ヒット化合物創出ユニット

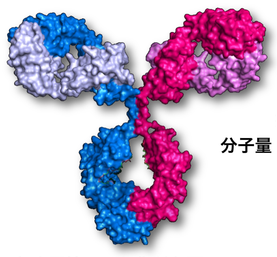
補助事業代表者（所属・職名）
藤井　郁雄（大阪公立大学 研究推進機構・特任教授）

分子標的中分子ペプチド創出の支援

補助事業分担者（所属・職名）
藤原　大佑（大阪公立大学 大学院創薬科学研究科・講師）、道上　雅孝（大阪公立大学 大学院創薬科学研究科・講師）

支援の内容と成果

抗体医薬のダウンサイジング



抗体
分子量：150,000

ダウンサイジング
（低分子化）



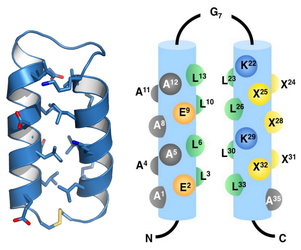
分子標的HLHペプチド
分子量：4,000

強固な立体構造を持つ
helix-loop-helixペプチド

■免疫原性：ヒト化が必要
■動物細胞による生産製造コストが高い
■細胞に入らない：標的タンパク質に制限あり

■非免疫原性：ヒト化が不必要
■化学合成が可能：製造コストが安い
■細胞導入が可能：細胞内タンパク質が分子標的になる

分子標的HLHペプチドの分子設計



■35 アミノ酸から構成される
■N-末端 α-ヘリックス，グリシン・ループ，C-末端 α-ヘリックス の３部分から構成される
■ロイシン側鎖（緑：L)の疎水相互作用により２つのヘリックスが会合し安定化する
■グルタミン酸側鎖（橙：E)とリジン側鎖（青：K)の静電相互作用により２つのヘリックスが会合し安定化する
■外側のアミノ酸（黄: X)は立体構造形成に関与しないため，さまざまなアミノ酸への置換が可能になる（HLHペプチド・ライブラリー）

標的分子	結合活性 (K_D)	作用機構	生物活性	適用
VEGF	26 nM	結合阻害	HUVEC細胞の増殖阻害 担がんマウスの腫瘍増殖抑制(ヒト大腸がん)	がん 加齢黄斑変性
	0.7 nM	PDC	送達薬物によるHUVEC細胞の増殖阻害	がん 加齢黄斑変性
HDM2	36 nM	結合阻害	ヒト前立腺癌細胞の増殖阻害	前立腺癌
CTLA-4	60 nM	結合阻害	混合リンパ球反応阻害	悪性黒色腫 腎細胞がん
G-CSF受容体	0.08nM	結合阻害	NMF60細胞の増殖阻害	リューマチ
ヒト血清アルブミン	37nM	体内動態改善	インシュリン複合体によるマウス血糖降下作用遷延化	糖尿病
Trop-2	2 nM	PDC	乳がん細胞mcf7の増殖阻害	がん
Cancer-related protein	4.5 nM	PDC	検討	がん
uPAR	0.17 nM	PDC	Hela細胞，膠芽腫U-87MG細胞の増殖阻害	がん
SARS-CoV-2 Spike RBD/Fc Chimera	0.42 nM	結合阻害	ヒトACE2 を遺伝子導入したサル腎臓上皮細胞株 Vero 細胞への SARS-CoV-2 (野生型) を感染を阻害	感染症
Small GTPase Arf6	527 nM	結合阻害	Hela細胞の遊走阻害，グアニンヌレオチド交換因子の阻害 (IC_{50}: 3.4 μM)	がん
BCL2	0.18 nM	結合阻害	Hela細胞の増殖阻害	mRNA医薬

分子認識特異性

ヒトタンパク質マイクロアレイによる特異性の評価
福島県立医科大学　医療-産業TRセンター
●優れた選択性（約6,000種の中で標的タンパク質のみに結合することを確認）

血清中安定性

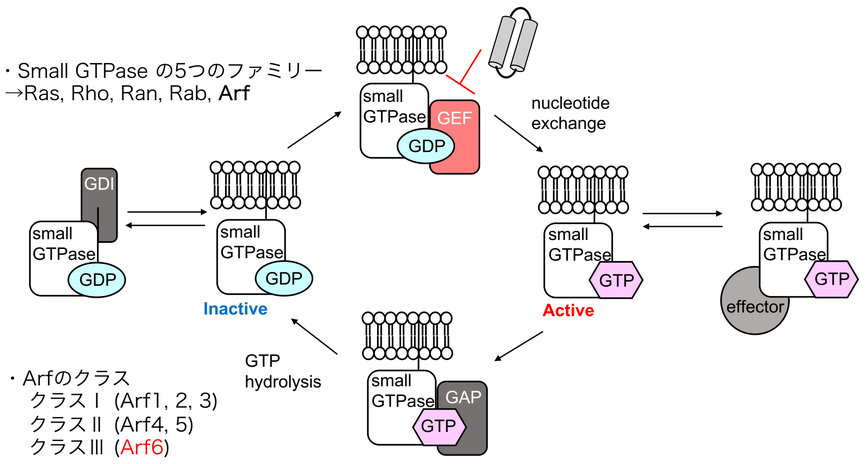
ペプチド分解酵素への抵抗性（*in vitro*）
●高い生体内安定性: 半減期約15日

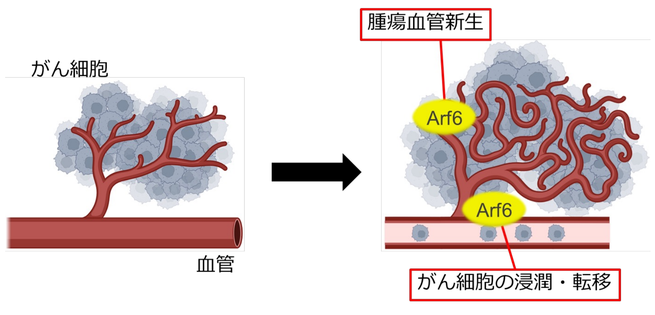
免疫原性

Balb/cマウスに免疫し抗体誘導を評価
●免疫原性を有さないことを確認

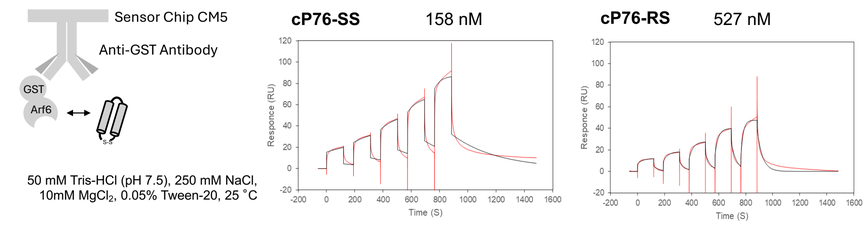
低分子量Gタンパク質Arf6を標的とするHLHペプチドの創出

・細胞膜やエンドソームに局在、細胞内小胞輸送や細胞遊走を担う.
・がん細胞の浸潤・転移を促進、腫瘍血管新生を介して腫瘍を増大させる.
・ Arf6特異的阻害剤は抗がん剤として開発が期待される.

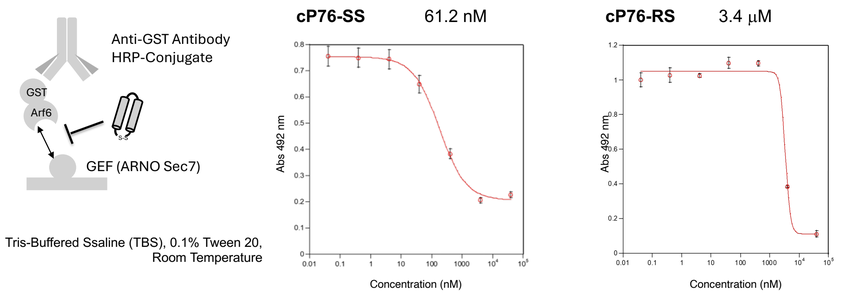




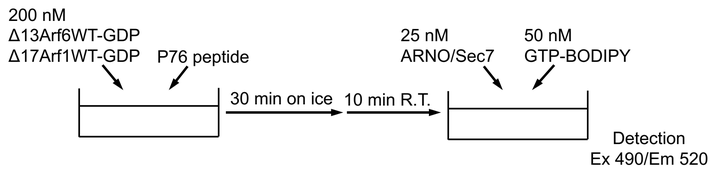
Arf6に対する結合活性測定（SPR, K_D値）



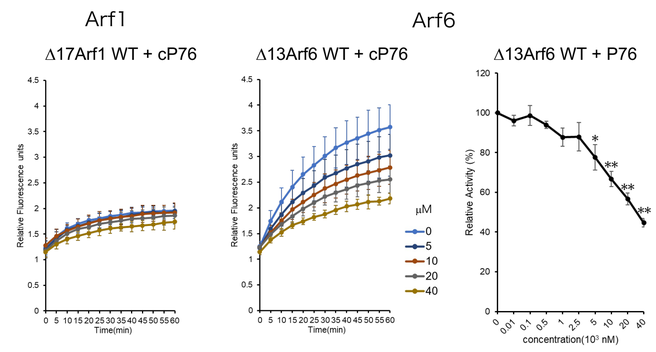
Arf6/GEF相互作用阻害活性（ELISA, IC_{50}）



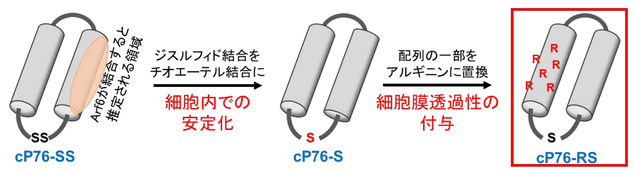
Arf6活性化の抑制試験（蛍光ヌクレオチオド交換アッセイ）



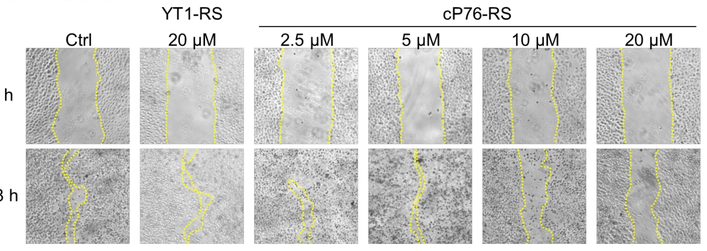
Arf6に対する選択性とペプチド濃度依存的な活性化抑制能



細胞膜透過性を付与したArf6結合性HLHペプチドの分子設計



細胞遊走阻害試験



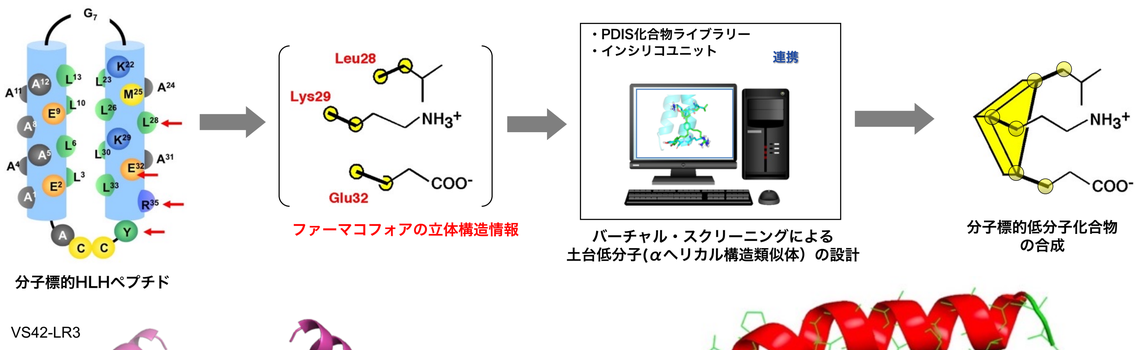
ペプチドがcP76-RS細胞内でArf6の機能を阻害し、細胞遊走を抑制することが示唆された。P76ペプチドの性状解析および構造最適化を基盤とし、Arf6が制御する腫瘍血管新生やがん細胞の浸潤・転移に対する抑制効果を評価することで新規抗がん剤の開発につながることが期待される。

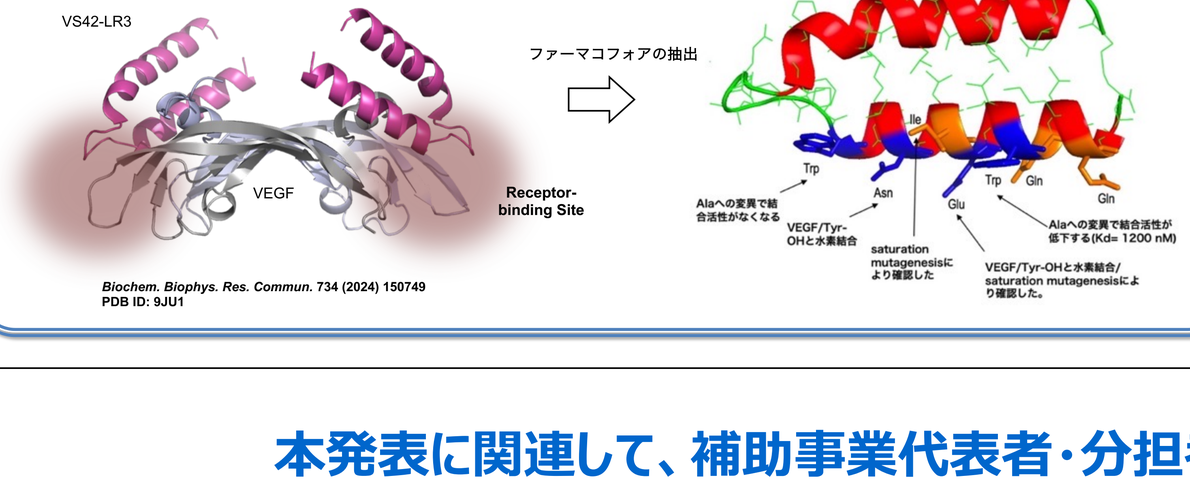
ユニット間連携の内容と成果

新しい分子標的化合物設計法の開発

インシリコ解析ユニット：筑波大学・広川貴次

分子動力学計算による分子標的化合物の設計

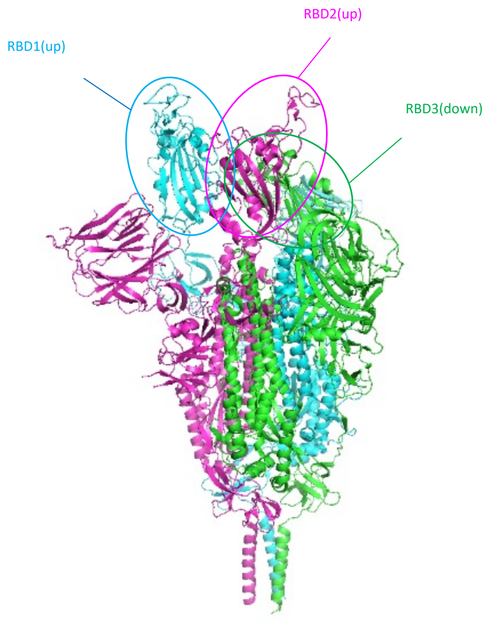


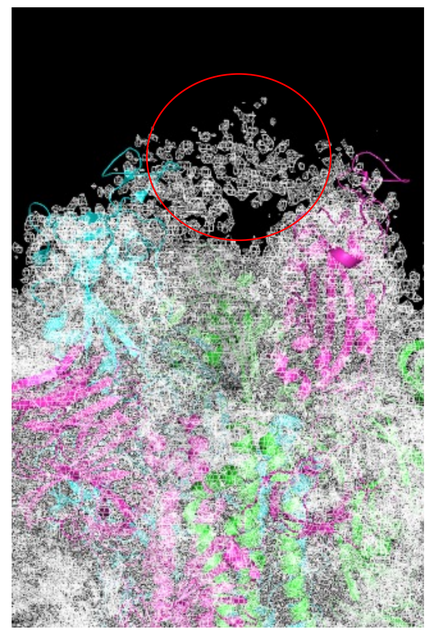


Biochem. Biophys. Res. Commun. 734 (2024) 150749
PDB ID: 9JU1

クライオ電子顕微鏡によるウィルス・タンパク質 / 分子標的HLHペプチド複合体の構造解析

構造解析ユニット：大阪大学・難波啓一





本発表に関連して、補助事業代表者・分担者に開示すべきCOI（利益相反）はありません。