

# 中分子ペプチドの構造最適化を網羅的かつ 迅速に実現するペプチドスキニング手法

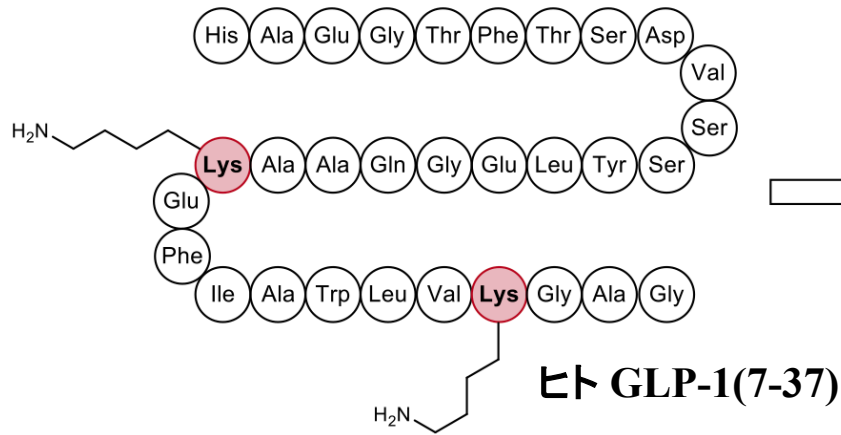
北海道大学 大学院薬学研究院

創薬科学研究教育センター

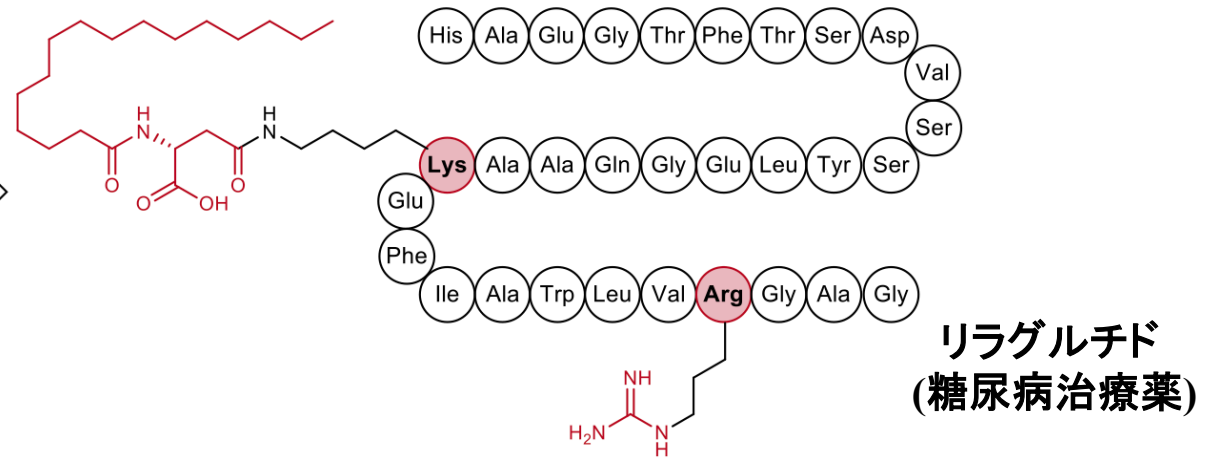
教授 市川 聡

2024年10月10日

# 従来技術とその問題点



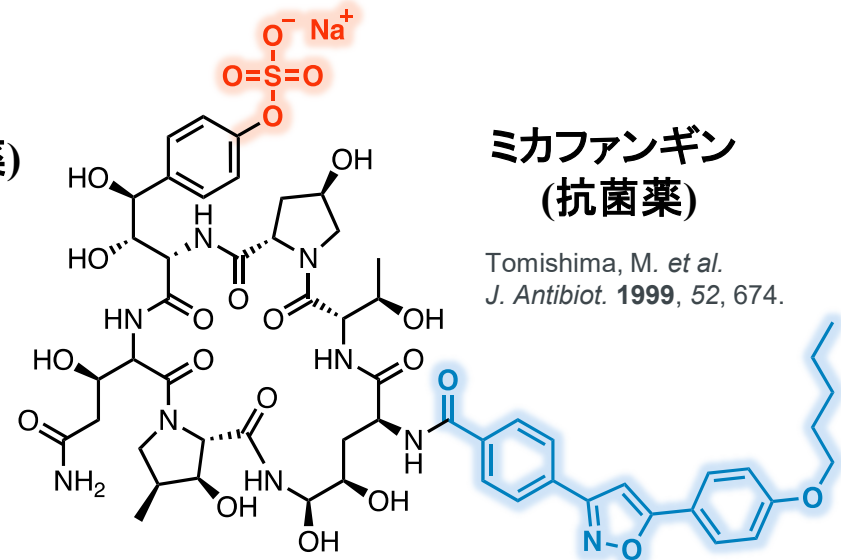
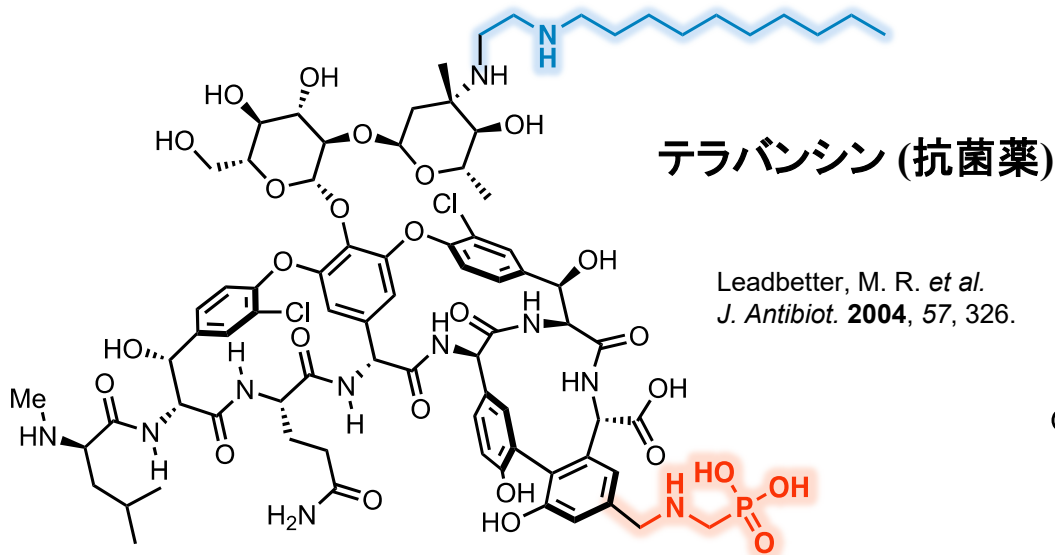
Habener, J. F. *et al. J. Biol. Chem.* 1986, 261, 11880.



Knudsen, L. B. *et al. J. Med. Chem.* 2000, 43, 1664.

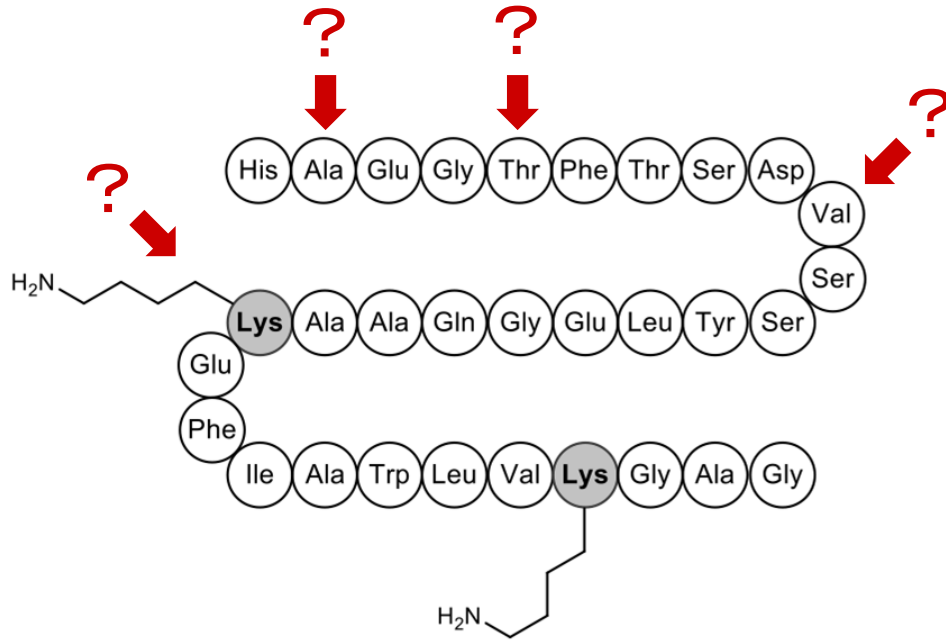
アミノ酸残基の適切な改変により、ペプチド医薬品の開発が達成できる

応用例：環状ペプチドの構造最適化



# ペプチドの構造変換スキーム

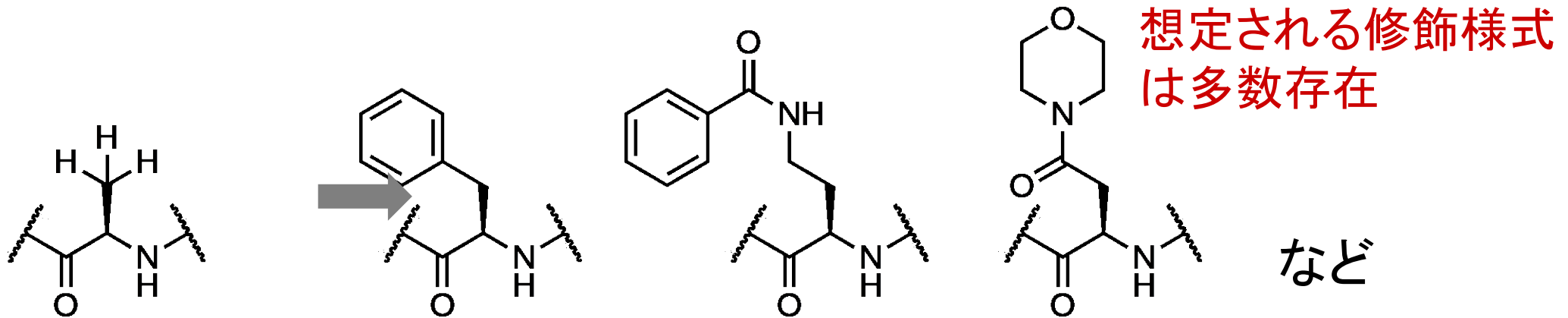
## ① どのアミノ酸残基が変換可能を調べる



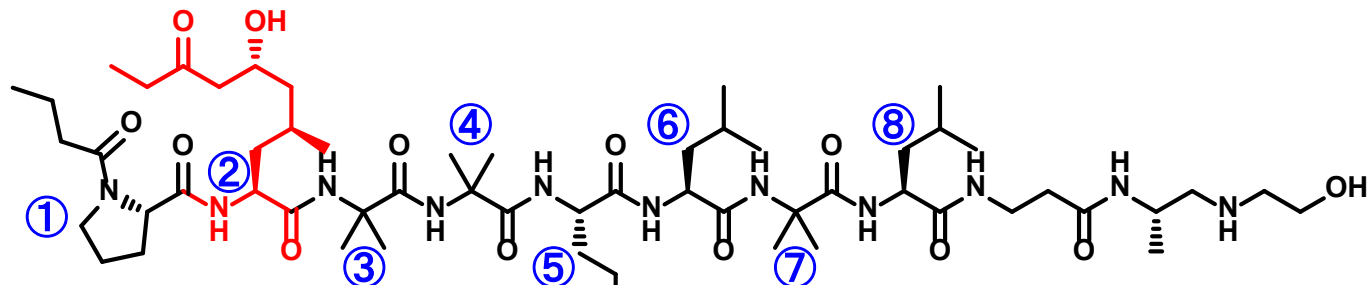
- ・変換することにより本来の活性を損なわないか？
- ・その位置の修飾により活性向上の余地があるか？

アミノ酸の数だけ検討が必要

## ② どのような修飾様式が良いかを検討する



## ペプチドスクランニングを用いた方法



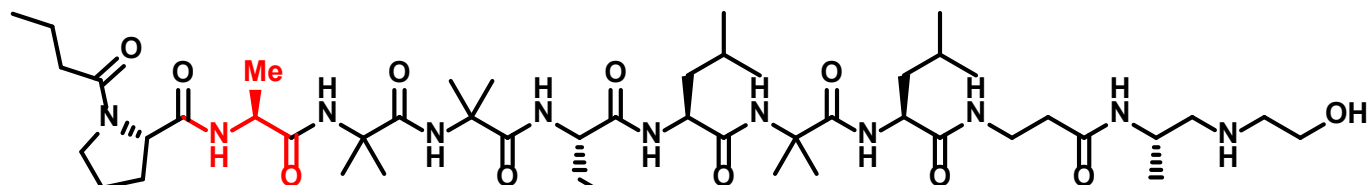
アラニン  
スクランニング



IC<sub>50</sub>

= 8 nM (breast cancer cell line T47D)

アミノ酸①～⑧を全てアラニンに変換して活性を評価



アラニン

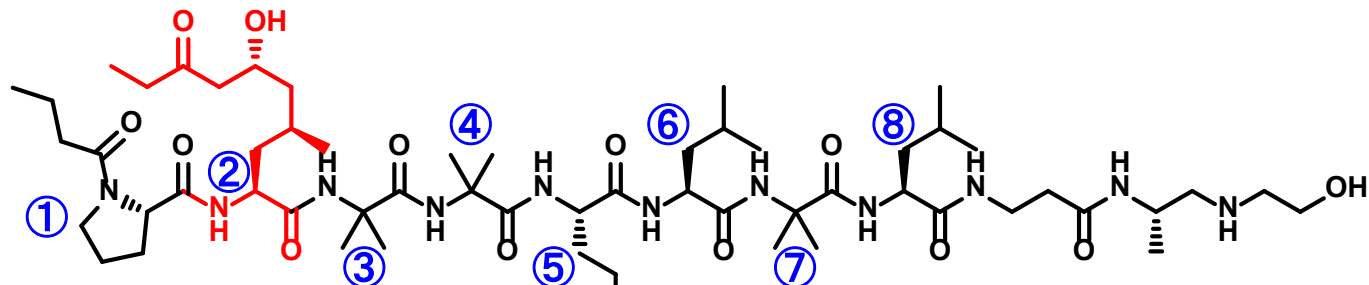
IC<sub>50</sub>

= 5 nM (breast cancer cell line T47D)

アミノ酸②の変換が許容であることがわかる

# 従来技術

## ペプチドスクランニングを用いた方法

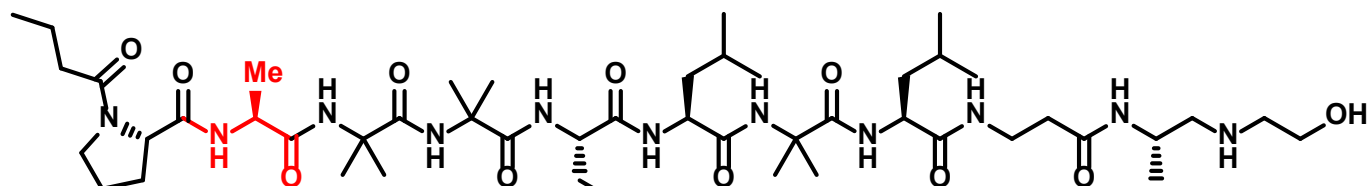


アラニン  
スクランニング

IC<sub>50</sub>

= 8 nM (breast cancer cell line T47D)

アミノ酸①～⑧を全てアラニンに変換して活性を評価



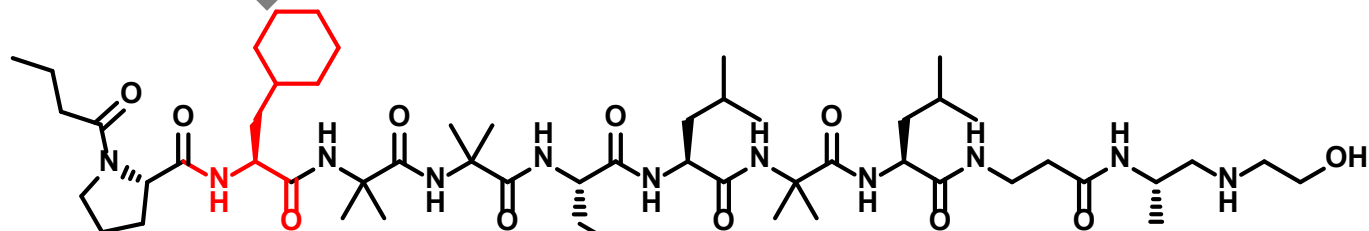
アラニン

IC<sub>50</sub>

= 5 nM (breast cancer cell line T47D)

アミノ酸②の変換が許容であることがわかる

誘導展開

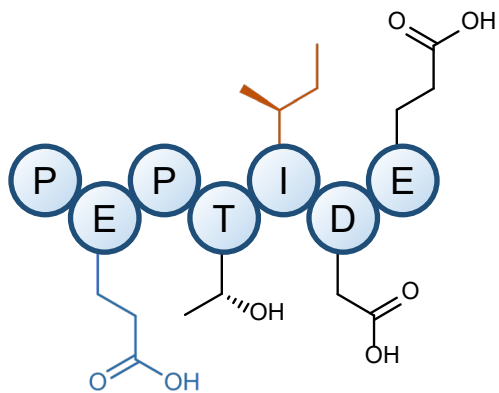


IC<sub>50</sub>

= 2 nM (breast cancer cell line T47D)

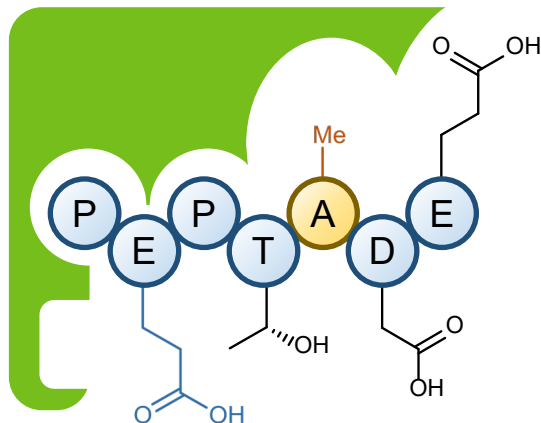
様々な修飾様式を  
検討した結果  
高活性誘導体を獲得

# 従来技術とその問題点



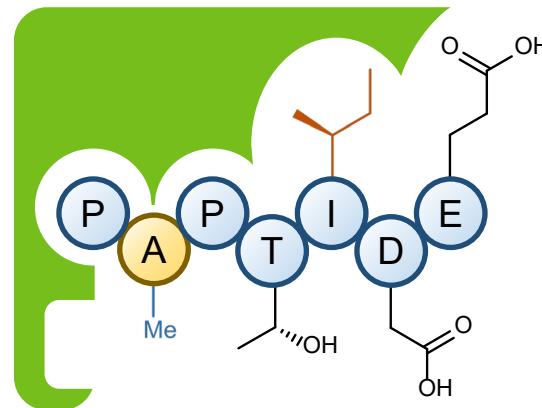
アラニン  
スキャンニング

step 1



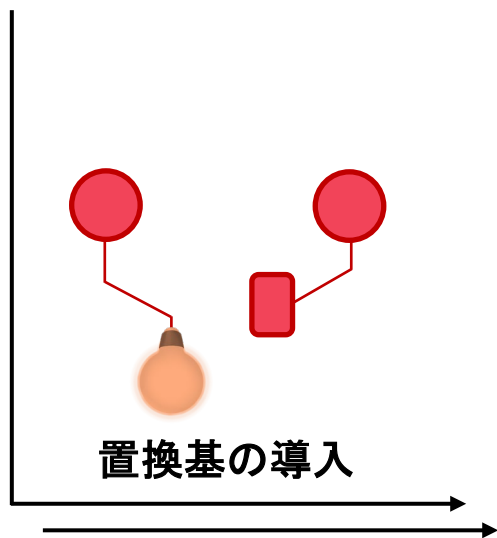
スキャンニング誘導体①

活性低下

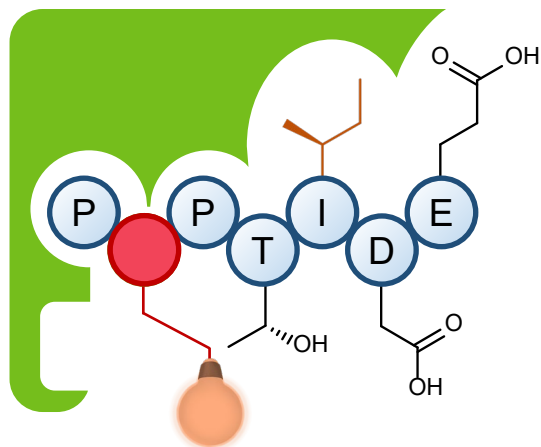


スキャンニング誘導体②

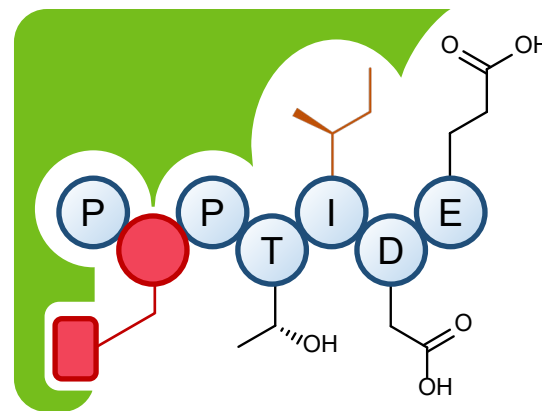
活性維持



step 2

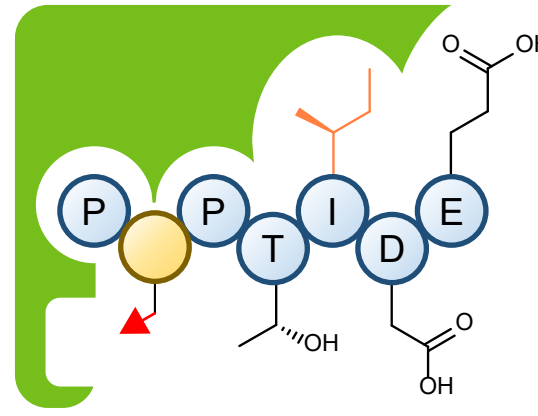
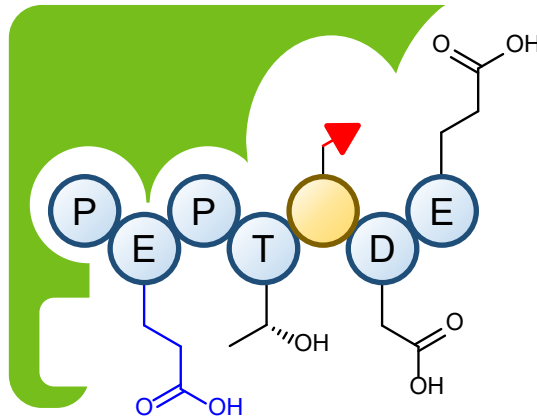
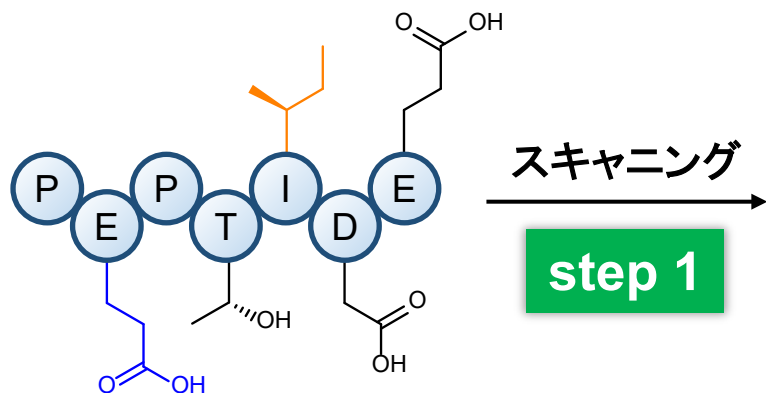


新たな機能の付与



活性向上

# 新技術の要点

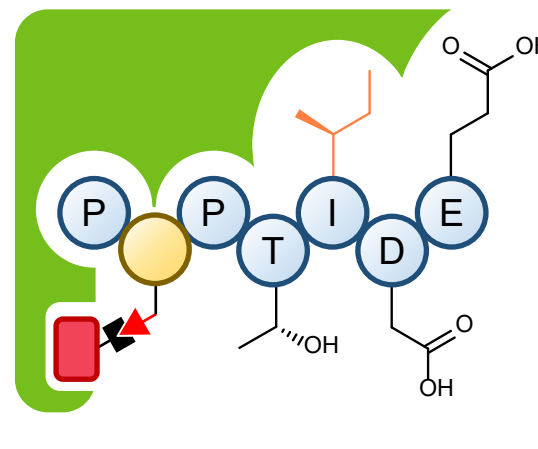
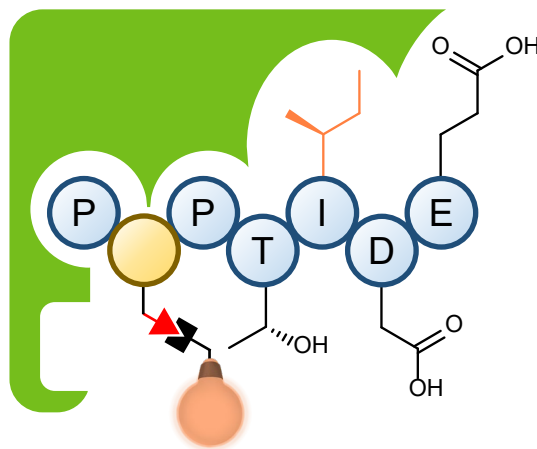


スキヤニング誘導体① 活性低下  
スキヤニング誘導体② 活性維持

スキヤニング誘導体の  
反応点(●)に化学選択的に  
置換基を導入

置換基の導入と  
活性評価  
**step 2**

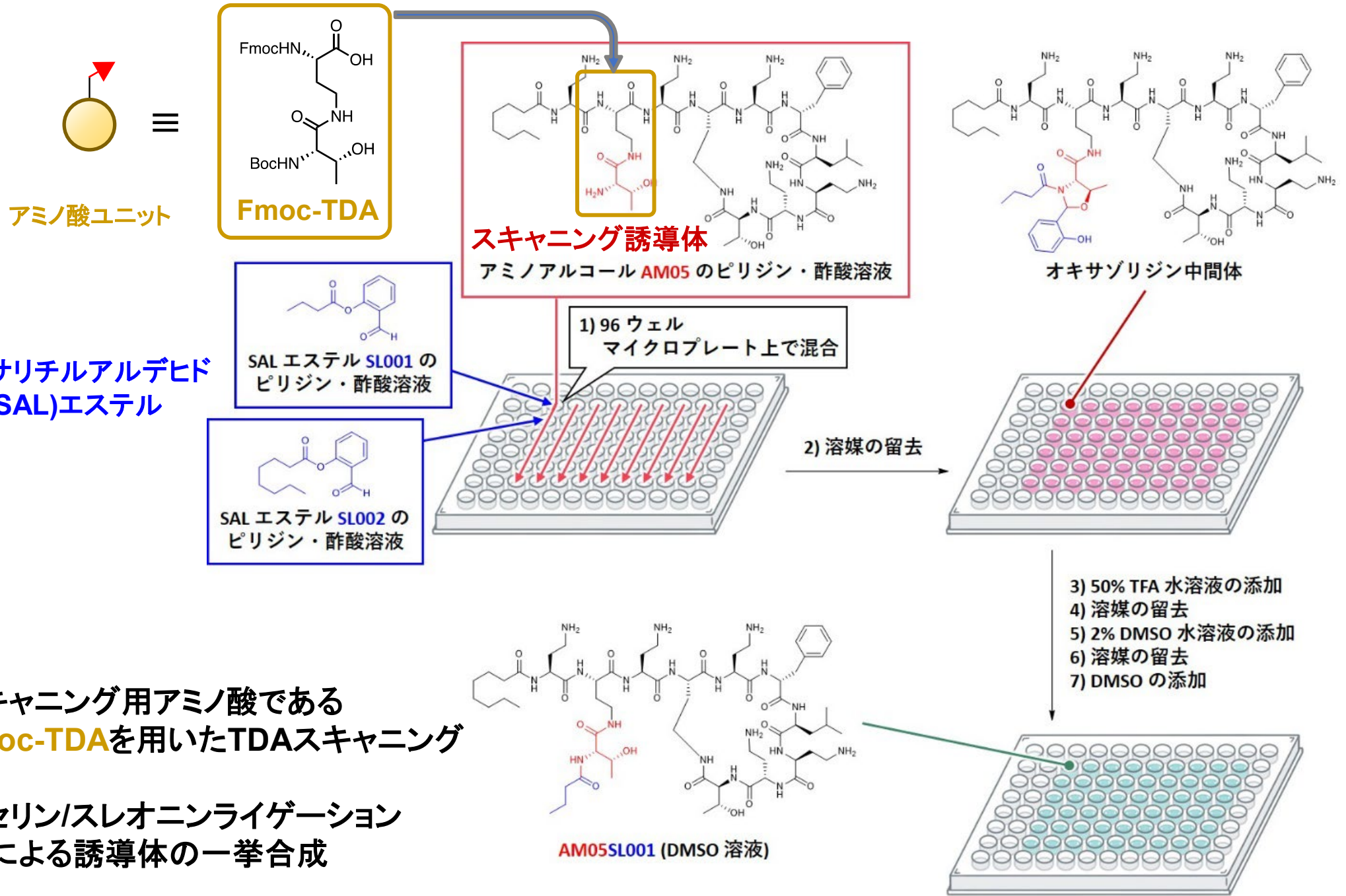
構造探索と誘導展開を  
シームレスに実現可能



## 実績

200 nmol程度のごく微量の検体で合成と生物活性評価を実施できる。(in situ化学)

# 新技術詳細

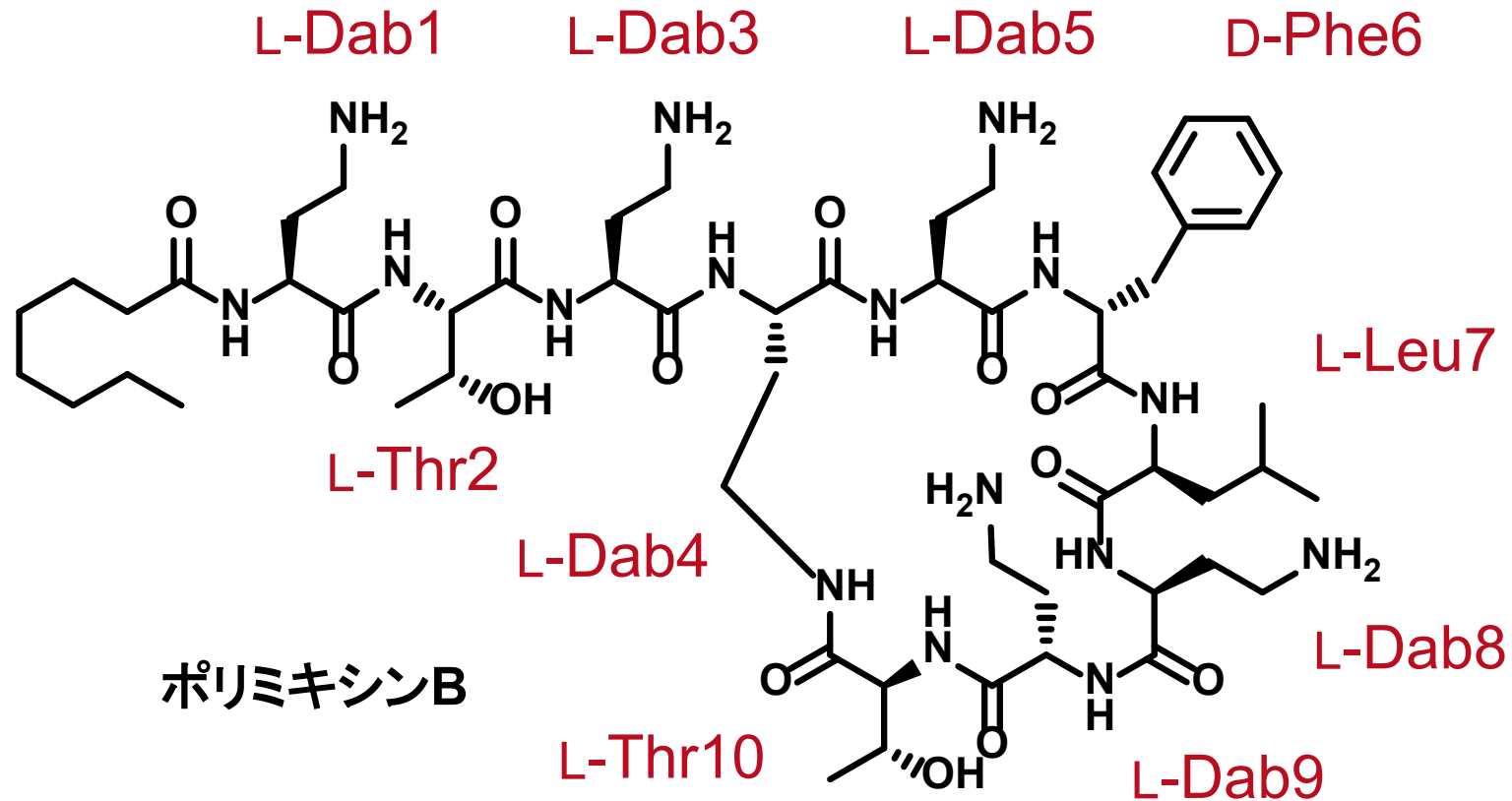




# 新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来のペプチドスキャンニングでは、ペプチドスキャンニングの結果を踏まえて設計した誘導体をアミノ酸単位から合成し直す必要があったが、本技術では利用したスキャンニング誘導体から直接誘導体を合成することができる。
- *In situ*化学との併用により、スキャンニング後の誘導展開は数100誘導体の一挙合成が可能。
- 誘導体展開においては、有機合成の専門家以外も合成を行える簡便なプロトコールが確立されている。

# 実施例



- ・グラム陰性菌による感染症治療の「最後の砦」  
(MIC = 0.78 mM for *P. aeruginosa* ATCC 27853)

Brownlee, G. *et al. Nature* **1947**, *160*, 263.  
Benedict, R. G.; Langlykke, A. F. *J. Bacteriol.* **1947**, *54*, 24.  
White, H. J. *et al. Bull. Johns Hopkins Hosp.* **1947**, *81*, 43.

- ・薬剤耐性菌の出現が深刻化

Shen, J. *et al. Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161.

## 誘導体展開の目的

- ① ポリミキシン耐性菌に有効な誘導体
- ② 狭域・広域スペクトルを有する誘導体

# 実施例

## ポリミキシンBを対象としてTDAスキヤニング

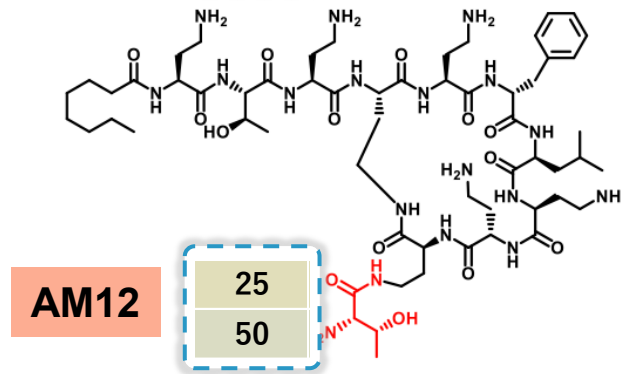
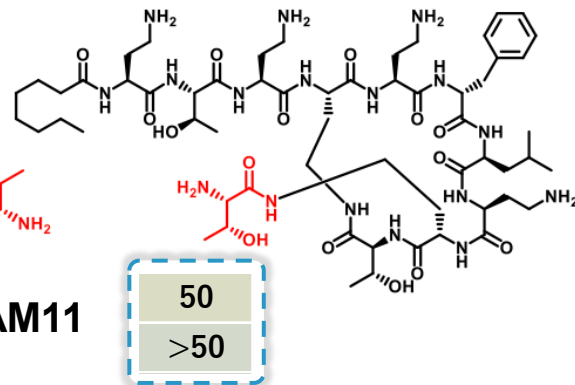
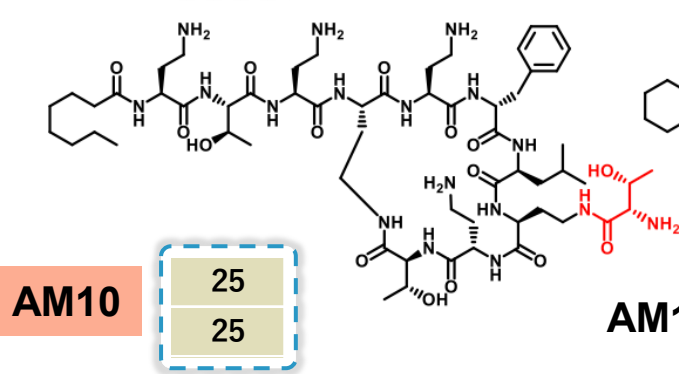
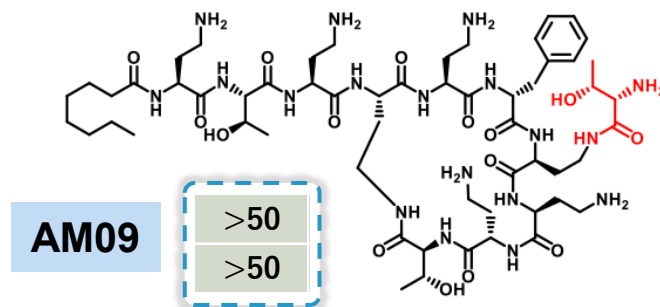
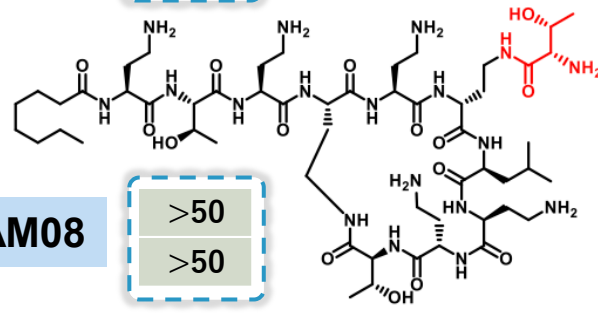
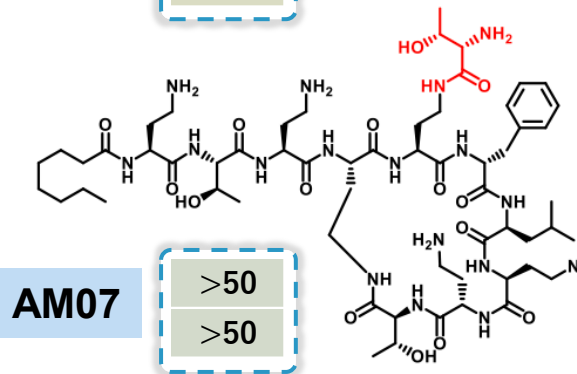
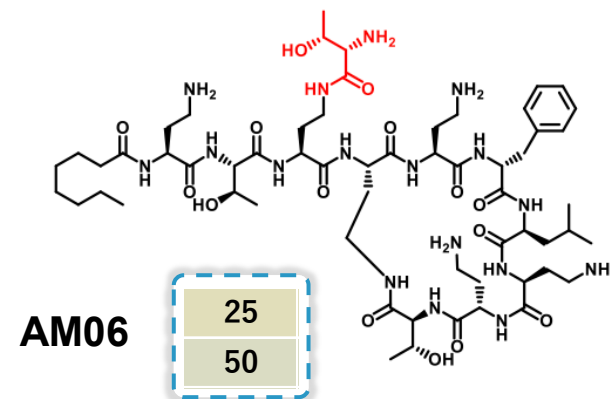
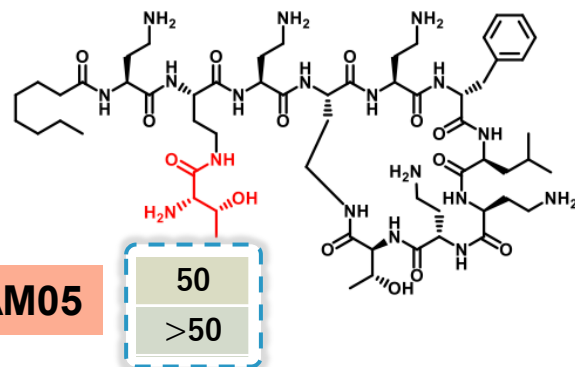
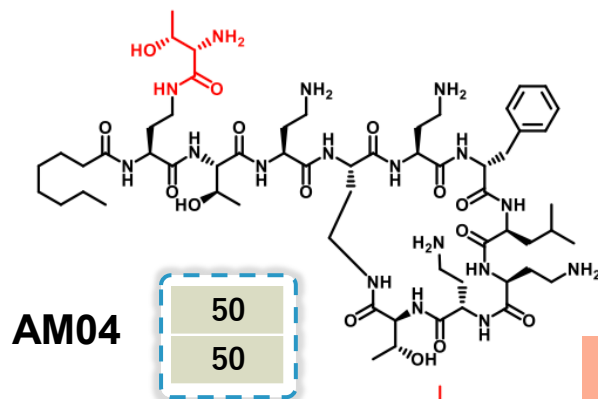
- ①実施例1: 薬剤耐性菌に有効な誘導体の創製
- ②実施例2: 抗菌スペクトルの改変
- ③既存技術(アラニンスキヤニング)との比較

# 実施例①

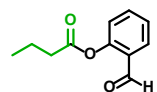
## スレオニルジアミノブタン酸(TDA)を有する スキャンニング誘導体の構造と抗菌活性一覧

MIC (μM)
<i>E. coli</i> SME98 / plnc12_mcr-1
<i>E. coli</i> SME98 / PORTpmrB34

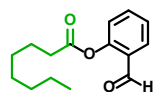
polymyxin B
3.13
6.25



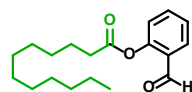
# 実施例① 誘導展開に用いた SALエステル一覧(54種類)



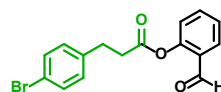
SL001



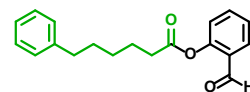
SL002



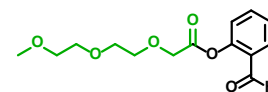
SL003



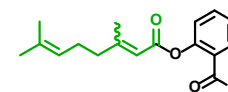
SL004



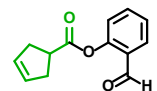
SL005



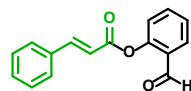
SL006



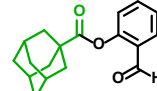
SL007



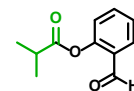
SL008



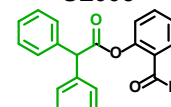
SL009



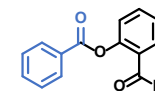
SL010



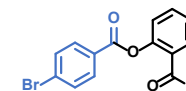
SL011



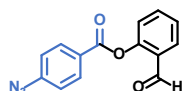
SL012



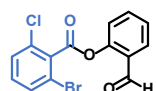
SL013



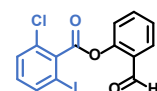
SL014



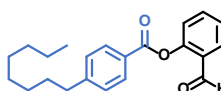
SL015



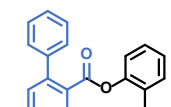
SL016



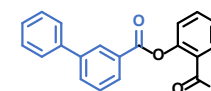
SL017



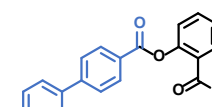
SL018



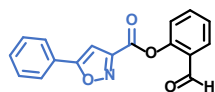
SL019



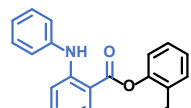
SL020



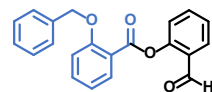
SL021



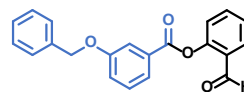
SL022



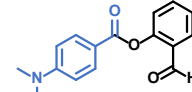
SL023



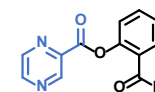
SL024



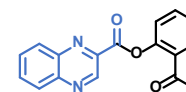
SL025



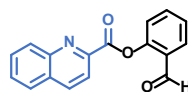
SL026



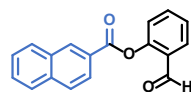
SL027



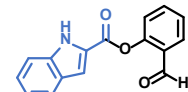
SL028



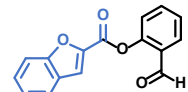
SL029



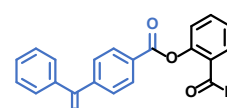
SL030



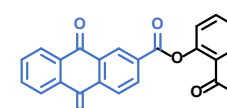
SL031



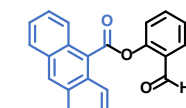
SL032



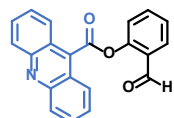
SL033



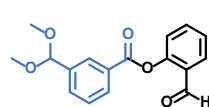
SL034



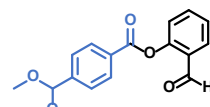
SL035



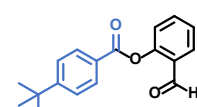
SL036



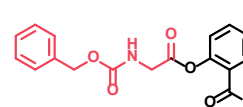
SL037



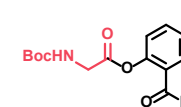
SL038



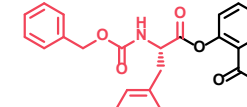
SL039



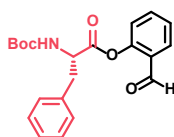
SL040



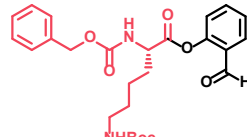
SL041



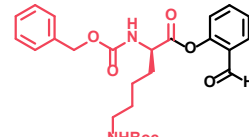
SL042



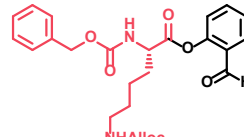
SL043



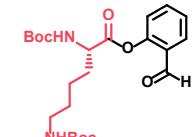
SL044



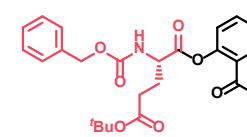
SL045



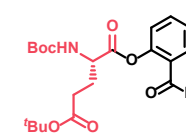
SL046



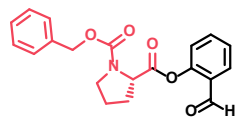
SL047



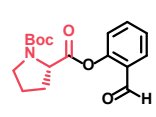
SL048



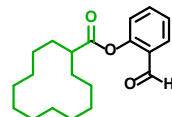
SL049



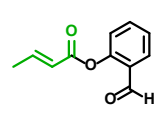
SL050



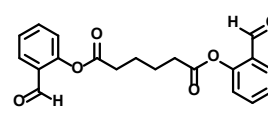
SL051



SL052



SL053

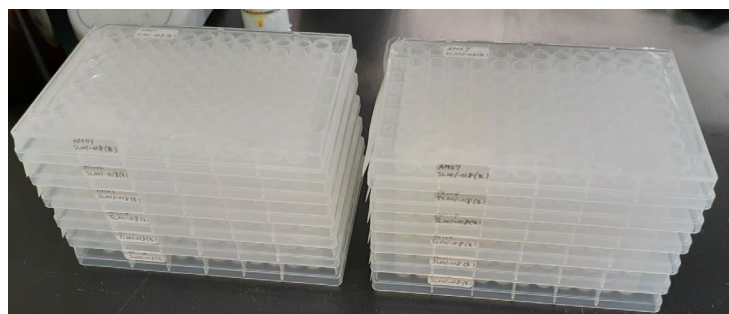


SL054

- alkyl SAL ester
- aryl SAL ester
- amino acid SAL ester

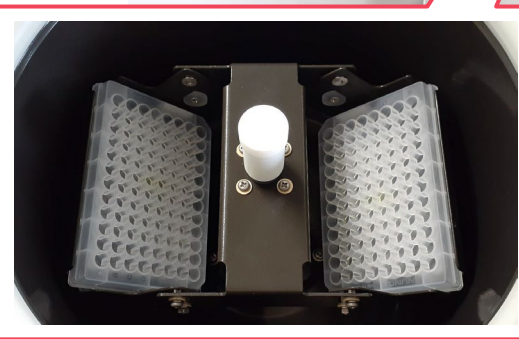
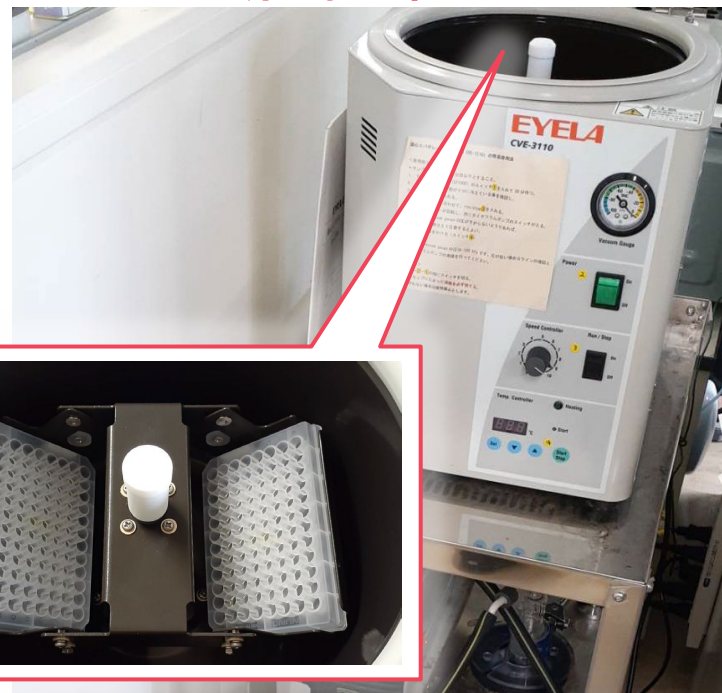
# 実施例① プレート上での誘導体の合成

6 スキャンニング誘導体 × 54 SALエステル = 324 化合物の合成例  
96 ウェルプレート上での合成



そのまま生物活性評価に使用できる

溶媒の留去



- ・生物活性評価に必要な最小限の化合物のみを合成
- ・有機合成の専門的技量が必要ない

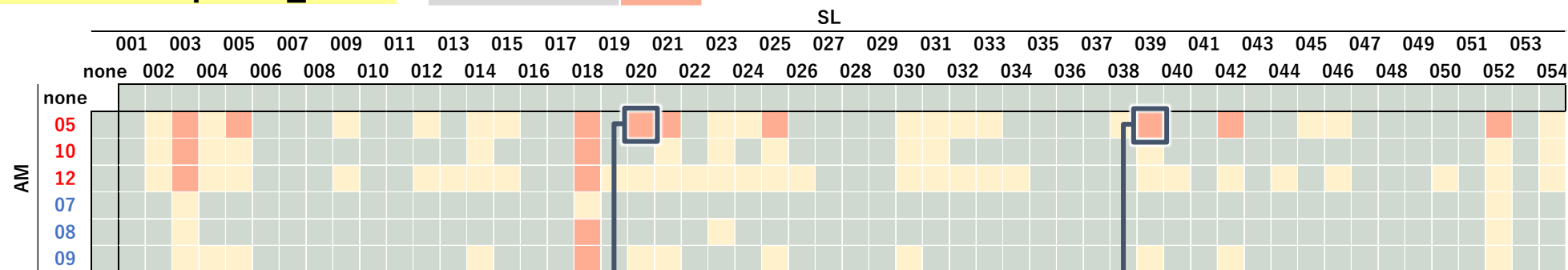
# 実施例① 薬剤耐性菌に対する抗菌スクリーニング → ヒット化合物の再合成

## 抗菌スクリーニング



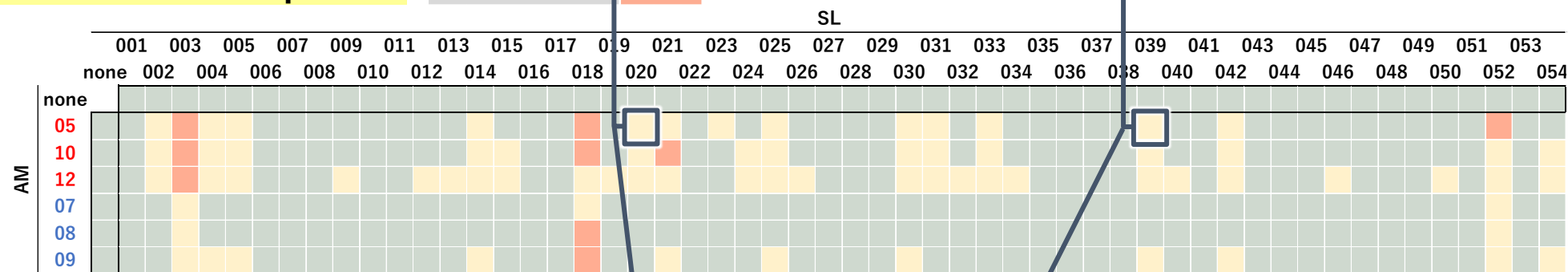
***E. coli* SME98/plncl2\_mcr-1**

polymixin B 3

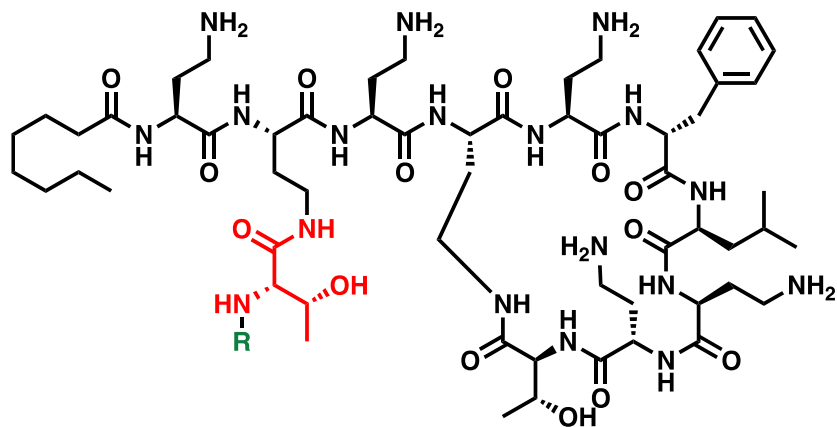


***E. coli* SME98/PORTpmrB34**

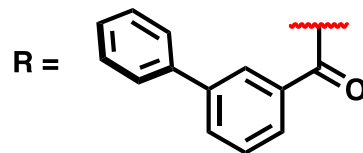
polymixin B 3



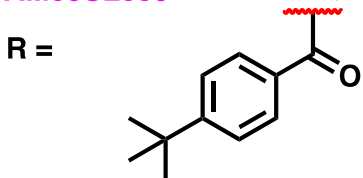
## ヒット化合物の再合成と評価



AM05SL020



AM05SL039



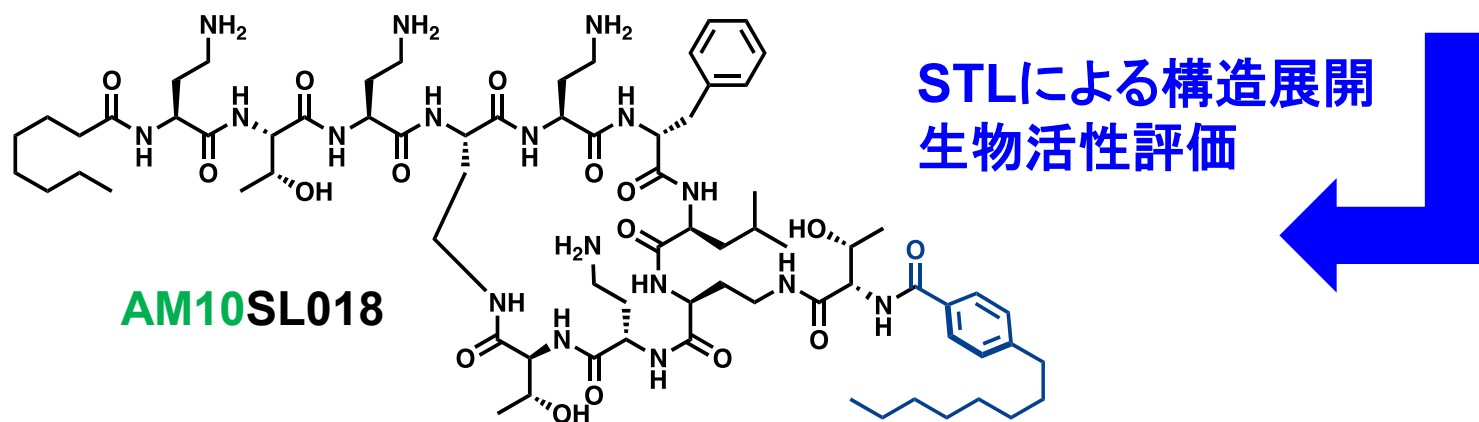
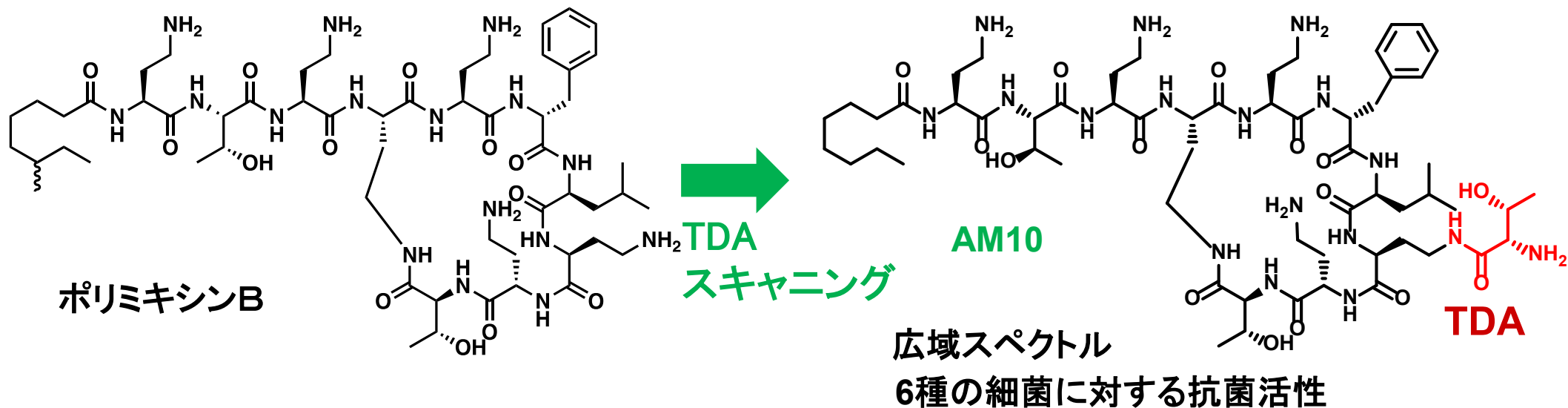
MIC (μM)

compd.	strains	<i>E. coli</i> SME98 /plncl2_mcr-1	<i>E. coli</i> SME98 /PORTpmrB34
AM05		50	>50
AM05SL020		1.56	3.13
AM05SL039		3.13	6.25
polymixin B		3.13	6.25

weak activity potent activity

# 実施例②

## 実施例②: 抗菌スペクトルの改変



MIC ( $\mu\text{M}$ )

strains compd.	<i>E. coli.</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> SME98	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	<i>E. faecium</i> ATCC 35557	<i>E. coli</i> SME98 /pIncl2_mcr-1	<i>E. coli</i> SME98 /PORTpmrB34
AM10SL018	3.13	1.56	1.56	1.56	3.13	3.13	50, 1.56	3.13	1.56
polymyxin B	0.39	0.20	50	0.39	0.78	>50	>50	3.13	6.25

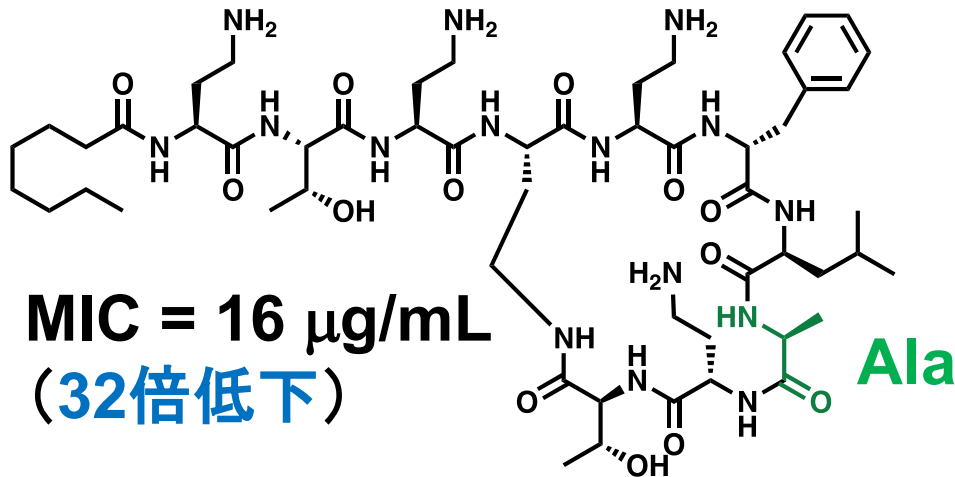


# アラニンスクヤニングとの比較

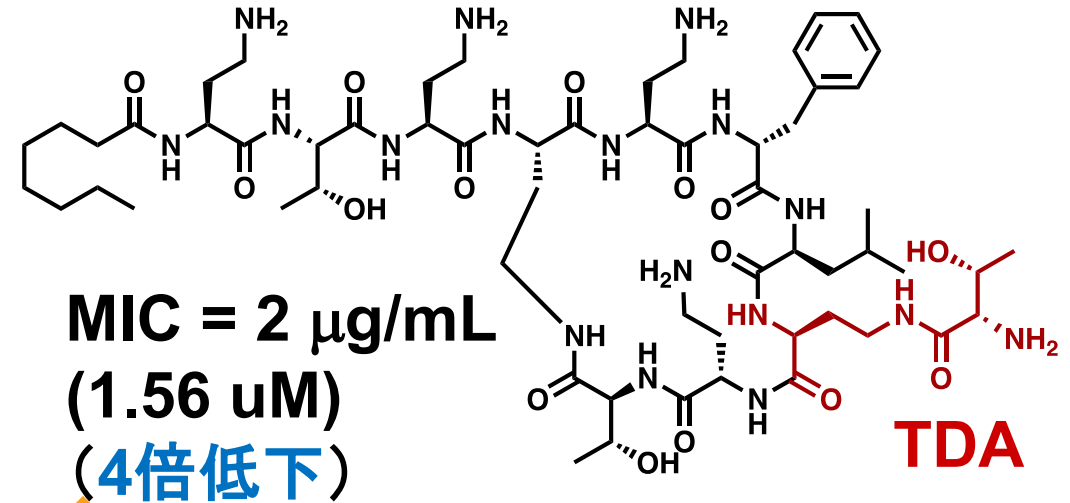
*A.baumannii* ATCC 19606に対する抗菌活性

polymixin B: MIC = 0.5  $\mu\text{g/mL}$

## アラニンスクヤニング

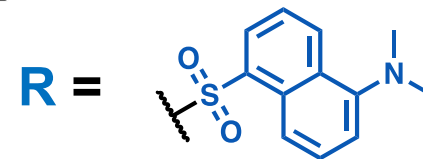
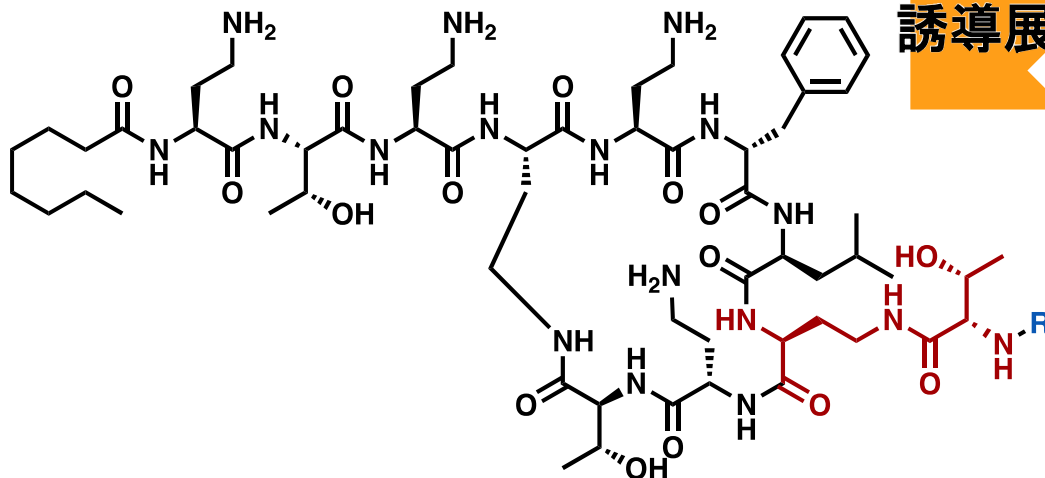


## TDAスクヤニング

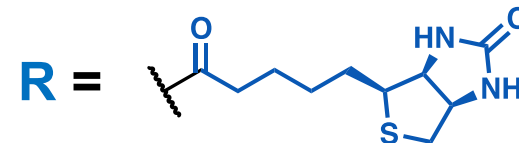


\* Li, J. et al. Chem. Sci. 2021, 12, 12211.

誘導展開



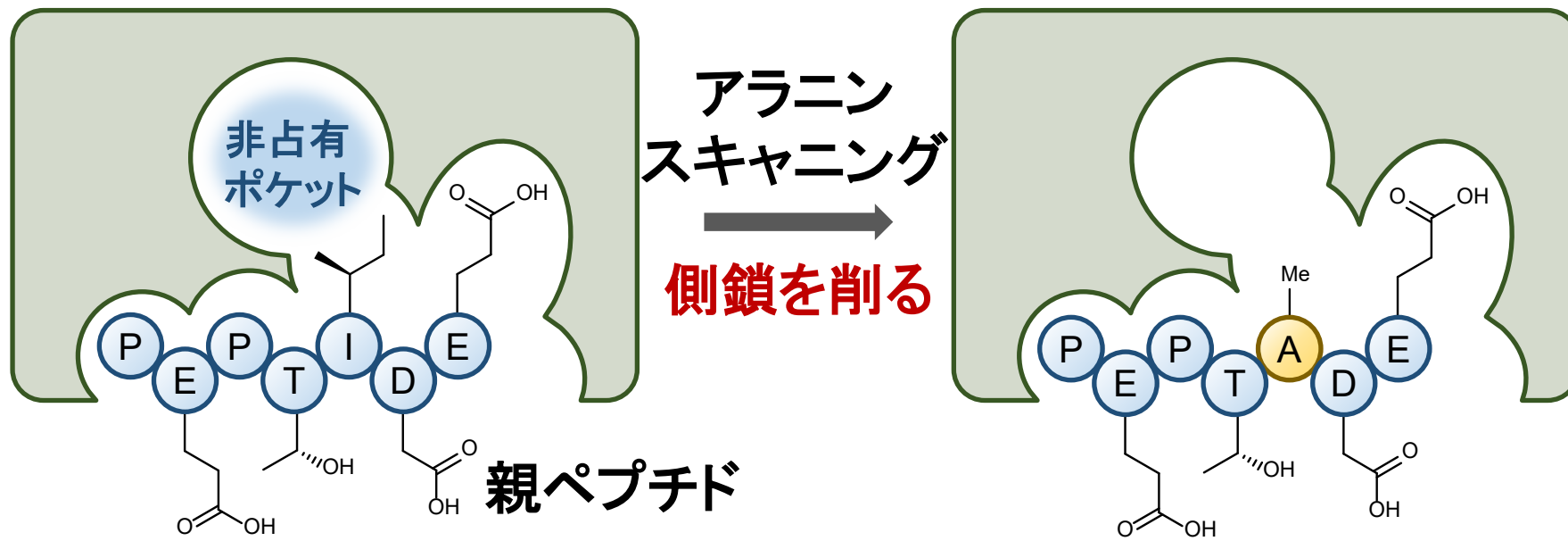
MIC = 1.56  $\mu\text{M}$



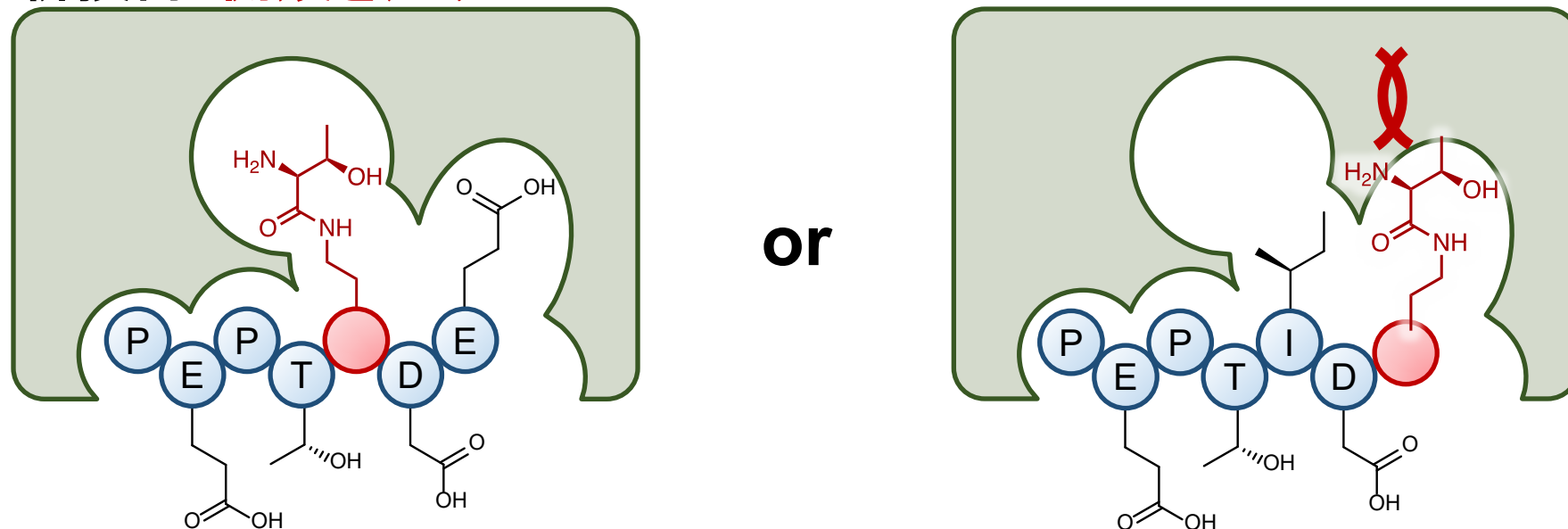
MIC = 12.5  $\mu\text{M}$

活性を維持しながらプローブ化

# アラニンスキヤニングとの比較



## 新技術: 側鎖を足す



「側鎖を足すアプローチ」により構造修飾に耐える空間を探索できる

# 想定される用途

- 主に中分子創薬において、リード化合物の迅速な構造最適化が実施できる。
- ペプチドを用いた生命科学研究において、バイオリジスト自身が高親和性ペプチドやプローブ分子の合成を実施できる。

# 実用化に向けた課題

- 現在、ポリミキシンBについて抗菌活性の増大や抗菌スペクトルの改変が可能なことを示した。
- TDAを用いたスキャンニングに関しては、適用できる対象となるペプチドの実績数は多くなく、今後の実用化に向けては、様々なペプチドで本技術により個々の研究目的が達成できることを示す必要がある。

# 企業への期待

- 本技術を生命科学の研究者が広く使用できるような形で製品化することで、本手法の実績数の増加が期待される。
- 企業が有する有機合成化学者以外からの潜在的なニーズについての情報をフィードバックする形で、誘導展開のプロトコールの最適化（専門技術なしにより簡便に実施できる）についても検討していきたい。

# 企業への貢献、PRポイント

- 医薬品を開発している製薬企業に対しては、医薬品開発候補化合物の迅速な同定に直接寄与するものと期待される。
- 本技術をより効果的に活用するための、新しいスクリーニング用アミノ酸素子を開発することが可能です。
- プレート上での多検体合成に関する実験操作や実験設備などのノウハウを提供することができます。

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：スキャンニング用アミノ酸化合物、スキャンニング用改変ペプチド、スキャンニング用キット及びペプチドの活性部位のスキャンニング方法
- 出願番号：特願2023-100910
- 出願人：国立大学法人北海道大学
- 発明者：市川 聡、勝山 彬、家口 凜太郎

# お問い合わせ先

**北海道大学 産学・地域協働推進機構**  
**産学協働マネージャー 渡部 正博**

**産学・地域協働推進機構 ワンストップ窓口**  
**<https://www.mcip.hokudai.ac.jp/about/onestop.html>**