

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：非天然 α -アミノ酸を用いた中分子ペプチド医薬品創成

Development of middle-sized peptide drugs using unnatural α -amino acids

研究開発実施期間：令和3年10月20日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：矢崎 亮

Ryo Yazaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人九州大学 高等研究院 准教授

Institute for Advanced Study, Kyushu University, Associate Professor

II 研究開発の概要

中分子ペプチドは、GPCR（Gタンパク質共役受容体）などの標的タンパク質だけでなく、次世代医薬品のターゲットとして近年注目されている PPI（タンパク質間相互作用）を標的とすることが可能である。広く平らな PPI 界面をカバーできる新たな創薬モダリティとして、環状ペプチドや機能性分子付加型の特殊ペプチドが期待されている。しかし、既存の特殊ペプチドは、しばしば細胞膜透過性が低く、*in vivo* での活性が低いことに加え、化学合成による円滑な提供が困難である。そのためこれら既存の特殊ペプチドとは根本的に異なる新たなペプチドの創成が強く望まれている。

このペプチド創薬の課題に対し、申請者らは立体障害の大きな非天然 α -アミノ酸合成法を開発している。この非天然 α -アミノ酸合成法では、立体障害の精密制御が可能であり、既存の立体障害の小さな非天然 α -アミノ酸では実現困難なケミカルスペースを有する化合物の提供に加えて、劇的な疎水性やヘリックスの安定性の増強のみならず、バイオアベイラビリティの向上が可能である。本研究では、独自の非天然 α -アミノ酸合成技術を基盤とし、*in vitro/in silico* での構造解析・物性評価系、*in vitro/in vivo* での機能評価系を有機的に連携させ、中分子ペプチド医薬品創成のための基盤技術を確立することを目的とする。独自のタンパク質生産技術を活用して調製した新型コロナウイルス SARS-CoV-2 spike とその受容体である hACE2 との PPI 阻害や、心不全の発症に関わる PPI の制御、さらには、かゆみや炎症に関わるサブスタンス P (SP) の伝達に重要な PPI を阻害する非天然ペプチドアナログの創成など本研究グループ独自の評価系を活用して非天然中分子ペプチドでの PPI 阻害医薬品の創成を目指す。さらに、合成したペプチドは中分子ペプチドライブラリーとして国内外の研究グループへ提供することで、創薬研究における中分子ペプチドの有用性を示す。

汎用性の高い炭化水素原料を用いた非天然 α -アミノ酸の合成法を新たに開発し、非天然 α -アミノ酸を導入

したペプチドの創出に初めて成功した。ターゲットに応じた非天然 α -アミノ酸を数グラムで提供可能な技術として、実用的な合成法の開発に成功した。本合成法では、独自の非天然アミノ酸をグラムスケールでの合成が可能となった。また、 α ヘリックス構造を安定化させる非天然アミノ酸だけでなく、 β ターン構造を安定化可能な非天然アミノ酸のペプチド導入法の開発に成功した。長鎖ペプチド合成において、これまで用いられていない新規ペプチド連結反応を開発した。

非天然 α -アミノ酸含有のモデルペプチドの2次構造解析により、従来のAibでは α ヘリックス構造をもたないが、独自の非天然 α -アミノ酸を導入したペプチドにおいて α ヘリックス形成が誘導されることを明らかにした。新型コロナウイルスSタンパク質を結合標的とするペプチドの構造解析・相互作用解析を進めた。Sタンパク質が結合するhACE2のN末端ヘリックスの配列に基づき合成した天然・非天然ペプチドの相互作用評価を表面プラズモン共鳴法により実施し、相互作用に必要な配列を絞り込むことに成功した。さらに、各ペプチドのS蛋白質親和性とヘリックス含有率には高い相関が見られた。得られた情報と*in silico*解析に基づき、非天然アミノ酸の導入位置を決定した。従来のAibおよび独自非天然アミノ酸を導入し、構造と相互作用を評価したところ、Aibよりヘリックス含有率が高く、Sタンパク質へ高い結合親和性を示すペプチドを見出した。さらに、異なる構造の非天然アミノ酸の導入、複数位置への導入を進めた結果、Sタンパク質への結合親和性をさらに増強することができた。また、これらのペプチドにACE2内在化抑制効果(感染抑制効果)が得られるか検証した。hACE2安定発現HEK293T細胞を用いて検討を行った結果、ACE2内在化阻害効果をもつペプチドを同定した。さらにCOVID-19感染細胞系でのアッセイを行ったところ、非天然アミノ酸含有ペプチドにおいて抗ウイルス活性を示すことが確認された。天然のアミノ酸由来のペプチドにおいては抗ウイルス活性を示さなかったことから、独自非天然アミノ酸の優位性を確認することができた。

非天然アミノ酸の細胞膜透過性の評価を行った。CACO-2細胞を用いて、細胞内への取り込み活性について評価を行ったところ、非天然アミノ酸含有ペプチドは天然アミノ酸由来のペプチドと比較して有意に細胞内取り込みが増加した。このことから、天然アミノ酸を非天然アミノ酸と置換することにより、生細胞を用いた評価では膜透過性が大きく改善されることがわかった。非天然アミノ酸により細胞膜透過性向上効果が確認できたため、MDM2-p53 PPI阻害天然ペプチドに非天然アミノ酸を導入したペプチドを用いて、生細胞内でのp53-MDM2 PPIの阻害活性について評価した。その結果天然ペプチドと比較して非天然 α アミノ酸含有ペプチドが細胞内でのp53-MDM2のPPIを有意に阻害することが明らかになった。ここまでに、天然ペプチドと比較して良好な膜透過性やPPI阻害効果を示すことが確認できたため、続いてペプチドの生体内での安定性について評価を行った。まずマウス肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験を行い、非天然アミノ酸含有ペプチドが十分な代謝安定性を有していることを確認した。さらに、マウスを用いて血中濃度をモニタリングすることで、非天然アミノ酸含有ペプチドが天然由来のペプチドと比較して半減期が約16倍延長することが明らかになり、非天然アミノ酸による代謝安定性が向上することも確認できた。

心不全の発症に関わるPPI阻害薬開発においては、ロイシンスキャニングを用いることで、非天然アミノ酸の導入位置を最適化し、細胞膜透過性を有するPPI阻害活性を有する非天然アミノ酸含有ペプチドを見出し、細胞レベルで心筋細胞の萎縮を抑制することを明らかにした。さらに、生体での有効性を確認するために疾患モデルマウスを用いて、筋萎縮や筋力の改善を指標に評価を行った。その結果、筋肉細胞の萎縮が抑制される傾向が見出された。また、血中の筋損傷マーカーもペプチド投与個体で改善傾向が見られた。以上の疾患モデルマウスを用いた検討により、非天然アミノ酸含有ペプチドが、細胞内PPIを標的した治療薬として有用であることが確認できた。

サブスタンスP(SP)が作用する3種類の受容体(NK1受容体、MRGPRB2およびMRGPRX2)に対する評

価系を構築し、天然アミノ酸で構成された市販の SP アナログについて阻害活性を評価したところ、MRGPRB2/X2 へのアゴニスト活性を有することがわかった。SP 受容体に対して、SP を短くしたペプチド残基を評価することで、SP の N 末端領域が MRGPRB2 および X2 の活性に重要であることを明らかにした。また MRGPRX2 への活性化作用を持たずに NK1 受容体阻害作用を示す SP アナログを確認した。

This study aims to establish a strategy for the development of middle-sized peptide drugs using a highly congested unnatural α -amino acid. The middle-sized peptide can be used not only for drug discovery research focusing on target proteins such as GPCRs, but also for targeting protein-protein interactions (PPIs) that are frequently intractable drug targets with small molecule drugs. In this study, we will establish the general strategy to design innovative middle-sized peptide drugs through our well-organized collaboration from diverse research fields including organic chemistry, physical chemistry, protein science, theoretical chemistry, biochemistry, and pharmacology. Our originally synthesized HCUAA allows precise control of steric hindrance and enables dramatic improvements in hydrophobicity, helix stability, and bioavailability, which are difficult to achieve with existing unnatural α -amino acids with small steric hindrance. The HCUAA peptides developed in this proposed study will be important additions to next generation peptide therapeutics such as cyclic peptides by enhancing cellular permeability and *in vivo* activity, thus accelerate drug discovery efforts with middle-sized peptide drugs.

A new synthesis method for unnatural α -amino acids using hydrocarbon was developed, and the incorporation of unnatural α -amino acids into peptides was achieved. A practical synthetic method was also developed, providing highly congested unnatural α -amino acids at a gram-scale. Furthermore, a synthesis method for unnatural α -amino acids that stabilize β -turn structures of peptides was developed.

Through secondary structure analysis of model peptides containing unnatural α -amino acids, we found that peptides incorporating our original unnatural α -amino acid induced α -helix formation, whereas conventional Aib did not induce α -helical formation. Based on the sequence of the *N*-terminal helix of hACE2, which binds to the S protein, we investigated affinity evaluations of natural or α -unnatural amino acid-derived peptides and S protein using surface plasmon resonance. A strong correlation was observed between the affinity of each peptide for the S protein and its helix content, indicating that helix formation plays a crucial role in peptide binding to the S protein. Using these results and *in silico* analysis, we determined the positions for introducing unnatural α -amino acids and discovered peptides with higher helix content and stronger binding affinity to the S protein than Aib-derived peptides. Further progress was achieved by introducing unnatural α -amino acids with different structures and at multiple positions, resulting in enhanced binding affinity to the S protein. Furthermore, assays conducted in COVID-19-infected cell lines confirmed antiviral activity of peptides containing unnatural α -amino acids. This activity was not observed peptides derived from natural α -amino acids, demonstrating the superiority of our original unnatural α -amino acids.

We evaluated the uptake activity into cell using CACO-2 cells and found that peptides containing unnatural α -amino acids exhibited a significantly increased cellular uptake compared to peptides derived from natural α -amino acids. Since we confirmed the enhanced cell membrane permeability effect of unnatural α -amino acids, next evaluated the inhibitory activity of p53-MDM2 protein-protein interaction (PPI) in live cells. The peptides containing unnatural α -amino acids significantly inhibited p53-MDM2 PPI in cells compared to natural peptides. Furthermore, we found that metabolic stability was significantly improved by unnatural α -amino acids.

In the development of PPI inhibitors related to heart failure, we utilized leucine scanning to optimize the positioning of unnatural α -amino acids, leading to the discovery of peptides with high cell membrane permeability and PPI inhibitory activity. We demonstrated that these peptides could suppress the atrophy of myocardial cells. Furthermore, to confirm their effectiveness *in vivo*, we used a disease model mouse to evaluate improvements in muscle atrophy and muscle strength as indicators. Through the evaluations using the disease model mouse, we confirmed that peptides containing unnatural α -amino acids have promise as therapeutic agents targeting intracellular PPI for the treatment of heart failure.

We established an evaluation system for three receptors targeted by Substance P (SP) Through evaluating peptides with shortened SP sequences, we clarified the importance of the *N*-terminal region of SP for the activity of MRGPRB2 and X2. Additionally, we identified an SP analog that demonstrates NK1 receptor inhibition without activating MRGPRX2.