

ターゲットエンゲージメントが切り拓くキナーゼ標的創薬

近年のブロックバスターは多くが抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品になっているとはいえ、キナーゼや GPCR は創薬ターゲットとして魅力がある分子です。実際に、2016 年 2 月の時点で開発中の低分子性抗がん剤のうち 68% がキナーゼ阻害剤であり、特にチロシンキナーゼファミリーをターゲットとしたものが多いという報告 (1) もあり、創薬ターゲットとしてキナーゼが重要であることが分かります。特定の酵素やキナーゼファミリーに特異性が高い化合物の探索だけでなく、新たな阻害剤評価法や評価項目も出てきており、様々なキナーゼ解析手法がとられるようになってきました。ここでは、キナーゼ阻害剤解析や探索においてプロメガが提供する多様な解析法をご紹介します。

(1) 分子標的薬開発 (2016 年 2 月時点) scads.jfcr.or.jp/db/table.html

キナーゼ阻害剤スクリーニング

キナーゼアッセイは RI 標識したリン酸を使う方法、リン酸化タンパク質特異的抗体を使う方法、基質リン酸化の電荷の違いにより検出する方法など、様々なアッセイ法が考案されてきました。プロメガはすべてのキナーゼに共通の基質である ATP に着目し、反応前後の ATP 量を比較することでキナーゼ活性を測定する Kinase-Glo[®] を開発、のちにこれを改良して反応生成物の ADP を検出する ADP-Glo[®] を開発しました(図 1)。

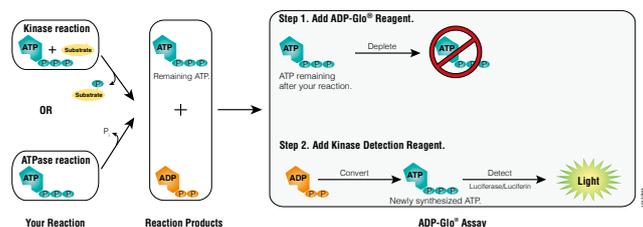


図 1. ADP-Glo[®] アッセイ原理

ATP や ADP を検出する手法により、これまでは RI アッセイ以外では難しかった全長タンパク質、糖や脂質のような分子を標的基質とするキナーゼアッセイを、ペプチドを基質とするキナーゼと同様にアッセイできるという大きな特長があります(図 2)。またキナーゼ反応後の残存 ATP を検出する Kinase-Glo[®] に比べ、反応生成物である ADP を検出する ADP-Glo[®] は非常に高感度であり、活性の弱いキナーゼや少ない酵素量でも高感度なアッセイができるようになりました。ルミノメーターさえあれば測定できる簡便さから、基礎研究から HTS まで幅広く使用されています。特に HTS では、擬陽性が少ないロバストなアッセイ系として高く評価されてきました。

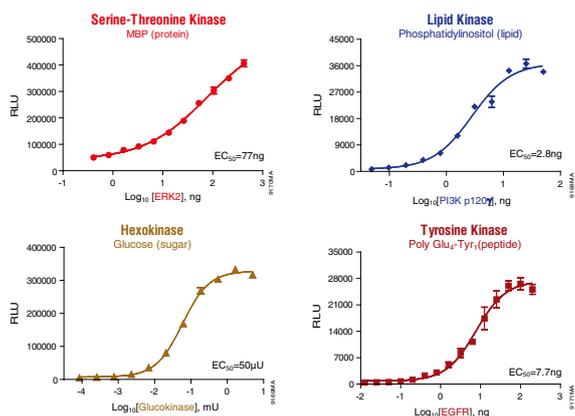


図 2. 様々な基質の ADP-Glo[®] アッセイデータ事例 タンパク (ERK2)、脂質 (PI3K)、糖 (Glucose)

また、より簡便にキナーゼ阻害剤を研究できるよう、174 種のキナーゼについて精製キナーゼ・基質・反応バッファーをセット化した Kinase Enzyme System を用意しました (KES リスト www.promega.com/a/kinase/)。

キナーゼのプロファイリング

キナーゼをターゲットにした創薬では、特異性の高い化合物を見つけた、また見つけた化合物が他のキナーゼファミリーと反応するかどうか調べたい、というニーズが高まっています。このようキナーゼファミリーにおけるプロファイル解析系は自作するのは容易ではありません。受託サービスという方法もありますが、受託サービスには様々なメリットがある一方、ちょっとやってみたい場合には利用しにくく、また化合物を外部に出不せない場合は利用できません。ADP-Glo[®] Kinase Enzyme System をキナーゼファミリーごとに、またはヒトの Kinome を代表する

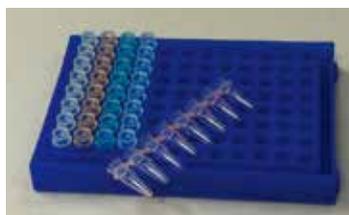


図 3. Kinase Selectivity Profiling System の酵素・基質ストリップ

パネルにまとめてセット化した Kinase Selectivity Profiling System は、自分で簡単にキナーゼプロファイリングをしたいというニーズに応える製品です。各酵素と基質はチューブストリップに分注されており、使用する際に希釈して混合するだけで理想的なキナーゼ活性が得られるよう調製済みです。特定ファミリーでの簡単なチェックから Kinome 全体の本格的なプロファイリングまで、柔軟に使い分けできる点も魅力の一つです。

細胞内での薬剤結合活性および滞留時間測定 (ターゲットエンゲージメント)

近年はターゲットからの解離が遅く、より長く効果を発揮する阻害剤を目指した開発が行われています。キナーゼ阻害剤においても同様に滞留時間 (Residence time) 測定のニーズが高まっています。また創薬ターゲットとして有望なチロシンキナーゼ型受容体ファミリーは膜貫通型キナーゼであり、これまでは全長タンパク質でのアッセイが難しく、阻害剤スクリーニングでは精製した活性ドメインのみ使用することが一般的でした。かわら版秋号 (www.promega.co.jp/pdf/kawara_1610_p3.pdf) でご紹介した TE アッセイ (Target Engagement Assay [細胞内蛍光標識化合物結合試験]) を利用すれば、従来法では解析が困難であった膜貫通型キナーゼやサイズの大きなキナーゼについても生細胞内におけるキナーゼ結合活性および滞留時間の測定を簡便に行うことができます。また、TE アッセイでは Type I 阻害剤の他、Type II やアロステリック阻害剤の評価もできることが分かっています。図 4A は様々なタイプの阻害剤による Kinase Tracer と Abl キナーゼ結合阻害実験例です。Type I 阻害剤の Dasatinib、Type II 阻害剤の Imatinib と Ponatinib、Type III かつアロステリック阻害剤である GNF2 を評価したところ、全タイプの阻害剤において Kinase Tracer の結合阻害活性が観察されました。また、結合阻害活性が報告されているキナーゼ阻害活性ともよく相関し、Dasatinib や Ponatinib では GFN2 や Imatinib に比べて強い活性を示しました。

これらの滞留時間を測定したところ、第一世代の Imatinib は添加後数十分でプラトーに達しており比較的解離が早いことを示していますが、第二世代の Dasatinib や Bafetinib、さらに第三世代の Ponatinib は非常に滞留時間が長く、非常にゆっくりとした解離が観察されています(図 4B)。簡便に滞留時間を測定できる TE アッセイが強力なツールになることは間違いありません。

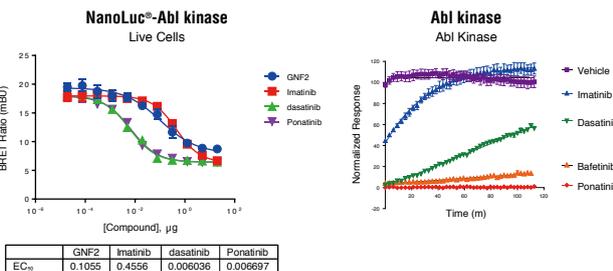


図 4A. Type I、II 阻害剤と ATP 非拮抗型阻害剤 図 4B. 各阻害剤の滞留時間

キナーゼの TE アッセイは現時点でヒトキノーム全体のうち 120 種以上の全長キナーゼ解析システムを構築済みであり、カタログ製品化に先立ち先行販売しております。ご興味がある方は是非お問合せ下さい (E-メール: prometec@jp.promega.com)。