

# 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：立体構造規制ペプチドを基盤とした低分子医薬品の次世代デザイン法の開発  
Study of drug design based on conformationally constrained peptide libraries

研究開発実施期間：令和2年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：藤井 郁雄  
Ikuro Fujii

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
公立大学法人大阪 大阪公立大学研究推進機構 特任教授  
Osaka Metropolitan University, Organization for Research Promotion, Specially Appointed Professor

## II 研究開発の概要

### [研究の目的と意義]

現在、分子標的化合物探索、特にタンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) を遮断する低分子化合物の創出は、2つ手法で行われている。当該 PPI に関与するタンパク質の立体構造を利用して化合物を設計する方法 (SBDD) と膨大な数の化合物ライブラリーを準備し、スクリーニングにより目的とする化合物を取得する方法である。しかし、前者は目的とする情報を得るための構造解析の難しさが、また後者ではヒット化合物の活性改善の難しさがボトルネックとなり、手間とコストに見合った成果が得られているとは言えず、創薬の成功例も稀である。本研究では、従来法の課題を一挙に解決する革新的な方法として、進化分子工学 (分子標的 HLH ペプチド・ライブラリー技術) とペプチド構造構築理論を組み合わせた分子標的化合物の新しい設計法を開発する (図 1)。すなわち、独自の分子標的 HLH ペプチドの細胞表層提示ライブラリーをスクリーニングして、生物活性をもつペプチドを獲得する。この分子標的 HLH ペプチドは、強固な立体構造を持っているので、結合活性アミノ酸 (ファーマコフォア) の空間配置を容易に決定することが可能となる。

本法は4つの研究ステップから成る。

- ①細胞表層ライブラリー法により、分子標的化合物として分子標的 HLH ペプチドの開発を行う。
- ②分子標的 HLH ペプチドの結合活性、安定性、生物活性を確認する。
- ③分子標的 HLH ペプチドの立体構造から活性アミノ酸残基 (ファーマコフォア) の3次元構造を決定する。
- ④立体構造情報をもとに低分子分子標的化合物の設計し、合成して生物活性を確認する。

これらの研究を、3つの疾患関連タンパク質 [1. 免疫チェックポイント受容体 CTLA-4, 2. p53 調整因子 HDM2, 3. 血管内皮細胞増殖因子 VEGF(追加研究課題)] を標的タンパク質として行い、低分子医薬品の次世代デザイン法を確立するとともに、その有用性を示す。

## [研究成果]

### 分子標的 HLH ペプチド・ライブラリーの構築

分子標的 HLH ペプチドは、3つの領域で構成される[①N 末端ヘリックス(14 アミノ酸残基からなる構造支持領域)、②ループ(Gly 7 残基からなるリンカー)、③C 末端ヘリックス(14 アミノ酸残基からなる相互作用領域)] (*Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6013) (図 2)。2つのヘリックスは、内側に存在する Leu 基の疎水相互作用および側面の Glu 基と Lys 基の静電相互作用により寄り添い、安定な構造を形成する。一方、ヘリックス外側のアミノ酸は立体構造構築に関わっていない。したがって、外側のアミノ酸 (X 部分) をさまざまなアミノ酸に置換することにより、同一構造のペプチド・ライブラリーを構築することができる。本研究では、ループと C 末端ヘリックスの両領域にランダム変異を導入したライブラリーおよびループ領域のみにランダム変異を導入したライブラリーの2種のライブラリーを作製し、スクリーニングに用いた。

### 低分子医薬品の開発

#### ①細胞表層ライブラリー法による分子標的 HLH ペプチドの創出

分子標的 HLH ペプチドのファージ表層提示ライブラリーを、ビオチン化した標的に対してスクリーニングし、結合性ファージをアビジン化磁気ビーズにより回収した。このバイオパンニングの過程において、ファージ粒子の溶出方法を検討した。受容体を加えて、競合的に溶出することにより受容体と結合部位が同じ結合性ファージのみが回収され、リガンド-受容体相互作用を阻害できるペプチドを獲得した。

#### ②分子標的 HLH ペプチドの結合活性、安定性、生物活性

ファージ表層提示ペプチド・ライブラリーから受容体を使った競合溶出法により結合ペプチドを獲得した。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて、結合活性と、受容体相互作用の阻害活性を評価した。解離定数 ( $K_D$ ) は、75 nM であった。また、受容体をセンサーチップに固定化し、100 nM の標的タンパク質存在下で HLH ペプチドを添加すると、ペプチドの濃度依存的に標的タンパク質の結合レスポンスが低くなったため、HLH ペプチドが受容体相互作用を阻害することが判明した ( $IC_{50}=37$  nM)。さらに、円二色性 (CD) スペクトルを用いて HLH ペプチド3の構造安定性を評価したところ、20°C および 80°C においても、 $\alpha$ -ヘリックス構造特有の CD スペクトルを示し、安定な HLH 構造を持つことを確認した。

獲得した HLH ペプチドについて、細胞増殖に対する阻害活性を評価したところ、強い阻害活性を観測した ( $IC_{50}=44$  nM)。

#### ③分子標的 HLH ペプチドの立体構造から活性アミノ酸残基 (ファーマコフォア) の3次元構造を決定

HLH ペプチドと標的タンパク質との複合体の X 線構造解析を行った。X 線構造から、ペプチドが HLH 構造を保持していること、C 末端ヘリックス領域が相互作用してこと、またペプチドが受容体結合領域に結合していることが判明した。さらに、HLH ペプチドの部位飽和変異 (saturation mutagenesis) を行うことにより、配列の全領域において、最適なアミノ酸の情報を得た。これら構造情報と配列情報を組み合わせることにより、結合活性アミノ酸 (ファーマコフォア) について高精度の3次元構造情報を得ることに成功した。

#### ④ファーマコフォア立体構造情報による低分子分子標的化合物の設計と合成

分子標的ペプチド HLH ペプチドの結合活性アミノ酸 (ファーマコフォア) の3次元構造を利用して、低分子

化合物ライブラリーをバーチャル・スクリーニングし、110種の候補低分子化合物を選別した。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて、結合活性を評価したところ、15種の低分子化合物が結合活性を示した。そこで、次に細胞増殖の阻害活性を評価した。HUVEC を 5,000 cells/well で 96-well プレートに播種し、低分子化合物を添加し、48 時間後に細胞数を WST-1 アッセイで評価した。その結果、濃度依存的に細胞増殖を阻害する 10 種の低分子化合物の獲得に成功した。

以上のように、本研究で、進化分子工学 (分子標的 HLH ペプチド・ライブラリー技術) とペプチド構造構築理論を組み合わせた分子標的化合物の新しい設計法の開発に成功した。本法は、従来のペプチドミミックによる低分子化とは根本的にコンセプトもアプローチも異なり、迅速かつ低コストの分子標的化合物の獲得が達成される。

Today, two methods of drug development for molecular targeting therapy are available, structure-based drug design (SBDD) and combinatorial chemistry and high-throughput screening (CC & HTS), as shown in Fig.1. In SBDD, molecular targeting drugs are designed based on structural information of disease-related proteins, but the structures are not always available. On the other hand, CC & HTS require no structural information of the targeted proteins, but a huge library of druggable small compounds and expensive screening machines for HTS. The researchers devote most of their time and effort in the drug design, which still remains a challenge. Herein, we propose a new method for drug design for molecular-targeting small compounds by combining directed evolution and peptide engineering. A cell surface-displayed library of our original helix-loop-helix (HLH) peptides was screened against disease-related proteins to obtain peptides with biological activity (Fig. 2). The molecular targeting HLH peptides have a rigid three-dimensional structure, which makes it easy to determine the spatial arrangement of the binding active amino acids (pharmacophore). Since the HLH peptide folds by virtue of the interactions between the amino acid residues positioned inside the molecule, the outside solvent-exposed residues are possible to be mutated with a variety of amino acids to give a library of the helix-loop-helix peptides.

This method consists of four research steps: (1) Generation of molecular targeting HLH peptides by cell surface-displayed library method, (2) Confirmation of the binding activity, stability, and biological activity of molecular target HLH peptides, (3) Determination of the 3D structure of active amino acid residues (pharmacophore) from the 3D structure of molecular target HLH peptides, and (4) Design and synthesis of molecular targeting small compounds based on the 3D structural information.

(1) Generation of molecular targeting HLH peptides: We screened our peptide libraries for a disease-related proteins to successfully obtain the molecular-targeting HLH peptides.

(2) Confirmation of the binding activity, stability, and biological activity: The surface plasmon resonance (SPR) showed a strong binding activity to the disease-related proteins. The HLH peptide showed a strong inhibitory activity against the cell proliferation.

(3) Determination of the 3D structure of active amino acid residues (pharmacophore): The X-ray structure complexed with the receptor was analyzed. We succeeded in obtaining the 3D structure of the pharmacophore with high accuracy by performing the saturation mutagenesis.

(4) Design and synthesis of molecular targeting small compounds: Using the 3D structure of the pharmacophore, a virtual screening was performed to select 110 candidate small molecule compounds. The binding assay using SPR method revealed that 15 compounds showed activity. Finally, we evaluated the inhibitory activity against the cell proliferation, and found that 10 compounds showed remarkable inhibitory activity.

In this work, we succeeded in developing a new method of drug design for molecular-targeting small compounds based on 3D structural information of pharmacophores in the molecular-targeting HLH peptides screened from our original cell surface-displayed libraries.