

標的タンパク質特異的ラベル化のための反応基の探索とコバレントドラッグ開発への応用

湊田, 大和

<https://hdl.handle.net/2324/1931853>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

【序】

コバレントドラッグは、標的タンパク質と共有結合を形成し、不可逆的にその機能を阻害する薬剤である。通常の可逆阻害剤と比較して強い薬理活性、薬効の持続、薬剤耐性の克服など様々な利点を有している。しかしながら、その反応性が高いと、標的以外のタンパク質（オフターゲット）と非特異的に反応して副作用を引き起こす可能性がある。そこで、本研究ではコバレントドラッグのための標的タンパク質選択性の高い反応基の探索を行うこととした。さらに新規反応性基を有するコバレントドラッグを開発し、その有用性を評価した。

【研究内容】

新規反応基の探索

まず、オフターゲットとの非特異反応を抑制できる反応性の低い求電子剤を探索した。反応性評価にはグルタチオン（GSH）との反応を追跡することが一般的だが、低反応性基は生理的条件下において GSH との反応がほとんど進行しないため、従来法ではそれらの反応性評価は困難である。今回、我々は、「ペプチドタグ・亜鉛錯体プローブペア」を利用した評価系を独自に構築した。本評価系では、タグ上の連続アスパラギン酸配列と亜鉛錯体との強い相互作用によりタグ上の Cys 残基とプローブの反応基とが近接し、共有結合形成が促進される（Fig. 1）。これを利用したスクリーニングにより様々な反応基の反応性を網羅的に解析した。

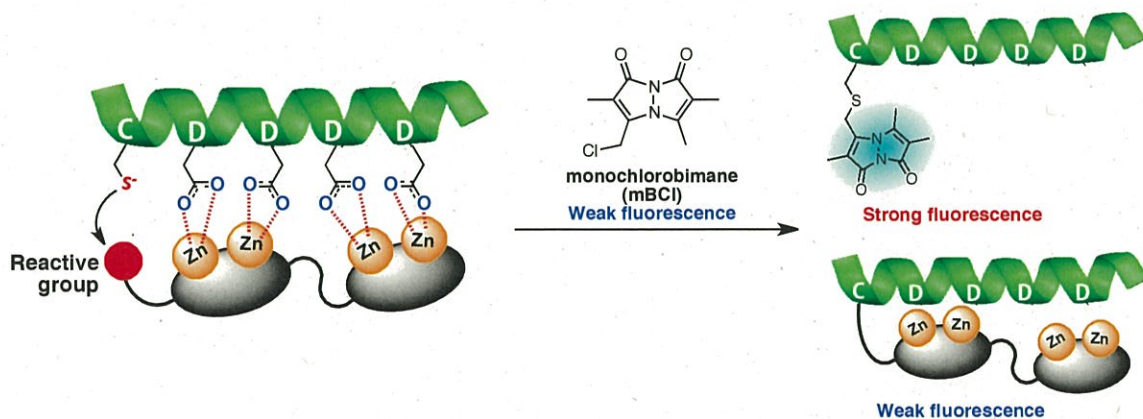


Figure 1. Fluorescence assay system for evaluation of reactivity using peptide-tag/ Zn^{II}-complex pair.

今回のスクリーニングにより α-クロロフルオロアセトアミド（CFA）が、コバレントドラッグに汎用されているマイケルアクセプター（MA）と比較して Cys 残基と穏やかに反応することを見出した（Fig. 2）。CFA は、生理的条件下においてほとんど GSH と反応せず、従来法では正確な反応性の評価が困難であった。したがって、本研究で構築した「タグ・プローブペア」を利用したアッセイ系は幅

広い反応性の解析が可能のため、コバレントドラッグに適した反応基の探索に有用な手法であると考えられる。

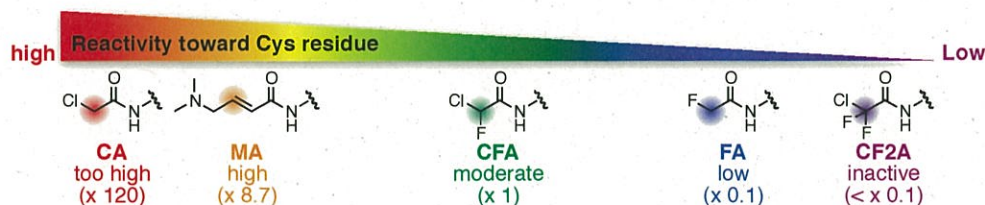


Figure 2. Relative reactivity toward a Cys residue.

第二世代 EGFR-TKI (tyrosine kinase inhibitor) の開発

CFA の有用性を評価するため、CFA を有するコバレントドラッグ開発を行った。まず、キナゾリン骨格の不可逆的 EGFR 阻害剤 (第二世代 EGFR-TKI) への CFA の応用を検討した。キナゾリン骨格と CFA の間のリンカーの異なる様々な化合物を合成し、EGFR-TKI に高い感受性を示す PC-9 細胞と不可逆的 EGFR-TKI にのみ感受性を示す H1975 細胞に対する増殖阻害活性を評価した。その結果、既存の第二世代 EGFR-TKI の afatinib と同程度の優れた阻害活性を有する **NS-058** の開発に成功した (Table. 1)。

Table 1. Summary of anti-proliferative activity (IC_{50} μ M) against EGFR-dependent cell lines.

cell line	2nd generation EGFR-TKI		none	NS-012	NS-016	NS-022	NS-023	NS-066	NS-058
	afatinib	erlotinib							
PC-9	< 0.01	0.020	0.013	0.024	0.029	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
H1975	0.19	4.7	1.0	> 10	8.8	3.7	> 10	> 10	0.30

H1975 細胞に対して強い阻害活性を示したヒット化合物 (**NS-058**) のアルキンタグを有する誘導体を合成し、gel-based ABPP (activity-based protein profiling) により生細胞内でのラベル化選択性を評価した (Fig. 3a, b)。EGFR を過剰発現する A431 細胞を各プローブで処理してタンパク質を回収し、銅触媒のアジド-アルキン環化付加反応 (Cu-catalyzed azide alkyne cycloaddition; CuAAC) によりプローブの付加したタンパク質を蛍光標識した。その後、SDS-PAGE を行って選択性やラベル化効率を比較した。マイケルアクセプターを有する afatinib 誘導体は、インキュベーション時間・濃度に依存して様々なタンパク質と非特異的に反応した一方で、CFA を有する **NS-058** 誘導体は長時間あるいは高濃度インキュベーション条件においても選択的かつ効率的に EGFR をラベル化した (Fig. 3c, d)。

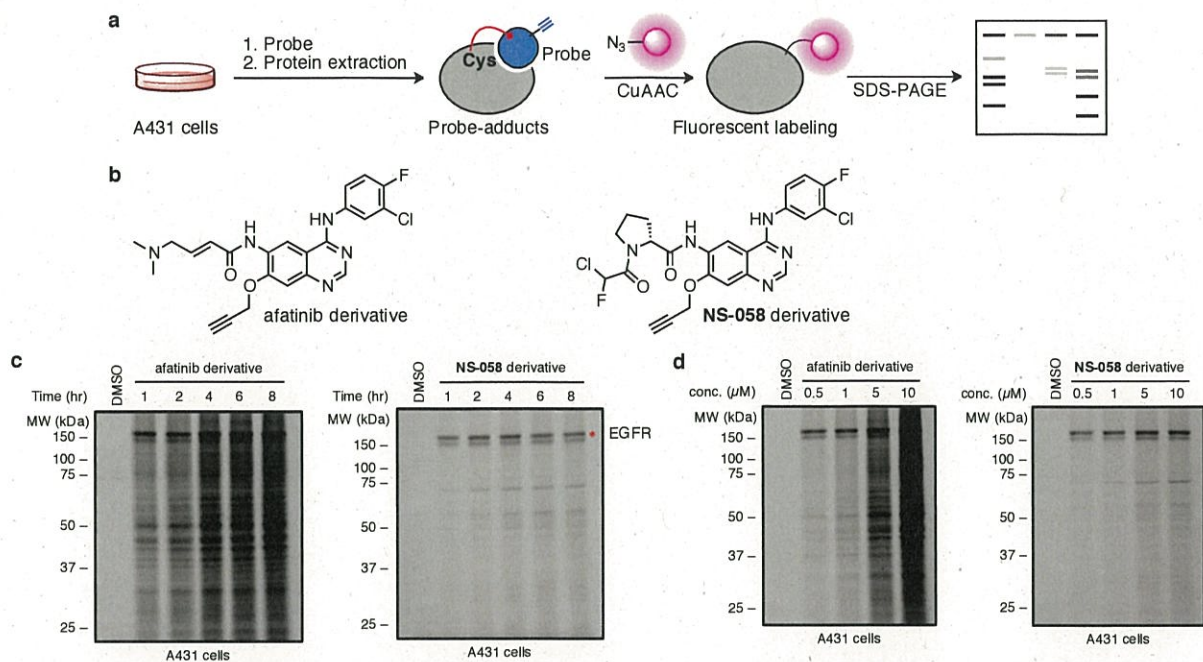


Figure 3. (a) Schematic illustration of gel-based ABPP. (b) Structures of afatinib and NS-058 derivatives. (c) Time-dependent reaction profiles in A431 cells ([Probe] = 3 μ M, 0–8 hr, 37 °C). (d) Concentration-dependent reaction profiles in A431 cells ([Probe] = 0–10 μ M, 3 hr, 37 °C).

次に、CFA が生体内で機能することを示すため、*in vivo* 抗腫瘍活性を評価することとした。まず、NS-058 の水溶性の向上を目的として構造最適化を行い、承認薬の afatinib と同等の阻害活性を有する NS-062 を得た (Fig. 4a)。NS-062 は、HEK293 細胞や SW620 細胞といった EGFR 非発現株に対する増殖阻害活性が afatinib より低下しており、マイケルアクセプターを標的選択性の高い CFA に置換したことで非特異的な細胞毒性が軽減していることが示唆された。また、ウェスタンブロッティングや X 線結晶構造解析から NS-062 は、EGFR と共有結合を形成してその機能を不可逆的に阻害することが示された (Fig. 4b, c)。

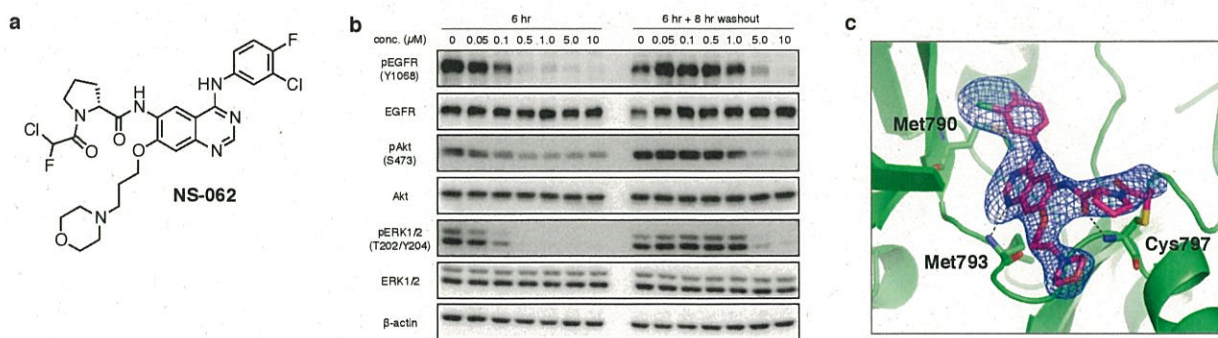


Figure 4. (a) The structure of NS-062. (b) Western blot analysis of EGFR signaling pathway in H1975 cells treated with NS-062. (c) Cocystal structure of EGFR^{L858R/T790M} kinase domain bound to NS-062.

最後に、H1975 細胞を皮下移植したヌードマウスを用いて NS-062 の *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した。NS-062 を連日経口投与したところ、NS-062 は control と比較して有意に腫瘍の成長を抑制し、afatinib と同程度の優れた抗腫瘍活性を示した (Fig. 5a)。さらに、afatinib 投与群ではマウスの体重減少が確認されたが、NS-062 投与群では体重減少は観察されず、afatinib と比較して副作用が軽減しているこ

とが示唆された (Fig. 5b)。

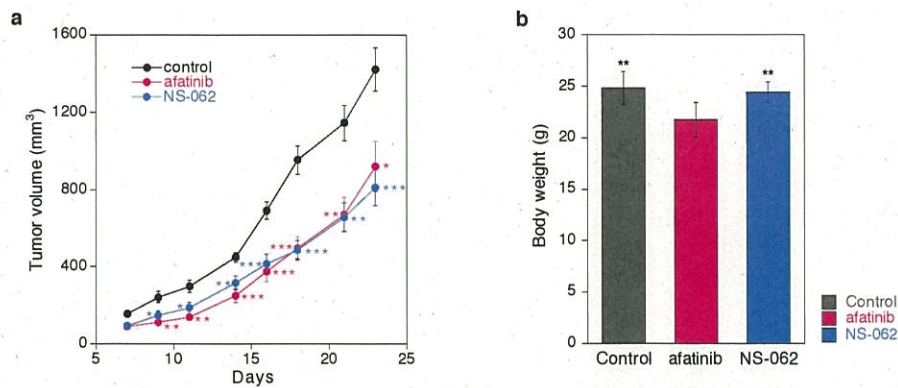


Figure 5. (a) *In vivo* anti-tumor activity of quinazoline compounds (20 mg/kg, oral administration twice daily). Each plot represents an average \pm SE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control (two-tailed Student's t-test). (b) Effect of quinazoline compounds on mice body weight after the 25-day continuous oral administration. Each bar represents an average \pm SE. ** $P < 0.01$ versus afatinib (two-tailed Student's t-test).

第三世代 EGFR-TKI の開発

キナゾリン以外の阻害剤構造に対しても CFA が適用可能なことを示すため、変異型 EGFR 選択的な不可逆阻害剤である第三世代 EGFR-TKI の開発を行った。ピリミジン 5 位の置換基とリンカーの検討を行い、EGFR^{L858R/T790M} 二重変異体を発現する H1975 細胞と野生型 EGFR を発現する H292 細胞に対する増殖阻害活性を評価した。その結果、既存の EGFR-TKI の osimertinib と同程度の H1975 細胞増殖阻害活性と高い H1975 細胞選択性を示す NSP-037 の開発に成功した (Fig. 6)。NSP-037 は、*in vivo* においても抗腫瘍活性を示し、CFA が様々な阻害剤に適用可能であることが示唆された。

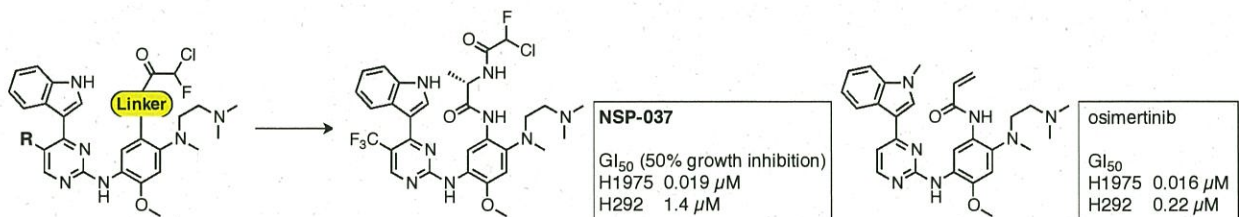


Figure 6. Structures of NSP-037, osimertinib and their anti-proliferative activity (GI₅₀ μM) against EGFR-dependent cell lines.

【まとめ】

本研究では、コバレントドラッグのための標的タンパク質選択性の高い反応基の探索とその有用性の評価を行った。まず、独自のアッセイ系によりオフターゲットとの非特異反応を抑制できる低反応性基を探索し、CFA がマイケルアクセプターと比較して Cys 残基と穏やかに反応することを見出した。次に、CFA を有する不可逆阻害剤の開発を行い、高い標的タンパク質特異性と阻害活性を有する NS-062 の開発に成功した。NS-062 は *in vivo* においても高い抗腫瘍活性を示した。さらに、CFA は第三世代 EGFR-TKI への応用も可能であった。以上のように、本研究ではコバレントドラッグ開発に貢献できる標的選択性の高い新規反応基として CFA を見出すことに成功した。