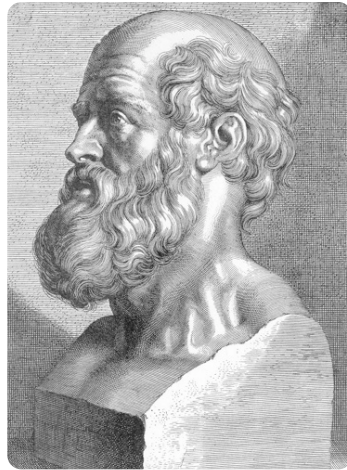


# バイオマテリアル基礎論

第三回

名古屋大学  
シンクロtron光研究センター  
渡邊信久



ヒポクラテス：(紀元前460年 - 紀元前377年)

さて、今日が3回の授業の最後になります。

## 医薬品開発 と 結晶構造解析

これまでの2回で、「薬」とはどういうものなのか、また、薬が作用する標的蛋白質の構造との関連で、副作用と薬剤耐性の話をして来ました。最初にも話したように、今回の授業の目標は、そうした分子構造のレベルで、「薬」の作用や問題点が議論出来るようになる、ということです。

という訳で3回目を始めましょう。

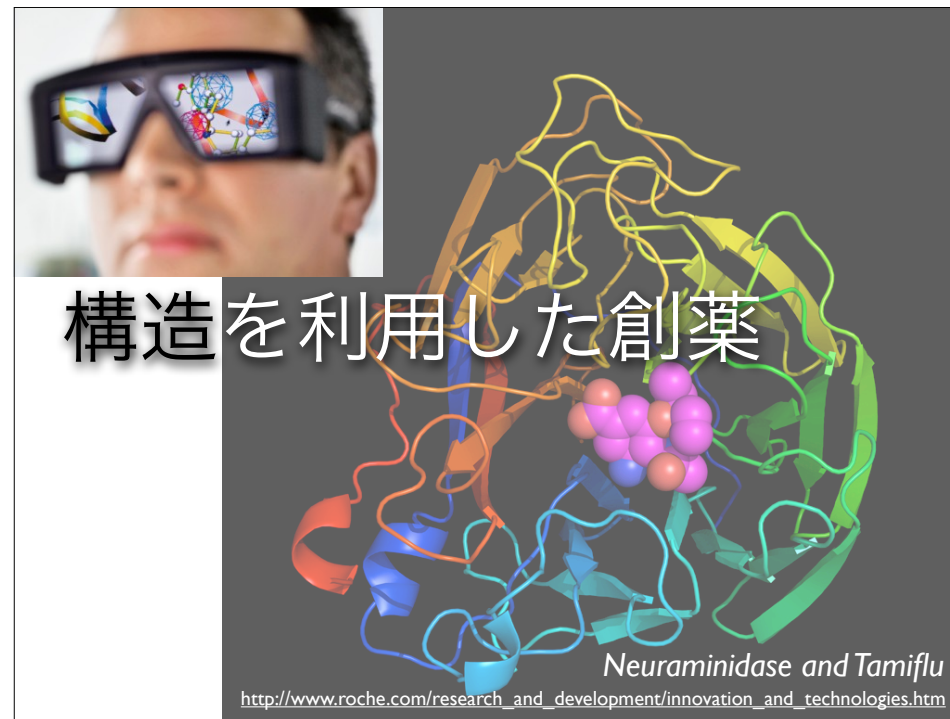


さて、これは一回目の最初の導入で使ったスライドです。それから、2回の授業をしてみました。

そもそも「薬」とはなんですか。今ならどういふに答えますか？

(何人かに質問する)

特定の標的蛋白質に、**選択的・特異的に結合**して、その標的蛋白質の機能を阻害したり、あるいは活性化したりするような化合物ですね。ですから、今日のテーマ「創薬」という観点からは、そうした**選択的・特異的に結合**する化合物を、どうやって効率的にみつけ出すか、そして、それを元にしてどのように改良するか、ということになります。



ということで、今回は医薬品の開発、つまり**創薬とX線結晶構造解析**の関係を見ていくことにします。

これはロッシュのホームページにある**ノイラミダーゼ**に結合した**タミフル**の様子です。構造解析が成功すれば、このように分子レベルで結合の様子を理解することが出来る。そこまでは前回いろんな例を見ました。次は、そうした構造情報を今度は薬の開発・改良に利用することが出来る、というのが今日の主題です。

# 従来型の創薬

## Ligand-based drug design

(Pharmacophore-based drug design)

カギ穴の構造が  
分っていない



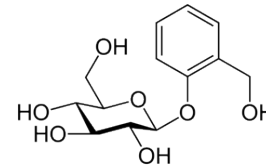
「構造情報の利用」の話の前に、[従来型の創薬手法](#)をざっと見ておきます。

さっきも話したように、今日の主題は「標的蛋白質の構造」が分っている、そうした状況での創薬ですが、そうした[構造情報が無い時代](#)にも薬の開発は行なわれて来たわけです。

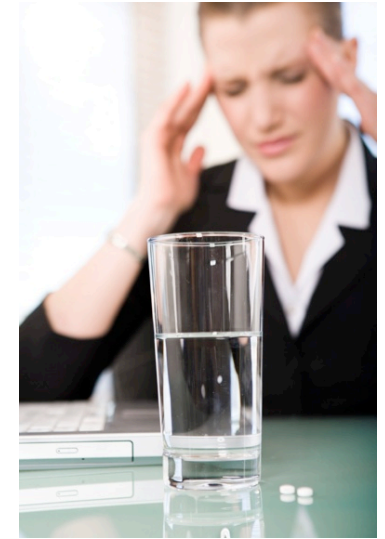
その方法は[リガンド・ベースド・ドラッグ・デザイン](#)と呼ばれます。リガンド、つまり何らかの薬理活性のある化合物そのものに注目して、それを改良していく、そうした方法です。

今回の授業で出て来た例を二つ見て復習しておきます。

# Ligand-based drug design



「サリシンが痛みに効く」

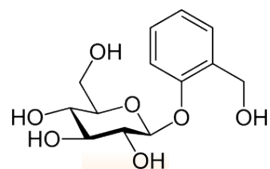


まずは、前回使った[アスピリン](#)の例です。

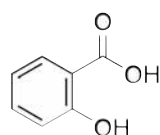
一回目の「薬の歴史」でも見たように、アスピリンの実用化は1899年ですから、二回目の授業で見たプロスタグランジン類による痛みの分子メカニズムが解明されるよりもずっと前です。

柳の木の皮の鎮痛成分[サリシン](#)が解明されたのは、1820年で、

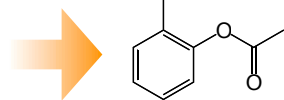
## Ligand-based drug design



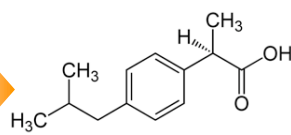
化合物の立体化学・物理化学的特徴を利用してデザイン



salicylic acid



acetylsalicylic acid  
(Aspirin)

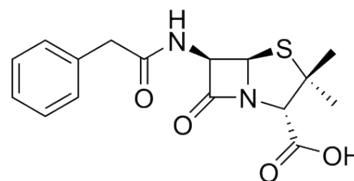


Ibuprofen

それを踏まえて、類似化合物を探し、副作用を抑えるためにpKaをどうやって下げるかを研究し、さらには活性の高い化合物にするにはどうすれば良いかを「化合物ベース」で検討し、たくさんの化合物を合成してテストを繰り返しています。

この時、前回見たようなCOXの構造情報はないわけです。

## Ligand-based drug design



「Penicillinがブドウ球菌の感染症に効く」

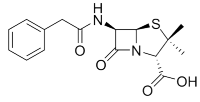


もう一つの例は、 $\beta$ ラクタム系の薬の開発です。きっかけは、ペニシリンの発見ですが、当時、ペニシリンがなぜ病原菌の感染症に効くのか分っていた訳ではありません。そもそもペニシリンそのものの構造が分るのにも21年かかっています。1949年にペニシリンの構造がこういうものだと分ります。

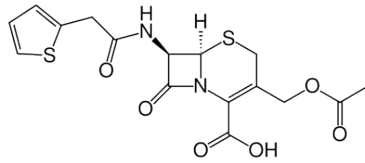
(構造解析したのは誰だっけ?)

前回見たように、耐性菌とのたたかいで、さまざまな $\beta$ ラクタム系の薬が開発されています。

# Ligand-based drug design



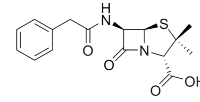
Penicillin



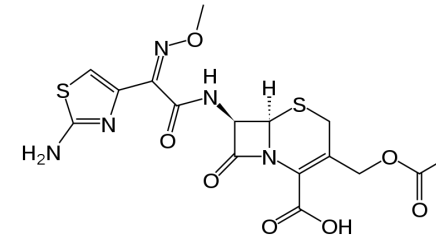
Cefalotin

前回みたセフェム系のセファロシンや、

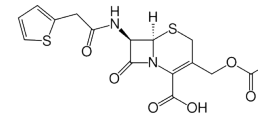
# Ligand-based drug design



Penicillin



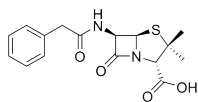
Cefotaxime



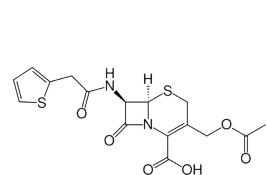
Cefalotin

セフォタキムが開発されますが、

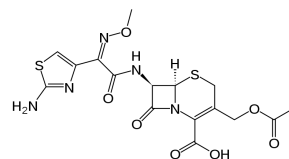
# Ligand-based drug design



Penicillin



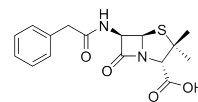
Cefalotin



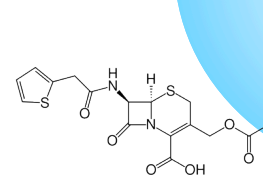
Cefotaxime

こうした開発の段階では、標的蛋白質とこうした薬剤の結合の分子メカニズムが意識されていた訳ではなく、

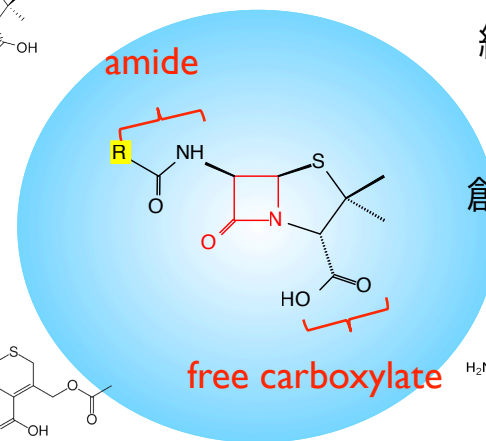
# Ligand-based drug design



Penicillin

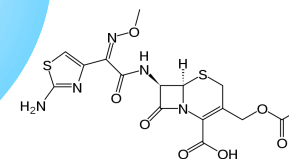


Cefalotin



結果の蓄積

創薬の"feeling"

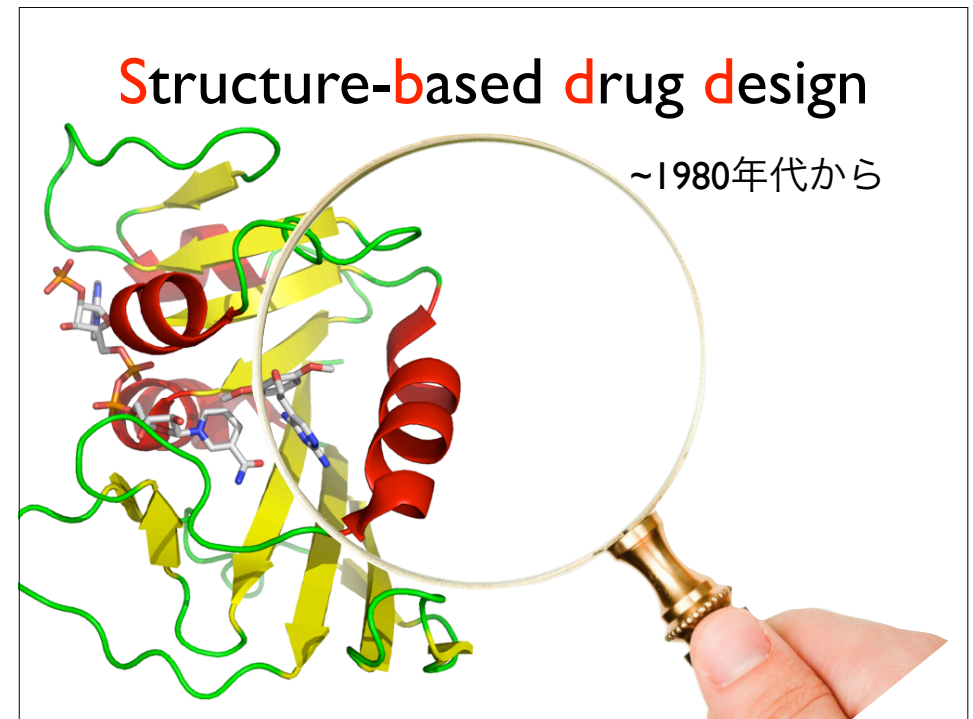
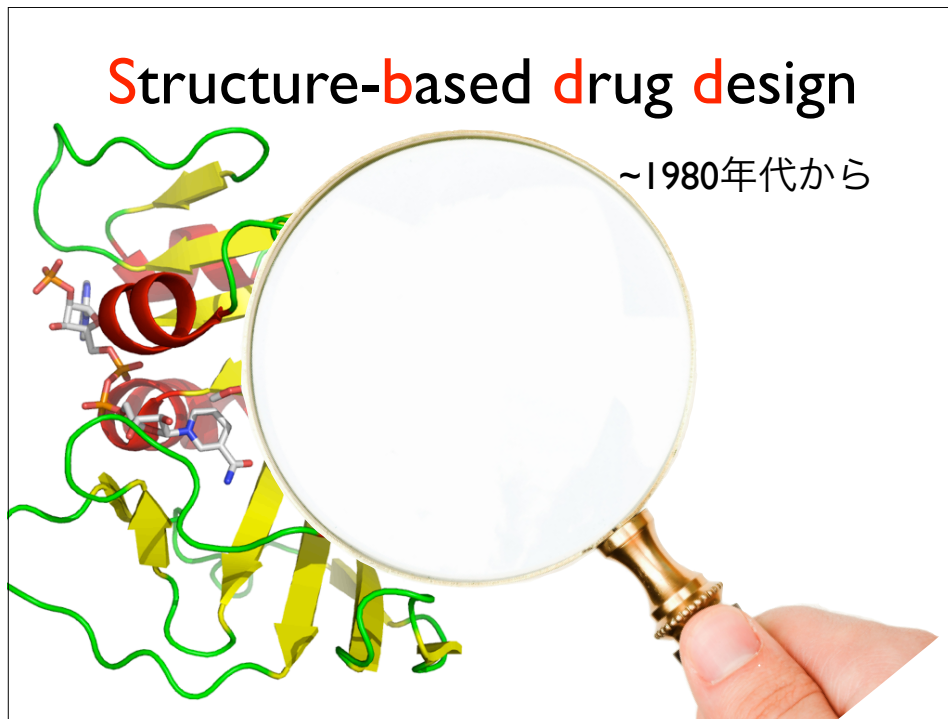


Cefotaxime

こうした化合物の開発を通して、結果が蓄積されていき、それが新規化合物設計のための経験的な"feeling"として利用されました。ベータラクタム系の場合、ベータラクタムの他に、ここにフリーのカルボン酸と、ここのアミドが必須ということが「経験」として蓄積され、あとはここの"R"部分を色々に変更して高活性の(というか耐性菌のβラクタマーゼに分解されにくい)化合物を得る努力がされたということになります。

このように、LBDDでは、標的蛋白質の側ではなく、化合物側(リガンド)の性質に注目して改良を加えていくということです。





医学，生物学の発展にともない，病気の原因となっている蛋白質，つまり創薬の標的蛋白質が明らかにされ，さらには，1980年代からは標的蛋白質の構造解析も可能となって来ます。

こうした手法は，**標的蛋白質の「構造」**を創薬に活かすという意味で，Structure-based drug design (SBDD)と呼ばれています。

標的蛋白質の構造が既知で，





# LBDD & SBDD



LBDD



SBDD

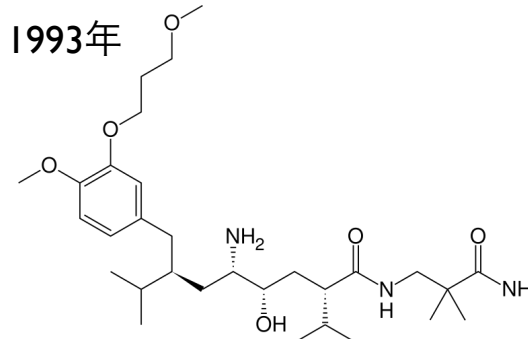
LBDDとSBDDを簡単に例えると、こんな説明はどうでしょうか。

左がLBDDです。LBDDでは、「左手」が活性があると分った時に、それに似ているもの、例えば「右手」を開発していきます。左手がなぜ活性があるのかは分かりません。

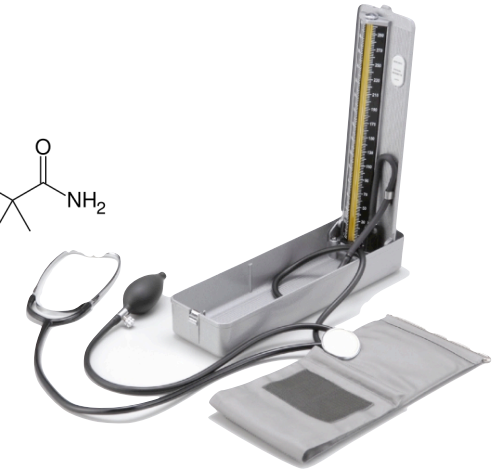
それに対して、SBDDでは、標的がどういう構造をしているか(この場合は雪の上の手の形)が分っていて、それにピッタリ合うような「右手」を開発していく訳です。

# Renin阻害剤のSBDD

1993年



Aliskiren



話を戻しましょう。

参考文献にも載せておいたように、[レニン阻害剤の開発](#)については具体的な情報が既にたくさん公開されているので、SBDDの例として、ここではレニン阻害剤の開発を見てみます。

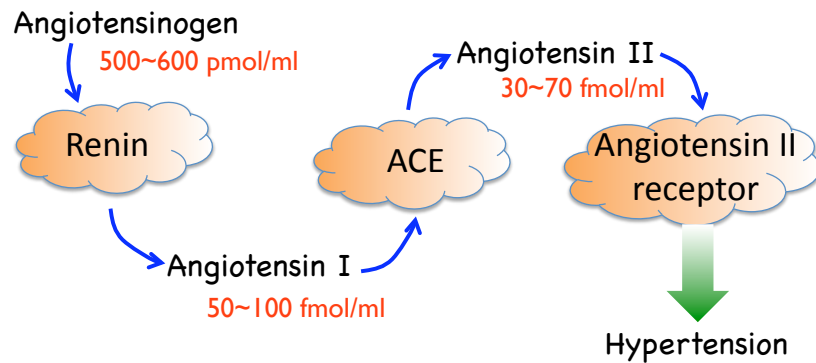
ここにある[アリスキレン](#)という化合物は、ノバルティス(開発の初期はチバ・ガイギーでした)がSBDDの手法を使って、1993年に開発しました。アリスキレンは、アメリカでは2007年に承認されています。日本ではラジレス錠(150mg)として、2009年の7月7日に製造販売が承認されたばかりのホットな医薬品です。

レニン阻害剤なので高血圧の薬ですが、レニンってどこかで習っていますか？

(訊いてみる：無駄かな?)

やはりここは、最初にレニンってなかに、からでしょうか。

# Renin-angiotensin system



レニン・アンジオテンシン系は、生体の**血圧調節**に重要な酵素-ホルモン系です。アンジオテンシノーゲンは肝臓で産生され、血中へ分泌されます。腎臓で産生される酵素レニンが、このアンジオテンシノーゲンを切断し、アンジオテンシンIが生成され、さらにアンジオテンシン変換酵素(ACE)によりアンジオテンシンIIへと変換されます。このアンジオテンシンIIが、特異的受容体を介して血管を収縮させるため血圧が上昇するわけです。

レニンを阻害すれば、このホルモン系を最上流でストップさせることが出来、高血圧症を治療することが出来ます。

赤の数字はマウスの血漿中の標準的な濃度です。

# Renin阻害剤の歴史

1950~1960：renin抗体でブロック

1960~ 天然有機化合物の探索

ペプチド性阻害剤(基質類似物)の開発

DRVYIHPFHLVIHN...

遷移状態理論の利用

**高血圧症**は、その合併症と合すると全世界で死亡原因のトップですから、治療を目指した創薬にも長い歴史があります。

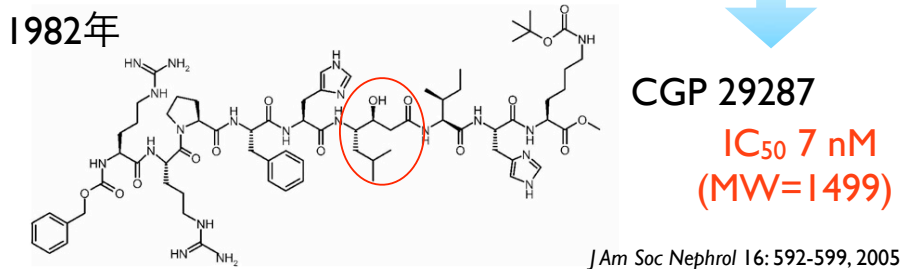
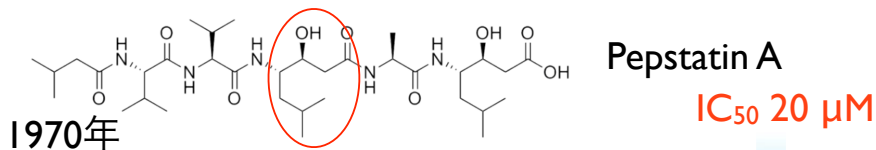
1950から60年代は、**レニン抗体**でブロックしてしまおうという考え方が流行りましたが、そもそも純粋なレニンを精製することが出来ず、モノクローナル抗体の開発が出来ませんでした。

1960年代以降、**レニンの基質のペプチド配列を参考にして阻害剤**の開発が進められます。ここに書いたのがレニンの内在性基質の配列ですが、それに遷移状態理論も適用してたくさんのペプチド性阻害剤が開発されました。

(遷移状態理論ってなに?)

# Renin阻害剤の歴史

第一世代：ペプチド性阻害剤



こうして、遷移状態をミミックした非天然アミノ酸スタチン (statine)(赤丸で囲んでところ)を含むペプチド性の阻害剤が開発されます。

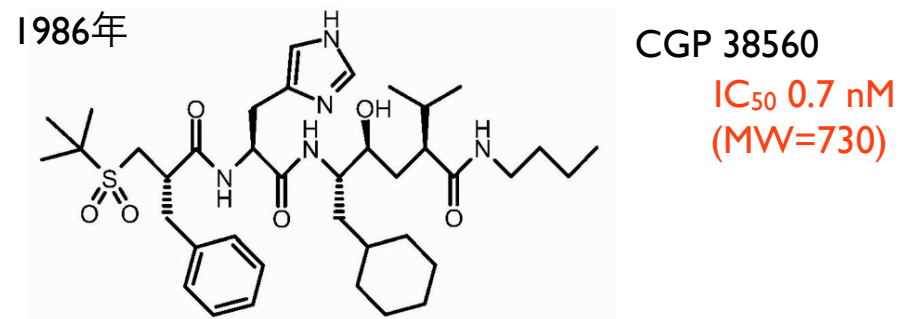
$IC_{50}$ は50%阻害濃度です、小さいほど良いですが、前回濃度の議論を少ししたように、普通の薬が体内で阻害剤としてちゃんと働くためには、nM以下が必要です。

1970年のペプスタチンAからRIP(レニン阻害ペプチド)を経て、1982年のCGP29287では、 $IC_{50}$ が一桁nMを達成しました。

しかし、CGP29287の場合、分子量が1500ほどもあり、**大き過ぎ**て実際の薬剤としての実用性は望めないということになります。

# Renin阻害剤の歴史

第二世代：ペプチド性阻害剤



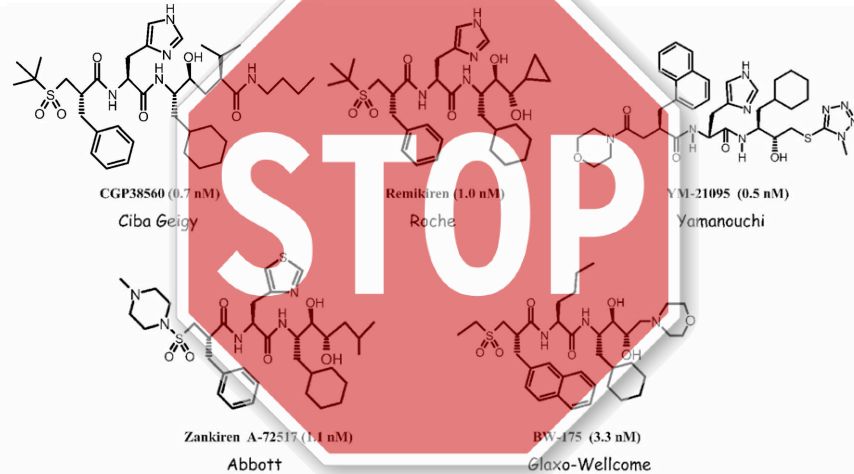
*J Am Soc Nephrol* 16: 592-599, 2005

その後も開発が進められ、比較的小型で、阻害活性が高い、第二世代のペプチド性阻害剤が開発されます。

ここに上げたのは、1986年に開発されたCGP38560ですが、分子量730で、 $IC_{50}$ は1nMを切って、0.7nMを達成しました。

# Renin阻害剤の歴史

第二世代：ペプチド性阻害剤



ここにあげたように、この時期には、世界の製薬企業で開発競争が進められていました。これは山之内の開発していたものです。

いくつかの化合物はIC50で1nM以下を達成しています。

しかし、残念なことに、こうしたペプチド性の阻害剤は、この段階で開発がストップしてしまいました。

(なぜでしょう?)

# Renin阻害剤の歴史

経口投与の壁



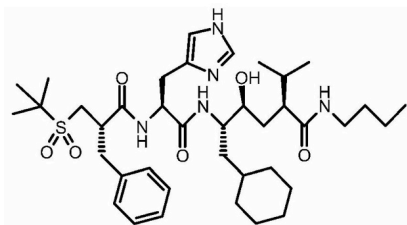
これらのペプチド性の阻害剤は、経口投与してもほとんど吸収されず、生体内で不安定であり、すぐに代謝されてしまうという欠点を克服することが出来なかったのです。例えば、CPG38560の経口吸収率は、わずか1%以下でした。

薬の開発にとっては、経口投与が出来るかどうかということは非常に重要です。経口投与が出来ない場合は、病院での注射といった処置が必要になりますから、「自宅で定期的に服用して下さい」とはならない訳です。

タミフルが多用されてリレンザがあまり使用さしてもらえないのもこのためですね。もっとも、そのおかげでリレンザ耐性の新型インフルエンザウィルスは、出現が遅かった(2010年3月発表)ようですが。

# Renin阻害剤とSBDD

1987年：2Dから3Dへ



CGP 38560

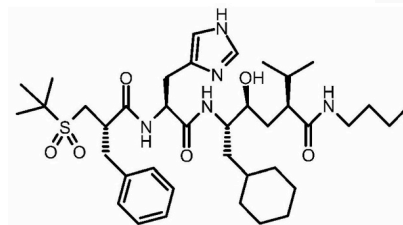
話を戻します。

これは、さっきのCGP 38560ですが、それまでのLBDD的な開発方法では、こういう化合物(リガンド)の化学式をよく見て、どこかの官能基をちょっと似ている別のものに変えて活性をみてみよう、といった試行錯誤で開発が進んでいた訳です。

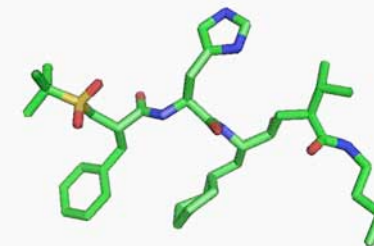
それが1980年代に標的蛋白質の構造が現実的な速さで決定出来るようになって、状況が変わります。

# Renin阻害剤とSBDD

1987年：2Dから3Dへ



CGP 38560



何が違ったかということ、左のように構造を平面的に見ていることから、この右のように三次元的に見て考えようということです。

特に、何らかの化合物が標的蛋白質に結合した複合体として構造解析が出来ていれば、その化合物の各原子は、標的蛋白質との結合にとって意味がある向きや位置になっているはずで、それらを理解した上で新規の化合物の設計に活かそうということです。

つまり構造に基いた薬剤設計(SBDD)なわけです。

## Renin阻害剤とSBDD



Renin + CGP 38560

PDB ID: 1RNE

*J Struct Biol.* 1991, 107(3):227-36.

## Renin阻害剤とSBDD



Renin + CGP 38560

PDB ID: 1RNE

*J Struct Biol.* 1991, 107(3):227-36.

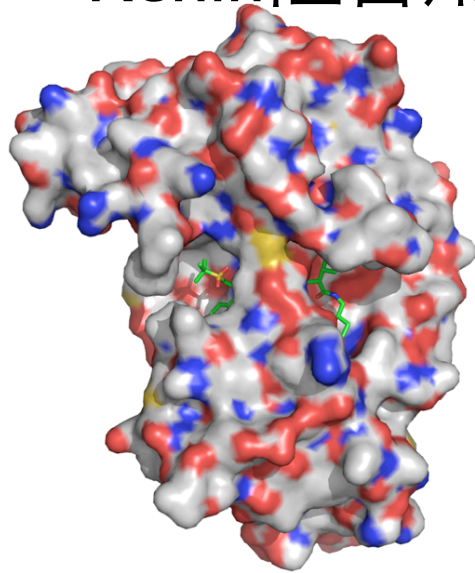
さて、レニンにCGP38560がどのように結合しているか  
ということですが、複合体の結晶構造解析が、1991年に  
実施されています。

こんな感じです。

やはり、例によって分子表面を描いてみます。



# Renin阻害剤とSBDD

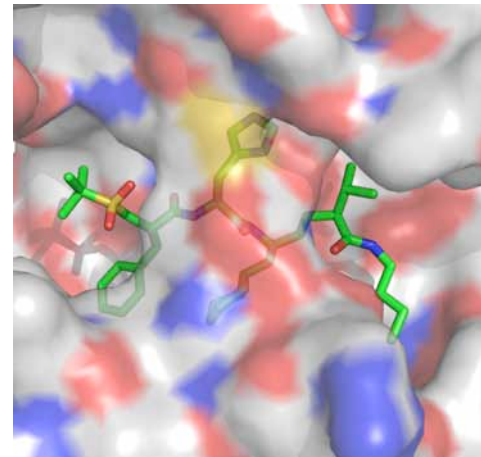


Renin + CGP 38560

PDB ID: 1RNE  
*J Struct Biol.* 1991, 107(3):227-36.

レニンプロテアーゼは、このように活性部位は良くあるように「くぼみ」になっていて、

# Renin阻害剤とSBDD

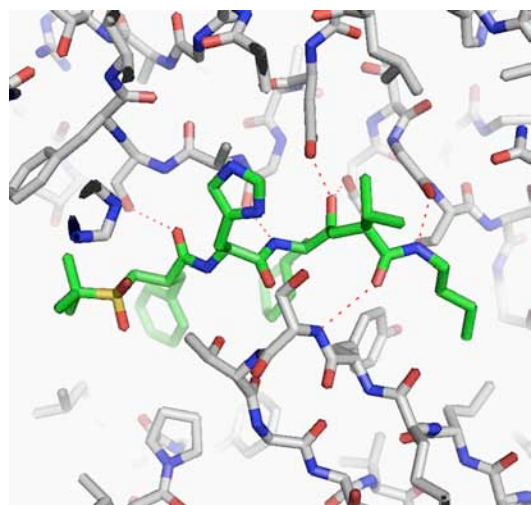


Renin + CGP 38560

PDB ID: 1RNE  
*J Struct Biol.* 1991, 107(3):227-36.

基質の代わりに、活性部位にCGP38560が結合しています。

# Renin阻害剤とSBDD



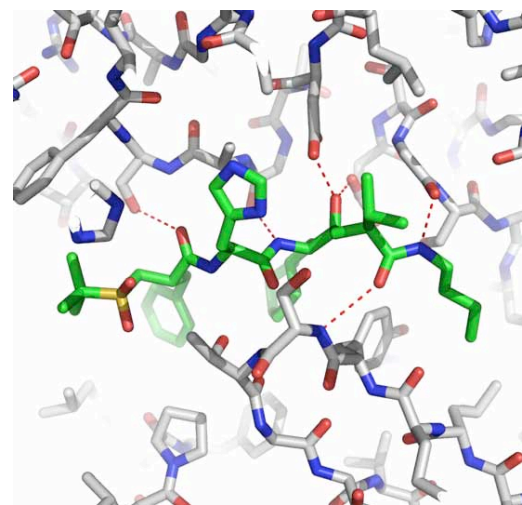
Renin + CGP 38560

PDB ID: 1RNE  
*J Struct Biol.* 1991, 107(3):227-36.

構造解析が出来れば、このように、CGP38560とレニンの相互作用が分子レベルで理解出来ますから、

(何を考えればいいんですか?)

# Renin阻害剤とSBDD



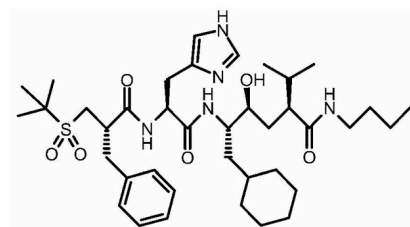
Renin + CGP 38560

PDB ID: 1RNE  
*J Struct Biol.* 1991, 107(3):227-36.

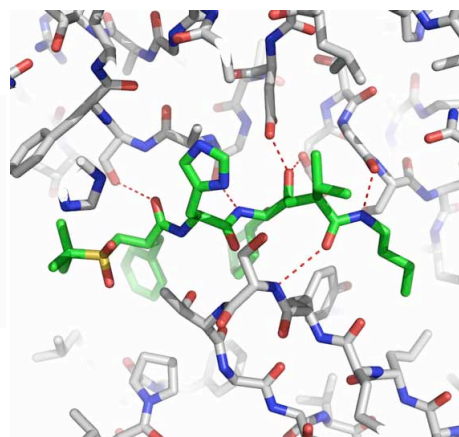
この情報を活かして、ペプチド性ではない阻害剤を設計することが可能だろうということになります。

# Renin阻害剤とSBDD

2Dから3Dへ



CGP 38560

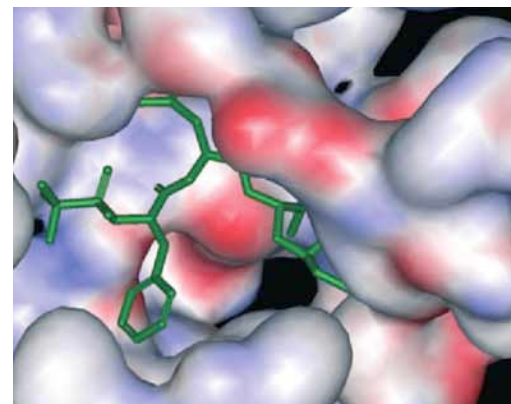


左の化学式で描かれた化合物には自由に回転する結合がたくさんあり、紙の上にはこのように簡単に描けますが、実際に立体的にはどんな構造になっているかは分かりません。大変な自由度があります。

分子自体のエネルギー的に安定なコンフォメーションは計算出来るでしょう。しかし、真似すべきなのは、その安定構造ではなくて、右のように、レニンとの相互作用を可能にしている時の「三次元的な構造」だということが重要です。

# Renin阻害剤とSBDD

1987年：実際はホモロジーモデル



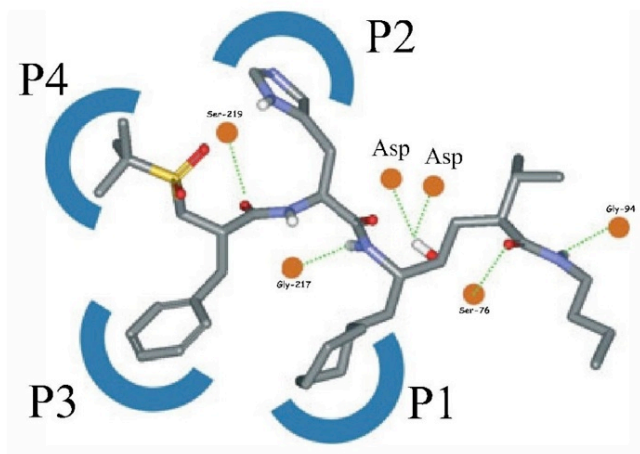
Renin + CGP 38560

Chem Biol Drug Des 2007; 70: 557-565

ちょっと「どんでん返し」ですが、実は1987年時点では、レニンのX線結晶構造解析は、まだ実現されていませんでした。たぶん世界中の製薬企業で結晶化の努力がされていたはずですが、まだ出来ていなかったのです。なので、当時 Ciba-Geigy (Novartis)がSBDDに使用したのは、ペプシンの構造を元にして作ったレニンのホモロジーモデル(類似の蛋白質の構造を元にして作ったモデル構造)でした。

結晶構造が解析されている今なら、さっき見た「結晶構造」に基いてやっているはず、ということです。

# 構造から抽出した情報

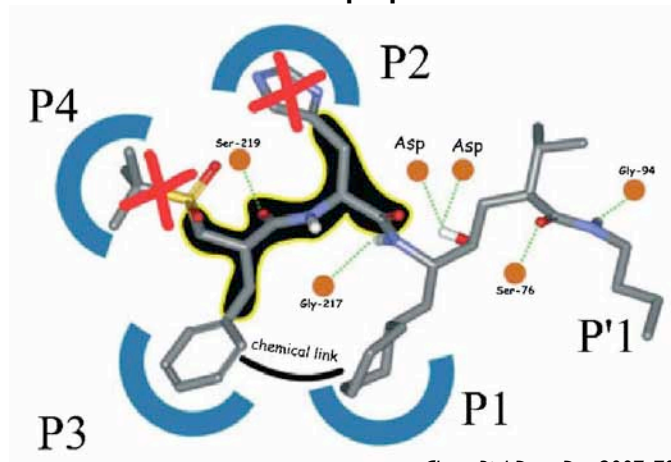


Chem Biol Drug Des 2007; 70: 557-565

さて、さっきも話したように、構造解析(この場合は実際はホモロジーモデルですが)で見えているのは、CGP38560の”bio-active”なコンフォメーションということです。つまり、CGP38560の、どういう構造が、レニンとの結合に重要なのか、ということです。こうして見えて来た情報は、レニンとCGP38560の結合には、ここに緑の点線で示されている「6つの水素結合」とP1からP4の「4つの疎水結合ポケット」が大事そうだ、ということです。

# Strategy

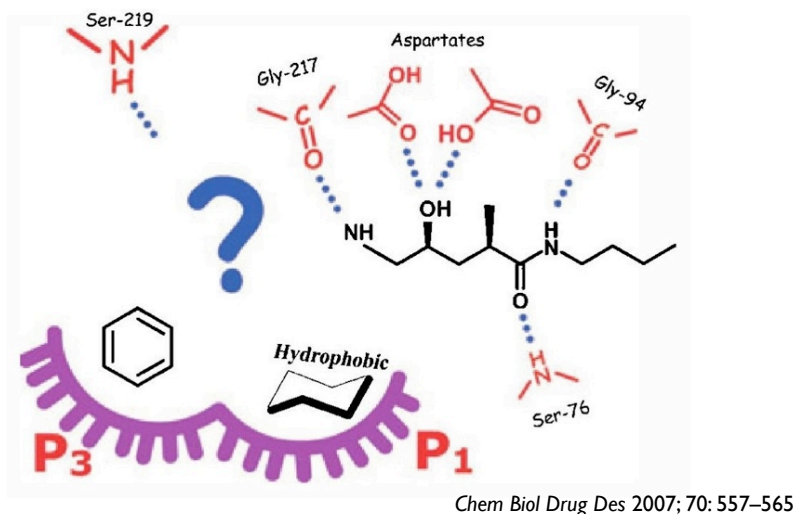
We do not want to use peptide...



Chem Biol Drug Des 2007; 70: 557-565

この情報に基づいて分子設計を進める訳ですが、この黒い部分には、問題の多い「ペプチド分子」は使いたくありません。彼等は4つの結合ポケットのうち、P1, P3を重視し、さらにその2つのポケットに入る部分を直接リンクしてレニンに認識され易い構造を保証することを考えます。こうした芸当はペプチドでは出来ません。P2, P4のポケットは、後で必要になったら再度検討することにし、それよりもSer219との水素結合を重視しました。

# Operational strategy



つまり、条件としてはこんなふうです。

右半分はCGP38560の構造をそのまま使うと、6つの水素結合のうち5つは残せません。

あとは、さっきも見たように、P1とP3の2つの疎水ポケットにうまくはまるような疎水部を繋いで、しかもSer219との水素結合を確保することが出来るような化合物を設計してみよう、ということになります。要するに、ペプチド以外の化合物を使って、レニンに結合しているCGP38560の三次元構造そのものをミミックしてみようということです。

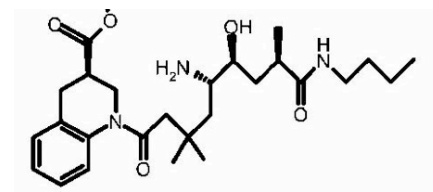
こうして多くの構造がメディシナルケミストによって提案されました。そうした平面的に設計された分子を3Dグラフィクスで実際にレニンに結合させた際に、基底状態よりも1 kcal/mol以上エネルギーを要すものは除外します。

(なぜですか?)

例えば水素結合一つで2~3kcal/mol.

# 最初の非ペプチド性阻害剤

tetrahydroquinoline scaffold



IC<sub>50</sub> 0.8 nM

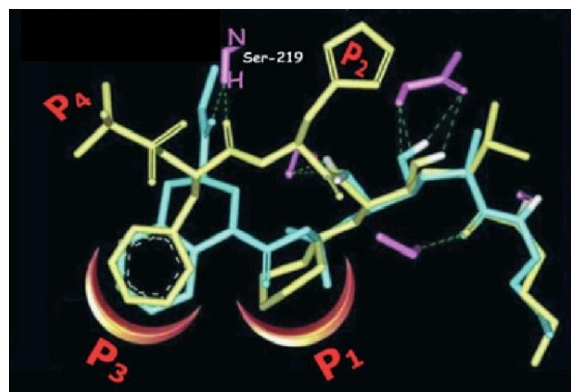
Chem Biol Drug Des 2007; 70: 557–565

非ペプチド性阻害剤としての最初のブレイクスルーとなったのが、この図のテトラヒドロキノリンによるものでした。

IC<sub>50</sub>は0.8nMを達成出来ています。



## 最初の非ペプチド性阻害剤



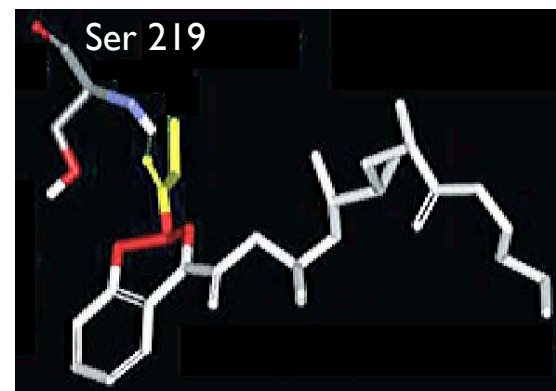
THQ inhibitor

CGP 38560

Chem Biol Drug Des 2007; 70: 557-565

この分子の立体構造を、設計モデルとしたCGP38560と重ねてみると、このようになっています。重視しなかったP2, P4はないですが、CGP38560と同じように、P3ポケットにアニリノのフェニル部分が入り、P1ポケットとP3ポケットを直接繋ぎ、Ser219との水素結合も可能な構造です。

## 最初の非ペプチド性阻害剤



IC<sub>50</sub>

0.4 × 10<sup>-6</sup>

0.5 × 10<sup>-7</sup>

0.8 × 10<sup>-9</sup>

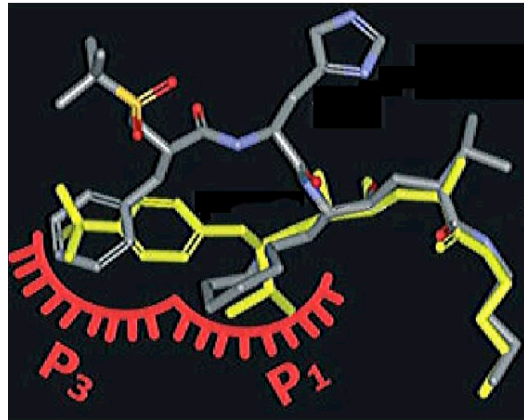
Chem Biol Drug Des 2007; 70: 557-565

彼等は、実際にこのテトラヒドロキノリンの合成過程でIC<sub>50</sub>を見ています。

白の直鎖キノリノの段階ではIC<sub>50</sub>が0.4μMしかないのが、赤のリンクでテトラヒドロキノリン環を形成した段階で50nMになり、さらに、Ser219との水素結合を意識して、3'にエステルを付加することで0.8nMを達成しました。



## Phenyl-based scaffold ^



CGP 38560

Phenyl-based inhibitor

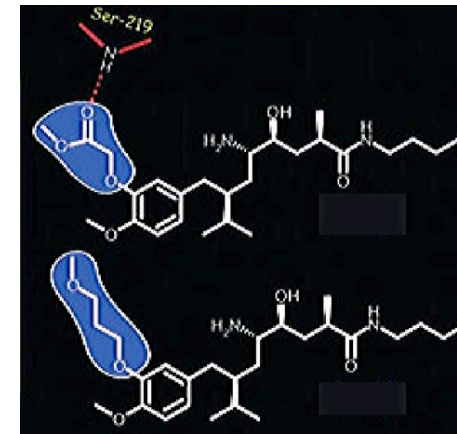
IC<sub>50</sub>  
0.1 μM

Chem Biol Drug Des 2007; 70: 557-565

その後、化学合成の容易さの観点でも改良が進められ、P3ポケットに入る部分を *tert*-butylにしたフェニルベースの化合物が提案されます。

この最初の化合物はIC<sub>50</sub>が0.1 μMもありますが、

## Phenoxy series ^



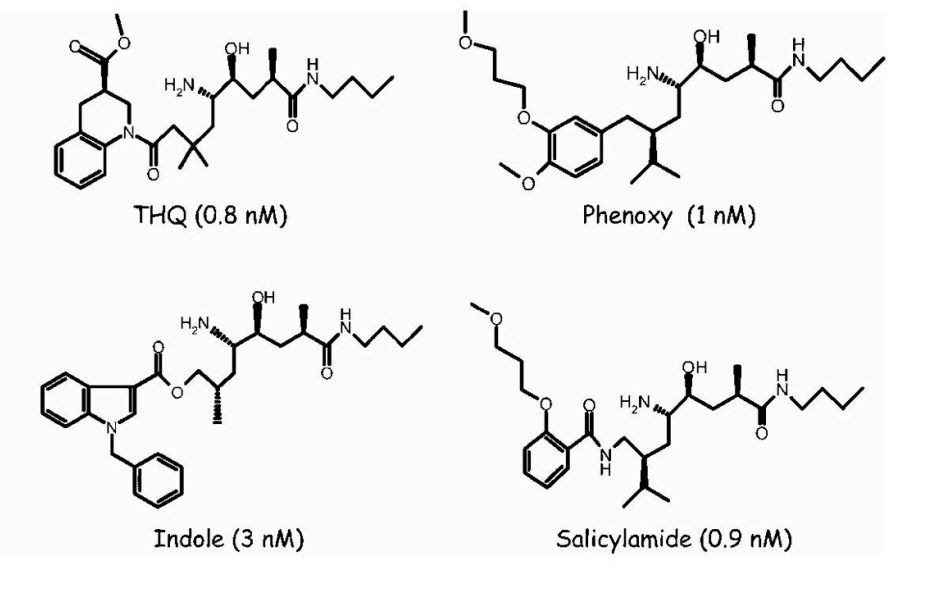
IC<sub>50</sub>  
4 nM  
↓  
1 nM

Chem Biol Drug Des 2007; 70: 557-565

*tert*-butylをメトキシに換え、さらにSer219との水素結合の可能性を追求するために、フェニルリングの3'に側鎖を付加しました。

メトキシを持つこの化合物はIC<sub>50</sub>で1nMを達成します。

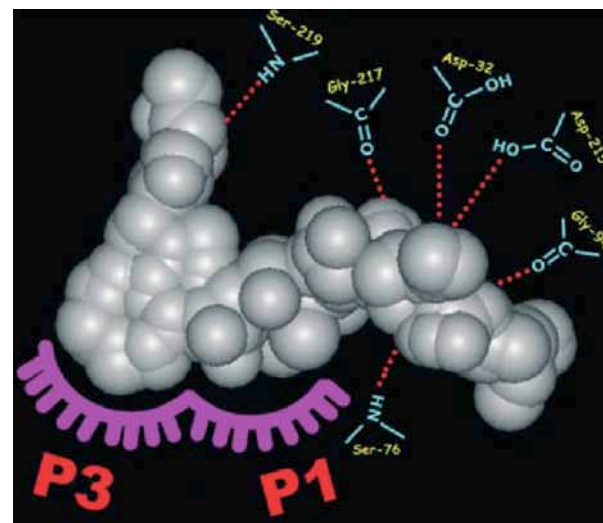
## SBDDで提案された化合物



実は、ノバルティスでは、4つの研究室で並行して開発を進めていたようで、この図は、それぞれの研究室が独立に提案した化合物です。

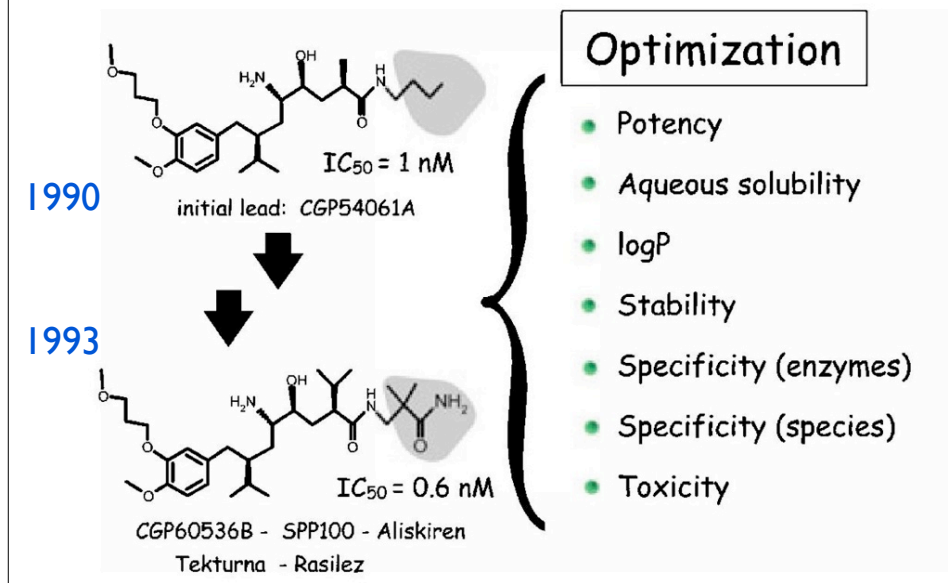
これらがLBDDではなくSBDDで開発された化合物であるということが、次のように、全部の化合物の立体構造を重ねてみると良く分ります。

## SBDDで提案された化合物



このように、レニン阻害剤として提案された4つの化合物は、レニンとCGP38560の立体構造から考えられていた「立体的な」設計指針に合致している訳です。

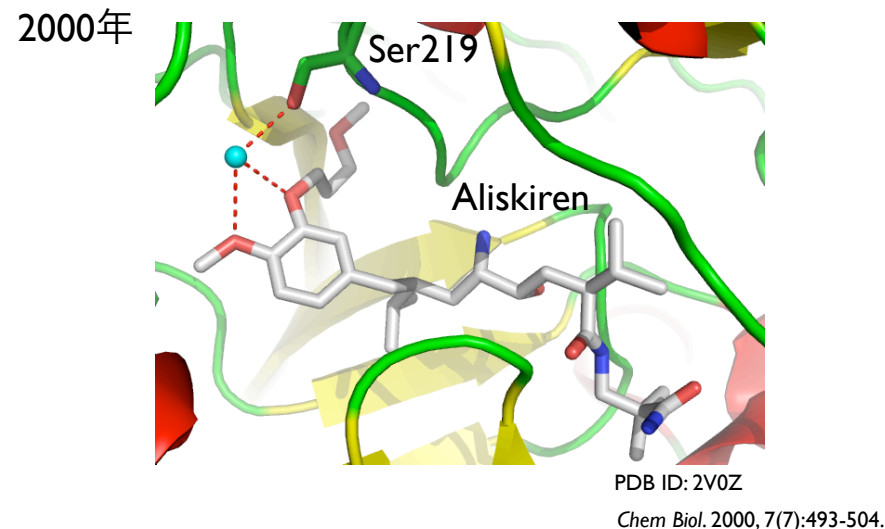
## その後の改良



さて、フェニルベースの化合物から、こうしたことに注意を払いながら、さらに改良が進められ、1993年にはIC<sub>50</sub>で0.6nMのこの化合物が開発されます。

これが、先程紹介したように、日本でも2009年に認可され、2009年10月から「ラジレス錠150mg」として販売が開始されているAliskirenです。

## 実際の構造解析



実は、この例には、もう一つ「落ち」があります。

レニンと化合物の結晶構造解析がなかったため、この開発はホモロジーモデルによる構造を出発点としていました。

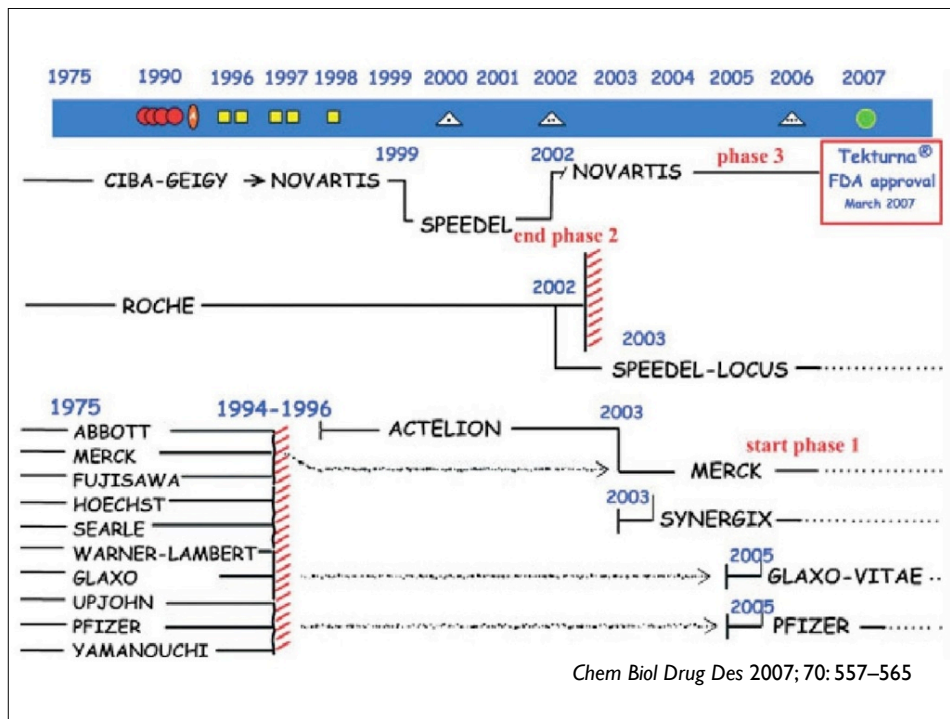
そのことが、どの程度影響していたかは不明ですが、レニンとアリスキレンの複合体の結晶構造解析の結果は、Ser219とアリスキレンの間には直接の水素結合は無く、「水を介した」水素結合があったのです。

「落ち」と言いましたが、2000年当時は「結果良ければ、すべて良し」か、という感じだったように思います。でも、実は今はちょっと違います。

(どういふことか分かる?)

最近「水」の構造が重視されているのです！

これは、我々「構造屋」にとっては、ちょっとだけ嬉しいかな...ホモロジーモデルなどの構造予測では、水の位置までは、そう簡単には決められないでしょう。

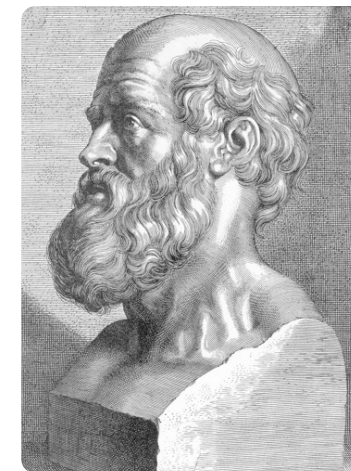


この図は、レニン阻害剤の開発の歴史を示しています。高血圧の薬ですので、多くの製薬メーカーが阻害薬の開発にしのぎを削っていました。いくつくらい名前を聞いたことがあるかな。2005年に合併してアステラスになっちゃった、藤澤、山之内もありますね。ペプチド性の阻害剤の開発の段階で、ほとんどのメーカーが断念したのに対して、ノバルティスは、先程まで見て来たようなSBDDの考え方でアレスキレンの開発に成功したということです。この成功が示すように、今では、ほとんどの製薬メーカーが、創薬に標的蛋白質と化合物の複合体の3D構造情報を利用しています。

# バイオマテリアル基礎論

おしまい

名古屋大学  
シンクロtron光研究センター  
渡邊信久



ヒポクラテス：(紀元前460年 - 紀元前377年)

さて、おしまいです。今日は、SBDDを概観しました。そして最後に、ちょっと分子のフレキシビリティのことも見ました。これを通して見たかったのは、標的蛋白質と化合物の結合に関する三次元的な構造情報の重要性です。

バイオマテリアル専攻ということで、うちの卒業生のような蛋白質結晶構造屋と、石原研の卒業生のようなメディシナルケミストとが、こんな創薬のような職場で有機的に協力して仕事をすることもあるのかな、というようなことを空想しながら、これで、私の3回の授業を終わります。