

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：細胞内タンパク質間相互作用を標的とする中分子創薬技術の開発

Development of technologies for designing middle-size drug molecules targeting intracellular protein-protein interactions

研究開発実施期間：令和元年 12 月 16 日～令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：森本 淳平

Jumpei Morimoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京大学 大学院工学系研究科化学生命工学専攻 講師

The University of Tokyo • School of Engineering, Department of Chemistry & Biotechnology • Lecturer

## II 研究開発の概要

本研究では、従来のバイオ医薬品では創薬が困難であった細胞内のタンパク質間相互作用（PPI）を標的とした中分子性阻害剤の合理的設計手法の開発を目的とした。

このような目的を実現するために、我々は、ペプチドと呼ばれる中分子を用いることとした（R. Simon, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9367–9371.）。ペプチドは、膜透過性が高いことが知られているため（P. Yu, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 746–751.）、細胞内の PPI を標的とするのに適している。ペプチドは構造の柔軟性が高く、それ故にタンパク質への結合親和性が低いという課題があったが（T. Kodadek and P. J. McEnaney, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6038–6059.）、我々は最近、ペプチドの構造を剛直化し、タンパク質への結合親和性を向上させることに成功してきた（J. Morimoto, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *142*, 2277–2284.）。そのため、ペプチドは、細胞内 PPI 阻害を実現する中分子の候補として有力であると考えられる。

このようなペプチドを用いることで、本研究では、細胞内 PPI を標的とした創薬の発展につながる下記の 2 つの成果を達成することを目標とした。

1. ペプチドを足場とする PPI 阻害剤のインシリコ設計手法の確立
2. 上記手法による阻害剤創出法の実用性の検証

これらの研究開発の目標を達成することによって、下記の創薬上重要なねらいに取り組むこととした。

1. 細胞内 PPI に対する汎用的な創薬技術の創出
2. 創薬における中分子の有用性の検証

本研究で目的とする「細胞内のタンパク質間相互作用（PPI）を標的とした中分子性阻害剤の合理的設計手法の開発」達成するために、具体的には、4 つの研究開発項目について取り組んだ。それぞれの研究課題の内容とその成果について以下に詳述する。

### 【研究開発項目 1】細胞内 PPI 阻害剤のインシリコ設計法の確立

我々はまず、ペプチドを足場として、PPI 阻害剤をインシリコで設計する手法の確立に取り組んだ。本研究開発項目では、がんに関連する PPI である MDM2-p53 の相互作用をモデル標的として、阻害剤を創出する手法を確立することを目的とした。我々が開発してきたペプチドは、主鎖のアミド窒素上に置換基を導入しても主鎖の 3 次元構造が崩れないことがわかっている (J. Morimoto, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *142*, 2277–2284)。これを利用して、まず、標的 PPI を構成するタンパク質のうち p53 上に提示されるホットスポットである Phe, Trp, Leu の 3 残基と同様の官能基を、適切な配向で提示できる N 置換基のパターンを模索するインシリコプログラムを模索した。このプログラムでは、p53 上のこれら 3 つの残基の根元の原子とペプチド上の各残基の根元の原子を重ね合わせ、最も提示パターンが類似するものを、RMSD の値を参考に探索する。これを利用することで、実際に、以前に我々が見出していた MDM2-p53 阻害ペプチドと同じ構造の分子を迅速に発見することができることがわかった。

次に、ペプチド性の足場構造を拡張するために、ペプチドのアミド窒素上だけでなく  $\alpha$  炭素上にも置換基を導入できるかどうかを検証した。具体的には、5 残基の N メチルアラニンオリゴマーと、その  $\alpha$  炭素上にメチルより大きな官能基を導入した N メチルペプチドについて、量子化学計算、分子動力学計算、核磁気共鳴測定、による構造解析を行い、その構造を比較した。その結果、 $\alpha$  炭素上にメチルより大きな官能基を導入してもペプチドの主鎖の構造が大きく変化しないことが示唆された。これにより、ペプチドの足場の上に実現できる官能基提示パターンが 10 倍ほどに拡張した。この結果に基づき、これらの提示パターンの中から、標的 PPI 阻害に最も適すると考えられるものを、構造の類似性の観点からインシリコで探索する手法を確立した。この手法を MDM2-p53 の阻害剤探索に適用することで、アミド窒素上に置換基を導入するだけで設計した以前の阻害剤よりもより多様で阻害活性の高い阻害剤を創出できることを実証した (M. Yokomine, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202200119)。

### 【研究開発項目 2】細胞内 PPI 阻害剤創出法の汎用性の評価

ペプチドを足場とすることで、多様な PPI の阻害剤が創出できるかどうかを検証するために、MDM2-p53 以外の複数の PPI を標的とした阻害剤の設計に取り組んだ。その中で、アポトーシスに関わる PPI を標的として設計したペプチドについて、実際に複数の阻害剤候補化合物を合成し、標的 PPI を阻害できるかを蛍光偏光法で検証した。その結果、目的の PPI を弱いながら阻害することが確認され、本設計手法の汎用性の高さが示唆された。一方で、その PPI 阻害活性は比較的低かったため、ドッキングシミュレーションを組み合わせるなど設計手法の改良を試みてきた。しかしながら、いまだ PPI 阻害活性は十分ではないため、今後、ペプチドの構造解析やドッキングシミュレーション手法の改良などに着手していくことで、より優れた PPI 阻害剤設計手法を確立していきたいと考えている。

### 【研究開発項目 3】細胞内 PPI 阻害剤の実用性の評価

インシリコで設計し、精製タンパク質に対して阻害活性を示したペプチドについて、目的とする細胞内での PPI 阻害を実現できるかを検証した。MDM2-p53 阻害剤として働くペプチドを、MDM2 を過剰発現する SJSA-1 細胞に作用させ、PPI 阻害活性を評価した。まず、PPI 阻害によって MDM2 と p53 の相互作用が抑制され、p53 の分解が抑制されるかを、ウェスタンブロッティングを用いて検証した。その結果、最初に設計したペプチドでは、20  $\mu$ M で培養細胞に作用させても、p53 のタンパク質量の上昇は確認されず、初期設計段階のペプチドは、細胞内 PPI を阻害するには不十分であることがわかった。

この結果を受け、我々は、PPI 阻害活性と細胞膜透過性を向上するための構造展開を行うこととした。まず、MDM2-p53 の相互作用に対して PPI 阻害活性を示したペプチドと MDM2 との相互作用様式を分子動力学計算によって推定し、その結果に基づいて、PPI 阻害活性と膜透過性を向上すると期待される誘導体の設計を行った。いくつかの誘導体を合成し、評価したところ、阻害活性を 10 倍以上向上することに成功した。また、人工

膜透過試験 (PAMPA) によってペプチドの膜透過性を評価したところ、いくつかの誘導体では、膜透過性が数倍向上していることが確認された。

こうして構造展開し性能が向上したと期待されるペプチドについて、改めて培養細胞における細胞内 PPI 阻害活性を評価した。その結果、ウェスタンブロッティングによって SJSA-1 細胞内での p53 のタンパク質量が上昇することが確認され、細胞内で標的 PPI が阻害されることが確認された。そこで、さらに、ペプチドによって細胞内の MDM2-p53 相互作用が阻害されることで、細胞のアポトーシスが誘導されるかを検証した。その結果、10  $\mu$ M のペプチドを作用させることで、60–70%の細胞がアポトーシス誘導されることがわかった (Y. Fukuda, *et al.*, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 13292–13300)。

これらの結果から、インシリコ設計したペプチドは、実際に細胞内 PPI 阻害剤として働くことが実証された。ここまでの実験結果から、①ペプチドを足場としてホットスポット提示の類似度を元に初期設計し、②その結果に基づいて MD シミュレーションを用いた構造最適化を行う、という 2 段階のインシリコ設計を実施することで、細胞内 PPI を阻害する中分子を合理的に創出することが可能であることが示されたといえる。

#### 【研究開発項目 4】動物を用いた腫瘍成長の抑制効果の評価試験

ここまで MDM2-p53 の相互作用を標的として設計・改良してきた PPI 阻害剤として働くペプチドについて、生体応用を見据えて、担がんマウスを用いた *in vivo* での薬効評価に取り組んだ。その結果、顕著な阻害活性は見られなかったため、薬剤として使用するためには、生体内安定性や阻害活性の向上が必要であることが示唆された。このような動物実験での結果を踏まえて、今後、細胞内 PPI 阻害により適するようにペプチド骨格を改良していくことが望ましい。

以上、本研究では、最初に述べた 2 つの目標を達成することに成功した。まず、1 つ目の目標であった、ペプチドを足場とする PPI 阻害剤のインシリコ設計手法の確立、については、2 つの標的に対する阻害剤の設計・評価を通して、これを実証した。次に、2 つ目の目標であった、本阻害剤創出法の実用性の検証、については、培養細胞レベルで機能する細胞内 PPI 阻害剤を実現することで、本手法の創薬における実用性の一定の実証ができたと考えている。

本研究によって、細胞内 PPI 阻害剤の創出という創薬研究における最重要課題に対して、ペプチドを用いるという 1 つの解決策が提示されたといえる。今後、この技術がさらに改良され利用されていくことで、細胞内 PPI という困難な標的に対する創薬が加速されていくと期待される。

The objective of this study was development of a methodology to design middle-size molecules that inhibit intracellular proteins.

To achieve the research objective, we recruited a middle-size molecule called peptoid (R. Simon, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9367–9371.) Peptoid has been reported to exhibit high membrane permeability (P. Yu, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 746–751.), therefore peptoid is suitable for inhibiting intracellular PPIs. Peptoid is conformationally flexible, and therefore peptoids generally does not show high affinity to proteins, which has been limiting the utility of peptoids for PPI inhibitors (T. Kodadek and P. J. McEnaney, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6038–6059.). Recently, we have succeeded in generating conformationally constrained peptoids and improving binding affinities of peptoids to proteins (J. Morimoto, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *142*, 2277–2284.). Altogether, peptoid is potentially useful for realizing middle-size molecules that inhibit intracellular PPIs.

In this research, we aimed to achieve the following two things.

1. Establishment of *in silico* design methods for producing PPI inhibitors using peptoids as scaffolds
2. Evaluation of the practical utility of the above method

By achieving the research objectives, we aimed to achieve the following two things.

1. A general method for producing drug candidates for inhibiting intracellular PPIs
2. Evaluation of the practical utility of middle-size molecules for drug discovery

To achieve the objective of this study, we have addressed the four research items. The details of the items are described below.

#### 1) Development of *in silico* design method for intracellular PPIs.

We devised *in silico* methods for designing PPI inhibitors. We aimed to develop methods for producing inhibitors using MDM2–p53 interaction as a model target. The peptoid we have been developing is known to maintain the backbone shape irrespective of the *N*-substituent structures (J. Morimoto, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *142*, 2277–2284). By utilizing the structural characteristic, we have devised *in silico* program that seek the *N*-substituent patterns on peptoids that well mimic the orientations and distances of Phe, Trp and Leu residues on p53 that consists of the target PPI. This program overlay the atoms at the root of the three hot spot residues on p53 and *N*-substituents and seek the resembled patterns based on the RMSD values. Using this program, we have succeeded in rapidly discovering the peptoid structure that has been previously shown to work as inhibitors of MDM2–p53 interaction.

Next, to expand the peptoid-based scaffold structures, we tested whether functional groups can be introduced not only at amide nitrogens but also at  $\alpha$ -carbons. More specifically, we compared the structures of *N*-methylalanine pentamer and *N*-methyl peptides with functional groups larger than methyl groups at  $\alpha$ -carbons using DFT calculations, molecular dynamics simulations and nuclear magnetic resonance measurements. As a result, the peptoid backbone shape was suggested to be maintained even when functional groups larger than methyl group are introduced at  $\alpha$ -carbons. Consequently, the number of patterns for displaying functional groups was increased about 10-fold. Based on the result, we developed an *in silico* method for finding the patterns that is suitable for mimicking the hot spots on the target PPI. We applied this method for discovery of inhibitors of MDM2–p53 interactions and demonstrated that more diverse and stronger inhibitors can be discovered using the modified method (M. Yokomine, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202200119).

#### 2) Development of *in silico* design method for intracellular PPIs.

We next designed inhibitors of multiple PPIs other than MDM2–p53 to assess the utility of the *in silico* design method for producing PPI inhibitors using peptoids as scaffolds. Among the designed ligands, we synthesized peptoids targeting a PPI involving apoptosis and evaluated the inhibitory activity against the PPI using fluorescence polarization method. As a result, some of the designed ligands inhibited the target PPI, which demonstrated the general utility of the design method.

However, the inhibitory activity was weak. Therefore, we attempted to improve the design method by recruiting docking simulation methods. Even after the attempts, the inhibitory activity is still not high. Therefore, we are going to conduct further structural analysis and improvement of docking simulation methods to develop better *in silico* design methods for generating PPI inhibitors.

### 3) Evaluation of the utility of the designed peptoids for inhibiting intracellular PPIs.

We next assessed whether the peptoids that exhibited inhibitory activities against purified MDM2 can inhibit the target PPI intracellularly. We have applied the peptoids to SJSA-1 cells that is known to overexpress MDM2 and evaluated the PPI inhibitory activity. We conducted western blotting to evaluate whether the degradation of p53 protein is suppressed by inhibition of MDM2–p53 interaction. As a result, the initially designed peptoid did not increase the protein level of p53 in the cells even at 20  $\mu$ M concentration, which indicate that it is difficult to produce peptoids that efficiently inhibit the intracellular PPIs.

We next conducted structural optimization of the peptoids to improve inhibitory activities and membrane permeability to realize peptoids that inhibit the target PPI inside the cells. We predicted the mode of interaction between the MDM2–p53 inhibitor peptoids and MDM2 using molecular dynamics simulations and we designed derivative peptoids that are expected to exhibit higher inhibitory activities and membrane permeability. After testing several compounds, we obtained inhibitors with more than 10-fold higher inhibitory activities. Furthermore, the membrane permeability of the peptoids were measured with the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) and found to be 2–3 fold higher than the initially designed peptoid.

Finally, we evaluated the inhibitory activity of the peptoids against intracellular MDM2–p53 interaction. We found that the improved ligand increased the p53 protein level in SJSA-1 cells, which suggested that the MDM2–p53 interaction was inhibited intracellularly. We further assessed whether the MDM2–p53 inhibition by the peptoid induce cellular apoptosis with Annexin V assay. As a result, the peptoid was found to induce apoptosis to 60–70% of the cells at 10  $\mu$ M concentration (Y. Fukuda, *et al.*, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 13292–13300).

These results demonstrated that the peptoids designed *in silico* can inhibit an intracellular PPI. The results so far demonstrated that middle-size molecules that inhibit intracellular PPI can be rationally designed using the following two-stage *in silico* design method for producing intracellular PPIs: Stage 1. Inhibitors are designed using peptoids as scaffolds based on the similarity of the orientations and distances of hot spot residues with the target PPI; Stage 2. The structures of the initially designed peptoids are optimized based on molecular dynamics simulations.

### 4) Evaluation of the effect of tumor suppression effect in rodent

We evaluated the therapeutic effect of the developed peptoids that inhibit MDM2–p53 interactions on tumors in mouse. As a result, we could not observe obvious inhibitory effect *in vivo*. This result suggests that the biological stability and inhibitory activity needs to be improved for peptoids to be used as drugs. It is desirable to modify the peptoid structures to achieve such characteristics in the future.

In this study, we have succeeded in achieving the two aims. The first aim was development of *in silico* design method of PPI inhibitors using peptoids as scaffolds. This was achieved via production of inhibitors against two PPIs. The second aim was evaluation of the utility of the design method. We achieved this by producing inhibitors that inhibit an intracellular PPI in cultured cells.

This research proposed one potential solution to development of inhibitors of intracellular PPI which is one of the most important challenges in drug discovery. The methodology developed in this study is expected to be improved and utilized for accelerating drug discovery against intracellular PPIs.