

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業  
(革新的中分子創薬技術の開発)  
事後報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 進化的 *in vitro* 及び *in silico* 複合選択による中分子薬剤の調製  
(英語) Development of middle size drugs by *in silico* and *in vitro* hybrid selection

研究開発実施期間: 平成30年4月1日～令和年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 伊藤嘉浩  
(英語) Yoshihiro Ito

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 創発物性科学研究センター 創発生体工学材料研究チーム  
チームリーダー

(英語) Team Leader, Emergent Bioengineering Materials Research Team, RIKEN Center for Emergent  
Matter Science

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

図1に本研究課題の基本設計を示す。これまで低分子化合物、あるいは高分子量の抗体が標的指向性の付与や阻害剤として用いられてきたが、本研究では、ペプチドを付加することによって低分子だけでは不十分な標的指向性や阻害活性を、分子間に働く相互作用点を増すことによって増強する中分子量医薬の創出を目指す。ペプチドの選別には、*in silico* 及び *in vitro* 複合進化分子工学で実現することを新たに開発する。

具体的には、第一には癌細胞指向的な低分子複合ペプチド化合物の開発と、第二には抗体に代わる中分子量の免疫チェックポイント (PD-1/PD-L1) 阻害剤の開発の二つの研究課題に取り組んだ。



図1 本研究課題の中分子医薬の基本設計

第一の課題の癌細胞指向性中分子化合物の創成では、癌指向性低分子化合物として葉酸を選んだ。特定の癌組織では葉酸受容体が高発現することが知られており、特に $\alpha$ 型(folate receptor  $\alpha$ : FR $\alpha$ )が発現されているが、従来は低分子の葉酸だけを標的指向性に用いることしかできず、それでは $\beta$ 型にも結合してしまう。そのため、本研究ではFR $\alpha$ だけを指向するようにペプチドを選別することを計画した。

FR $\alpha$  特異的葉酸ペプチド複合体開発では、進化的 in silico 選択法により設計したアミノ酸配列を、葉酸に結合させ、FR $\alpha$ への結合力が増加する配列が見つかった。その葉酸結合ペプチドを複合化して抗がん剤デリバリー用キャリアの合成を行った。

まず、葉酸受容体との親和性を測定するため、FR $\alpha$ およびFR $\beta$ を大腸菌で発現させ、リフォールディング法により活性型を大量に調製することに成功した。FR $\alpha$ およびFR $\beta$ の葉酸複合体結晶構造はすでに報告されているため、これらの構造を用いて、in silico ドッキング・シミュレーションを行った。葉酸とペプチドは、クリック反応を利用して結合した。シミュレーションしたペプチド配列を葉酸に複合化することにより、FR $\alpha$ への結合力が向上し、FR $\beta$ と比較して特異性も増すことを、平衡解離定数を測定して確認した。

合成したペプチドと葉酸との複合体を脂質に結合し、リポソームを形成し、抗癌剤のドキソルビシンを封入することに成功した。リポソームは種類に拘らずほぼ90-100nmの直径であることを動的光散乱法で確認した。FR $\alpha$ とFR $\beta$ を各々特異的に発現する培養細胞との相互作用を調べると、ペプチドと葉酸の複合体を結合したリポソームは、FR $\alpha$ を高発現する細胞に取り込まれやすいことがわかった。

第二の課題の中分子量の免疫チェックポイント阻害剤の創成では、既報の低分子阻害剤の基本分子骨格と考えられるビフェニル基をベースに免疫チェックポイント(PD-1/PD-L1)阻害剤の開発を進めた。まず、ビフェニル基をもつアミノ酸をもとに両方に天然アミノ酸を1残基ずつ伸長してゆく方法で、in silico ドッキング・シミュレーションを行い、最も相互作用が起こりやすいペプチドの配列を探索した。そして、その結果をもとに固相合成によってペプチド複合体を合成した。PD-1/PD-L1相互作用の阻害活性の指標としてIC<sub>50</sub>を測定した。In vitro 進化分子工学を行うために、ビフェニル化合物を含むランダム配列のペプチドライブラリーを調製できるようにした。

一方、In silico/in vivo 複合選択法により、PD-1をベースにしてアミノ酸を2か所変異させた高親和性PD-1変異体(2PD-1)の調製に成功した。2PD-1のPD-L1に対する親和性を測定したところ、野生型PD-1と比較して約100倍強い親和性を示した。また、2PD-1のPD-1/PD-L1に対する相互作用阻害活性を測定すると、野生型PD-1よりも30倍ほど阻害効果が高かった。さらに、2PD-1のT細胞再活性化活性を測定

したところ、ニボルマブよりは活性が低かったものの、野生型 PD-1 より 100 倍以上高い活性を示すことがわかった。

The concept of research project is shown in Figure 1. The aim is enhancement of low molecular inhibitor by peptide molecule which is selected by *in silico* and *in vitro* selections to replace the low molecular and antibody drugs.

In this study, development of folic acid- or immune checkpoint inhibitor compound-peptide conjugate binding to specific folic acid receptor or immune checkpoint protein was performed, respectively.

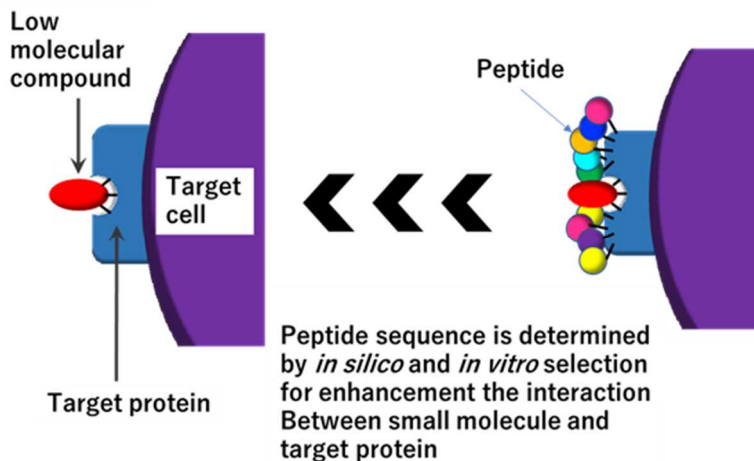


Figure 1 The basic concept in this research project

The first project was for targeting of folic acid receptor type  $\alpha$  which is overexpressed on cancer cells. Previously folic acid has been used for the carrier targeting cancer cells. However, since the cell generally expressed folic acid receptors including types  $\alpha$  and  $\beta$ , the specificity was not enough. Therefore, by designing type  $\alpha$  specific carrier, the specific deliver of anti-cancer drug was expected.

To seek the peptide sequence which plays a role in Figure 1, *in silico* docking simulation was performed. Since the crystal structures of receptors were reported, we found some sequences by this simulation. According to the found sequences, we synthesized the peptide by the solid phase method and the folic acid was conjugated by click chemistry. The synthesized peptide in fact interacted with receptor  $\alpha$  specifically against receptor  $\beta$ .

The peptide conjugates were coupled with lipid and incorporated into liposome which included anti-cancer drug doxorubicin inside. The liposome size ranged from 90 to 100 nm according to dynamic light scattering method. The specific delivery to the cell overexpressing type  $\alpha$  was confirmed by *in vitro* cultured cells.

The second project was development of middle size drug which can inhibit the interaction of the immune checkpoint proteins PD-1/PD-L1. The biphenyl group residue which was reported as the low molecular weight compound inhibitor was employed for the starting compound. First the *in silico* docking simulation was performed through the extension of the amino acid containing the biphenyl group by additional amino acid one by one. The most interactive peptide sequence containing the biphenyl group was found by the simulation. According to the sequence data, the biphenyl group-containing peptides were synthesized and the inhibition constant ( $IC_{50}$ ) was investigated. For the *in vitro* selection, the methodology for preparation of the random sequence of peptide library containing biphenyl group was also developed.

On the other hand, by *in silico/in vivo* hybrid selection, two amino acids in PD-1 were mutated and the PD-1 mutant (2PD-1) was found to be high affinity for PD-L1. The mutant has about 100 times affinity as high as the wild PD-1. The inhibition of PD-1/PD-L1 interaction by 2PD-1 was 30 times as high as that by the wild one. In addition, T-cell

reactivation assay demonstrated that 2PD-1 has 100 times activity as high as the wild one, although the activity was less than that of Nibolumab.