

# 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： ペプチド型中分子および核酸型中分子を病変細胞内に送達し、活性化する方法  
Target-selective delivery and activation of peptide-like and nucleic acid-like molecules

研究開発実施期間： 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：梅澤 直樹  
Umezawa, Naoki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
公立大学法人名古屋立大学・医薬学総合研究院（薬学）・教授  
Nagoya City University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Professor

## II 研究開発の概要

本研究開発の目標は、独自に開発した一時的環状化法を発展させ、中分子に適したドラッグデリバリーシステム（DDS）を開発することである。これまでの研究で得られた成果を発展させると同時に問題点を克服し、病変部位までは低活性の状態で送達でき、病変細胞内でのみ生物活性を示すようになる中分子の開発をめざす。ペプチド型中分子を用いてタンパク質間相互作用の阻害を、核酸型中分子を用いてタンパク質発現量の抑制を企図した。これらの生物活性はいずれも低分子化合物では達成が難しく、中分子を用いる必要性が高い。

本研究の概略を図1に示す。本研究で開発する分子は、「中分子部位」、「外部刺激切断部位」、「ガイド部位」という3つのモジュールからなる。「中分子部位」は生物活性を担う。活性化後に生じる中分子は無修飾で余分な化学修飾をもたないため、本来の生物活性を發揮できる。「外部刺激切断部位」は病変部位選択的な活性化を担う。還元環境・光・低酸素環境で切断され、中分子から完全に脱離する構造を合成する。「ガイド部位」は細胞膜透過や病変細胞へのターゲティングを担う。細胞膜透過ペプチド（CPP）や病変細胞で発現しているレセプターを認識し、結合するリガンドを用いる。本基本構想は、「中分子部位」にリシン特異的脱メチル化酵素 LSD1 阻害ペプチド（PRSFVLRK）、「ガイド部位」にオリゴアルギニン R<sub>10</sub>、「外部刺激切断部位」に還元環境切断部位を用いた分子の開発研究を通して、ほぼ実証することができた（*J. Med. Chem.*, 2021, 64(7), 3707-3719）。本研究では、さらなる適用範囲の拡大をめざし、以下の研究開発項目を進めた。

- 1) 細胞内で機能するペプチド型中分子の開発
- 2) 細胞内で機能する核酸型中分子の開発
- 3) モジュールの多様化

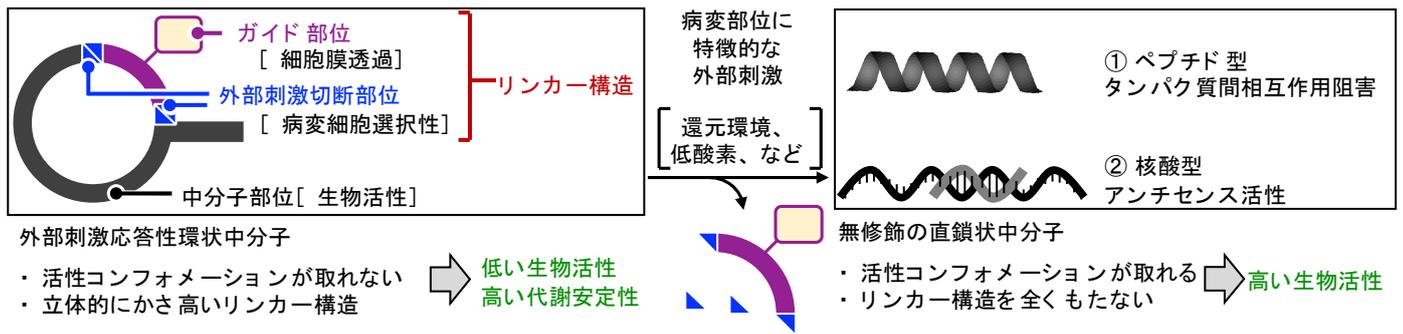


図1 本研究戦略の概要：一時的環状化を用いた中分子DDS

### 1) 細胞内で機能するペプチド型中分子の開発

多くのヒトがん細胞では p53 を制御する因子に異常を生じており、p53/MDM2 タンパク質間相互作用の阻害剤は抗がん剤として期待されている。細胞膜透過性に乏しいペプチド型中分子を細胞内で機能させることを企図し、「中分子部位」として p53/MDM2 タンパク質間相互作用を阻害するペプチド、「外部刺激」として細胞内の特徴である還元環境、「ガイド部位」として細胞膜透過ペプチドを用いた。

**化学合成** 「中分子部位」として p53/MDM2 タンパク質間相互作用を阻害するペプチド **1** (ETFSDLWKLLPEN) を選択した。ペプチド **1** は、MDM2 と相互作用する p53 タンパク質の MDM2 結合領域で、p53/MDM2 相互作用を阻害するペプチドとして汎用されている。直鎖ペプチド **1** は、MDM2 と結合する際  $\alpha$  ヘリックス構造を形成することが知られているが、環状化することで  $\alpha$  ヘリックス構造が取れなくなり、活性が低下すると期待した。還元環境で切断される「還元環境切断部位」、優れた細胞内移行能を示すオリゴアルギニンペプチド R<sub>10</sub> を「ガイド部位」として選択した。細胞内の還元環境下でジスルフィド結合の開裂、自己分解反応が進行して、無修飾の直鎖ペプチド **1** を与えると予想される (図 2)。固相合成と液相合成を組み合わせ、環状ペプチド **2** の合成に成功した。本合成法は、別途合成した各モジュール（「中分子部位」、「外部刺激切断部位」、「ガイド部位」）を、最終段階で結合させる収束的な合成法であり、各モジュールは自由に選択、交換できるという特長をもつ。

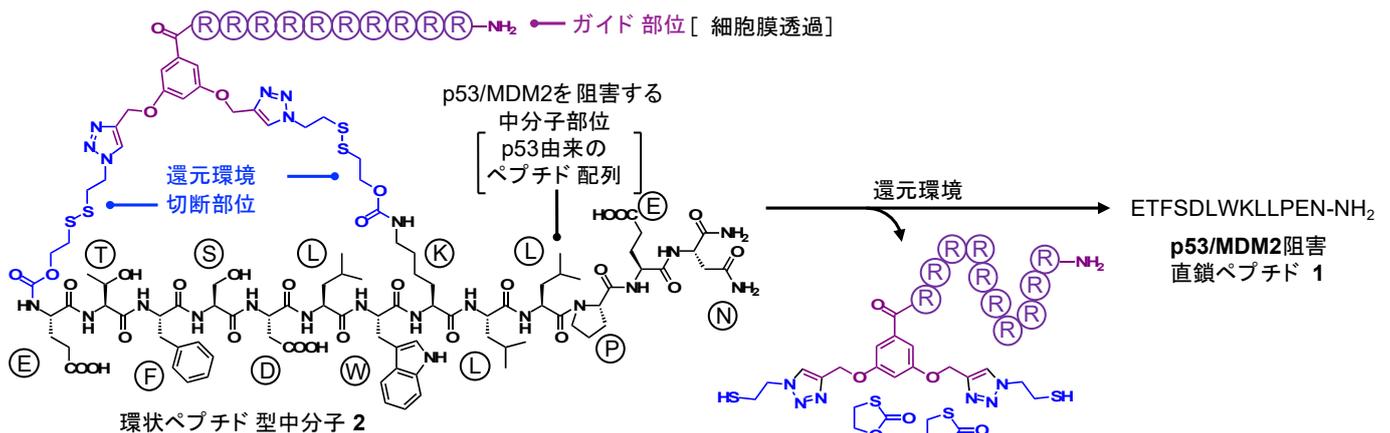


図2 還元環境応答性p53/MDM2阻害環状ペプチド **2** と還元環境下での推定反応

**評価系の構築** p53/MDM2 相互作用の阻害能を *in vitro* で評価できる、蛍光偏光アッセイを構築した。p53/MDM2 タンパク質間相互作用を検出する細胞評価系として、レポーターアッセイ、Fluoppi、スプリットルシフェラーゼを開発した。各評価系は、各々特徴を有するが、第一段階のスクリーニングには、簡便かつ定量的な評価が可能なレポーターアッセイを用いた。

**機能評価** 「中分子部位」である直鎖ペプチド **1** は、蛍光偏光アッセイで中程度の阻害活性を示した ( $K_i = 2.4$

μM)。次に、環状ペプチド**2**の活性を、レポーターアッセイ（MCF7細胞）で評価した。その結果、環状ペプチド**2**は、20 μMまで活性を示さず、50 μMでp53の活性化が見られたものの、細胞の形態に異常が見られ、偽陽性である可能性が示唆された。そこで、環状ペプチド**2**の細胞毒性をMTTアッセイで評価したところ、20 μMで強い細胞毒性が見られたため、レポーターアッセイで見られた50 μMでの活性は、細胞毒性に起因する偽陽性であると判断した。オリゴアルギニン、筆者の研究を含め、非常に多くの適用例がある。一般に細胞毒性が低いとされているため、想定外の結果であった。そこで、「3) モジュールの多様化」を実施して、細胞毒性が何に起因するかを解明し、細胞内で機能するp53/MDM2阻害分子の開発を進めることとした。詳細は、「3) モジュールの多様化」に記述する。

## 2) 細胞内で機能する核酸型中分子の開発

DNAやRNAの特定の箇所に相補的な塩基配列をもつ人工核酸は、がん遺伝子の働きを弱めることによるがん治療などへの利用が期待されている。本研究では、核酸型中分子として、アミド結合を骨格とするペプチド核酸（PNA; peptide nucleic acid）を用いた。本項目は、「1) 細胞内で機能するペプチド型中分子の開発」および「3) モジュールの多様化」に注力するため、開発半ばで中止した。

**化学合成** ルシフェラーゼのアンチセンス配列となる19塩基のPNAの合成条件を最適化し、高収率で目的物が得られる条件を見出した。PNAは水溶性に乏しいが、C末端にLysを2残基導入することで、十分な水溶性を付与できた。C末端のLysは、水溶性向上に有用であることに加え、環状化の際にも利用できる。

**細胞評価系の構築** 細胞系でのアンチセンス活性を評価するため、ルシフェラーゼを安定発現させたMCF7細胞を作成した。

**機能評価** 標的となるmRNAとの二重らせん形成能を評価するため、融解温度（ $T_m$ ）測定系を構築した。

## 3) モジュールの多様化

「1) 細胞内で機能するペプチド型中分子の開発」で生じた細胞毒性の問題を克服するため、「中分子部位」および「ガイド部位」の多様化を中心に進めた。「外部刺激切断部位」を導入する際は、すべて「還元環境切断部位」を用いた。環状ペプチド**2**がもつ、1) 低濃度で十分なp53/MDM2阻害活性を示さない、2) 高濃度で細胞毒性を示す、という2つの問題点を克服するために、1) 「中分子部位」の阻害活性を向上させる、2) 環状ペプチドの両親媒性を低下させる（「ガイド部位」のカチオン性の低下、「中分子部位」の疎水性の低下）、という2つの指針に基づき検討を進めた。「中分子部位」の阻害活性を向上させることで、細胞毒性を示さない濃度で活性を示すと期待した。また、環状ペプチド**2**は、カチオン性の高い「ガイド部位」と疎水性が高い「中分子部位」を併せもつ両親媒性の構造をもつため、細胞膜傷害性を呈する可能性がある。「ガイド部位」および「中分子部位」の構造をコントロールすることで、細胞毒性が低下できると考えた。

**「中分子部位」モジュールの多様化** 蛍光偏光アッセイより、直鎖ペプチド**1**のp53/MDM2阻害活性が中程度であることが明らかとなっている。強い阻害活性をもつ直鎖ペプチドを探索し、**1**よりも大幅に強い活性をもつペプチドを複数見出した。また、p53/MDM2阻害とは異なる機序でp53機能を回復できる、疎水性が低いペプチドも検討した。いずれのペプチドも、環状化するために必要なリシンをC末端にもつ。

**「ガイド部位」モジュールの多様化** ガイド部位として、さまざまな細胞膜透過ペプチドを検討した。オリゴアルギニンよりカチオン性が低い細胞膜透過ペプチドTatやPenetratin、非常に細胞膜透過性が高いと報告されているCPP9や環状R<sub>10</sub>などの環状細胞膜透過ペプチドに加え、腫瘍細胞選択的な取り込みが可能と報告されている腫瘍ホーミングペプチドを検討した。また、細胞膜透過ペプチド以外の「ガイド部位」も検討した。還元環

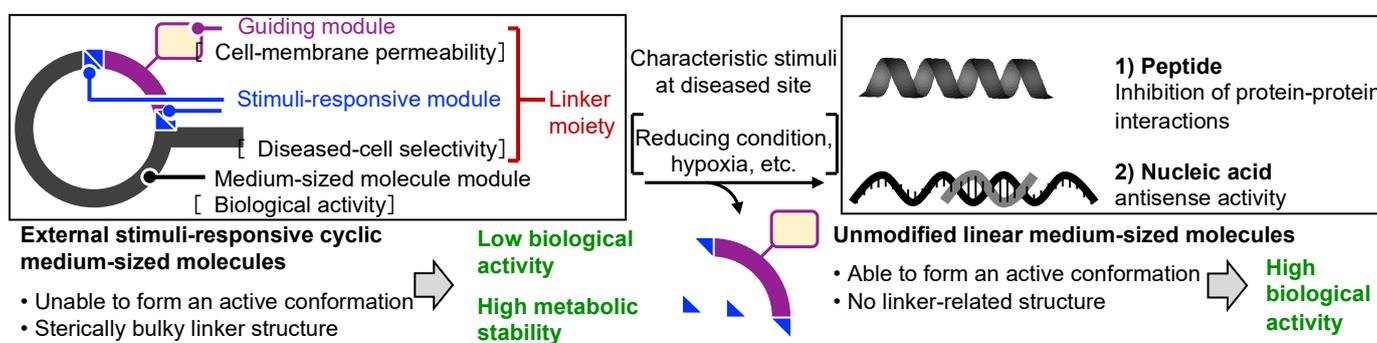
境応答性環状ペプチドに加え、先に見出した「中分子部位」と「ガイド部位」を直結した直鎖ペプチドを合成して、「ガイド部位」の機能を評価した。蛍光偏光アッセイ、レポーターアッセイおよび MTT アッセイを実施したところ、以下の結果が得られた。

- ・全てのペプチドで、p53 の転写活性化の明確な上昇が認められなかった。
- ・カチオン性が低い「ガイド部位」あるいは疎水性が低い「中分子部位」を用いることで、細胞毒性は低減した。
- ・蛍光色素を導入したペプチドの細胞内移行を検討したところ、細胞内から蛍光が検出され、細胞質にも分布した（「ガイド部位」：R<sub>8</sub>、環状 R<sub>10</sub>）。

2)の指針に従うことで、細胞毒性の低減に成功した。一方で、1)の指針は不十分であり、細胞内で p53/MDM2 阻害活性を示す分子の創製は困難を極めた。だが、ごく最近、活性をもたないよう設計したコントロール分子が、弱い p53/MDM2 阻害活性を示すという結果が得られた。この予想外の知見を端緒に考察・検討を進めることで、これまで合成してきた分子が活性をもたない原因が明らかとなってきた。推定される原因を克服できるような、新たな分子設計を施すことで、細胞系で強い p53/MDM2 阻害活性を示し、細胞毒性を示さない直鎖ペプチドの開発に成功した。このペプチドがもつ「中分子部位」に一時的環状化法を適用することで、当初目標とした分子の開発が達成できると期待される。また、見出した問題点は、非常に多くの生物活性ペプチドがもつ一般性が高い問題点であると予想される。そのため、本知見は高い波及効果をもつ可能性がある。

The goal of this research is to develop a drug delivery system (DDS) suitable for medium-sized molecules by advancing our temporary cyclization strategy. Peptide-based medium-sized molecules were used to inhibit protein-protein interactions, and nucleic acid-based medium-sized molecules were used to suppress protein expression. A schematic of this study is shown in Figure 1. The molecule developed in this study consists of three modules: a “medium-sized molecule module” for biological activity, a “stimuli-responsive module” for selective activation, and a “guiding module” for membrane permeabilization and/or targeting to diseased cells. This basic concept was almost demonstrated through the development of reducing environment-responsive cyclic LSD1 inhibitor peptide (*J. Med. Chem.* 2021, 64(7), 3707-3719). In this study, the following subjects were pursued with the aim of further expanding the scope of application.

- 1) Development of peptide-based medium-sized molecules that function intracellularly
- 2) Development of nucleic acid-based medium-sized molecules that function intracellularly
- 3) Diversification of modules



**Figure 1.** Overview of our research strategy: DDS of medium-sized molecules using temporary cyclization.

- 1) Development of peptide-based medium-sized molecules that function intracellularly

Many human cancer cells have abnormalities in factors that regulate p53, and inhibitors of the p53/MDM2 protein-protein interaction are expected to become anti-cancer agents. Cyclic peptide **2** was designed and synthesized (Figure 2). Peptide **1** (ETFSDLWKLLPEN) is known to inhibit p53/MDM2 protein-protein interaction. Oligoarginine R10 shows excellent intracellular translocation ability. Redox-responsive moiety is cleaved and self-immolatively eliminated under reducing conditions such as inside cells. Linear peptide **1** showed moderate inhibitory activity in the fluorescence polarization assay. The cellular activity of cyclic peptide **2** was evaluated in a reporter assay and MTT assay and found to be not active up to 20  $\mu\text{M}$  and toxic at 50  $\mu\text{M}$ .

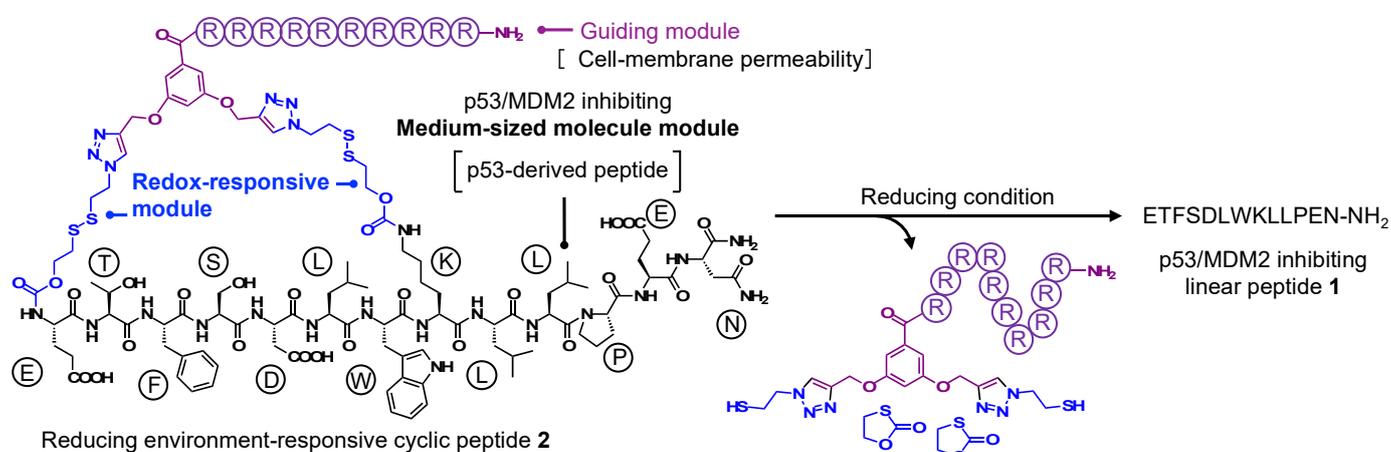
- 2) Development of nucleic acid-based medium-sized molecules that function intracellularly

Artificial nucleic acids are expected to be used for cancer therapy and other applications. This subject was discontinued in order to focus on other subjects.

- 3) Diversification of modules

To overcome the two problems of **2**, i.e., 1) inadequate p53/MDM2 inhibitory activity and 2) cytotoxicity, we proceeded research under two guidelines: 1) increase the inhibitory activity of “medium-sized molecule module” and 2) decrease overall amphiphilicity of peptide (decrease the cationic property of “guiding module” and/or decrease the hydrophobicity of “medium-sized molecule module”) anticipating to reduce potential cell-membrane damage. We found several peptides with significantly stronger activity than **1**. As “guiding

module”, various CPPs, tumor homing peptides, and non-peptidic molecules were examined. We synthesized various linear or cyclic peptides with “guiding module” and “medium-sized molecule module”. By following the guideline in 2), cytotoxicity could successfully be reduced. On the other hand, the guideline 1) was insufficient, and it was extremely difficult to create molecules that showed p53/MDM2 inhibitory activity in cells. Very recently, however, we found that a control molecule designed to be inactive exhibited weak p53/MDM2 inhibitory activity. This unexpected finding led to the elucidation of the cause of insufficient activity. By applying a new molecular design that overcomes the presumed causes, we succeeded in developing a linear peptide that exhibits strong p53/MDM2 inhibitory activity in cellular systems and is not cytotoxic. By applying the temporary cyclization strategy to this molecule as “medium-sized molecule module”, it is expected to develop the molecules with desired function. The problem found would be general and is anticipated to be evident in a large number of bioactive peptides.



**Figure 2.** Reducing environment-responsive p53/MDM2 inhibitory cyclic peptide 2 and its reaction under reducing conditions.