

医薬品開発 2

SBDD、CADD & CC/HTS (ランダムスクリーニング)

創薬化学

田中明人

今日、皆さんが自然と覚える単語は

SBDD :Structure based Drug Design)

論理的デザイン

CADD: Computer aided (assisted) Drug Design

CC :コンビナトリアルケミストリー (Combinatorial Chemistry)

ケミカルライブラリー (化合物ライブラリー)

ランダム・スクリーニング

HTS :High Throughput Screening

絵で見て分かる解説 :ランダム・スクリーニング

Random :非計画的に、めったやたらに、手当たりしだい
Screening :化合物の薬理評価を行うこと

(例)目的 理想の恋人ゲット



私の理想の恋人は誰？



とにかく 出会った人とは付き合ってみる。
当たって、砕ける！作戦
(ランダム・スクリーニング)

成功の鍵は

- 1)どれだけ沢山のひととトライするか (多くの化合物の評価)
- 2)出来るだけ出会う人の質を高めるか (ライブラリーの質向上)

(反対作戦) 論理的ドラッグデザイン
まず、理想の恋人条件を書き出し、条件にあつてそんな人の情報を集め、よ
く吟味してから、声をかける(SBDD)

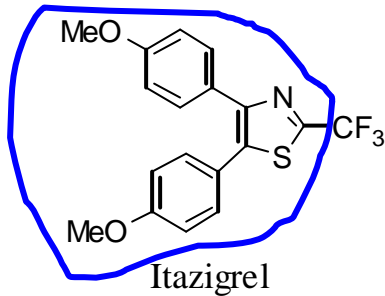
先週の復習 最適化研究とは？

シートが無いとスター出来ない！

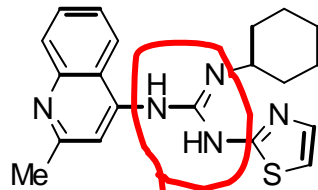
問題点

シート化合物
(seed:種)

誘導体合成は創薬合成者の'勘頼り'

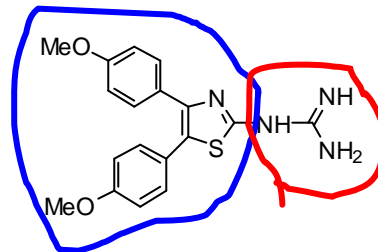


血小板凝集阻害

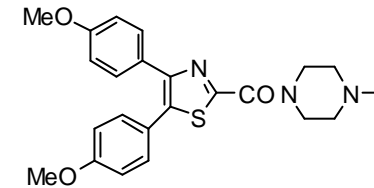


血管拡張作用

リード化合物
(Lead:導くもの)

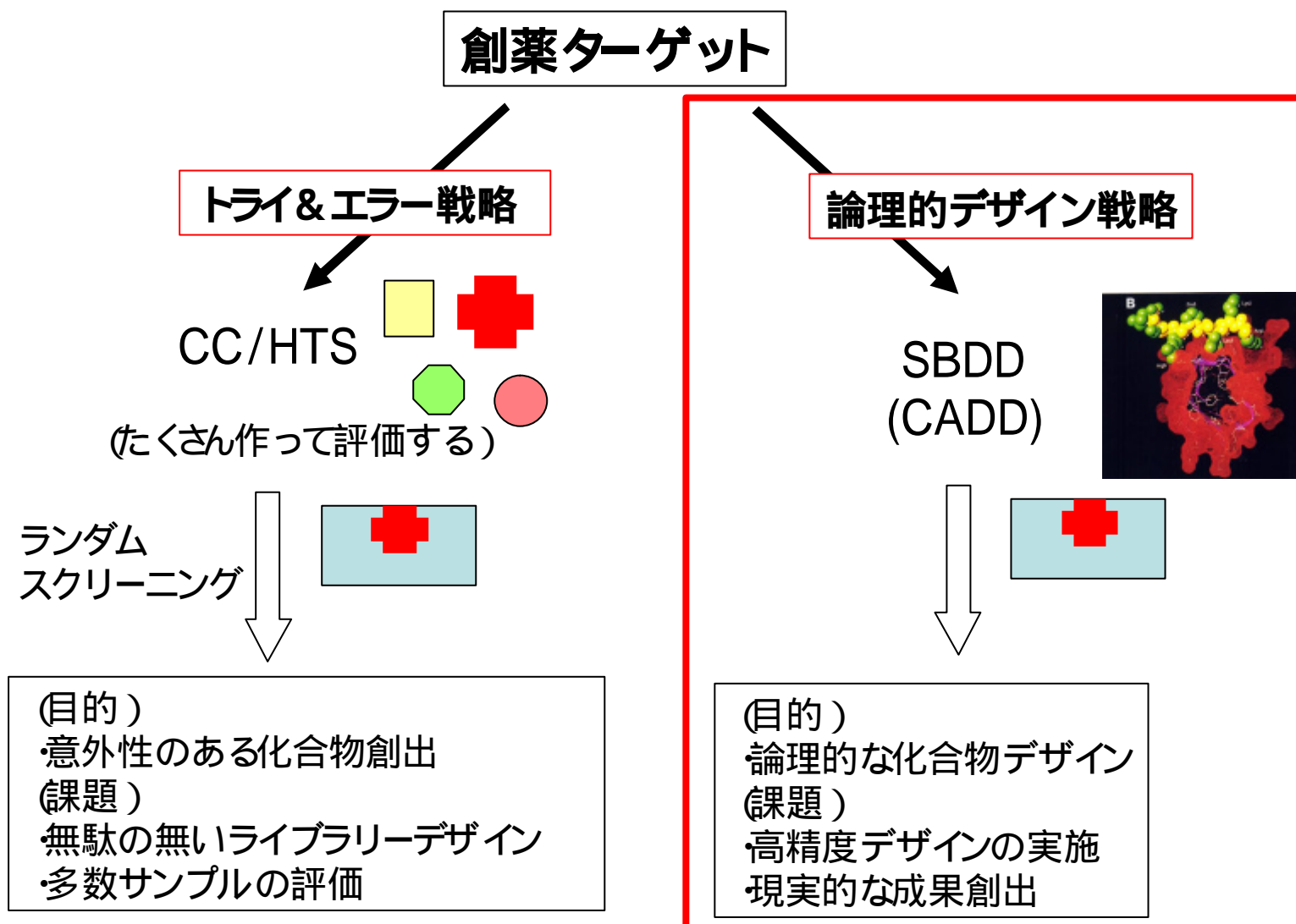


目標 (開発品)



最適化研究 : Lead optimization
リード・オプチマイゼーション

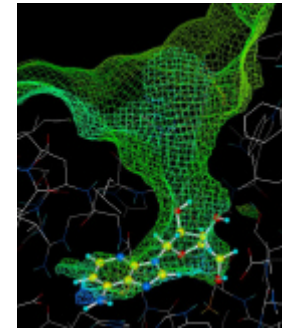
(1) 創薬に関する2大戦略 : トライ&エラー vs. 論理的デザイン



論理的ドラッグデザインとは？

CADD (Computer Aided Drug Design)

SBDD (Structure Based Drug Design)



< 技術が生まれてきた背景 >

(1) 合成サンプル数を10%抑制は数十億円のコストダウン

(2) *in silico* screeningが勝負を決める時代へ

(数の勝負では日本企業は太刀打ちできない時代)

(3) コンピュータ技術の発展 (蛋白質の構造計算が可能に！)

(4) 蛋白質化学の発展 (高純度) ターゲット蛋白質取得

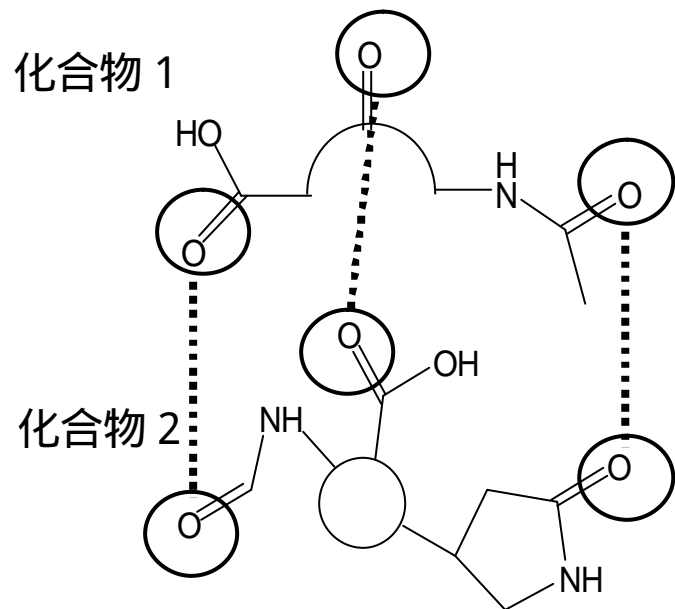
(1)SBDD夜明け前 :CADD

aided :手助けする

assisted:手助けする

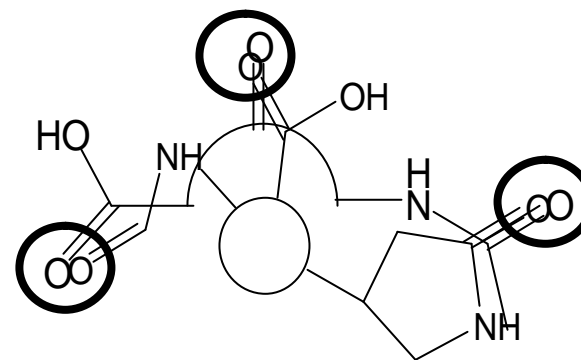
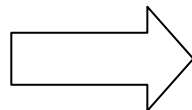
CADD :Computer-Aided Drug Design (20年くらいまではこちらのみ)

リガンド情報をもとにデザインに役立つ情報を提供し創薬研究を
推進させる研究



化合物 1, 2が同じ薬理作用

重ね合わせ

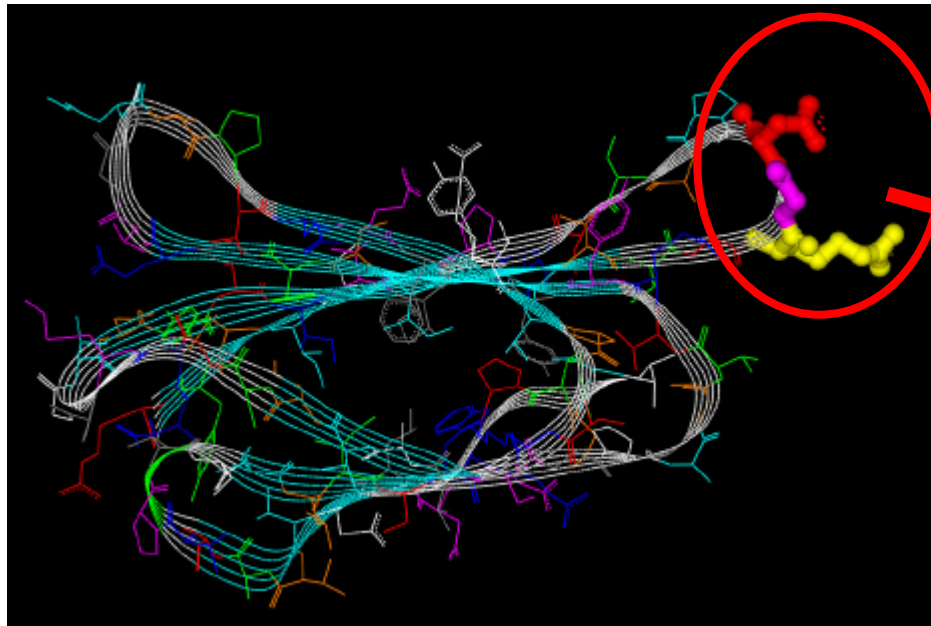


活性発現必須構造の同定

CADD創薬例 :FK633創出

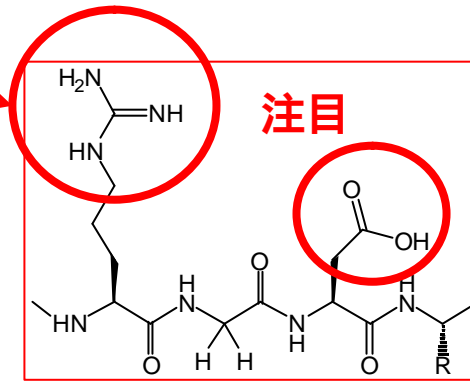
血小板“糊(のり)分子”の働きを止める化合物(薬)デザイン

糊分子は蛋白質から出来ている(蛋白質は20種類のアミノ酸で構成)



Fibronectin (PDB #1TTFを改変)

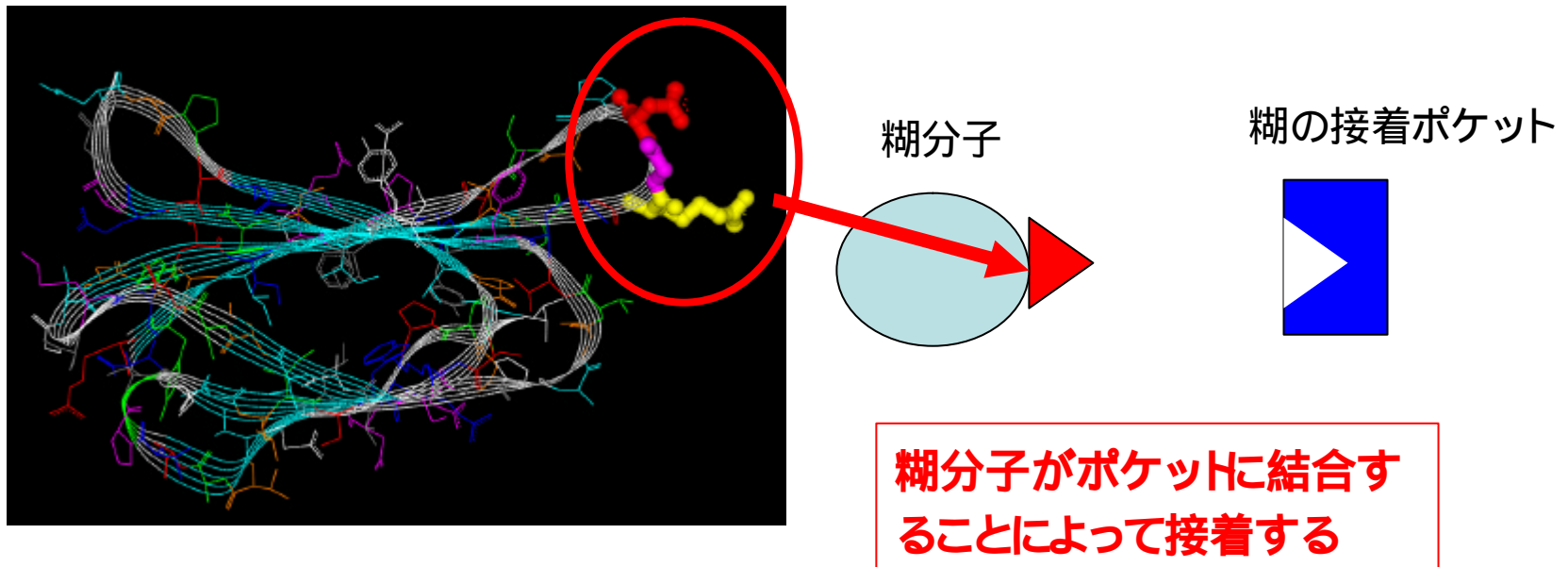
RGDペプチドの発見(1987年)



Arg R (アルギニン) Gly G (グリシン) Asp D (アスパラギン酸)

CADD創薬例 :FK633創出

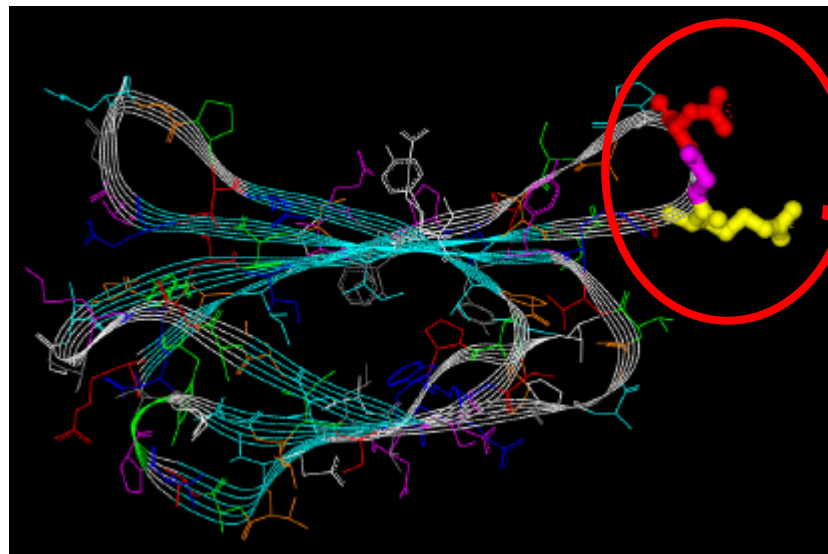
血小板「糊分子の働きを止める分子 (薬)」のデザイン



この構造と類似している分子を設計してやれば、血小板凝集を阻害できる?! (拮抗剤)

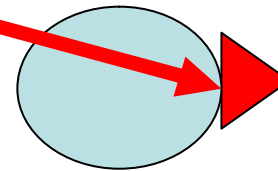
CADD創薬例 :FK633創出

血小板「糊分子の働きを止める分子（薬）」のデザイン

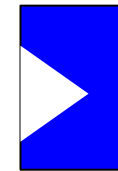


糊部分に類似した化合物があると？

糊分子



糊の接着ポケット

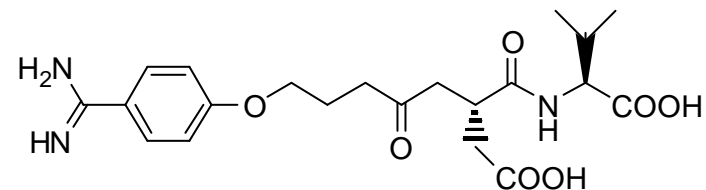
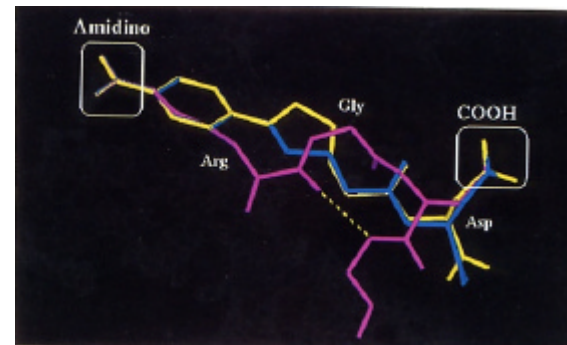
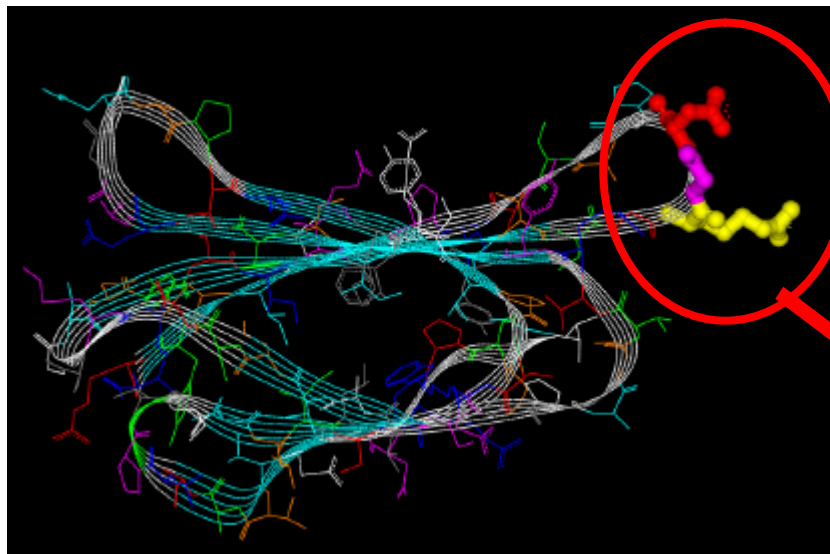


糊部分は結合できなくなる
(血小板がくっつけなくなる=凝集阻害)

CADD創薬例 :FK633創出

血小板「糊分子の働きを止める分子 (薬)」のデザイン

コンピュータ上で化合物をデザイン



FK633(抗血小板剤、注射)

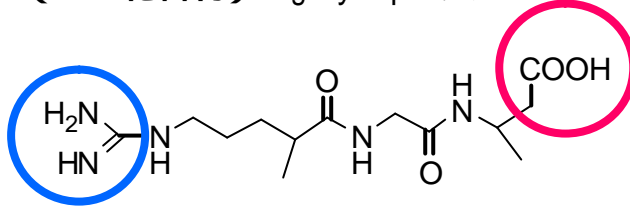
・バージャー病で有効(PIIA試験)

経済的理由により開発断念

CADD研究の流れ例

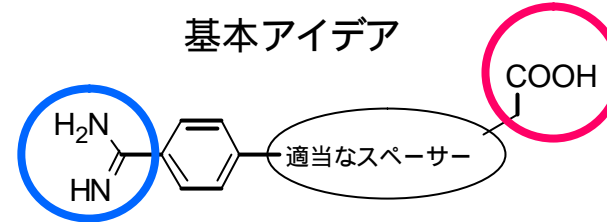
天然のリガンド(ターゲット)

(リード化合物): ArgGlyAspペプチド



薬を目指した化合物

基本アイデア

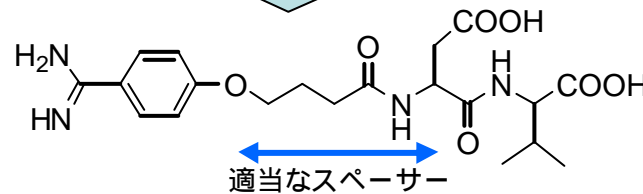


(仮想合成化合物)

in silicoでの重ね合わせ



通常optimization



血小板凝集抑制剤

FK633

Akito Tanaka, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6(13), 1443-1448 (1996)

CADDの問題点 SBDDへ

CADDの成功要因

各リガントが同じポケットに入っている前提

受容体構造が同一である前提

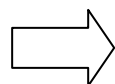
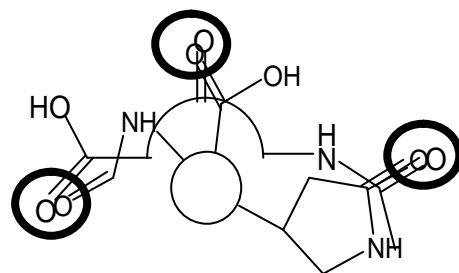
CADD精度を上げるためには多数の合成
が必要

新規結合ポケットが見つかりにくい

現実

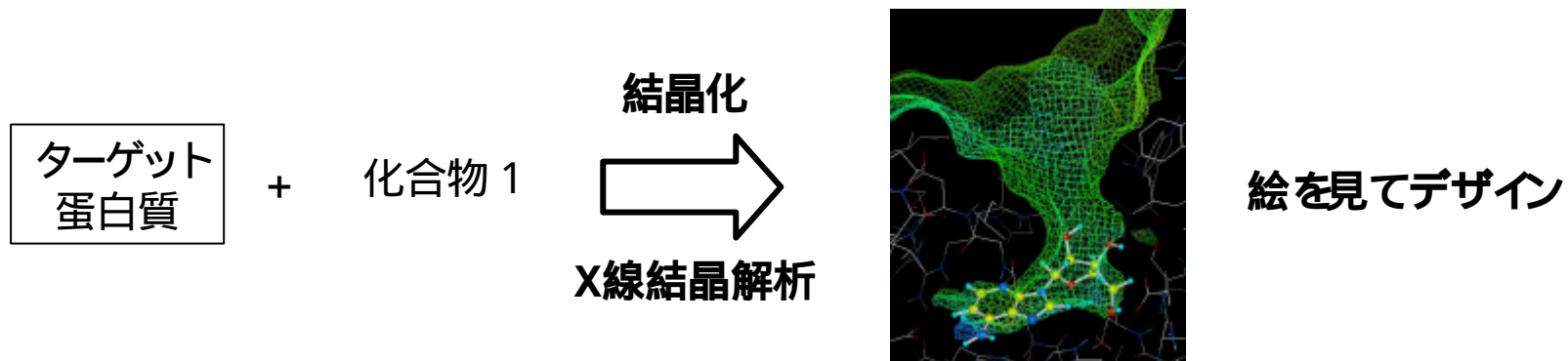
実際はそうでない場合も多有り
(Induced Fittingはよく起こる)

目的との自己矛盾



CADDからは運が良くなければ過去データの整理しかできない?

SBDDの基本的流れ



SBDD研究のメリット

化合物毎の薬物受容体構造が明らかとなる

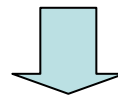
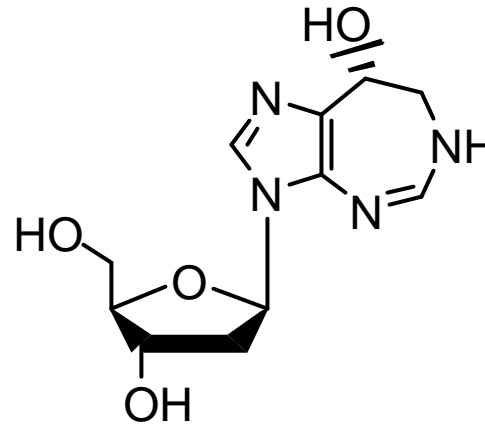
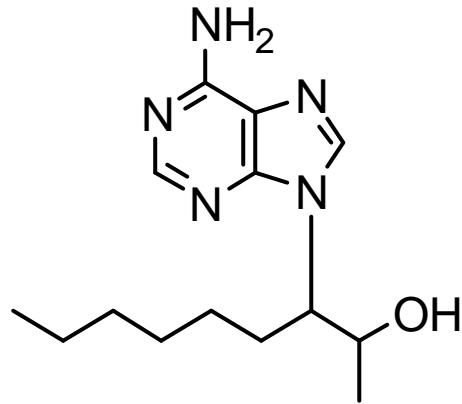
少数の化合物合成で受容体構造のイメージがクリアーとなる

新規結合ポケットが見つかり易い (全 <新規構造創出が可能！>)

SBDDの成功例 (15年ほど前の実例)

ADA(Adenosine Deaminase) Inhibitor創出PJ

(当時の) 既存のADA阻害剤



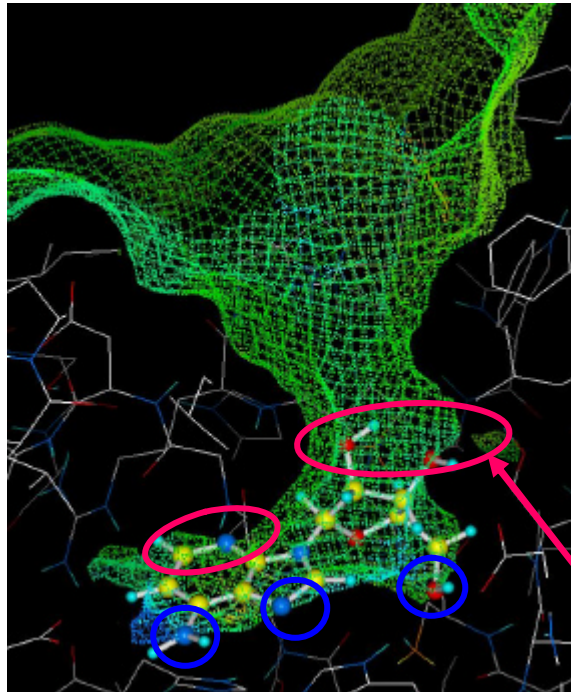
強い毒性
薬物動態での問題性 (経口吸収性、T1/2)

SBDDの成功例 (15年ほど前の実例)

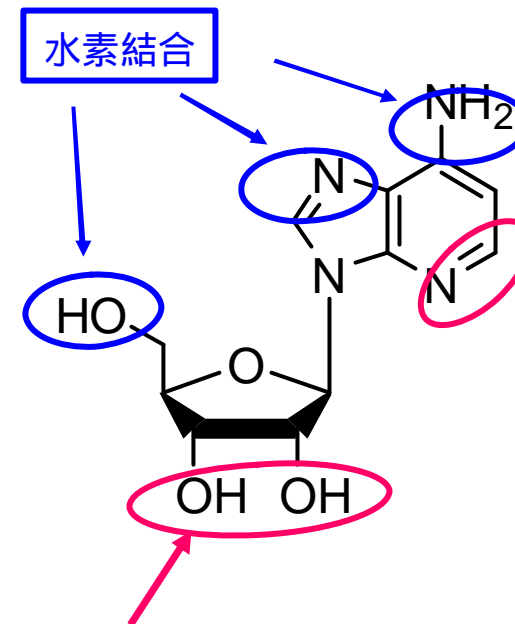
ターゲット蛋白質

ADA(Adenosine Deaminase) Inhibitor創出PJ

1-deazaadenosine(DAA)



ADA+DAA複合体結晶構造
(PDB code: 1ADD)

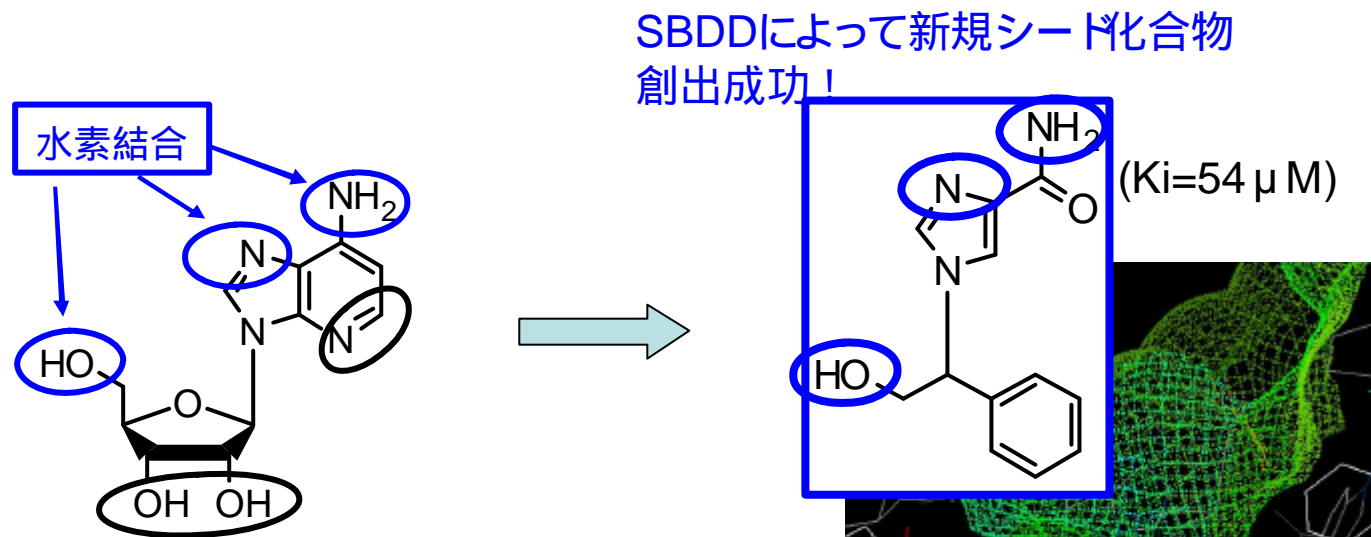


結合に参加していない

ターゲット蛋白質のX線結晶解析構造既知だった

SBDDの成功例 (15年ほど前の実例)

ADA(Adenosine Deaminase) Inhibitor創出PJ



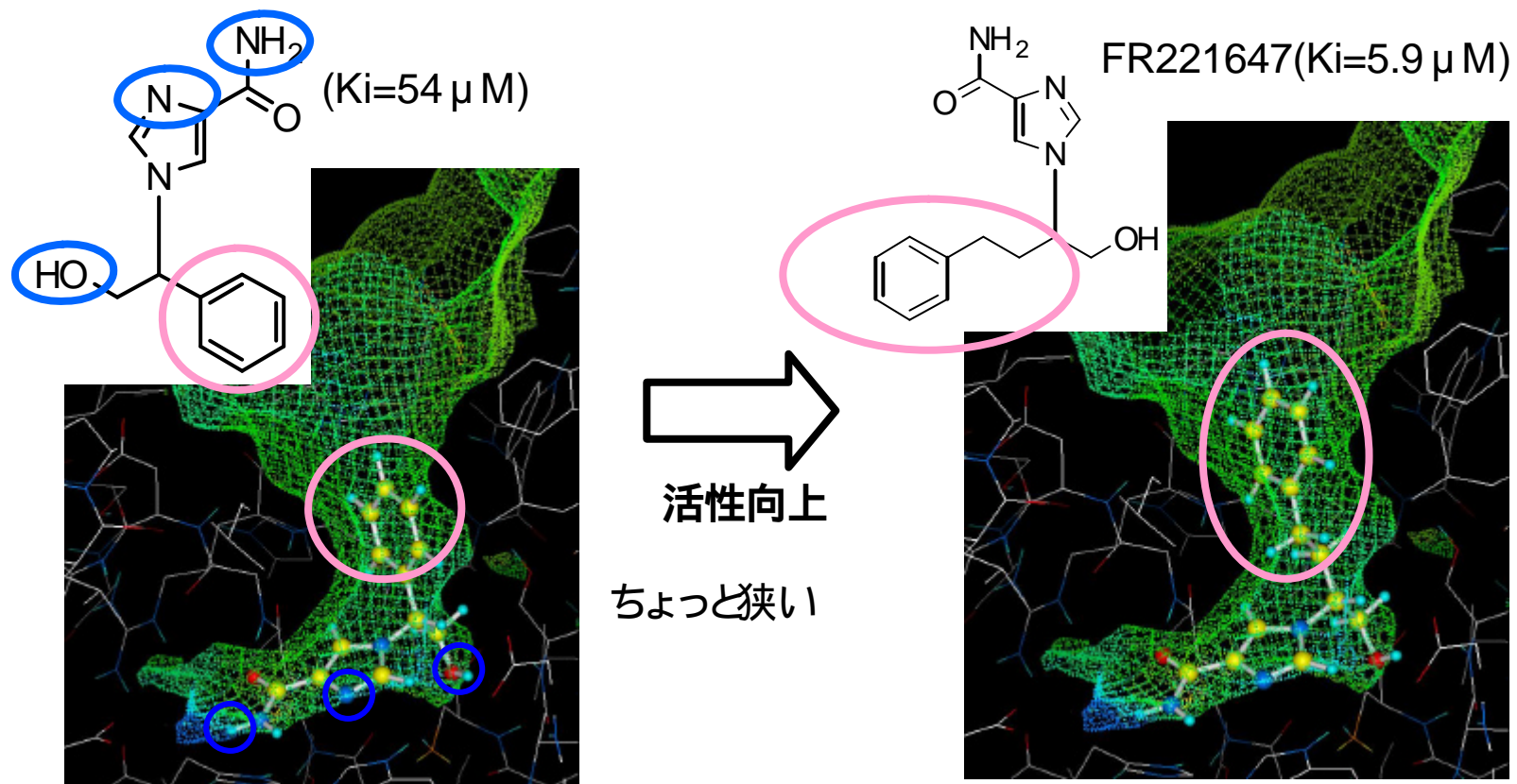
蛋白質と結合していない部分は自由に改変可能!

T. Terasaka, I. Nakanishi, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2003), 13, 1115-1118.

SBDDの成功例 (15年ほど前の実例)

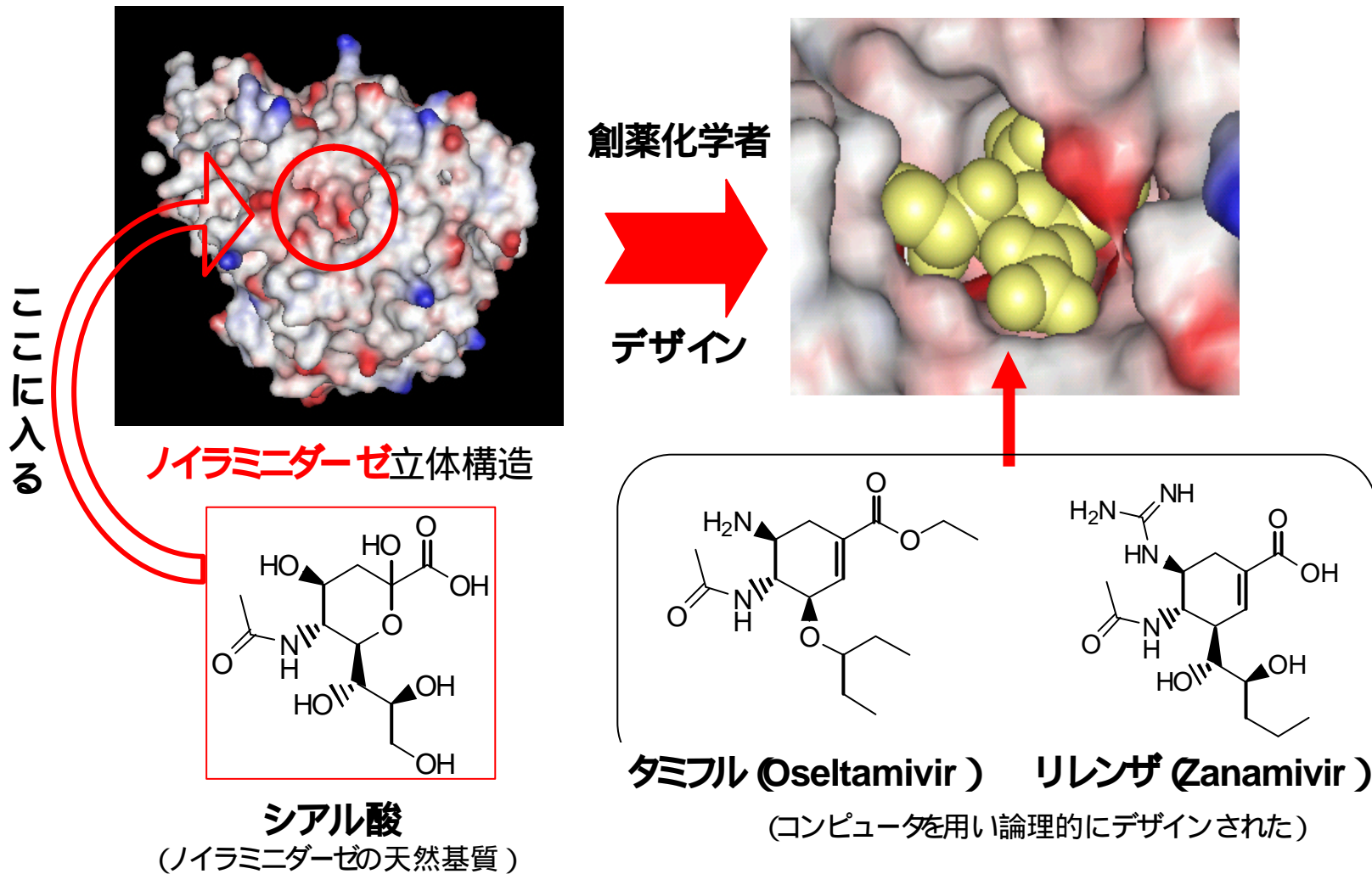
ADA(Adenosine Deaminase) Inhibitor創出PJ

ADA活性向上のさらなる試み

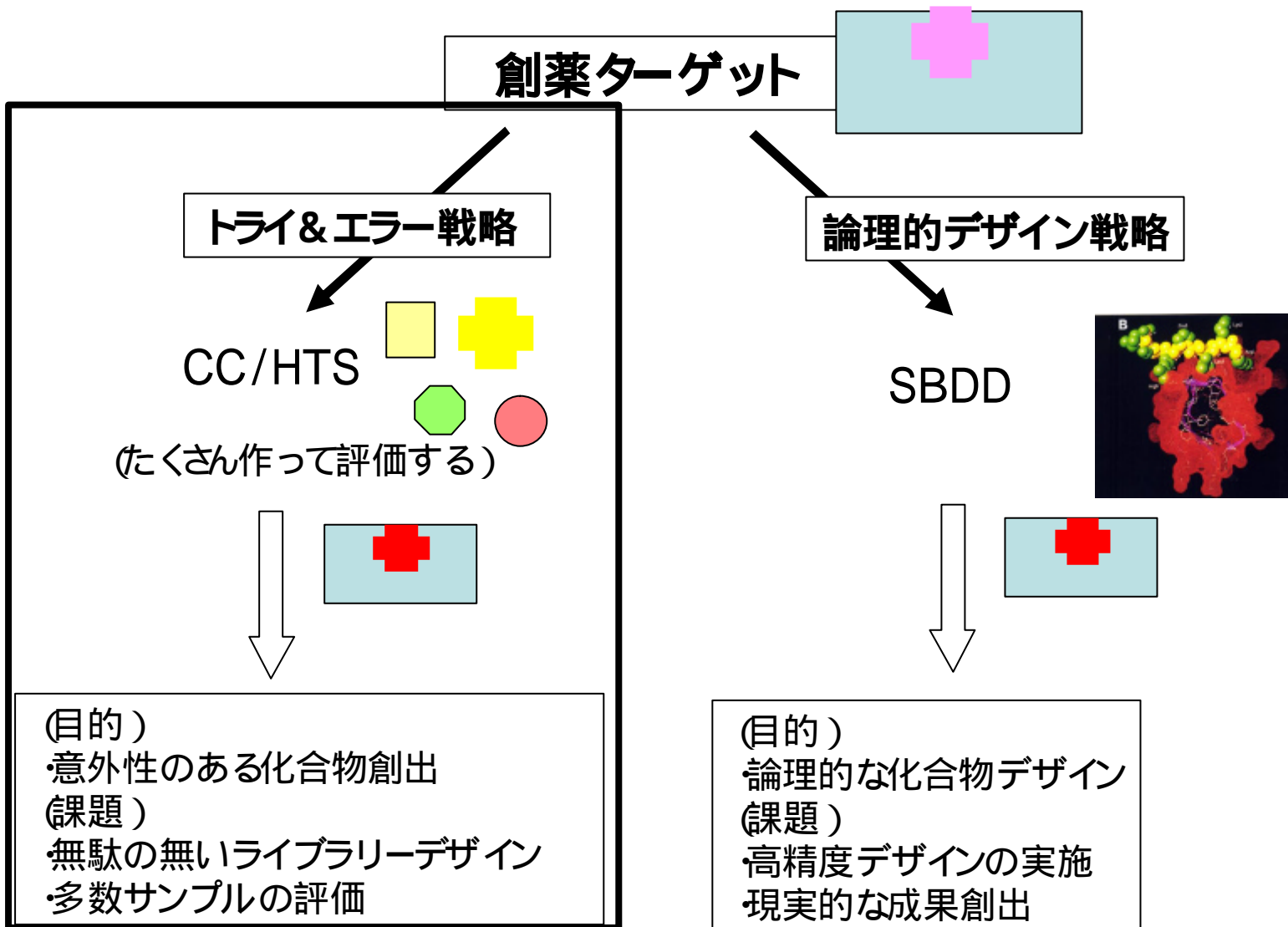


T. Terasaka, I. Nakanishi, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2003), 13, 1115-1118.

代表的なSBDD創薬例 (2)



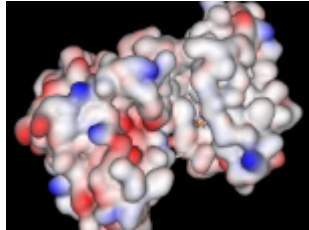
創薬に関する2大戦略：トライ&エラー作戦 vs. 論理的デザイン



ランダムスクリーニングとCC-HTS

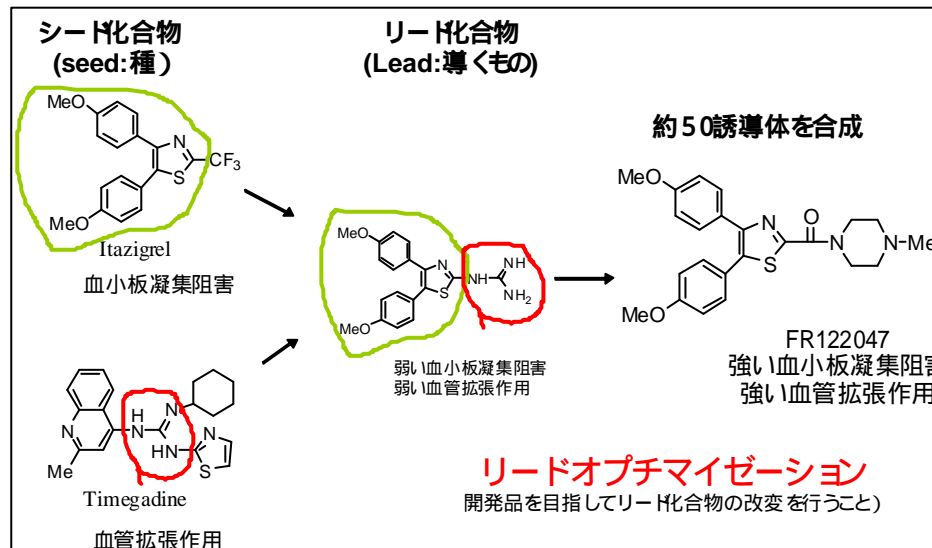
新規創薬ターゲット

ゲノム情報

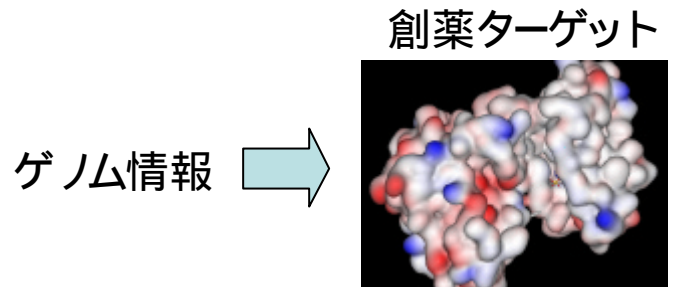


この蛋白質を阻害する化合物を創出すれば夢の新薬！

新規 何の蛋白質情報も無い
さて、どうする？
シートもリードも無い



ランダムスクリーニングとCC・HTS



この蛋白質を阻害する化合物を創出すれば夢の新薬！

ちなみに、**ライブラリー**は図書館のように“すべてのものが入っているようなもの”という意味です。

偶然、ヒットする化合物が見つかる(かも?)
= **ランダムスクリーニング (Random Screening)**
案外有力！

第2案 :とにかく〈手持ちの化合物全部評価しようぜ！

数千万化合物ストック
(化合物**ライブラリー**と呼ぶ)



競争に打ち勝つ条件 = 出来るだけ多くの化合物ライブラリーを保有する

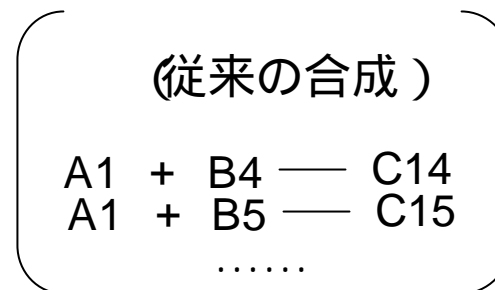
どうやって、こんな多数の化合物を合成するの？ CC
どうやって、こんな多数の化合物を評価するの？ HTS

コンビナトリアル化学 (CC)とは？

CC: Combinatorial Chemistry

原料A	原料B	目的物C			
A1	B4	C14	C24	C34	
A2	B5	—	C15	C25	C35
A3	B6	C16	C26	C36	

1度に多くの化合物を合成することが出来る
組み合わせの化学 = Combinatorial Chemistry



HTS: High Throuput Screening

ロボット等を用い多くの化合物を大量に評価するシステム
(1990初期、行き場を失った軍需 宇宙開発技術が米国を中心に創薬へ)



ランダム評価による意外なリード化合物発見の機会が増加 (独自のリード)

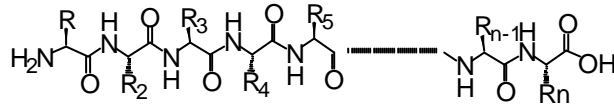


90年代は製薬企業における化合物ライブラリー規模競争 (数勝負) が激化

コンビナトリアル化学発展のきっかけとなった論文

Nature, 354, p84 (1991)

最初はペプチドライブラリー



prof. Victor J. Hruby
(じつは盗作？)

A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity

Kit S. Lam, Sydney E. Salmon, Evan M. Hersh, Victor J. Hruby*, Wieslaw M. Kazmierski† & Richard J. Knapp†

Arizona Cancer Center and Department of Internal Medicine, College of Medicine, Tucson, Arizona 85724, USA

* Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA

† Selectide Corporation, 10900 N. Stallard Place, Tucson, Arizona 85737, USA

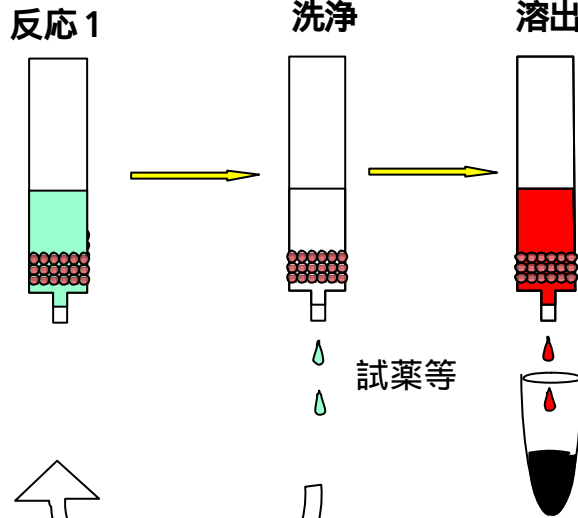
OUR aim was to improve techniques for drug development by facilitating the identification of small molecules that bind with high affinity to acceptor molecules (for example, cell-surface receptors, enzymes, antibodies) and so to mimic or block their interaction with the natural ligand^{1,2}. Previously such small molecules have been characterized individually on a serial basis. The systematic synthesis and screening of peptide libraries of defined structure represents a new approach. For relatively small libraries, predetermined sequence variations on solid-phase supports have been used^{3,4}, and large libraries have been produced using a bacteriophage vector into which random oligodeoxynucleotide sequences have been introduced⁵⁻⁸, but these techniques have severe limitations. Here we investigate an alternative approach to synthesis and screening of peptide libraries. Our simple methodology greatly enhances the production and rapid evaluation of random

ちなみに、ライブラリーは図書館のように“すべてのものが入っているようなもの”という意味です。

始める前に 固相合成と液相合成

(固相反応)

樹脂 ● — 原料 — — — — — ● — 目的物



繰り返し

反応手順が単純
後処理が簡便

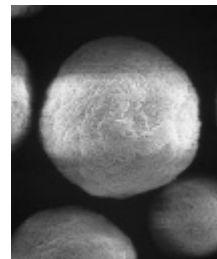
(液相反応)

反応1

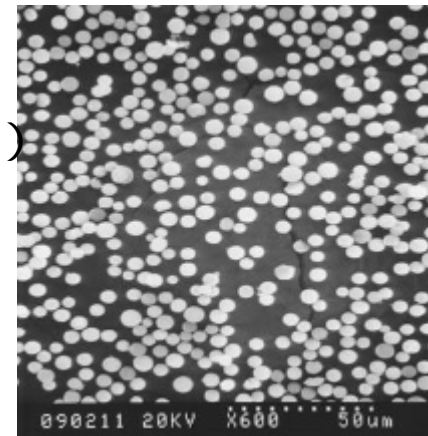


後処理
カラム精製

樹脂 (写真)

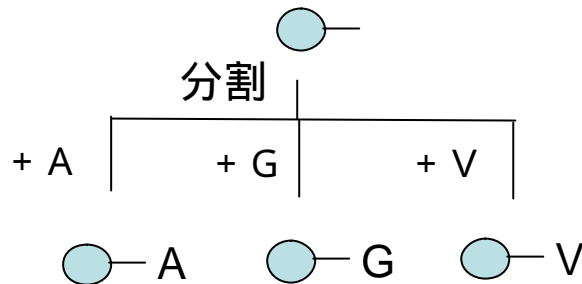
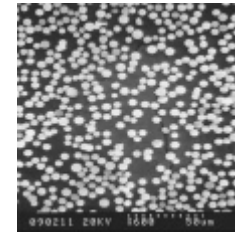


50 - 100 um

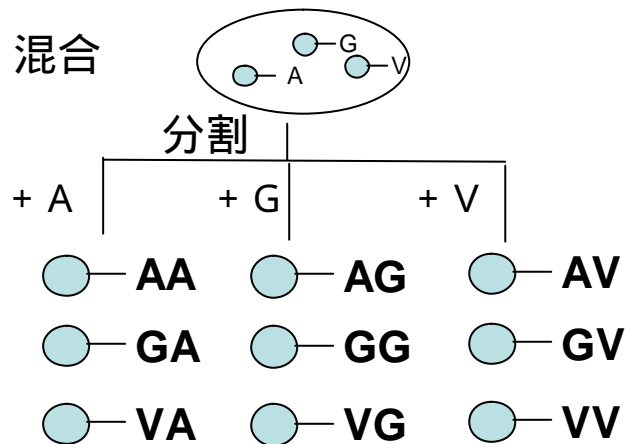


コンビナトリアル化学の基本

最初はペプチドライブラリー



3種類のアミノ酸(A,G,V)を用い、わずか2ステップで9種類すべての合成が可能！
A: アラニン、G:グリシン、V:バリン



1番目のアミノ酸

2番目のアミノ酸

	A	G	V
A	AA	AG	AV
G	GA	GG	GV
V	VA	VG	VV

・1gの樹脂(200万個)を使えばpentamer($19^5=248$ 万種類)まで網羅できる
 ・ペプチドなので高感度で構造決定可能(1個の樹脂で十分同定可能)
 ・ペプチドなので高収率・高純度で合成可能

ペプチドライブラリーの有用性を実証した最初の論文

～ SH3結合性リガンドの探索～

J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 12591

Biased Combinatorial Libraries: Novel Ligands for the SH3 Domain of Phosphatidylinositol 3-Kinase

James K. Chen,[†] William S. Lane,[‡] Andrew W. Brauer,[‡]
Akito Tanaka,[‡] and Stuart L. Schreiber^{*,†}

*Department of Chemistry, Harvard University
Cambridge, Massachusetts 02138*

*Microchemistry Facility, Harvard University
Cambridge, Massachusetts 02138*

*ARIAD Pharmaceuticals
Cambridge, Massachusetts*

Received September



prof. James K. Chen教授
と(現スタンフォード大学)

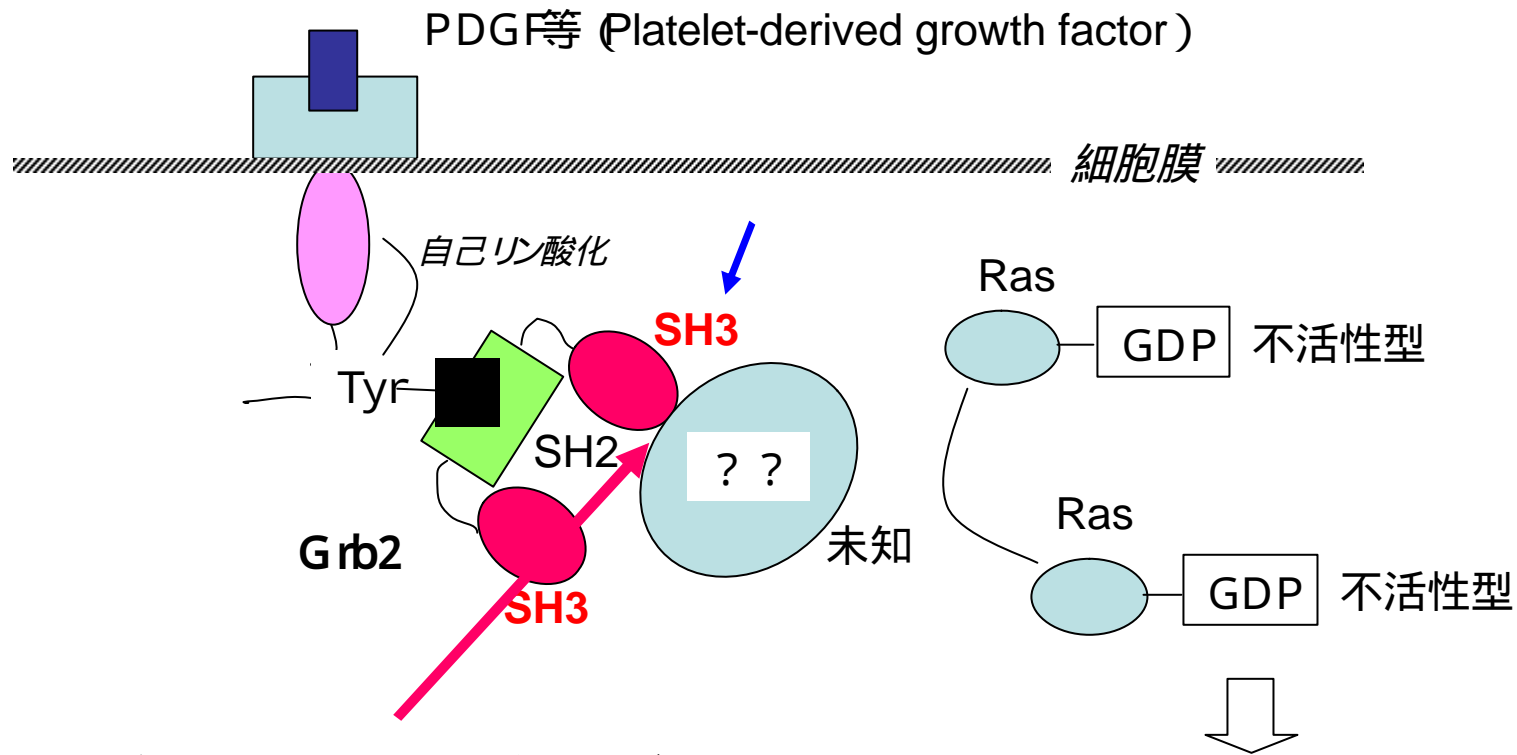


prof. Stuart L. Schreiber教授
と(ハーバード大学)

ペプチドライブラリーの有用性を実証した最初の論文

~ SH3結合性リガンドの探索 ~

SH3 (Src Homology 3) : 当時発見されたばかりの未知の蛋白質



どうしてもこのアミノ酸配列が知りたい!

前年発表されたペプチドライブラリー使おう!

細胞増殖などの細胞応答

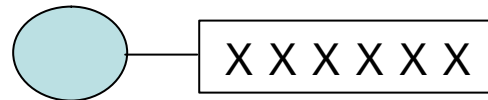
実験医学、13, 808 (1995)等

ペプチドライブラリーの有用性を実証した最初の論文

～ SH3結合性リガンドの探索～

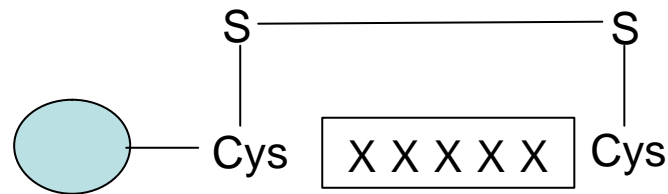
ペプチドライブラリーのデザイン - 1

(1)

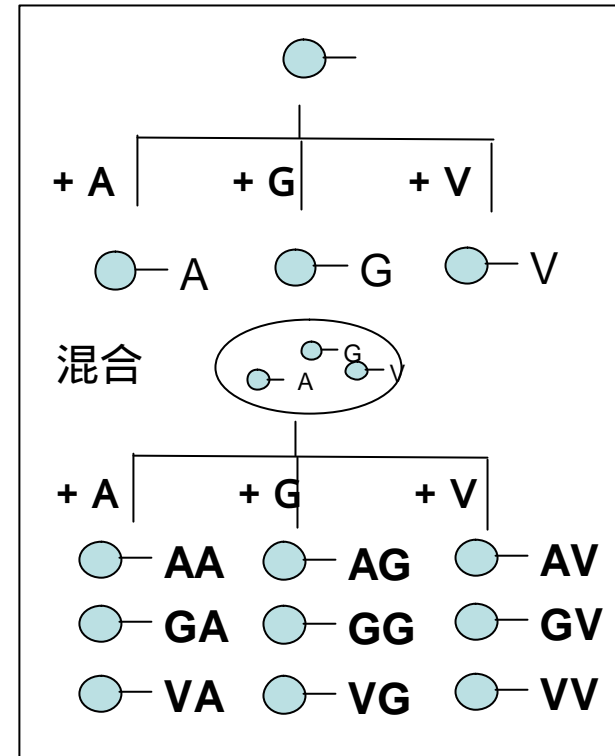


X: Cys以外の天然アミノ酸 (19種類)

(2)



X: Cys以外の天然アミノ酸 (19種類)

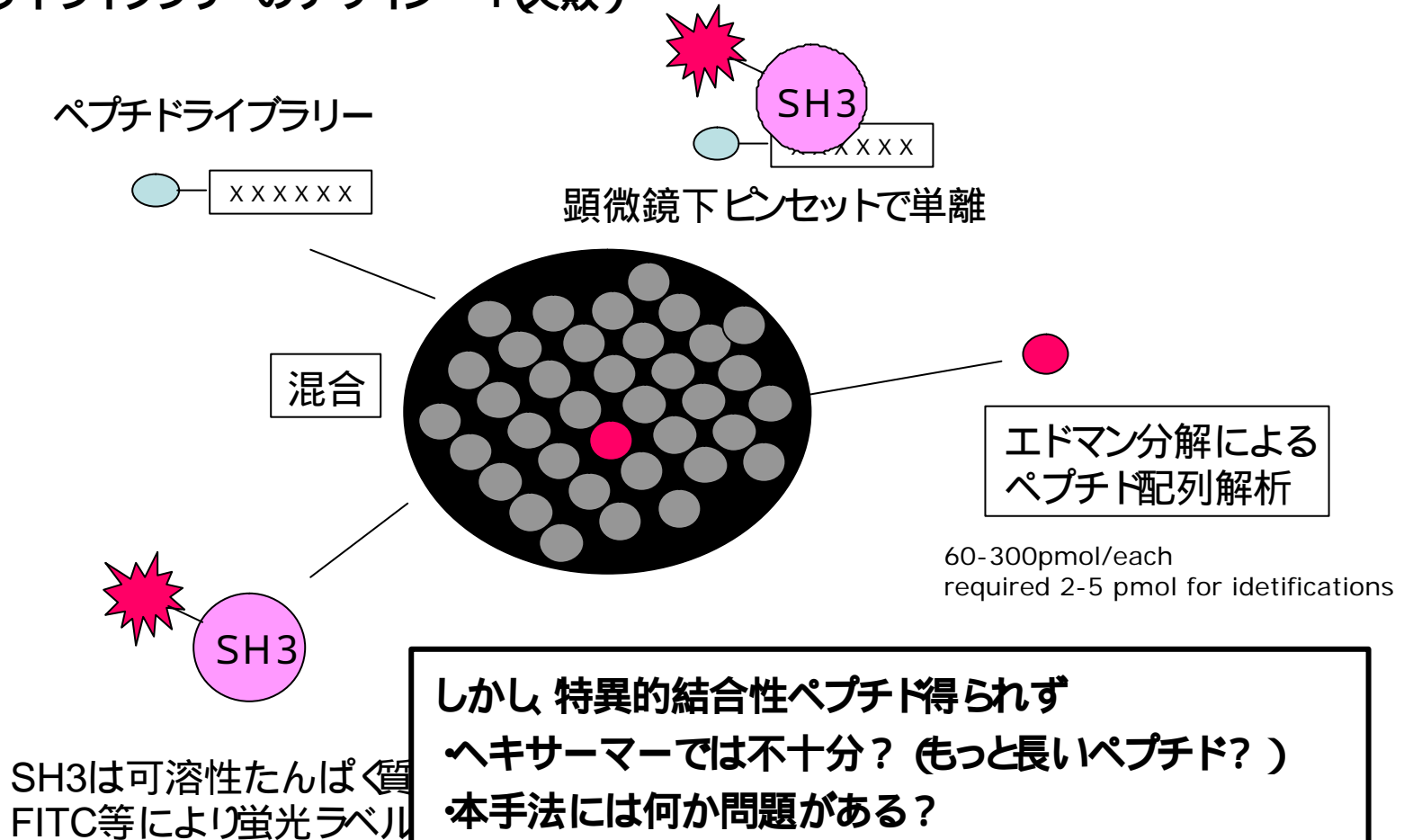


$19^5 = 248$ 万種類 in 2g樹脂(200万個)

ペプチドライブラリーの有用性を実証した最初の論文

～ SH3結合性リガンドの探索～

ペプチドライブラリーのデザイン - 1 (失敗)



ペプチドライブラリーの有用性を実証した最初の論文

~ SH3結合性リガンドの探索 ~

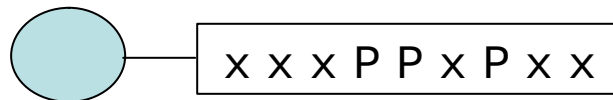
新たなペプチドライブラリーのデザイン biased (偏った) peptide librariesの合成

日々集められた生化学的手法によるターゲットペプチド情報の活用

SH3結合 たんぱく質	(推定)最小結合シーケンス
3BP - 1	A P T M P P P L P P V P P Q
3BP2 - 10	P P V P V P R K P
Sos	P P V P P R R R

推定共通構造 : P P x P x x

新たなペプチドライブラリーの合成



X : Cys以外の天然アミノ酸 (19種類)

$19^6 = 4700$ 万種類 in 2g樹脂(200万個)

ペプチドライブラリーの有用性を実証した最初の論文

～ SH3結合性リガンドの探索～

新たなペプチドライブラリーから見つかった特異的結合ペプチド(成功)

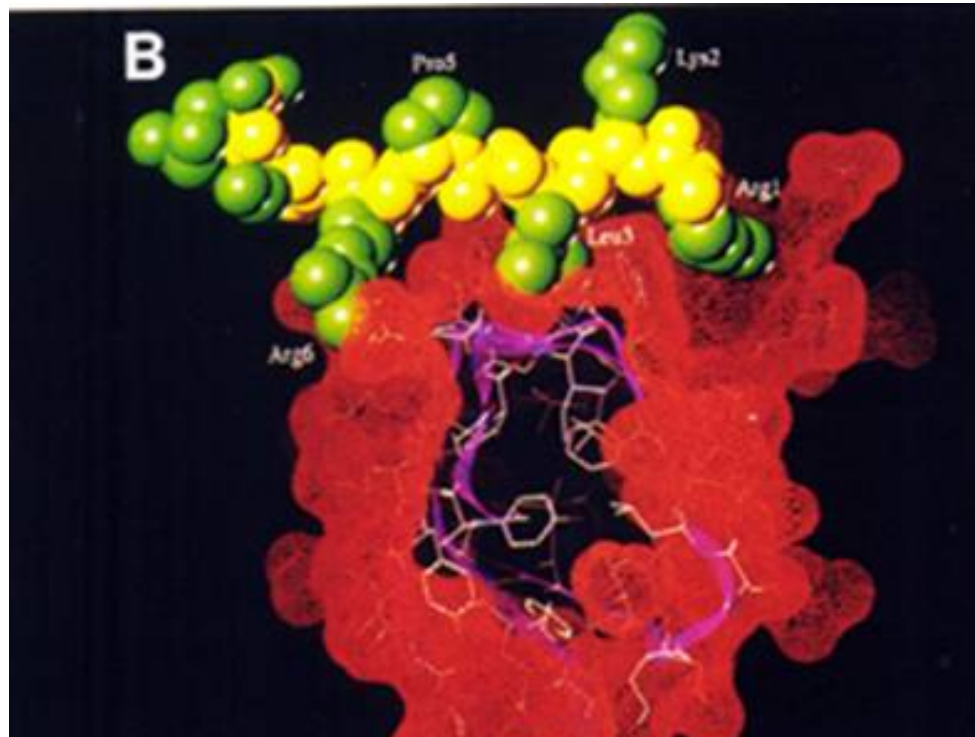
表3 バイアスドペプチドライブラリーによって見いだされた PI3 キナーゼ, サーク(*src*)の SH3 に特異的に結合するペプチドとその共通構造

SH3 名	クラス 1		クラス 2
	共通構造(RXLPPRPXX)		(XXXPPLPXR)
PI3 キナーゼ	RKLPPRPSK	RMLPPKPRV	VWKPPLPKR
	RKLPPRPAF	RKLPPKPKW	NRKPPLPAR
	RRLPPRPRR	RPLPPHPRR	LNKPPLPKR
	RYLPPRPMY	RALPPHPRF	PWHPPPLPLR
	RLLPPRPTF	RKLPPLPKA	
	RDLP RPAA	RPLPPAPWK	
	PALPPRPHS		
	共通構造(RXLPPLPXX)		(XXXPPLPXR)
サーク(<i>src</i>)	RALPPLPRA	RMLPPLPAW	PYHPPLPRR
	REL PPLPRF	RPLPPLPAW	MMAPPLPRL
	RALPPLPRY	RQLPPLPAF	AFA PPLPRR
	RNL PPLPRI	RRLPPLPQL	
	RALPPLPRW	RDLPPLPHR	
	RTL PPLPRF	REL PPLPVF	
	PALPPLPRI	PPLPPVPMF	
PPLPPLPTS	PPLPPTPKY		

ペプチドライブラリーの有用性を実証した最初の論文

～ SH3結合性リガンドの探索～

我々が見つけたペプチドとターゲット蛋白質 SH3とのNMR構造研究



リガンド:
RKL**PPR**PSK

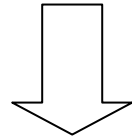
SH3:
PI3 kinase SH3

proline richペプチドはSH3結合性蛋白質の基本配列 (世界
で始めてペプチドライブラリーの有用性を実証した)

ここまでの流れ (コンビナトリアル化学の基礎)

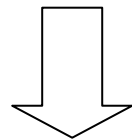
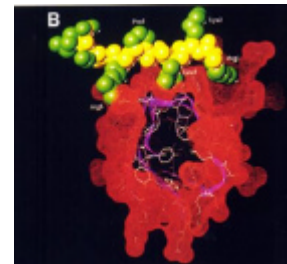
ペプチドライブラリーの発表

簡単な操作で "すべての" ペプチドを作成することが出来る!



ペプチドライブラリーの有用性の証明

ターゲット蛋白質SH3のリガントを発見

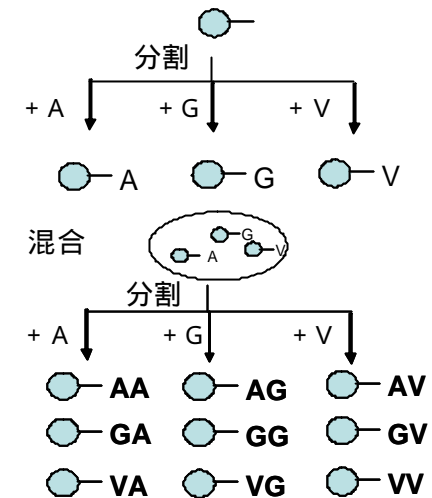


BUT、創薬研究にとって致命的な欠点 (流行しなかった)

ペプチドは基本的に膜透過性がないので、リード化合物にならない

1991 ~ 92年頃の課題!

一般、化合物でも固相樹脂を用いてライブラリー合成が出来ないか?!



ペプチドライブラリーからコンビナトリアル化学 (CC)へ いわゆるCCへの発展のきっかけ

J. Am. Chem. Soc. **1992**, *114*, 10997–10998

10997

-2.882 (2) Å).¹⁰
ture is the absence of
 $[\text{C}_2\text{O}_2]_2[\text{Pd}(\text{OTeF}_5)_4]$,¹⁰
 $[\text{C}_2\text{O}_2]_2$.^{11d} Instead, each
weakly coordinated to
acts of 3.029 (8) and
instances in AgSbF_6 ,²⁰
actively, and the sum



A General and Expedient Method for the Solid-Phase Synthesis of 1,4-Benzodiazepine Derivatives

Barry A. Bunin and Jonathan A. Ellman*

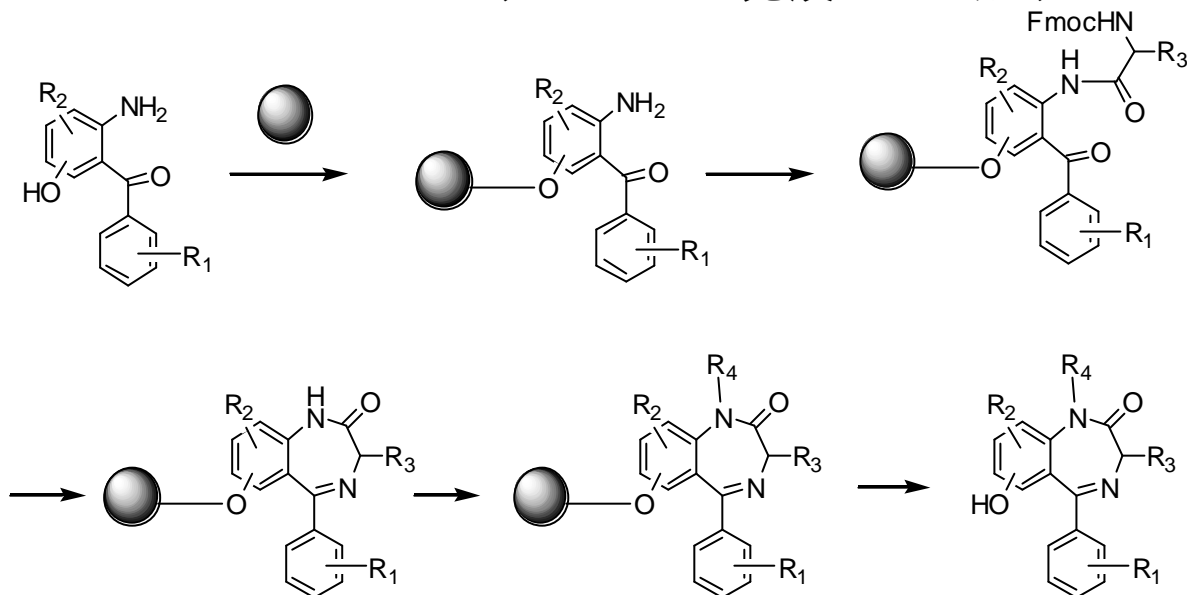
*Department of Chemistry, University of California
Berkeley, California 94720*

Received October 1, 1992

Very powerful methods have recently been developed for the combinatorial synthesis of large libraries of peptides which are then screened against a specific receptor or enzyme in order to determine the optimal peptide sequence for high affinity to that

B. A. Bunin, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10997-10998 (1992)
M. J. Plunkett, J. A. Ellman, *ibid.*, **117**, 3306-3307 (1995).

樹脂上で見事に非ペプチド性化合物ライブラリー合成に成功 いわゆるCCへの発展のきっかけ

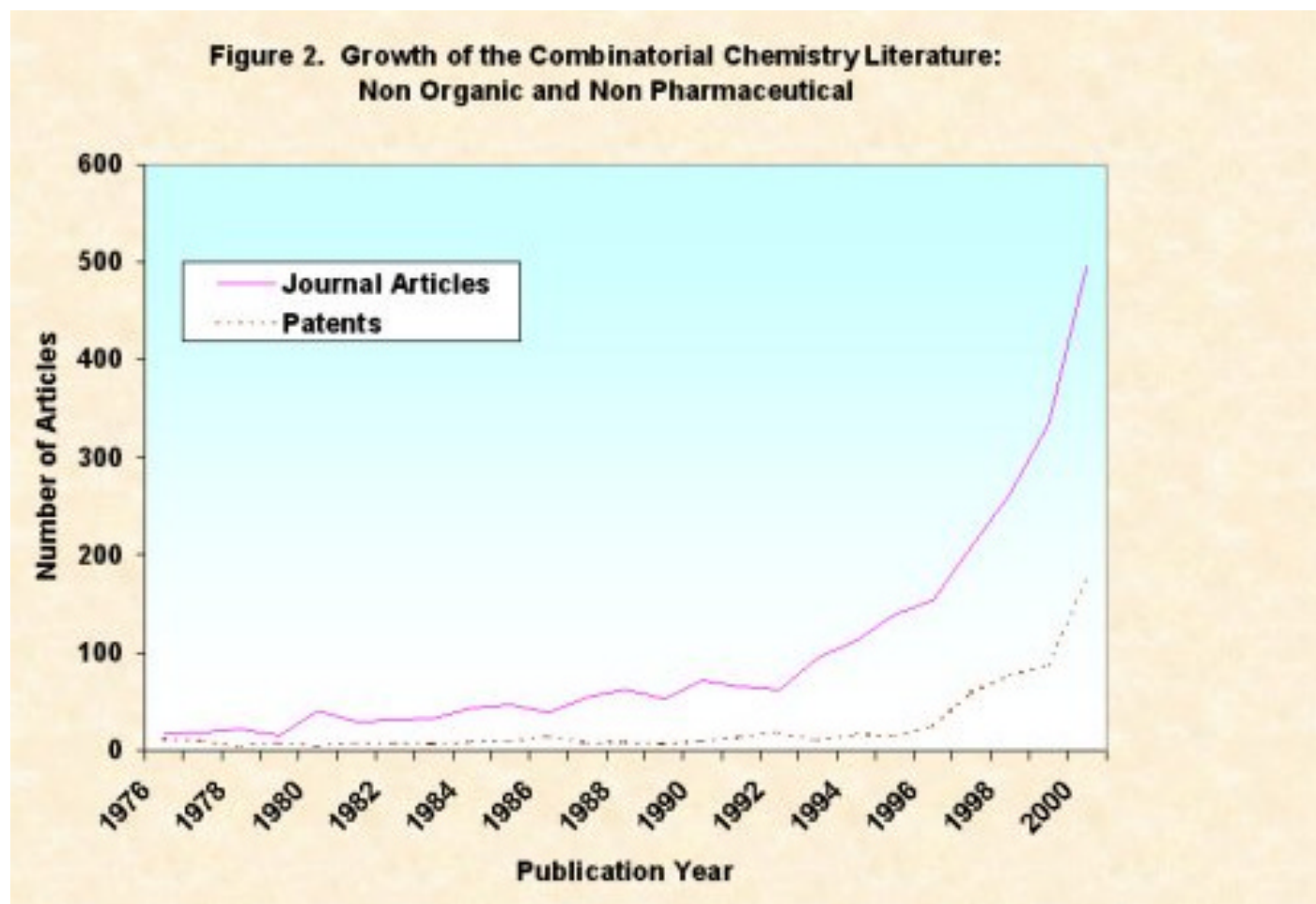


(例) R1, R2, R3, R4
それぞれ 4種類 (16種類) の試薬の場合、256化合物の合成可能
(まさに組み合わせの化学(Combinatorial Chemistry:CC)の威力)

コンビナトリアル化学の適応範囲がペプチドから一般化合物まで広がるきっかけに

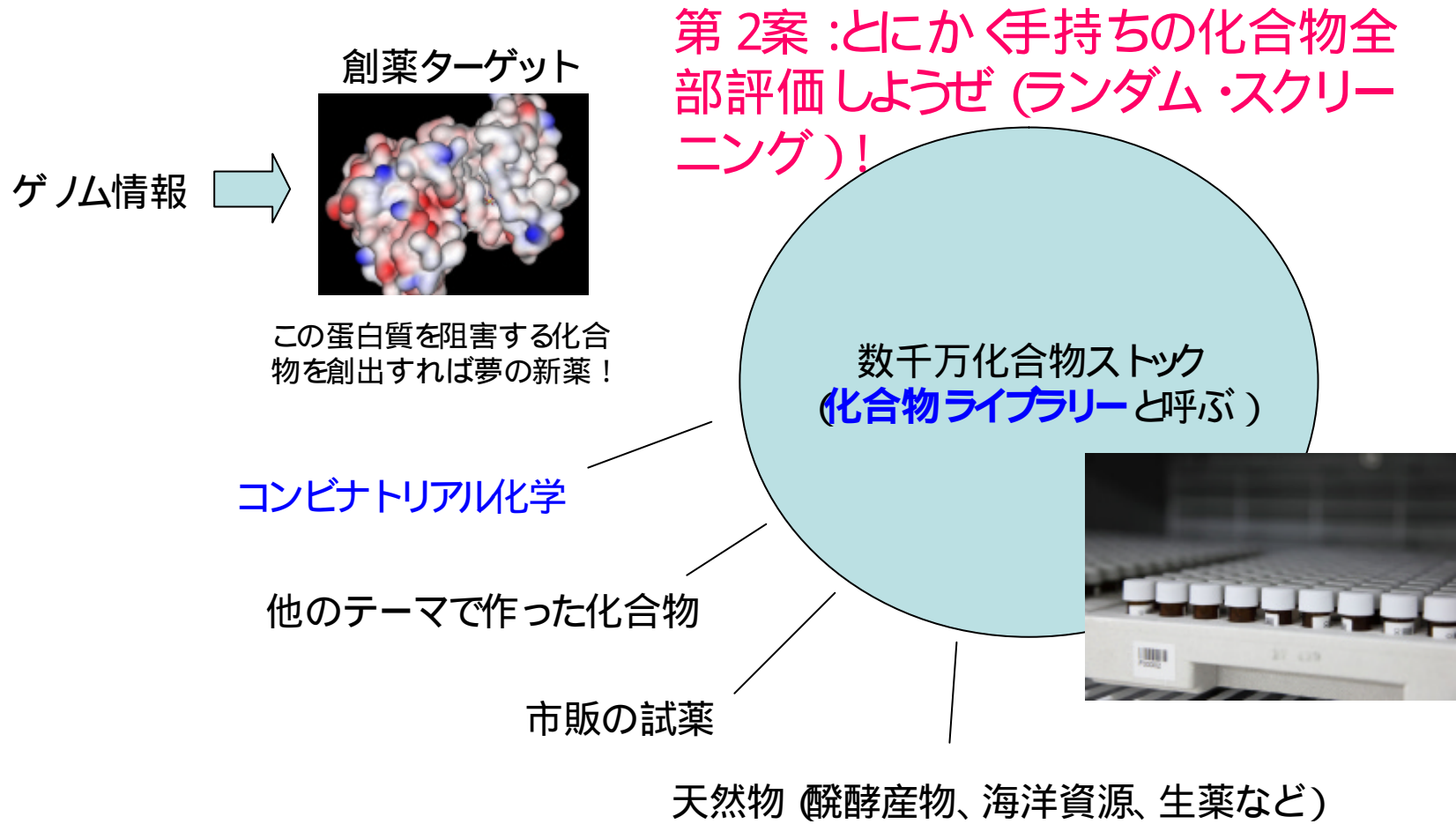
B. A. Bunin, J. A. Ellman, J. Am. Chem. Soc. 114, 10997-10998 (1992)
M. J. Plunkett, J. A. Ellman, *ibid.*, 117, 3306-3307 (1995).

その後のコンビナトリアル化学の発展



各製薬企業は独自化合物ライブラリー充実競争に (数千万化合物)

ランダムスクリーニングとCC-HTS



創薬競争に打ち勝つため、各製薬企業は
「独自化合物ライブラリー」収集に集中

コンビナトリアル化学の創薬研究に与えた影響

- これまで 1誘導体ずつ合成していた探索合成研究スタイルに革命
(最大 10誘導体/月/人 数千～数万誘導体/月/人 ロボット化)
- 固相有機化学の発展 (後処理の簡便さ)

膨大な数の化合物ライブラリーの構築 (数千万化合物/企業)

シード・リード化合物の無い新規ターゲット蛋白質での適応 (ランダム評価)

新リード化合物創出 (新規シート探索の充実)

- 1度に多種類のサンプル評価が必要 **HTSの発展**

ロボット化 (宇宙産業、軍需産業技術)
100万サンプル/日まで可能

HTS(High Throughput Screening)
ロボット例



自動合成ロボット例

