

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05588・20K20490

研究課題名（和文）低分子化合物を基材とする高分子免疫チェックポイント阻害剤の開発

研究課題名（英文）Development of polymeric immune checkpoint inhibitor by extension of low molecular weight compound

研究代表者

伊藤 嘉浩（Ito, Yoshihiro）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員

研究者番号：40192497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫チェックポイント阻害剤として低分子化合物を高活性化することを二つの原理から目指した。一つには、ペプチド鎖を複合化し、ペプチドによる相互作用点を増やすことで、より強く標的に相互作用させる方法である。そのために新しい低分子化合物-ペプチド・ライブラリー調製による進化分子工学の手法を開発した。もう一つには、低分子化合物を多価化した高分子医薬を開発した。分岐型ポリエチレングリコールやポリアミドアミンデンドリマーと複合化したり、重合性基を導入した。金ナノ粒子への固定化も行った。本研究では低分子阻害剤として3種類を用いたが、阻害剤の種類によってこれらの多価化効果が異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤の発見や発明は、がん治療における免疫治療という新しい医療を可能にした。しかし、阻害剤は抗体医薬に限られており、高分子量であることや、高価であることやから用途が限定されている。本研究では、阻害剤として低分子阻害剤3種類選り、ペプチド複合化による中分子医薬として、多価化による高分子医薬としての可能性を研究した。中分子医薬は、進化分子工学を用いることができることがわかった。また、高分子医薬化は阻害剤の種類によるもの高活性化が行われた。今後、本研究で検討した原理を用いた低分子化合物誘導体からの新しい医薬品の可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed biological activation of small molecule compounds as immune checkpoint inhibitors according to two principles. One method is the increase of the number of interaction points with target molecule by the peptide conjugation, for making them interact more strongly. To this end, we have developed a new method of evolutionary molecular engineering. In the other hand, we employed multivalent effect to enhance the local concentration of low-molecular-weight compounds around the target molecule. A polymerizable group was introduced to make it a polymer, or it was composited into a polyamideamine dendrimer or a branched polyethylene glycol. In addition, immobilization was performed on gold nanoparticles. In this study, three types of small molecule inhibitors were used, and it was found that these multivalent effects differed depending on the type of inhibitor.

研究分野：生体材料学

キーワード：中分子医薬 免疫チェックポイント阻害剤 進化分子工学 ペプチド医薬 高分子医薬 多価効果 C1k反応

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、様々な治療に関して細胞膜表面を標的とする医薬が発達し、その代表的なものに抗体医薬が様々な局面で用いられるようになってきている。しかし、抗体医薬は、高価で、他にも様々な問題点も指摘されている。もし、低分子医薬を起点としてその延長で抗体医薬に匹敵する高活性の医薬ができるようになれば、医学への貢献は非常に高い。

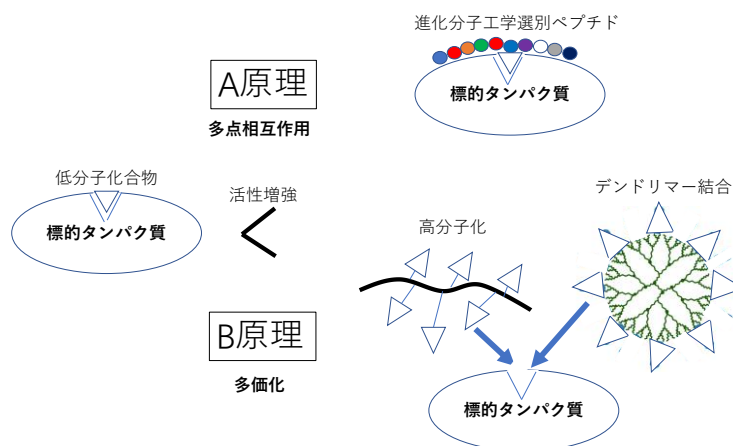
(2) 本研究では、これまで不十分な活性しか得られていなかった、あるいは医薬として実用化されなかったような低分子化合物、なかでも免疫チェックポイント阻害剤として候補にはなかったものを実用化されていない低分子化合物を高活性化することを目指す。抗体を用いない免疫チェックポイント阻害剤を生み出すことができればその影響は、学術的意義はもとより投与法の多様化などにより社会的、医療的意義は極めて高い。

(3) 高分子医薬による高活性阻害剤の概念は、古くからあるもののまだ医薬としての実用化には至っていない。本研究は、新しい免疫治療概念と、比較的古くから検討されている高分子医薬技術を融合して、抗体医薬に代わる新しい概念を構築しようとするものであり、萌芽的かつ例のない挑戦的研究として意義あるものと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 低分子化合物の高活性化のために図1に示すような二つの原理の確立を目指した。第一には、A原理で示すように、低分子化合物だけでは標的に結合定数は十分でないもののペプチド鎖を複合化し、相互作用点を増やすことで、より強く相互作用する方法である。このために特異的に結合する低分子化合物を起点として試験管内進化分子工学を駆使することによって、ペプチド配列を探索する。

第二には、B原理に示すように低分子を高分子化することによる多価化することにより活性を増強する。これは、高分子化により標的の近傍の局所濃度を増し、高活性化する手法となる。



(2) A原理のために、低分子化合物を含むランダム配列のペプチド複合体・ライブラリーの中から標的結合性ペプチド複合体を選別する手法を開発する。これまで

に開発してきた有機合成化学と酵素法を組み合わせたハイブリッド法では、低分子化合物結合アミノ酸担持 tRNA を作成し、これを用いて無細胞翻訳系で低分子化合物結合アミノ酸をペプチド中に導入し、リボソーム・ディスプレイとし、これによりペプチド複合化合物を選出してきた。しかし、この方法では、嵩高い低分子化合物はリボソームのチャネルを通過できず、低分子化合物複合化ペプチド・ライブラリーの作成が不可能であった、

そこで本研究では、これまで導入できなかった嵩高い低分子医薬もペプチド・ライブラリー内へ導入できるようにしてから、無細胞翻訳後に有機化学反応 (Click 反応など) で高効率な導入を可能にする。この場合、リボソーム・ディスプレイ法以外に mRNA ディスプレイ法を用いる。これにより、既知の相互作用を起点にした拡張型ペプチドアダプターの探索を可能にする。

(3) B原理では、分岐型ポリエチレングリコールやポリアミドアミン (PAMAM) デンドリ

図1 本研究では免疫チェックポイント分子を標的に選び、これまでの低分子化合物を拡張する進化分子工学 (A 原理) と高分子医薬 (B 原理) の観点から全く新しい免疫チェックポイント阻害剤を生み出すことを目指す。

マーに直接、ポリエチレングリコール(PEG)スペーサーを介して低分子化合物の複合化を行う。また、低分子化合物に直接重合性基(ビニル基、グリシジル基)を導入し、高分子化する。この他に、金ナノ粒子への固定化は、まずチオール基とアミノ基をもつ PEG で粒子を修飾した後に低分子化合物の固定化を行った。

3. 研究の方法

(1) 起点にする低分子化合物を図2に示す。これらの低分子化合物は、ブリストルマイヤーズスクイブ社からすでに論文や特許で発表されている免疫チェックポイント低分子阻害剤(Programmed Death-Ligand 1 に結合)である。

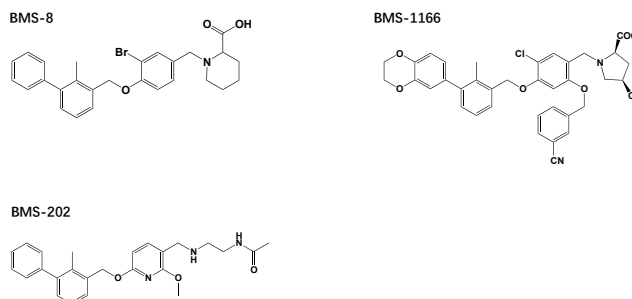


図2 本研究で起点に用いたブリストルマイヤーズスクイブ社から報告されている免疫チェックポイント阻害剤。

(2) A 原理のために図3のようなペプチド進化分子工学を開発した。特に、低分子化合物と複合化したアミノ酸をランダム配列ペプチド・ライブラリーを調製するために、新しい非天然アミノ酸導入法を開発した。これまでの非天然アミノ酸を tRNA にして翻訳過程で直接ペプチド・ライブラリーに導入するので、導入する化合物が嵩高い場合、翻訳過程でリボソームによるアミノ酸連結反応が進行しない。そこで、まず比較的分子量のビシクロ[6.1.0]ノン-4-イン(exoBCN)を前駆体アミノ酸としてランダム配列ペプチドに導入してから、Click 反応によって非天然化合物を導入できるようにした。

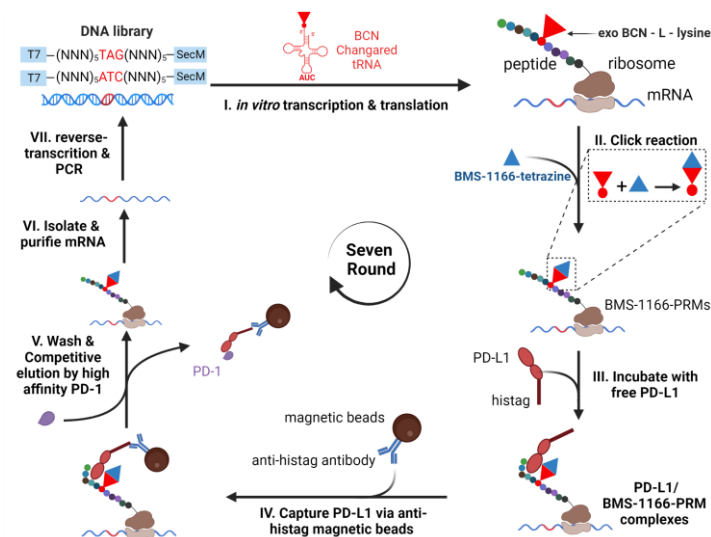


図3 本研究で用いた進化分子工学の方法論。ランダム配列の DNA から無細胞翻訳系でランダム配列のペプチド・ライブラリーのリボソーム・ディスプレイを調製し、PD-L1 へのアフィニティ選別を行った。

exoBCN 導入アミノ酸の導入には、変異型の BCN 結合アミノ酸-tRNA 合成酵素を用いた^①。exoBCN 導入したペプチドのランダム配列ライブラリーに、図4で示すようにテトラジンを結合した低分子化合物を、有機溶媒を含む溶液中で Click 反応によって導入した。そして、リボソーム・ディスプレイ法で PD-L1 を標的としてアフィニティ選別を行った。

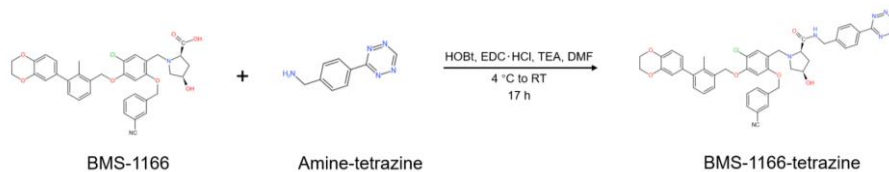


図4 低分子化合物に Click 反応できるテトラジンを導入。

(3) B原理では、BMS-8のビフェニル部を中心に図5に示すような誘導体を合成し、分岐型ポリエチレングリコースへの複合化を行った。ポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマーの第6世代型(256個のアミノ基をもつもの)と第4世代(64個のアミノ基をもつもの)に直接、ポリエチレングリコール(PEG)スパーサーを介したものに複合化を行った。低分子化合物に重合性

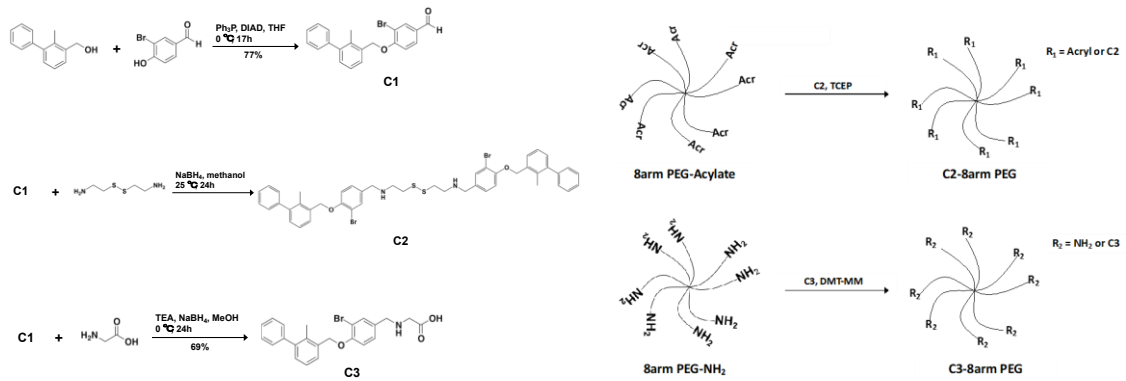


図5 BMS-8誘導体に官能基を導入してC2やC3化合物を合成し、これを8分岐型ポリエチレングリコールへ導入した。

基(ビニル基、グリシジル基)を導入し、高分子化も試みた。金ナノ粒子への固定化は、まずチオール基とアミノ基をもつPEGで修飾した後に行った。BMS導入量は金ナノ粒子上に残存するアミノ基の量から定量した。

(4) 得られた化合物の阻害活性を分子間相互作用としてBio-Layer Interferometry (BLI)法やAlphaLISAにより測定した。

4. 研究成果

(1) 進化分子工学により得られたペプチド配列を図5左に示す。図5右に示すようにマスペクトルから調製を確認することができた。しかし、BLI法によってPD-L1との相互作用を検討す

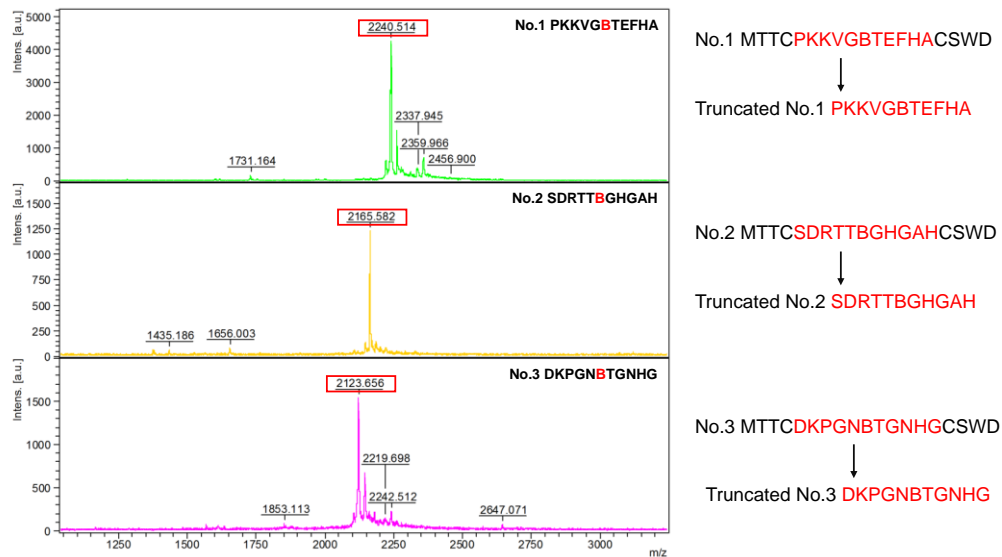


図6 右に進化分子工学で選別されたペプチド配列。左にペプチドの合成を示すマスペクトル。BはBMS-1166を結合したアミノ酸を示す。

ると修飾前のBMS-1166より活性が低下したことが分かった。テトラジン結合のBMS1166でも著しい活性低下が観測され、ペプチド修飾によっても高活性化はできなかった。

(2) BMS-8では、図7に示すように、分岐型ポリエチレングリコールとの複合化により多価

化することにより、活性の増加が観測された。特に、C3型では、BMS-8 ($IC_{50}=7.2\ \mu M$) と比較して、顕著な活性増加を観測された^②。

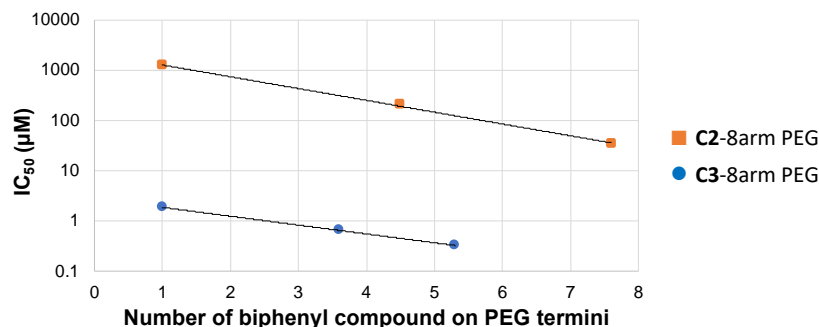
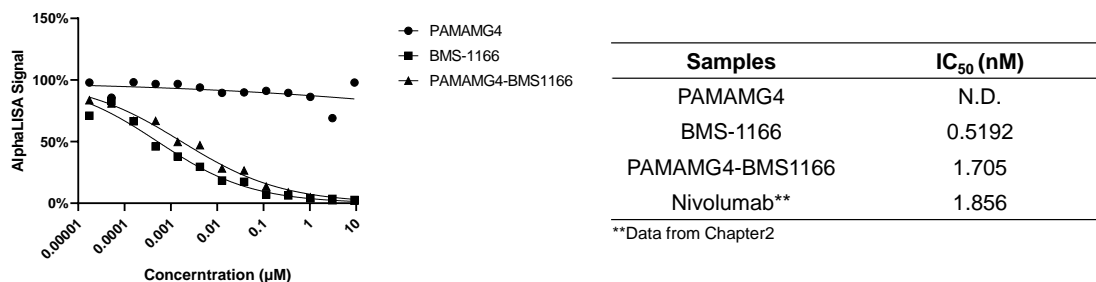


図7 分岐型ポリエチレングリコールに結合したBMS-8の阻害活性。

BMS-1166については、PAMAM dendrimerには第4世代の64個のアミノ基をもつものと複合化を行い、AlphaLISAによりPD-L1との相互作用を調べた。すると図8に示すように、dendrimer単独の活性は全くなく、dendrimer結合BMS-1166は、BMS-1166単独には若干劣るものの、



**Data from Chapter2

図8 PAMAM dendrimerと複合化したBMS1166のPD-1/PD-L1相互作用の阻害活性。

抗体医薬のNivolumabに匹敵する活性を示した。しかしながら、金ナノ粒子固定化ではBMS1166の固定化量にかかわらず、PD-L1への結合性は観測されなかった。BMS-1166の多価化を行うことができたが、多価化により阻害活性の増強は観測することができなかった。また、高分子化のためのBMS-1166へのビニル基あるいはグリシジル基導入を行うことができた。しかし、両方とも単独でも共重合でも高分子化することができなかった。また、金ナノ粒子への固定化でも顕著な効果は観測できなかった。

本研究では、低分子化合物の多価効果は観測されたものの、低分子化合物によって、その効果は異なった。今後は、化合物の分子構造に応じた適した修飾法を今後さらに検討してゆく必要がある。

<引用文献>

- ① Annika Borrmann, Sigrid Milles, Tilman Plass, Jan Dommerholt, Jorge M. M. Verkade, Manfred Wießler, Carsten Schultz, Jan C. M. van Hest, Floris L. van Delft, Edward A. Lemke, Genetic Encoding of a Bicyclo[6.1.0]nonyne-Charged Amino Acid Enables Fast Cellular Protein Imaging by Metal-Free Ligation, ChemBioChem, 13, 2012, 2094-9.
- ② Eun-Hye Kim, Ning Boyang, Masuki Kawamoto, Hideyuki Miyatake, Eiry Kobatake, Yoshihiro Ito, Jun Akimoto, Conjugation of biphenyl groups with poly(ethylene glycol) to enhance inhibitory effects on the PD-1/PD-L1 immune checkpoint interaction, J. Mater. Chem. B, 8, 2020, 10162-71.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eun-Hye Kim, Ning Boyang, Masuki Kawamoto, Hideyuki Miyatake, Eiry Kobatake, Yoshihiro Ito, Jun Akimoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Conjugation of biphenyl groups with poly(ethylene glycol) to enhance inhibitory effects on the PD-1/PD-L1 immune checkpoint interaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Mater. Chem. B	6. 最初と最後の頁 10162-10171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0TB01729A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eun-Hye Kim, Masuki Kawamoto, Roopa Dharmatti, Eiry Kobatake, Yoshihiro Ito, Hideyuki Miyatake	4. 巻 21
2. 論文標題 Preparation of Biphenyl-Conjugated Bromotyrosine for Inhibition of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 3639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 EunHye Kim, Boyang Ning, Masuki Kawamoto, Hideyuki Miyatake, Jun Akimoto, Motoki Ueda, and Yoshihiro Ito
2. 発表標題 Enhancement of Inhibitory Activity of Small Molecules on PD-1/PD-L1 Interaction by Conjugation with Branched Polyethylene Glycol
3. 学会等名 The 13th SPSJ International Polymer Conference (IPC2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮武 秀行 (Miyatake Hideyuki) (50291935)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員 (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秋元 淳 (Akimoto Jun) (80649682)	国立研究開発法人理化学研究所・創発物性科学研究センター・研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関