなぜ伸ばした?

A. おそらく親和性上げる目的です。Neratinibやcovalent部位以外のdrug designに関しては今回詳しく調べなかったので正確なことはわかりません。

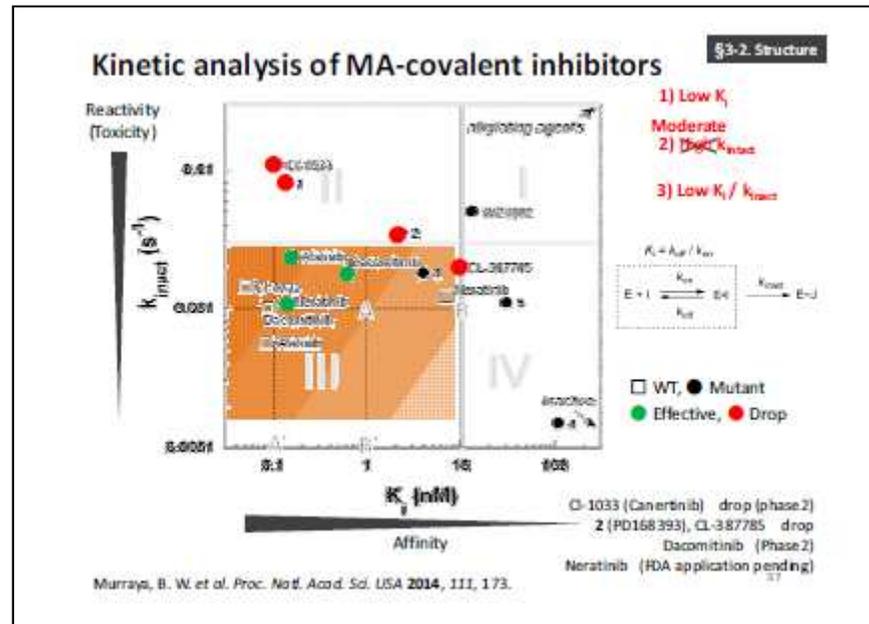


Q. ボロン酸エステル型 (Bortezomib) は紹介しない?

A. 今回は、ボロン酸エステルは配位結合と見なして紹介しておりません。

Q. Affinityと k_{inact} が完全に別のパラメータと見なせるのか?互いに影響してない?

A. 普通の測定ではそうになってしまうようですが、今回この著者らは測定法を工夫して別々なパラメータとして出した、としています。詳しくは論文をご覧ください。

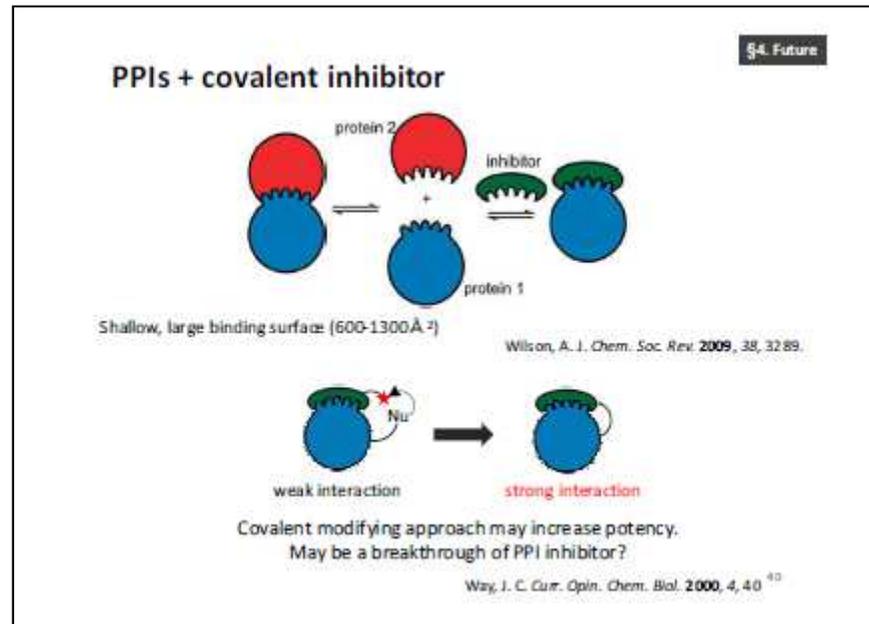


Q. Affinity強い方が良く、反応性がある程度高くないとダメだが、高すぎると毒性が出るからちょうどいいものを選びましょうという結論は当たり前のように感じたのですが、この分析は意味があるの?

A. 当たり前だと思います。でも、細胞での活性と反応性・親和性に関して実験的に相関を示した例はこれがおそらく初めて?でこの分野に関する研究はまだ全然行われていません。直感的に当たり前のことでも、実験的に示すと説得力が増します (データ数が足りない問題はありますが)。

また、その標的を狙う場合に求められる反応性と親和性の範囲を知ることは次の阻害剤の開発に繋がるので、この分析は将来の研究の役に立つと思います。この分析をしないと、具体的にどの程度の活性の阻害剤を作れば臨床で使えるかの判断ができません。

Q. PPIをcovalentに阻害するコンセプトはだいぶ前からあるようだが、これが実現できた例はある？
A. 調べた限りでは見つけれませんでした。まだコンセプトだけの状態です。



Q. PPIを標的とした創薬研究は現在どのレベルまで発展しているのだろうか？

A. すみませんが、この枠内に書ききれません。詳しくは、清水の文献資料や専門書・reviewをご覧ください。代表的なreviewを3つ以下に載せておきます。

Current Computer-Aided Drug Design **2007**, *3*, 51

Trends Pharmacol. Sci. **2013**, *34*, 393

Nat. Rev. Drug Discov. **2004**, *3*, 301

一般的な質問

Q. 今後、このようなcovalent drugが盛んになるとして、どのような能力のある人が求められる?

A. 化合物の誘導・合成経路の設計、タンパク質と化合物の分子モデリングによる解析、タンパク質配列のデータベースからの検索・分析ができる人がcovalent drugの研究を進めることができるのではないのでしょうか。そこから先の薬理的な分析は一般的な薬と一緒にです。このラボにいるような、合成化学者にちょっと生物やモデリングの知識を足すことでcovalent drugの開発ができる人になると思いますよ。

Q. ドラッグデザインを行っていく上で、開発した阻害剤が目的のタンパクとだけ作用していることを証明するのは難しそう。

A. その通りだと思います。Afatinibの例でも、開発途中にあった化合物は他のチロシンキナーゼと比較してEGFRへの選択性を確認していたのですが、19pに書いたように、後になってそこで評価していなかったキナーゼとの交差性が確認されました。全てのタンパク質との選択性の評価をするのは不可能です。なので、開発時にはいくつかの代表的なタンパク質(特に阻害したら致命的な影響に繋がるもの)との評価を行うものが一般的で、全部を見ていません。なので、臨床試験に入ったり市販後になってから毒性が問題になるケースが出てきます。それでもやれるだけのことはやった製薬会社が攻められるのでかわいそうだと思うんですが、世間は厳しいです。

Q. Covalent drugは毒性が強い、という印象があるのですが、わざわざそれに製薬企業が取り組むようになった背景は何だと思いますか?

A. 推測ですが、1) 既存の手法での標的との結合力や薬効の持続性等の限界を克服したかった、2) イントロでも話しましたが、実は毒性が強いと思われてるだけで(科学的根拠に基づいているわけではないので)、歴史上大量に使われているし、実際調べてみたらは安全なんじゃないかって考える人がいた、等の理由からではないでしょうか。

Q. Covalent drugが狙いにくいタンパク質のカテゴリーはある?細胞内でのターンオーバーが早いものは不向きそう。

A. その通りだと思います。標的と共有結合してもすぐに分解されてしまったら、薬剤の代謝が加速されるのと同じことと捉えられるので、通常の薬よりも薬効が弱くなってしまう可能性もあります。そういうタンパク質には非共有結合型の薬剤の方が望ましいと思います。その他、完全に阻害してはいけないターゲットに対する阻害剤としてはcovalent drugは向きません。ちょっとでも活性を維持しておきたい、一過性の阻害に止めて(例えば)翌日には活性を回復させたいような場合です。

Q. Affinityは強い方がよい?不可逆である必要があるのか。

A. 実際、上の質問にも書いたように、タンパク質のタイプによっては可逆の方がよい場合もあると思います。ターゲットに大きく依存します。ガンの場合強きに阻害するのが好まれているようです。

Q. 自殺基質(酵素の活性部位で活性化され、そこでcovalent bondを作るもの)みたいなのは、covalent inhibitorにはならないか?

A. なると思います。§ 3-1のSelegiline、Finasterideなんかはそれです。前者はMAOの活性部位でフラビンに酸化され、活性化したものがフラビンと反応しており、後者はNADPHに還元されてエノラートになったものがNADP⁺にアタックしています。どちらも補酵素に反応しているのですが、自殺基質のようなものではないのでしょうか?タンパク質と反応する自殺基質はありませんが、あったら1つのprodrugの形として有用だと思います。

Q. 生体分子とcovalent drugの結合は主に-OHや-SHを介して行われるとありましたが、それらの置換基は生体内に多数存在するわけで、本当にターゲットとのみ反応するような設計は可能なのか? prodrugの仕掛けが必要になるのでは?

A. 理想的にはそうだと思います。Prodrugにして、生体の届けたい場所でのみ活性化されて反応する自由に薬剤を設計できたら、副作用(非特異的な共有結合形成)を最小限に抑えられると思います。でも、生体内で活性化されて反応性を持つようになる置換基を狙って設計することは現在不可能です。既知のToxicophoreを利用して新しく考えるか、既存のものを利用するかしか方法がないわけです。それができないからmildな反応性を持った官能基を持つ化合物を使い、届くまでに他のタンパク質とちょっと反応するものもあるけど、メインは狙ったタンパクと反応している、ような分子を設計しているのではないのでしょうか。

Q. Covalent drugは薬効での既存薬との差別化を図るのは難しい?

A. そう思います。

補足ですが、Afinibが承認された背景として、第一世代の薬剤が効かない薬剤耐性型の変異の入ったNSCLCが第一世代の投与によって出現しており、その治療薬として承認されたということもあります。薬効の差別化をうたっていますが、covalentな性質によるものではなくそれ以外の構造を変えた結果だと思います。やはりcovalentだから既存薬とは薬効が異なる、ということは難しいのではないのでしょうか。

Q. Covalent drugで反応する場所を2つ以上もつものはある?

A. 調べた限りでは見つけれませんでした。

Q. どんな官能基のデザイン、どんな反応が開発できたら、このcovalent drugの発展に貢献できる? 反応屋の余地はあるか?

A. 抽象的になってしまいますが、ちょうど良い反応性の官能基をデザインする、生体内でもある程度遅い反応をデザインすることができたら役に立つと思います。どうしても有機合成をする人は反応性が高い官能基や反応設計の方に目がいてしまうので、そこで“遅い反応を開発する”ということに目を移せば他と差別化できるのではないのでしょうか。Michael acceptorは不可逆だと言われていますが、最近ケトンの α 位にシアンを入れることでreversibleになるとの報告があったり、まだそのチューンナップに関しては余地が残されているようです (Nat. Chem. Biol. 2012, 8, 471)。Covalentだけどreversibleの方が良い場合もあったりするので、そういう官能基を目指す人もいるみたいです。最近covalent drugの進展がすさまじいので、もうすでにそういった研究してる人も多いかもしれません。

また、反応部位の持つ求核性/求電子性の値はデータベースもあるようで、それを指標にちょうど良い反応性を持つ官能基の設計ができないものとも言われています(データ数は少ないですが)。Knimeという計算ソフトを使って、そのデータを元に任意の構造の値を求めることができるらしいので、それを基にいろいろとcovalent drugの構造をいじって最適な構造を求めることができるかもしれません。

<http://www.cup.lmu.de/oc/mayr/reaktionsdatenbank/>

http://www.knime.org/files/ugm2013_talks/knime_ugm_2013_evotec_final.pdf

余談ですが、細胞破碎液中に反応性のある構造を持った化合物を入れ、それがどんなタンパク質やその中の残基と反応したかを調べるActivity-Based Protein Profilingという分野があります (Annu. Rev. Biochem. 2008, 77, 383.)。彼らは、プロテオーム解析の手法として、タンパク質を“反応する化合物の構造で分ける”という、私から見たらあまりなじみのないことをやっています。現在彼らはいろいろなタンパクが釣れてくる反応性の高い官能基を使っているようですが、そのうちcovalent drugに適したちょうど良い反応性を探るような研究に流れてくるかもしれません。

