

# 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：新規低分子ペプチドミメティクス設計法の開発と検証

Development and Validation of a Novel Method for Designing Small Molecule Peptide Mimetics

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：松岡 茂

Shigeru Matsuoka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人大分大学 医学部臨床薬理学講座 特任教授

Oita University, Faculty of Medicine, Specially Appointed Professor

## II 研究開発の概要

バイオ医薬品の発展は著しく、近年、医療用医薬品売上の上位10品目のうち約半数を占めるまでに成長した。しかしながら、高い製造コスト等が原因となり、アクセス可能な患者や医療従事者が限られている。そのため、公平性や持続可能性の観点から、製造コストを削減する技術の開発が求められている。

一方、自然界に存在する植物や微生物などに由来する物質は長年医療目的に利用されてきており、これらの多くは低分子化合物である。低分子医薬品は、多くの場合、合成化学による製造が可能であり生産コストが抑えられ、常温での長期保存や経口投与が可能な利点がある。一般的な薬物や抗生物質などの多くは低分子であり、長年信頼されているモダリティである。

本研究の目的は、バイオ医薬品の中心的なモダリティであるタンパク質やペプチドの薬理機能を、低分子で再現するための、インシリコ創薬技術の開発と検証である。既存のバイオ医薬品や未利用のタンパク質・ペプチドから、医薬品として利用できる部分の三次元構造をコンピューター上で抽出し、低分子化合物として再設計することで、医薬品のリードとして有望な化合物を提供する。

### 1) 設計環境開発

PDB 原子座標空間に任意の位置と方向を持つ一つのダイヤモンド格子を発生させ、各格子点にある炭素原子と結合標的タンパク質の重原子の距離をスコア化し、格子上に結合ペプチドの分子形状模倣の骨格を可視化するプログラムを Python 上で作成した。この方法は完全にトランス、ゴーシュ配座からなるダイヤモンド格子を使うため、sp<sup>2</sup>炭素や5員環などが再現できない。分子設計には設計者自身が創薬化学/有機化学の知識を有することが必要で、立体反発や合成実現性を考えながら分子形状を検討する必要があった。このため汎用的な分子設計手法

ではないが、結合標的に対して *in silico* のドッキングスタディで、高い親和性と理想的な結合構造が得られる低分子を見つけることが比較的容易にできた。また、本方法を発展させ、プログラムに分子の概形を提案させることに成功した。

## 2) 分子の設計

1)の方法を、ヒトエストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) を含む4つの標的タンパク質—タンパク質/ペプチド (or 中分子天然物) 複合体に応用し、合成可能な低分子の設計を行った。医薬品開発の重要なステップとなる構造展開や構造最適化を容易とするため、合成の工程数が入手可能な原料から5工程以内になるように分子を設計した。物性の予想には OSIRIS property explorer や AMED Cardiotoxicity Database など *in silico* ツールを利用した。

## 3) 設計分子の合成

2)の標的の中から合成実現性の高かった3つの分子について合成を実施した。合成した低分子骨格の例を図2に示した。合成過程で派生した構造も含めて、5つの骨格で約300化合物を合成した。

## 4) 合成化合物の検証

### 4-1. 標的タンパク質への結合試験

これまでに、TR-FRET、Protein Thermal Shift Assay (PTSA)、福島ヒトタンパク質マイクロアレイ、さらに令和4年度は、X線共結晶解析による結合標的タンパク質の同定を試みたが、完全に特定することはできなかった。化合物で、Isothermal Titration Calorimetry で  $K_d=4.0\ \mu\text{M}$  の親和性が見られたが、薬理活性との関連性はまだ示せていない。これらの化合物の標的分子の完全な特定は今後の課題である。

### 4-2. *in vitro* 生物活性試験

設計分子の医薬品としての有用性を明らかにする目的で、各種生理活性試験を実施した。

合成した設計分子について抗RSウイルス活性試験、抗SARS-CoV-2活性試験、線維化阻害試験などの *in vitro* 薬理活性試験を行った。抗RSウイルス活性試験では50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>) 6.25 $\mu\text{M}$ 、50%細胞毒性濃度 (CC<sub>50</sub>) >100  $\mu\text{M}$  で選択性>16倍の選択性を示す化合物 (PCT/JP2022/025361) が、抗SARS-CoV-2活性試験では EC<sub>50</sub> 1.71 $\mu\text{M}$ 、CC<sub>50</sub> >400  $\mu\text{M}$  で選択性>234倍の選択性を示す有望な化合物 (特願 2023-076174) がそれぞれ得られた。また、線維化阻害活性試験では、5  $\mu\text{M}$  で強力な抗線維化を示す化合物を得ることができた。

抗線維化化合物については、ブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルで *in vivo* 活性を評価した。線維化抑制効果が 10 mg/kg/day で確認できた。

以上の結果から、約300程度の小規模ライブラリであるが、全ての試験で有望なヒット化合物 (EC<sub>50</sub> <10  $\mu\text{M}$ ) が得られた。本研究で開発した分子設計法により、タンパク質や生理活性ペプチドの部分構造を基に医薬品のリードとして有望な化合物を設計し、多様な生物活性を示す新たなケミカルスペースを開拓できた (次頁図5)。

The development of biopharmaceuticals has been remarkable, with roughly half of the top ten pharmaceutical sales in recent years accounted for by this sector. However, high manufacturing costs limit the accessibility for patients and healthcare practitioners. Therefore, from the perspectives of fairness and sustainability, there is a demand for the development of technologies to reduce manufacturing costs. On the other hand, substances derived from plants and microorganisms found in nature have long been used for medical purposes, many of which are small molecule compounds. Small molecule pharmaceuticals are often synthetically producible, resulting in lower production costs, and have advantages such as long-term storage at room temperature and oral administration. Many common drugs and antibiotics are small molecule and represent a modality that has been trusted for many years. The goal of this research is the development and validation of *in silico* drug discovery techniques to reproduce the pharmacological functions of proteins and peptides, which are at the core of biopharmaceuticals, with small molecule compounds. We extract the three-dimensional structure of the parts of existing biopharmaceuticals and unused proteins and peptides that can be used as pharmaceuticals on a computer, and by redesigning them as small molecule compounds, we provide compounds that are promising as pharmaceutical seeds.

Molecular design was conducted as follows: A program was created that generates a diamond lattice at an arbitrary position and direction in PDB atomic coordinate space, and visualizes the skeleton imitating the molecular shape of the binding peptide on the lattice. This method uses a diamond lattice consisting entirely of *trans* and *gauche* conformations, so it cannot reproduce  $sp^2$  carbon or 5-membered rings. The user must have knowledge of medicinal chemistry/organic chemistry for molecular design, and it is necessary to consider steric hindrance and synthetic feasibility. Although it is not a universal design method, it was easier to find small molecules, that show high affinity and ideal binding structure for the binding target in *in silico* docking studies.

We designed small molecule inhibitors for four protein-protein or protein-peptide complexes, such as the human estrogen receptor and NRBoxII peptide complex, using this methodology. By basic skeleton and its structural development, we synthesized approximately 300 new compounds in total.

Various physiological activity tests were conducted with the aim of clarifying the usefulness of these designed molecules as pharmaceutical seeds. *In vitro* pharmacological activity tests such as anti-RS virus assay, anti-SARS-CoV-2 assay, and fibrosis inhibition assay were conducted on the synthesized compounds. In the anti-RS virus assay, a compound showing selectivity of more than 16 times with a 50% effective concentration ( $EC_{50}$ ) of 6.25  $\mu\text{M}$  and a 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) of more than 100  $\mu\text{M}$  was obtained. In the anti-SARS-CoV-2 assay, a promising compound showing a selectivity of more than 234 times with an  $EC_{50}$  of 1.71  $\mu\text{M}$  and a  $CC_{50}$  of more than 400  $\mu\text{M}$  was obtained. In the fibrosis inhibition activity test, a compound showing strong anti-fibrosis at 5  $\mu\text{M}$  was obtained.

Although it is a small-scale library of about 300 compounds, promising hit compounds ( $EC_{50} < 10 \mu\text{M}$ ) were obtained in various physiological activity tests, so we believe that we have been able to explore useful chemical space containing diverse bioactive compounds through the molecular design method developed in this study.