

In silico フラグメントマッピング法による
PD-1/PD-L1 低分子性阻害剤の探索

Virtual screening for small-molecule inhibitors of
PD-1/PD-L1 protein-protein interaction
using *in silico* fragment mapping method

2019 年 3 月

北里大学大学院薬学研究科

創薬物理化学教室

DP-15101 酒匂 佑介

目次

論文要旨	7
略語一覧	16
第 1 章 序論	17
第 1 節 背景	18
第 1 項 PD-1/PD-L1 の PPI を標的とした創薬研究の現状	18
第 2 項 PD-1 および PD-L1 の立体構造	20
第 3 項 PPI を標的とした創薬研究の課題点と打開策	21
第 2 節 本研究の目的	22
第 2 章 方法	23
第 1 節 探索ターゲット構造の選定	24
第 1 項 結晶構造における PD-1/PD-L1 PPI 界面の観察	24
第 2 項 分子動力学シミュレーションによる構造サンプリング	24
第 2 節 <i>in silico</i> フラグメントマッピング	26
第 1 項 CSFDB	26
第 2 項 Fsubsite プログラム	28
第 3 項 代表フラグメントの選抜	29
第 3 節 3D feature query の構築と探索プロトコルの設定	31
第 4 節 3D pharmacophore-based VS	34
第 5 節 候補化合物の <i>in vitro</i> アッセイ	37

第 3 章 結果	39
第 1 節 探索ターゲット構造の選定	40
第 1 項 結晶構造における PD-1/PD-L1 PPI 界面の観察	40
第 2 項 分子動力学シミュレーションによる構造サンプリング	42
第 2 節 <i>in silico</i> フラグメントマッピング	45
第 3 節 3D feature query の構築と探索プロトコルの設定	58
第 4 節 3D pharmacophore-based VS	63
第 5 節 候補化合物の <i>in vitro</i> アッセイ	67
第 4 章 考察	69
第 1 節 ヒット化合物の阻害メカニズム	70
第 2 節 ヒット化合物のリガンドデザイン	73
第 5 章 結論	77
謝辞	80
引用文献	81
付録	87
探索ターゲット構造と hPD-1 結晶構造 (holo 体) および mPD-1 結晶構造 (holo 体) のマッピング表面の比較	88
学術誌掲載論文	89

論文要旨

【背景と目的】

PD-1/PD-L1 の Protein-Protein Interaction (PPI) を標的とした抗がん治療が近年脚光を浴びている。臨床現場において同 PPI を阻害するモノクローナル抗体によるがん免疫療法が、様々ながん種を抱えた患者に対して抗腫瘍（がん細胞の増殖・浸潤の抑制や減弱）や長期寛解の効果があることが認められている。一方、低分子化合物による PD-1/PD-L1 阻害剤の開発に関しては、抗体薬の開発状況と比べると大きな差があり、少数の阻害剤の報告例があるだけである。但し、抗体薬に勝る低分子化合物の利点として、製造コストが低く抑えられることや経口投与が望めること、また免疫原性の問題を排除できる可能性等が挙げられ、低分子化合物による PD-1/PD-L1 阻害剤の開発が注目されている。

このような背景の中、本研究では PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子化合物の探索を試みた。PPI 界面は、一般的に広くて浅い表面となっていることが多く、ファーマコフォアモデルの設定が難しいケースがある。PD-1/PD-L1 についても同様であり、高難度ターゲットとして区分できるが、後述の *in silico* フラグメントマッピング法を用いることで、PPI 界面におけるリガンドファーマコフォア仮説を立て、その情報に基づいて PD-1/PD-L1 の PPI 阻害剤を探索することにした。

【方法】

PD-1/PD-L1 の PPI 阻害剤を探索するために次の解析を行った。

① 探索ターゲット構造の選定

研究開始時に明らかにされていた X 線結晶構造を調査し、解析対象となる構造を選抜すると共にそのタンパク質構造の動的挙動を考慮するために分子動力

学 (MD) シミュレーションによる構造サンプリングを実施. 選抜した X 線結晶構造と MD サンプリング構造を探索ターゲット構造として選定した.

② *In silico* フラグメントマッピング

当研究室で開発された Canonical Subsite Fragment DataBase (CSFDB) および Fsubsite プログラムを用いて本解析を実施した. CSFDB は既知のタンパク質-リガンド X 線結晶構造から抽出されたサブサイト-フラグメントペア群から構成されるデータベースである. 一方, Fsubsite は CSFDB 内のサブサイトと類似しているサイトを標的タンパク質上で探索, そして類似サブサイトが存在していた場合にペアとなるフラグメントを CSFDB から取り出して標的タンパク質上に配置する, いわゆる知識ベースのフラグメントマッピング プログラムである. ①の探索ターゲット構造について Fsubsite の解析対象となるマッピング表面を設定した後, *in silico* フラグメントマッピングを実施した. そして, マッピングされたフラグメント集団の優先順位付けとして, エネルギー極小化計算 (macromodel, Schrodinger 2015-2) および結合自由エネルギー (MM/GBSA) 計算を行い (prime_mmgbsa, Schrodinger 2015-2), MM/GBSA の値上位 20 個を代表フラグメントとして選抜した.

③ 3D feature query の構築と探索プロトコルの設定

3D feature query の構築: Pharmacophore Editor (MOE 2012, CCG) を用いて, 次を示す手順に従い 3D feature query を構築した.

手順Ⅰ: 代表フラグメントをそれらの配置から集約し, 個別のサイトに分類.

手順Ⅱ: 分類された各サイトに属するフラグメントの脂溶性官能基が, すべて納まるような脂溶性 feature を各々配置.

手順Ⅲ: 各フラグメントの極性官能基に対応する極性 feature を配置. この際, 2.5Å 内の半径の球でまとめられる同種の feature を 1 つに集約.

手順Ⅳ：マッピング表面に属するアミノ酸の重原子に排除体積 feature を配置.

探索プロトコルの設定：探索プロトコルを次のように設定した.

設定Ⅰ：手順Ⅰのサイト分類の結果に基づき必須サイトと任意サイトを設定.

目視により中央にあるサイトを必須サイト, その他を任意サイトとした.

設定Ⅱ：必須サイトについては, 脂溶性 feature と少なくとも 1 つの極性 feature を満たすことを条件に含めた. また任意サイトについてはいずれかの脂溶性 feature を 1 つ満たすことを条件に含めた. すなわち合計 3 点以上の feature を満たすものを後述の Virtual Screening (VS) におけるヒット化合物要件とした.

④ 3D pharmacophore-based VS

構築されたクエリーおよび探索プロトコルを用いて市販化合物を対象とした VS を実施した. 多数化合物に対応するため多段階のスクリーニングを実施した. 1 次スクリーニングとして OMEGA (version 2.4.6, OpenEye) により生成された立体配座集団を対象とした pharmacophore search (MOE 2012, CCG) を, 2 次スクリーニングとしてドッキング (GOLD version 5.2, CCDC) を行い, 3D feature query の要件を満たしつつ, ドッキングスコア上位化合物を抽出した. さらに, 3 次スクリーニングとして, 抽出された化合物と探索ターゲット構造との複合体モデルを構築し, エネルギー極小化計算および結合自由エネルギー (MM/GBSA) の算出を行った. そして, MM/GBSA 値の上位化合物について構造クラスタリング (Cluster Molecule module, Pipeline Pilot 9.1) を実施すると共に購入可能性を調査し, 候補化合物を選抜した.

⑤ 候補化合物の *in vitro* アッセイ

選抜した候補化合物を購入し, hPD-1/hPD-L1 の PPI 阻害能を *in vitro* 評価 (ELISA 法) により実施した (BPS Bioscience 社に委託).

【結果】

① 探索ターゲット構造の選定

結晶構造の調査の結果、PPI 界面において窪みがみられる PD-1 を探索ターゲットとすることが望ましいと考え、human PD-1 である PDB ID: 3RRQ を探索ターゲット構造に選定することにした (hPD-1 結晶構造と呼称)。同構造は PPI を形成していない apo 体構造である。PPI 阻害剤探索の戦略として holo 体構造を用いることが有効な手段と考えられるが、本研究では *in silico* フラグメントマッピング手法の検証も兼ねて apo 体構造を用いることにした。また、hPD-1 結晶構造を用いて MD シミュレーションを実施した結果、4 つのサンプリング構造が得られ (MD_cluster1~4 と呼称)、計 5 つを探索ターゲット構造として選定した。

② *In silico* フラグメントマッピング

解析の結果、各ターゲット構造に対して以下の数のフラグメントがマッピングされた。hPD-1 結晶構造：353 個、MD_cluster1：353 個、MD_cluster2：346 個、MD_cluster3：353 個、MD_cluster4：339 個。そして、フラグメントの優先順位付けを行った結果、図 1 に示す代表フラグメントが選抜された。

③ 3D feature query の構築と探索プロトコルの設定

②で選抜された代表フラグメントを基に図 2 に示す 3D feature query を構築した。そして探索プロトコルについても設定、図 2 において必須サイトを白色の枠で囲った。

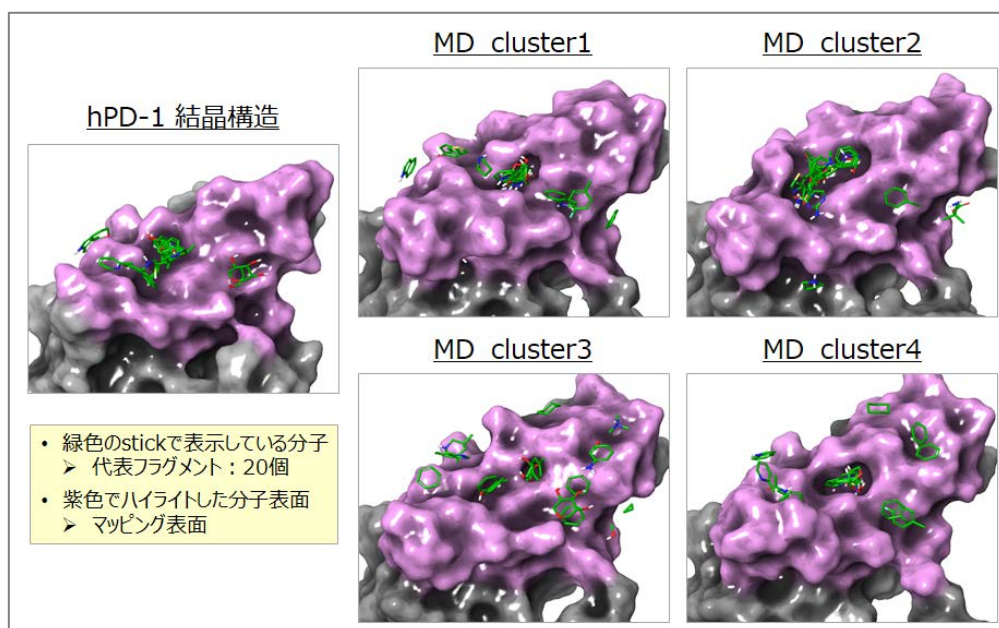


図 1. 代表フラグメント

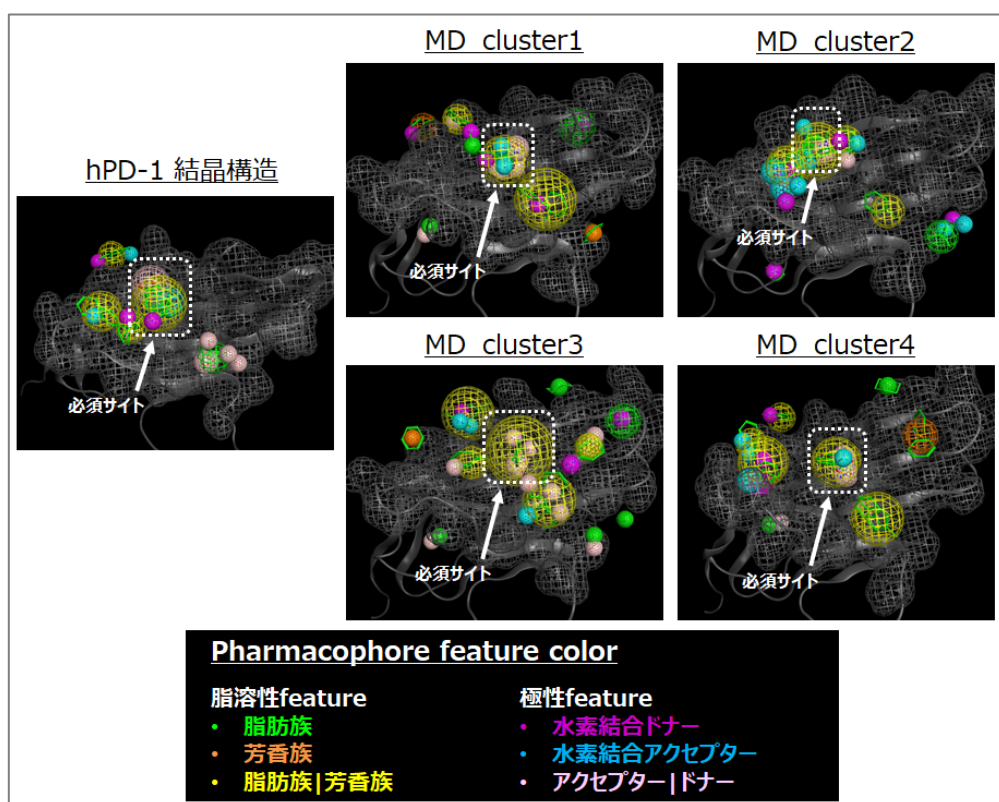


図 2. 3D feature query

④ 3D pharmacophore-based VS

市販化合物（約 500 万化合物）を対象とした VS を実施した結果、各段階の VS ヒットとして図 3 に示す化合物が各々抽出された。そして、最終的に選ばれた計 25 個の候補化合物について *in vitro* アッセイを実施した。

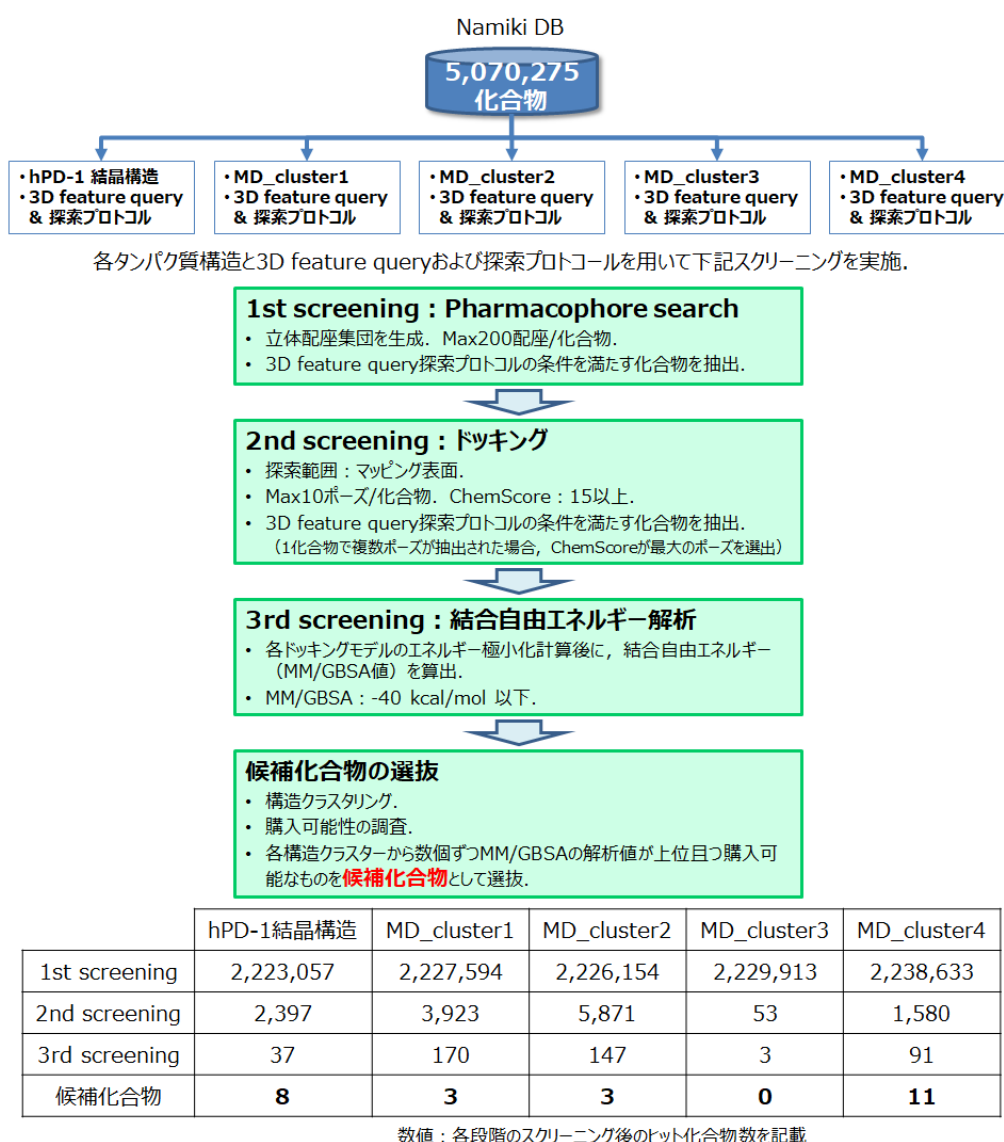


図 3. 3D pharmacophore-based VS の結果

⑤ 候補化合物の *in vitro* アッセイ

アッセイの結果、compound 3 が化合物濃度 100uM で阻害率 21%の hPD-1/hPD-L1 PPI 阻害能を有することが確認された。同化合物は、hPD-1 結晶構造の 3D feature query を用いた VS から抽出された化合物である。hPD-1/compound 3 の複合体モデルを図 4 に示す。

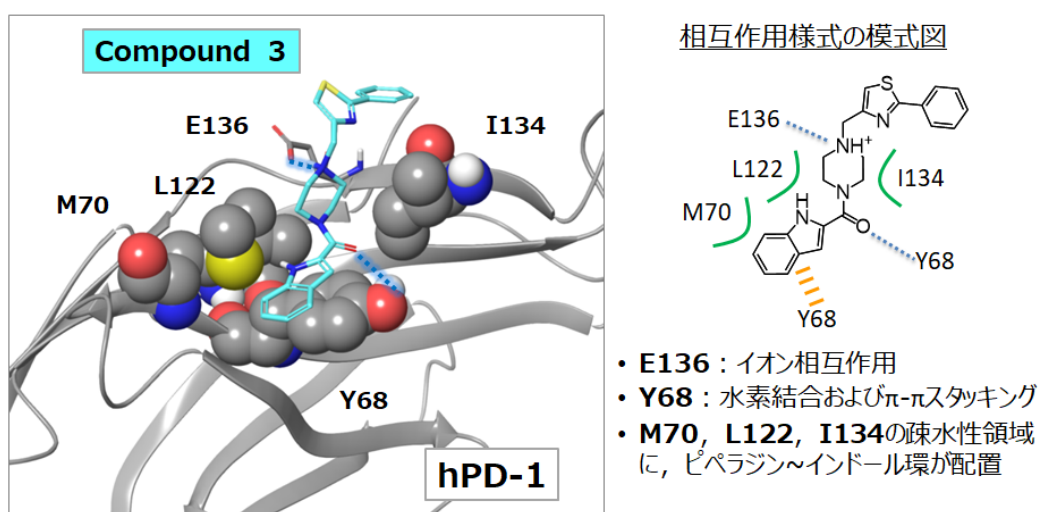


図 4. hPD-1/compound 3 複合体モデル

【考察】

hPD-1/hPD-L1 複合体構造 (4ZQK) が現在明らかにされているため、hPD-1 に対する hPD-L1 および compound 3 の相互作用様式の比較を行った。図 5 に示すように、4ZQK の構造において hPD-1 E136 に対して R113 がイオン相互作用を形成していたが、compound 3 についても hPD-1 E136 に対してピペラジン環内のカチオン化した窒素原子がイオン相互作用を形成していた。また、4ZQK の構造において hPD-L1 Y123 が hPD-1 のサブポケットを埋めているが、compound 3 についてもピペラジン~インドール環部分が同ポケットを埋める形

となっており，これら相互作用によって hPD-1/hPD-L1 の会合相互作用が阻害されている可能性が示唆された．本研究では holo 体の情報を使用していないが，上記のように，結果として key ファーマコフォアを検出するに至った．このことから *in silico* フラグメントマッピングの有用性が示せたものと考えられる．また，compound 3 の阻害活性は 21%と低活性であるが，図 6 に示すように compound 3 近傍においてフラグメントがマッピングされたサイト（Site 1, Site4, Site5）が見いだされているため，これらサイトを満たすように compound 3 をベースとした構造展開を図ることでポテンシャルのより高い化合物が創出されることが期待される．

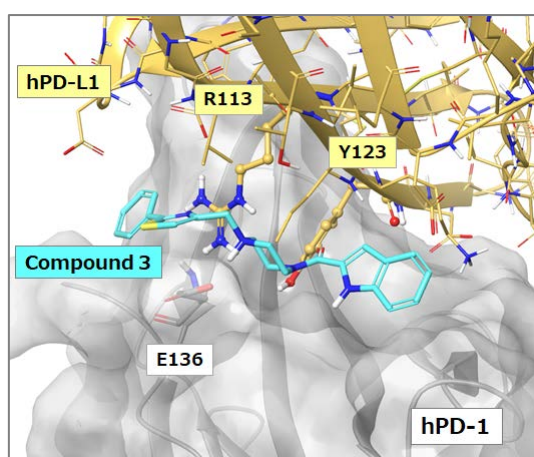


図 5. hPD-1 に対する hPD-L1 と compound 3 の相互作用様式比較

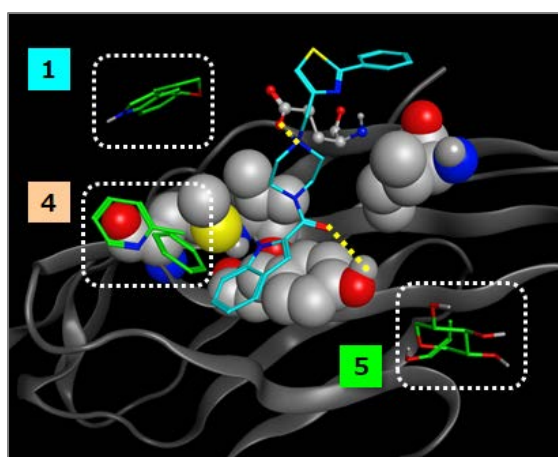


図 6. hPD-1/compound 3 複合体モデルと *in silico* フラグメントマッピングの比較

略語一覽

PD-1	: Programmed Death-1
hPD-1	: human PD-1
mPD-1	: mouse PD-1
PD-L1	: Programmed Death-1 Ligand
hPD-L1	: human PD-L1
PPI	: Protein-Protein Interaction
PDB	: Protein Data Bank
FBDD	: Fragment-Based Drug Design
SBDD	: Structure-Based Drug Design
LBDD	: Ligand-Based Drug Design
CSFDB	: Canonical Subsite Fragment Data Base
3D	: Three Dimension
VS	: Virtual Screening
MD	: Molecular Dynamics
nsec	: Nano second (10^{-9} 秒)
psec	: Pico second (10^{-12} 秒)
RMSD	: Root Mean Square Deviation
MM/GBSA	: Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HRP	: HorseRadish Peroxidase

第 1 章 序論

第1節 背景

第1項 PD-1/PD-L1 の PPI を標的とした創薬研究の現状

PD-1 は、免疫細胞である T 細胞表面上に発現しているタンパク質であり、その生体内における機能として、正常細胞に発現している PD-L1 と Protein-Protein Interaction (PPI) を形成して抑制シグナルを免疫細胞に伝達し、過度な免疫作用を止め、自己免疫疾患を防ぐことが知られている [ref. 1, 2]。一方で、がん細胞が上記システムを利用して免疫細胞による攻撃を抑制し、がん細胞の増殖を進行させることが明らかとなり [ref. 3-8]、近年 PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する抗 PD-1、抗 PD-L1 抗体を用いた抗がん治療が脚光を浴びている。図 1-1 に、上記内容の模式図を示す。

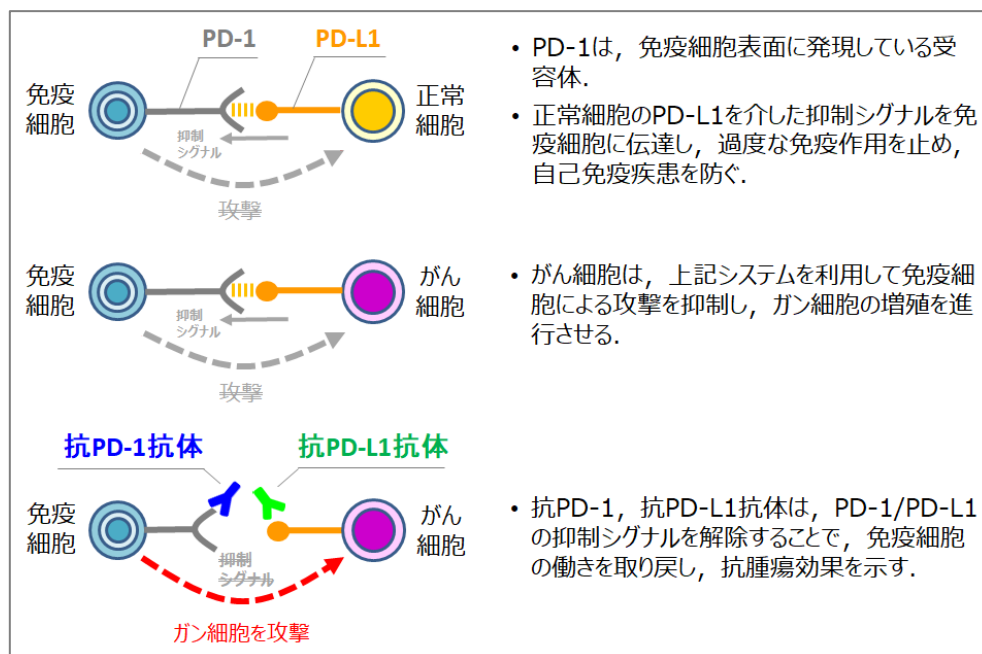


図 1-1. 生体内における PD-1/PD-L1 の機能と抗 PD-1、抗 PD-L1 抗体による抗がん作用の模式図

前頁で述べた PD-1/PD-L1 を利用したがん細胞の免疫応答の回避メカニズムに基づいたモノクローナル抗体によるがん免疫療法が、実際に臨床現場で行われ、その有効性が示されている。現在までに、U.S. Food and Drug Administration (FDA) によって、2 つの抗 PD-1 抗体：nivolumab (Opdivo, Bristol-Myers Squibb), pembrolizumab (Keytruda, Merck), そして 3 つの抗 PD-L1 抗体：atezolizumab (Tecentriq, Genentech/Roche), durvalumab (Imfinzi, AstraZeneca), avelumab (Bavencio, EMD Serono, Inc.) が承認され、抗がん治療薬として用いられており、様々ながん種を抱えた患者に対して抗腫瘍（がん細胞の増殖・浸潤の抑制や減弱）や長期寛解といった効果を示すことが認められている [ref. 9-13]。ただし、抗体医薬品については課題があり、投与法が点滴静注に限られてしまうため不便であることや、製造コストが高いため医療費増大に繋がること、さらに免疫原性の問題（抗体自身が抗原として認識され、免疫細胞により体外に排出されてしまう）がある、といったことが挙げられる。

一方、低分子化合物による PD-1/PD-L1 の PPI 阻害剤の開発に目を向けると、抗体薬の開発状況と比べるとその間には大きな差があるのが現状である。代表的なものとして、BMS より PD-L1 のダイマー形成を安定化して間接的に PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子化合物 [ref. 14-17] や、PD-L1 上の PPI 界面に結合して直接的に PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する環状ペプチド [ref. 18, 19] が報告されているが、これらを含めても少数の阻害剤の報告例があるだけである [ref. 20-22]。ただし、抗体薬に勝る低分子の利点として、前述の抗体薬の課題に対して、経口投与が望めることや製造コストが低く抑えられること、そして免疫原性の問題を排除できることが挙げられ、低分子化合物による PD-1/PD-L1

の PPI 阻害剤を開発することができれば、がん免疫療法のさらなる発展に寄与するものと考えられる。

第 2 項 PD-1 および PD-L1 の立体構造

研究開始当初、図 1-2 に示す PD-1 および PD-L1 に関する X 線結晶構造が報告されていた。 *In silico* 創薬研究の進め方として、標的とするタンパク質の立体構造に基づいて医薬分子設計を行う Structure-Based Drug Design (SBDD) 手法を用いる場合と、標的となるタンパク質の立体構造構造がわかっていないため既知リガンド分子の立体構造上の特徴に基づいて医薬分子設計を行う Ligand-Based Drug Design (LBDD) 手法を用いる場合の 2 つに大別されるが、本研究では、X 線結晶構造解析により PD-1 および PD-L1 の構造が明らかにされていたため、前者の SBDD 手法を行うことが可能な状況にあった。

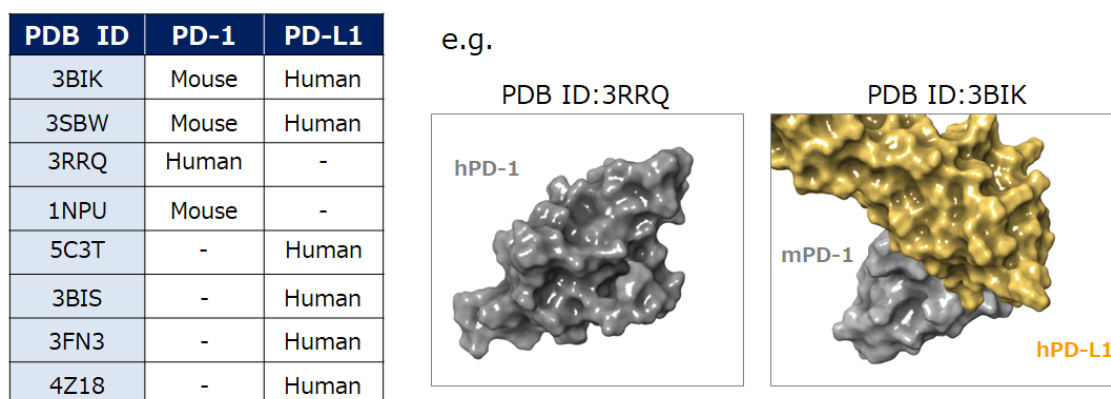


図 1-2. PD-1 および PD-L1 に関する X 線結晶構造

第3項 PPI を標的とした創薬研究の課題点と打開策

PD-1/PD-L1 は PPI 界面を形成することによってシグナル伝達を行い生体内での機能を働かせているが、一般的に PPI 界面は相互作用面が広く、比較的浅い窪みの相互作用となっている場合が多いため、低分子化合物による阻害剤探索の難易度が高いと言える。PD-1/PD-L1 についても結晶構造の観察を行ったところ同様の条件であり、阻害剤探索にあたっては、PPI 界面上に存在している複数のサブポケットをどのように使えば有効であるか、探索方針となるファーマコフォア仮説を如何に設定するかが重要と考えられた。これに対する打開策として Fragment-based Drug Discovery (FBDD) 手法が挙げられる。その理由として、PPI 界面に離散的に存在する小さいサブポケットを効率的に探索できるため、それら情報を活用することで PPI 阻害剤の探索に適していると考えられるからである [ref. 23]。図 1-3 に上記で述べた内容の模式図を示す。また、当研究室においては、これまでに *in silico* FBDD/SBDD を推進するための方法論として *in silico* フラグメントマッピング手法を開発してきた [ref. 24]。そこで、同手法を用いることで、PD-1/PD-L1 の PPI 界面上におけるファーマコフォア仮説を立て、その情報を基に PPI 阻害剤探索を行うことにした。

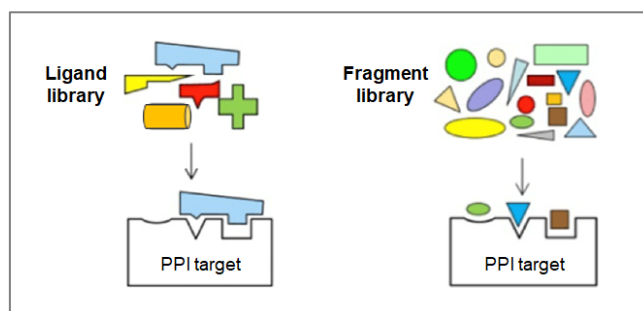


図 1-3. FBDD による PPI ターゲット阻害剤探索の模式図

第2節 本研究の目的

これまで述べてきたように、生体内において PD-1/PD-L1 の PPI はがん細胞の増殖に関与しており、そのメカニズムに着目した抗体医薬品が開発されている。そして、それら抗体薬はがん免疫療法の治療薬として臨床現場で用いられていて、実際に抗がん作用を示すことが確認されている。一方で、抗体薬の課題が顕在化しており、それらを払しょくする PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子化合物を開発することができれば、がん免疫療法のさらなる発展に寄与するものと考えられる。加えて、PD-1 および PD-L1 に関する X 線結晶構造が報告されていることから *in silico* FBDD/SBDD が可能な状況にあり、また低分子化合物による創薬ターゲットとしては高難度と区分される PPI ではあるが、そのための打ち手として当研究室で開発された *in silico* フラグメントマッピング手法が活用できるのではないかと考えられた。

以上をふまえ、本研究では、新規抗がん剤の開発を目指して PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子性化合物を *in silico* 創薬技術を駆使して見出すこととした。

第 2 章 方法

第1節 探索ターゲット構造の選定

第1項 結晶構造における PD-1/PD-L1 PPI 界面の観察

前章で述べたように、研究開始当初において PD-1 および PD-L1 に関する X 線結晶構造が明らかにされていた。そこで、これら構造について生物種の由来や PPI 形成の有無に基づいて分類を行うとともに、低分子化合物が結合し得る窪みが存在するかについて観察を行った。そしてこれらの検討結果を基に探索ターゲット構造を選定することにした。

第2項 分子動力学シミュレーションによる構造サンプリング

上記で探索ターゲット構造として X 線結晶構造を選定することにしたが、同解析から得られる情報はあくまで平均化された構造であり、元来生体内におけるタンパク質分子は多数の水分子に囲われ熱運動を行い、構造が揺らいでいるものと考えられる。他方で、後述の SBDD の検討 (*in silico* フラグメントマッピングやドッキングシミュレーション) においては、上記のような揺らぎは考慮されないため、タンパク質の柔軟性を事前に補っておく必要がある。そこで、探索ターゲット構造として選抜した X 線結晶構造を用いて、分子動力学 (Molecular Dynamics : MD) シミュレーションによる構造サンプリングを行うことにした。以下に実施した内容について示す。

入力構造の準備

X 線結晶構造において、disorder の影響によって構造がアサインされていない箇所を prime protein preparation (Schrodinger 2015-2) を用いて補い、また N 末端アミノ酸と C 末端アミノ酸を各々アセチル基、N メチル基によりキャッピングした。続いて、修正した構造を用いて desmond system builder (Schrodinger 2015-2) により系構築を行った。水分子モデルとして SPC を用いた orthorhombic の water box にタンパク質構造を配置し、Cl⁻イオンによる系の中和を行い、OPLS3 力場を用いて系を構築、MD シミュレーションの入力ファイルとした。

MD シミュレーション

作成した入力ファイルを用いて、desmond (Schrodinger 2015-2) の初期設定の平衡化プロトコルを適応し、NPT 一定、温度 300K 条件下のシミュレーションを 50ns 実施した。原子座標のトラジェクトリーは 100ps 毎に記録した。

構造サンプリング

シミュレーションによって得られたトラジェクトリーを基に、初期構造に対する RMSD を測定して構造が平衡化していることを確認した後、シミュレーションの後半にあたる 40~50ns のトラジェクトリーから 100ps 間隔で計 1,000 個のスナップショットを抽出し、trajectory_cluster モジュール (Schrodinger 2015-2) により構造クラスタリングを実施した。そして、クラスタリングの結果得られた各クラスター中心の構造を MD サンプリング構造とした。

以上、選抜した X 線結晶構造とその構造を基に MD シミュレーションを行い得られたサンプリング構造を併せて探索ターゲット構造として後述の解析に用いることにした。

第2節 *in silico* フラグメントマッピング

PD-1/PD-L1 の PPI 阻害剤を探索する際のファーマコフォア仮説を設定するために、前節で選定した探索ターゲット構造を対象として、当研究室で開発された CSFDB および Fsubsite プログラムによる *in silico* フラグメントマッピングを実施した。今日までに、ドッキングシミュレーションをベースとした幾つかの *in silico* フラグメントマッピング手法が開発されているが [ref. 25-30]、当研究室で開発された手法は既知のタンパク質-リガンド複合体 X 線結晶構造から抽出された構造情報を用いたナレッジベースの解析方法である。同解析を行うことで、探索ターゲット構造上にファーマコフォア仮説を設定する際の足掛かりとなるフラグメントがマッピングされるが、加えて、本研究ではこれらフラグメントの配置のリファインメントおよび優先順位付けを行うことにした。マッピングされたフラグメントの内、より探索ターゲット構造のサブサイトにフィットしている代表フラグメントを選抜し、それらを基にファーマコフォア仮説を設定したいと考えたためである。以下に、CSFDB および Fsubsite プログラムによる *in silico* フラグメントマッピングと代表フラグメントの選抜について示す。

第1項 CSFDB

同様な原子団が結合するタンパク質上の結合部位、すなわちサブサイト同士には類似性があると考えられる。この着想に基づいて、*in silico* フラグメントマッピング手法の開発に際しては、図 2-1 (a) に示すように、あるタンパク質-

リガンド複合体 X 線構造があった場合に、Fragmenter (JChem 6.3.0) を用いてリガンドをフラグメント化するとともに、SYBYL-X 2.1.1 によってフラグメント周囲 4 Å 内にあるアミノ酸残基をサブサイトとして抽出する「サブサイト-フラグメント・データベース」の構築が試みられた。そして、実際の同データベースの構築においては、図 2-1 (b) に示すように、PDBbind v.2013 core set に収載の 195 個のタンパク質-リガンド複合体 X 線結晶構造から前述の方法に従ってサブサイト - フラグメントペアを抽出するとともに、類似サブサイトをグループ化、代表サブサイトを選抜することで 482 個のサブサイト - フラグメントペアからなる CSFDB が構築された。

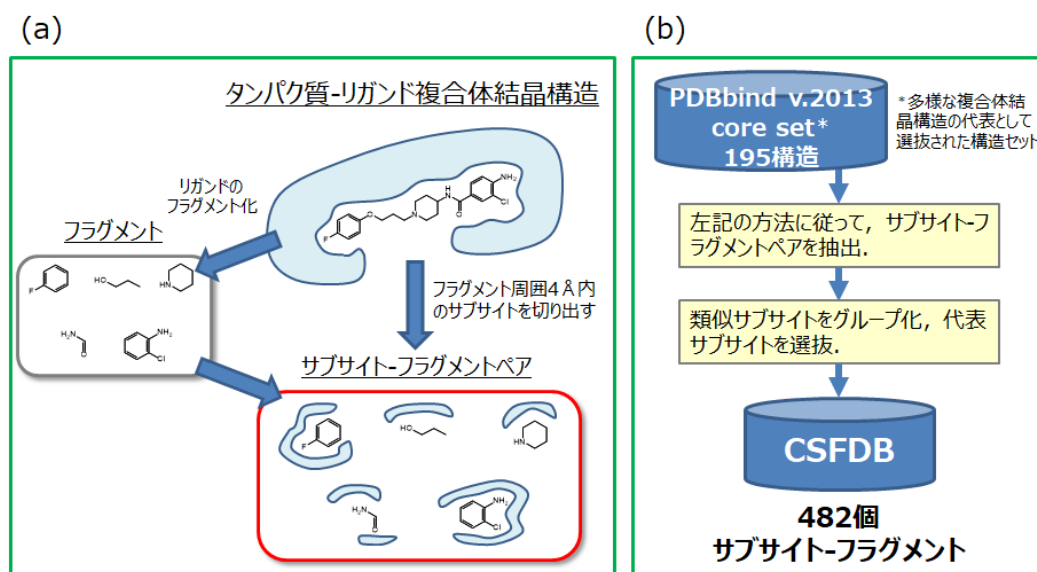


図 2-1. CSFDB 構築の概要

(a) サブサイト - フラグメントペア抽出の模式図, (b) CSFDB 構築の流れ

第2項 Fsubsite プログラム

Fsubsite は、SUPERPOSE アルゴリズム [ref. 31]を用いて、CSFDB 内のサブサイトと類似している場所を探索ターゲット構造上で探索し、類似サブサイトがヒットした場合にフラグメントをマッピングするプログラムである。既知のタンパク質 - リガンド複合体構造から抽出された「サブサイト - フラグメントペア」を用いてフラグメントをマッピングすることから、知識ベースの *in silico* フラグメントマッピング手法に分類される。Fsubsite による *in silico* フラグメントマッピングの手順を図 2-2 に示した。同手順に従って、探索ターゲット構造へのフラグメントマッピングを実施した。

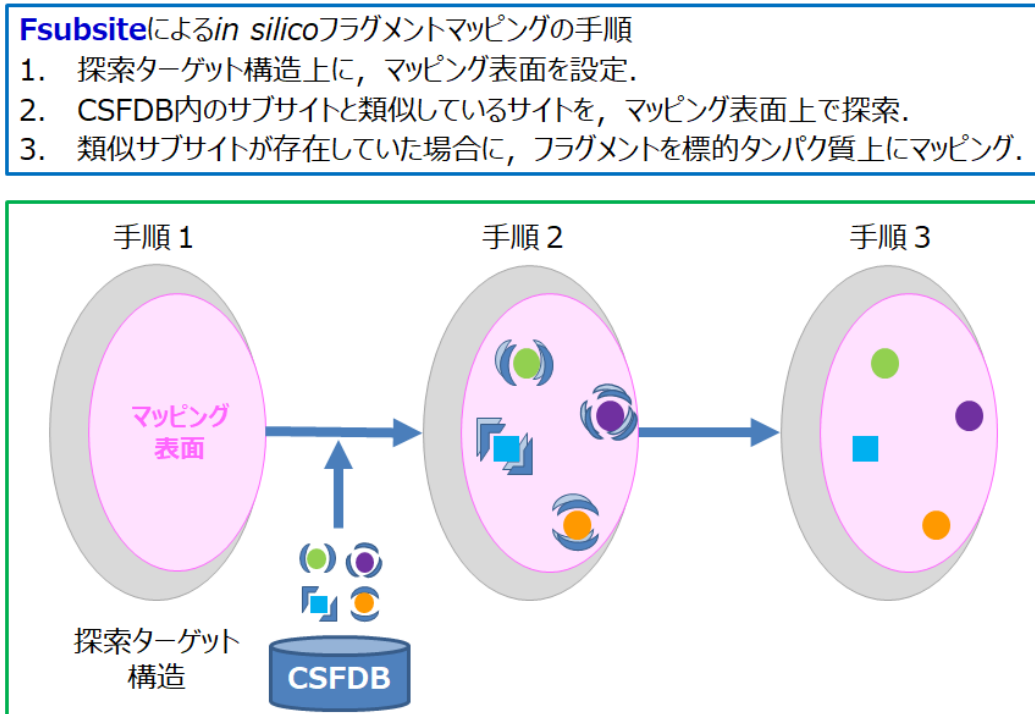


図 2-2. Fsubsite による *in silico* フラグメントマッピングの流れ

はじめに探索ターゲット構造において解析対象となるマッピング表面を設定した。本研究では、PD-1/PD-L1 PPI 阻害剤の探索を目的に設定したので、研究開始当初において明らかにされていた PD-1/PD-L1 holo 体の X 線結晶構造を基に PPI 界面付近に属するアミノ酸残基を特定して、マッピング表面を設定することにした。続いて、Fsubsite により CSFDB 内のサブサイトと類似している場所をマッピング表面上で探索し、ヒットしたサブサイトに対して、フラグメントをマッピングした。

以上、CSFDB および Fsubsite プログラムを用いた *in silico* フラグメントマッピングによって探索ターゲット構造に対するフラグメントのマッピングを実施した。

第 3 項 代表フラグメントの選抜

In silico フラグメントマッピングによって、探索ターゲット構造上にマッピングされたフラグメントの配置のリファインメントおよび優先順位付けを行い、代表フラグメントを選抜した。下記に選抜方法について示す。

複合体モデルの作成

はじめに、マッピングされたフラグメント分子の各々について、マッピングの際の座標を保持したままの状態、探索ターゲット構造との複合体モデルを作成した。

エネルギー極小化計算

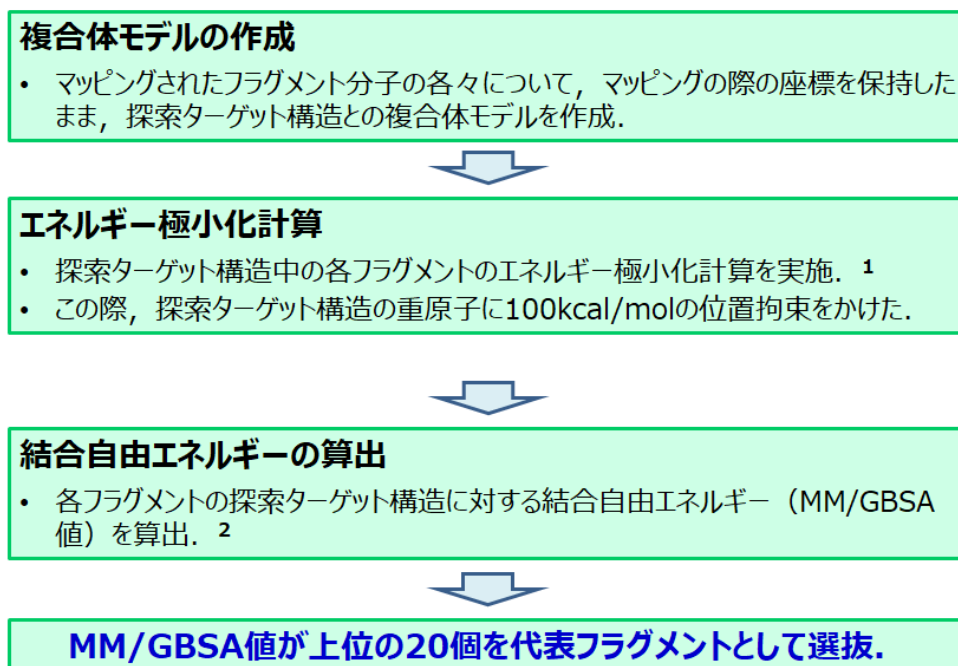
次に、macromodel (Schrodinger 2015-2) を用いて、探索ターゲット構造中の各フラグメントのエネルギー極小化計算を実施した。この際、探索ターゲット構造の重原子に 100kcal/mol の位置拘束をかけた。探索ターゲット構造につい

では、後述の VS におけるドッキングでも使用するため、ここではフラグメントの配置のみリファインメントを行った。

結合自由エネルギーの算出

続いて、リファインメントされた各複合体モデルを対象に、prime_mmgsa (Schrodinger 2015-2) を用いて、各フラグメントの探索ターゲット構造に対する結合自由エネルギー (MM/GBSA 値) を算出した。

そして、最終的に MM/GBSA 値が上位の 20 個を代表フラグメントとして選抜した。



¹ macromodel (Schrodinger 2015-2)

² prime_mmgsa (Schrodinger 2015-2)

図 2-3. 代表フラグメントの選抜方法

以上の解析によって選抜された代表フラグメントを用いて 3D feature query を構築することにした。

第3節 3D feature query の構築と探索プロトコルの設定

前節までに選抜された代表フラグメントを基に 3D feature query の構築を行うことにした。In silico FBDD/SBDD の進め方として、探索ターゲット構造上にマッピングされたフラグメントをベースに fragment growing や fragment linking によってフラグメント構造を残したまま阻害剤探索を行う方法が考えられるが、本研究では、代表フラグメントの各々が有している官能基特性（脂肪族，芳香族，水素結合ドナー，水素結合アクセプター）のすべてを pharmacophore feature の形に変換して 1 つのクエリーに集約することで、ファーマコフォア仮説となる 3D feature query を構築し、後述の 3D pharmacophore-based VS に用いることにした。このようにフラグメントを feature に変換することで、フラグメント構造に囚われることなく多様な構造の阻害剤探索が行えるのではないかと考えた。加えて、feature は一定の寛容性を持たせた球状のものが用いられるため、局所的ではあるがタンパク質の揺らぎである induced fit を考慮することが期待される。また、1 つのクエリーに集約する利点として、扱い易い形になるので VS における利便性も高まると言える。以上の内容をふまえ、3D feature query の構築と後述の 3D pharmacophore-based VS に同 query を用いるための探索プロトコルの設定を行った。

3D feature query の構築

次に示す 4 つの手順によって query の構築を行った。フラグメントの官能基特性への pharmacophore feature の配置と探索ターゲット構造のマッピング表面

に属するアミノ酸残基への排除体積 feature の配置については、Pharmacophore Editor (MOE 2012, CCG) を用いて行った。

手順Ⅰ：

代表フラグメントをそれらの配置から近接しているフラグメント同士を目視によって集約し、個別のサイトに分類。

手順Ⅱ：

分類された各サイトに属するフラグメントの脂溶性官能基（脂肪族，芳香族もしくはいずれか）がすべて納まるような脂溶性 feature を各サイトに配置。

手順Ⅲ：

各フラグメントの極性官能基に対しては，対応する極性 feature（水素結合ドナー，水素結合アクセプターもしくはいずれか）を配置。この際，2.5 Å内の半径の球でまとめられる同種の feature を1つに集約。

手順Ⅳ：

マッピング表面に属する探索ターゲット構造のアミノ酸残基の重原子に排除体積 feature を配置。

探索プロトコルの設定

構築した 3D feature query を後述の 3D pharmacophore-based VS に用いるための探索プロトコルの設定を行った。この設定方法によって VS の結果抽出されてくる化合物が変わってくるため，どのような化合物が VS ヒットとして得られてくるのか望ましいかを念頭に置き設定を行った。はじめに，サイト分類の結果を基に，3D feature query において中央に位置しているサイトを必須サイトとすることにした。端に位置しているサイトを必須サイトとすると，他のサイトへのアクセスが悪いために VS ヒットが得られ難くなることや，VS の結果か

ら活性化合物が得られた場合にその後の分子伸長等のリガンドデザインが難しくなることが想定されたためである。そして、必須サイトが満たすべき feature の要件として、脂溶性 feature と少なくとも 1 箇所以上の極性 feature を満たすことを条件に含めることにした。必須サイトは、化合物が探索ターゲット構造に結合する際のアンカーともいえる箇所になるため、脂溶性と静電的な相互作用がセットで形成されることを期待した設定となる。一方、必須サイト以外については任意サイトとして、いずれかのサイトの脂溶性 feature を少なくとも 1 箇所以上満たすことを条件に含めた。以上、必須サイトと任意サイトの各々の feature を合わせて少なくとも 3 点のファーマコフォアを満たす化合物を VS によって抽出することにした。これら 3D feature query 探索プロトコルの設定をまとめると次のようになる。

設定 I :

3D feature query のサイト分類の結果を基に、中央に位置しているサイトを必須サイト、その他を任意サイトとする。

設定 II :

必須サイトの条件：脂溶性 feature と少なくとも 1 箇所以上の極性 feature を満たすこと。任意サイトの条件：いずれかのサイトの脂溶性 feature を少なくとも 1 箇所以上満たすこと。必須サイトと任意サイトの各々の feature を合わせて少なくとも 3 点の feature を満たす化合物を VS によって抽出する。

以上、構築した 3D feature query と探索プロトコルを用いて市販化合物を対象とした 3D pharmacophore-based VS を実施することにした。

第 4 節 3D pharmacophore-based VS

PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子性化合物の候補を選抜するために、市販化合物 (Namiki DB) を対象とした VS を実施した。Namiki DB には 500 万を超える多数の化合物が収載されていたため、3 段階の *in silico* スクリーニング方法を用いて候補化合物を絞り込むことにした。はじめに低精度だが解析の速い方法によってスクリーニングを行い、徐々に化合物数を絞っていき、続いて解析に時間はかかるがより精度の高いスクリーニングを行うことで最終的な候補化合物の選抜を試みた。また本研究では、前節までの方法により 3D feature query および探索プロトコルを設定していることから、これらをファーマコフォアとして *in silico* スクリーニングに利用する 3D pharmacophore-based VS を実施することにした。具体的な解析内容を以下に示す。

1st screening

1 段階目のスクリーニングでは、タンパク質ーリガンド間の相互作用は考慮しないが (排除体積は考慮)、解析の速い pharmacophore search を行った。Namiki DB 収載の約 500 万化合物について OMEGA (OpenEye version 2.4.6) により、1 化合物あたり最大 200 配座を発生させて立体配座集団を得た後、Pharmacophore search (MOE 2013, CCG) の機能によって、3D feature query の探索プロトコルの条件を満たす化合物を抽出した。

2nd screening

2 段階目のスクリーニングでは、1st screening によって抽出した化合物を対象に、GOLD (CCDC version 5.52) を用いて前節までに設定したマッピング表面を探索範囲としたドッキングシミュレーションを行った。ドッキングによって

マッピング表面との形状相補性および静電相互作用を加味したドッキングポーズを 1 化合物あたり最大 10 ポーズ出力し、ドッキングスコアである ChemScore が上位のものを抽出した。加えて、1st screening の時と同様に Pharmacophore search の機能を用いて 3D feature query の探索プロトコルの条件を満たすドッキングポーズを抽出した。1 化合物あたり複数ポーズが抽出された場合には、ChemScore が最大のポーズを選抜し、3rd screening の入力ポーズとした。

3rd screening

3 段階目のスクリーニングでは、2nd screening で得られたドッキングポーズと hPD-1 タンパク質との複合体モデルを構築した後、macromodel (Schrodinger 2015-2) を用いてエネルギー極小化計算を行い、モデル構造をリファインメントした。そして、prime_mmgbsa (Schrodinger 2015-2) を用いて結合自由エネルギー計算を行い、その解析値である MM/GBSA を算出した。MM/GBSA 値には、タンパク質ーリガンド間の相互作用エネルギーに加えて、リガンドのタンパク質への結合に伴う脱溶媒和エネルギーのコストが含まれるため、Pharmacophore search やドッキングシミュレーションと比較して、より良いスクリーニングが行われることが期待される。そして、MM/GBSA 値が上位の化合物を抽出した。

候補化合物の選抜

最終的な候補化合物の選抜にあたっては、3rd screening までに抽出された化合物について、Pipeline Pilot (version 9.1) の Cluster Molecular module による構造クラスタリングを実施するとともに購入可能性について調査を行った。そして、これらの結果を基に、類似化合物ばかりを選ぶのではなく、できるだけ多様な化合物を選ぶことで活性化合物取得の可能性を高めるために、各構造クラ

スターから数個ずつ MM/GBSA の解析値が上位且つ購入可能なものを候補化合物として選抜することにした。

ここまで述べた解析内容を図 2-4 に示す。

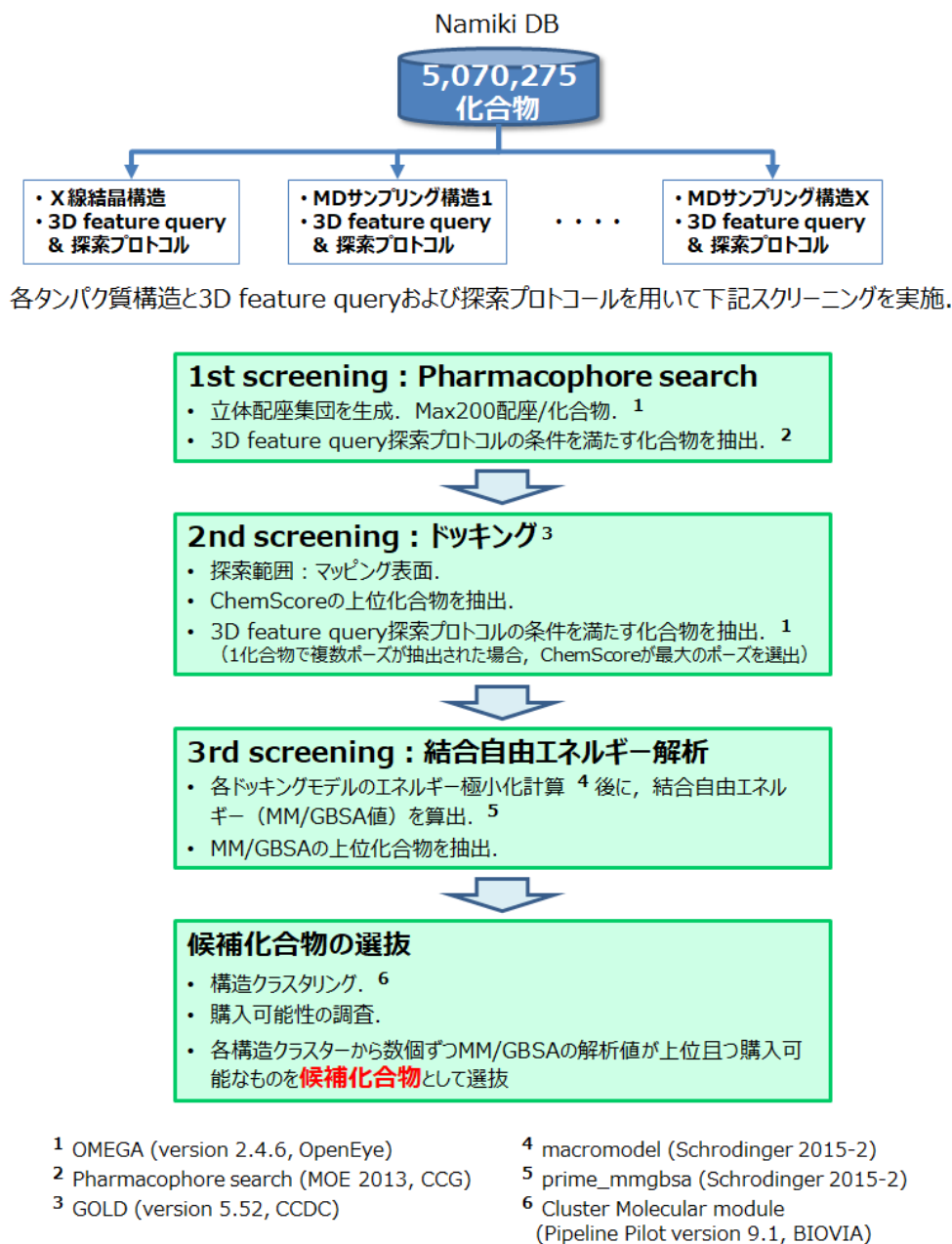


図 2-4. 3D feature query-based VS の流れ

以上の解析によって PD-1/PD-L1 PPI 阻害剤の候補化合物を選抜した。

第5節 候補化合物の *in vitro* アッセイ

3D pharmacophore-based VS により選抜された候補化合物の PD-1/PD-L1 の PPI 阻害能を評価するために、ELISA 法による *in vitro* アッセイを実施した。候補化合物を購入によって入手後、同アッセイを BPS Bioscience 社（カルフォルニア州，米国）に委託した。この際、アッセイキットとしては、Catalog #72005, hPD-1 [Biotinylated] : hPD-L1 Inhibitor Screening Assay Kit を使用した。図 2-5 (a) に BPS Bioscience 社で実施されたアッセイの流れを示す。はじめに、プレートに固相化された hPD-L1 に対して、100uM もしくは溶けなかった化合物については最大溶解濃度に調整した化合物とビオチン化された hPD-1 を混ぜて室温で 2 時間 incubation した。そして wash 後、発光標識体である Streptavidin-HRP を混ぜ、もう一度 wash した後に発光基質を入れることで発光強度を計測した。図 2-5 (b) に発光強度検出の模式図を示しているが、化合物を加えなかった場合には、プレートに固相化された hPD-L1 に対してビオチン化された hPD-1 が結合し、続いて Streptavidin-HRP も結合することから、系中に発光基質を入れることで発光が見られる。一方、化合物が hPD-1/hPD-L1 の PPI を阻害した場合には、後続のものたちの結合量が減るため、発光強度が弱まる。そこで、系中に何も加えなかった場合の発光強度を 100 として設定し、一方で化合物を加えて hPD-1/hPD-L1 の PPI を阻害した場合に発光強度がどれくらい弱まるかについて計測が行われた。そして、これら試験を 2 回実施して計測された値の平均値を各化合物の %inhibition とした。

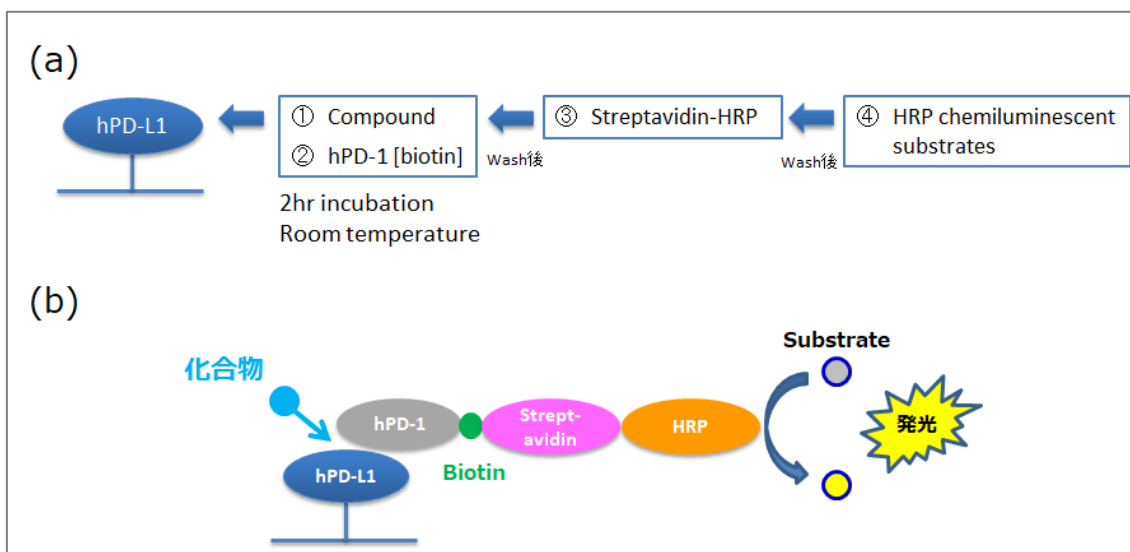


図 2-5. *in vitro* アッセイの概要

(a) アッセイの流れ, (b) 発光強度検出の模式図

以上のアッセイを行うことによって候補化合物の hPD-1/hPD-L1 の PPI 阻害能の評価を実施した。

第 3 章 結果

第1節 探索ターゲット構造の選定

第1項 結晶構造における PD-1/PD-L1 PPI 界面の観察

本研究の開始当初，表 3-1 に示す PD-1 および PD-L1 に関する X 線結晶構造が報告されていた．各構造について生物種の由来および PPI 形成の有無に基づいて分類を行った結果，探索ターゲット構造の候補として次の 3 種類が考えられた：①holo 体の hPD-L1，②apo 体の hPD-1，③apo 体の hPD-L1．

	PDB ID	PD-1	PD-L1	分類
①	3BIK	Mouse	Human	Holo
	3SBW	Mouse	Human	Holo
②	3RRQ	Human	-	Apo
	1NPU	Mouse	-	Apo
③	5C3T	-	Human	Apo
	3BIS	-	Human	Apo
	3FN3	-	Human	Apo
	4Z18	-	Human	Apo

表 3-1. PD-1 および PD-L1 X 線結晶構造

そして上記構造の内，holo 体（PDB ID: 3BIK）の PPI 界面の観察を行ったところ，図 3-1 に示すように PD-1 の凹面のポケットに対して PD-L1 の凸面部分が結合していることが分かった．このことから，低分子化合物が結合し得る窪みが存在している PD-1 を探索ターゲット構造として設定することが適していると考え，以降の解析では hPD-1 の構造（PDB ID: 3RRQ，hPD-1 結晶構造と呼称）を対象とすることにした．

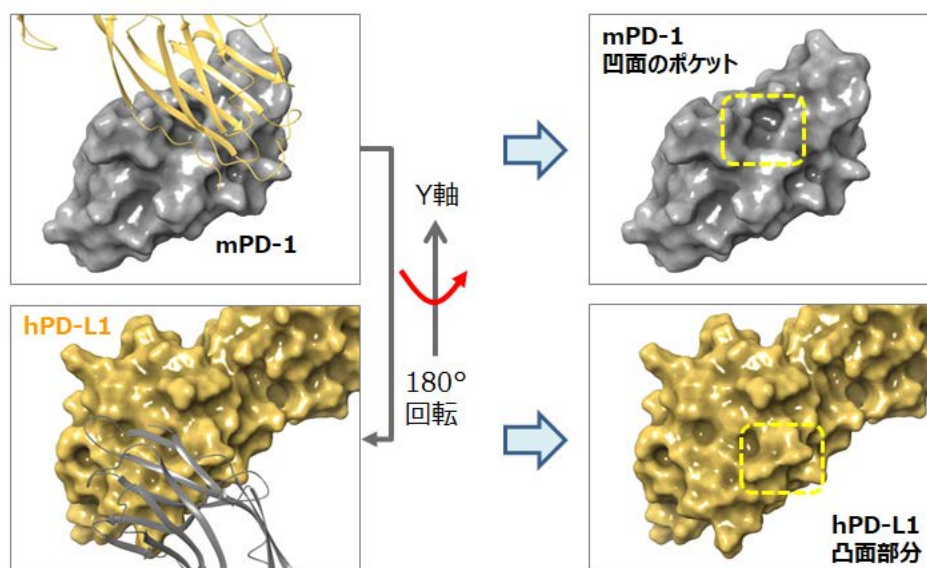


図 3-1. PD-1/PD-L1 の PPI 界面

前述したように，ファーマコフォア仮説の設定が SBDD を成功に導くための重要なプロセスとなる．方策の 1 つとして PD-1/PD-L1 の holo 体構造があることから PPI の情報を用いてファーマコフォア仮説を設定することが考えられるが，本研究においては holo 体からは PPI 界面のアミノ酸残基の情報を取得するのみに留めた．ファーマコフォア仮説については *in silico* フラグメントマッピングの結果を基に設定することとし，同手法の有用性を検証するとともに，PPI 領域外で新たなファーマコフォアとなり得るポイントが検出されるか検討することにした．

第2項 分子動力学シミュレーションによる構造サンプリング

探索ターゲット構造に設定した hPD-1 結晶構造を用いて、MD シミュレーション実施のための構造準備および系構築を行った。同構造では disorder の影響によって3箇所構造がアサインされていない領域があったので、prime protein preparation により欠損部位の修正を施し、また N 末端アミノ酸と C 末端アミノ酸を各々アセチル基、N メチル基によりキャッピングした (図 3-2)。続いて、修正した構造を用いて desmond system builder により系構築を行い、MD シミュレーションの入力ファイルを作成した (図 3-3)。

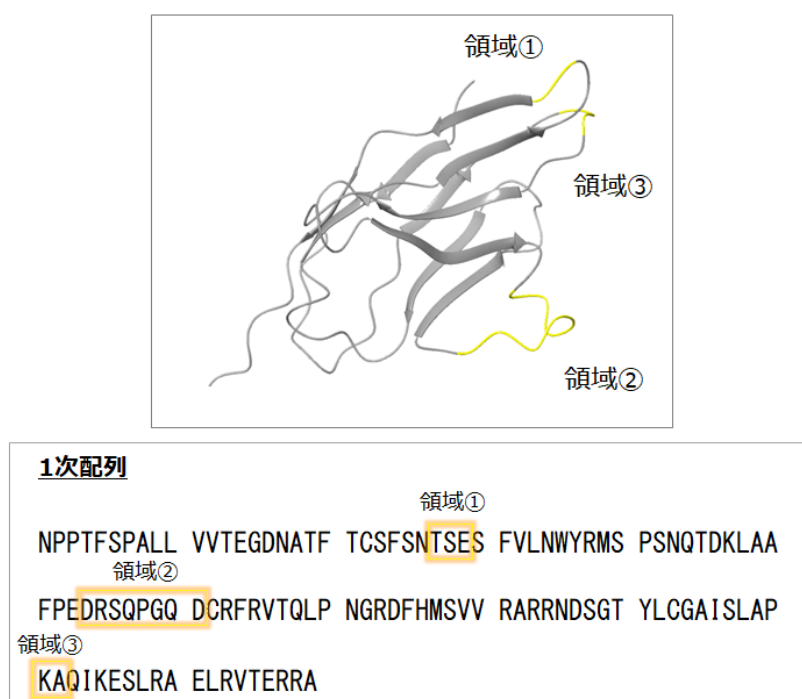


図 3-2. hPD-1 修正構造

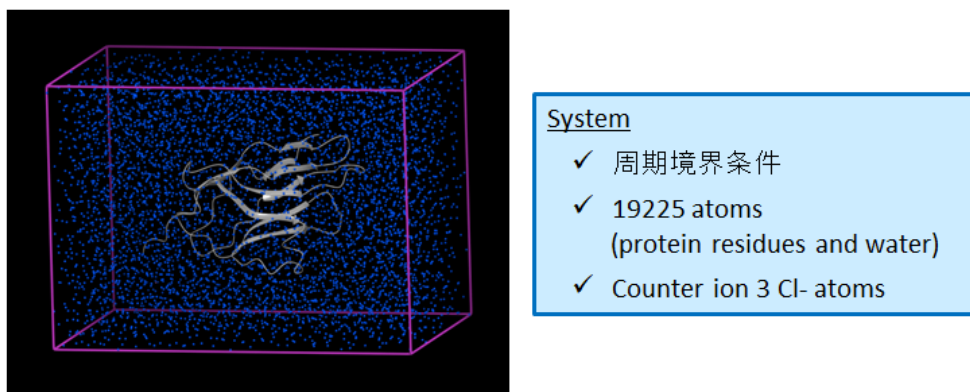


図 3-3. MD シミュレーションの入力ファイル

次に、作成した入力ファイルを用いて、desmond により 50nsec の MD シミュレーションを実施した。シミュレーション時間に沿ってモニタリングした hPD-1 タンパク質の初期構造に対する RMSD の推移を図 3-4 に示す。全重原子に加え、主鎖および側鎖の重原子について RMSD を測定した結果、一定の値に収束することが確認された。そこで、40～50ns 間のトラジェクトリーを抽出して構造クラスタリングを行うことにした。

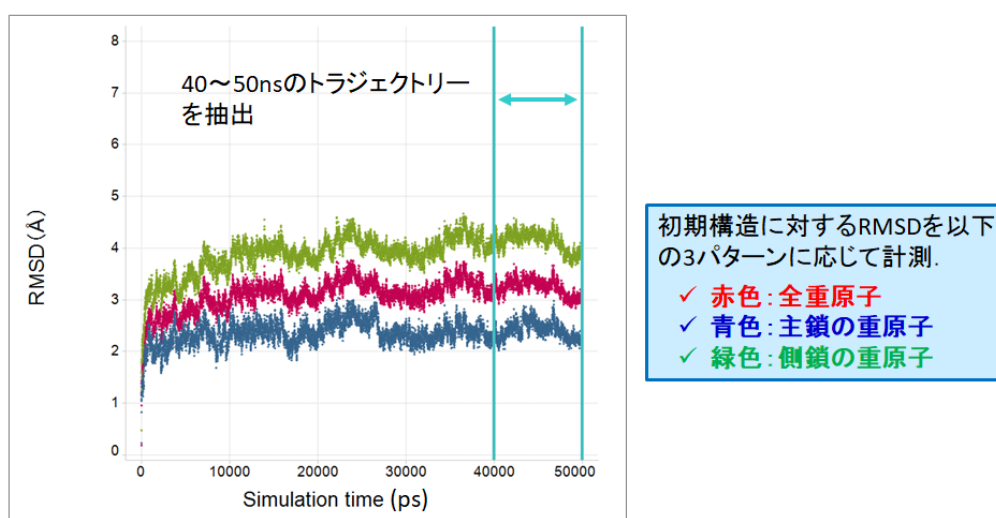


図 3-4. MD シミュレーションの結果：初期構造に対する RMSD の推移

抽出した MD トラジェクトリーを用いて trajectory_cluster モジュールにより構造クラスタリングを実施した。40.1ns～50ns の間から 100ps 間隔で計 1,000 構造を抽出して総当たりの rmsd を計測した。その結果、図 3-5 (a) に示すように 4 つの構造集団に分類され、そして各クラスター中心の構造として図 3-5 (b) に示す 4 つの構造が選抜された（以降、MD_cluster1, 2, 3, 4 と呼称）。これら 4 つの MD サンプルング構造と hPD-1 結晶構造を併せて後述の *in silico* フラグメントマッピングの解析に用いることにした。

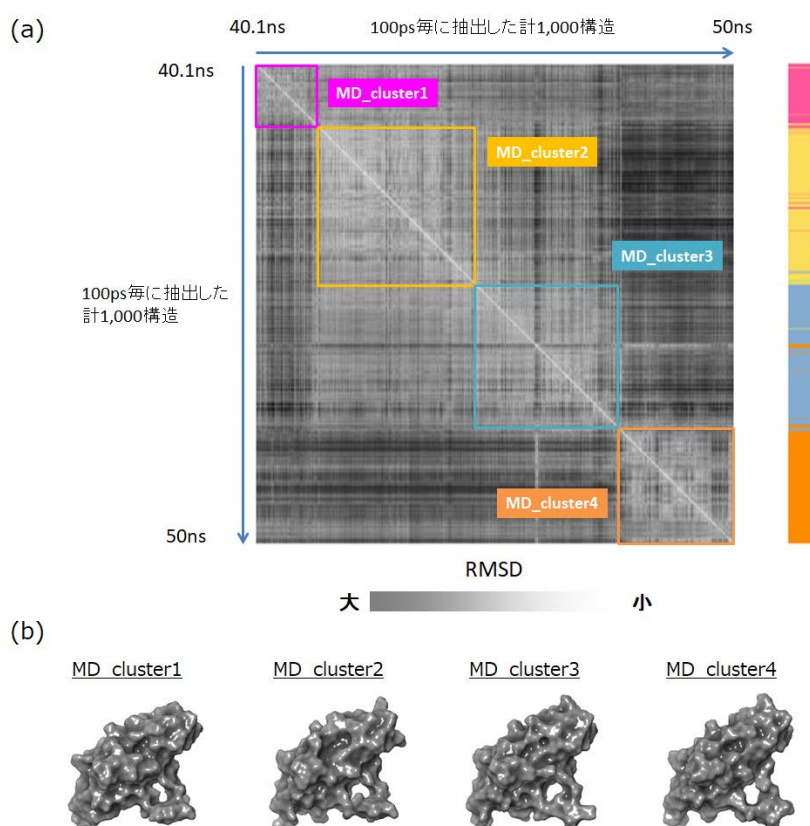


図 3-5. 構造クラスタリングの結果

(a) trajectory_cluster モジュール解析結果, (b) 選抜された MD サンプルング構造

第2節 *in silico* フラグメントマッピング

本検討に際して、マッピング表面残基の設定を行った。現在、human PD-1/human PD-L1 holo 体の X 線結晶構造 (PDB ID: 4ZQK) が明らかにされているが、研究開始当初において得られた holo 体構造は mouse PD-1/human PD-L1 (PDB ID: 3BIK, 3SBW) であった。そこで、はじめに図 3-6 に示すように 3BIK の構造を用いて PPI 界面に属する PD-1 のアミノ酸残基を特定した。具体的には、hPD-L1 から 6Å 内にある mPD-1 のアミノ酸残基 44 個を抽出した。続いて mouse および human PD-1 のアミノ酸配列の比較を行うことで、hPD-1 の PPI 界面付近に属するアミノ酸残基を抽出した。

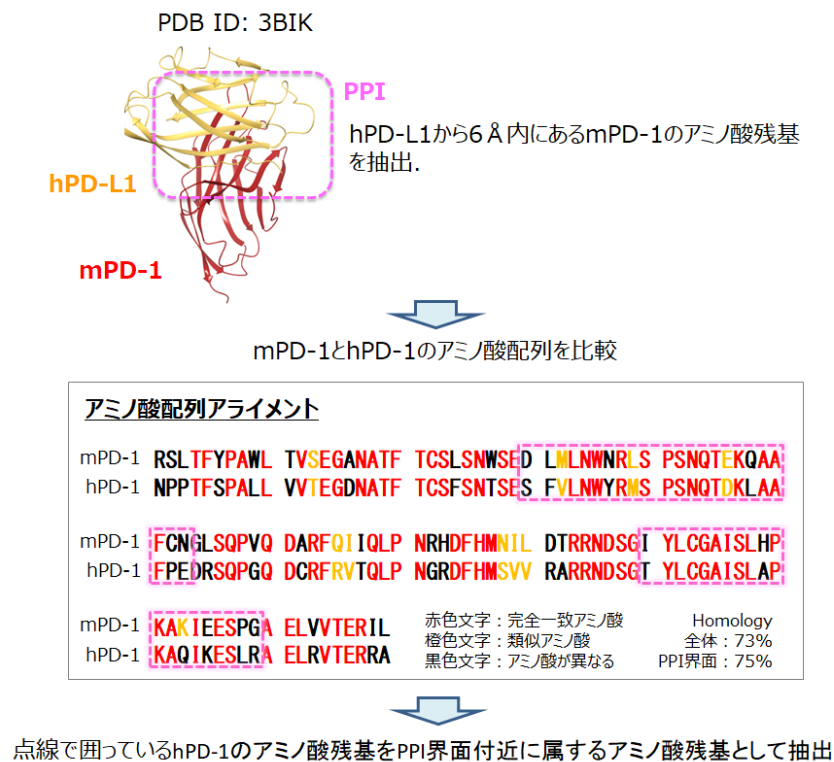


図 3-6. PPI 界面付近に属する hPD-1 アミノ酸残基の抽出

このようにして抽出された PPI 界面付近の hPD-1 のアミノ酸残基の情報を基に、*in silico* フラグメントマッピングのためのマッピング表面の設定を hPD-1 結晶構造と MD シミュレーションにより得られた 4 つのサンプリング構造に対して行った。図 3-7 に設定結果を示す。紫色でハイライトした分子表面がマッピング表面である。

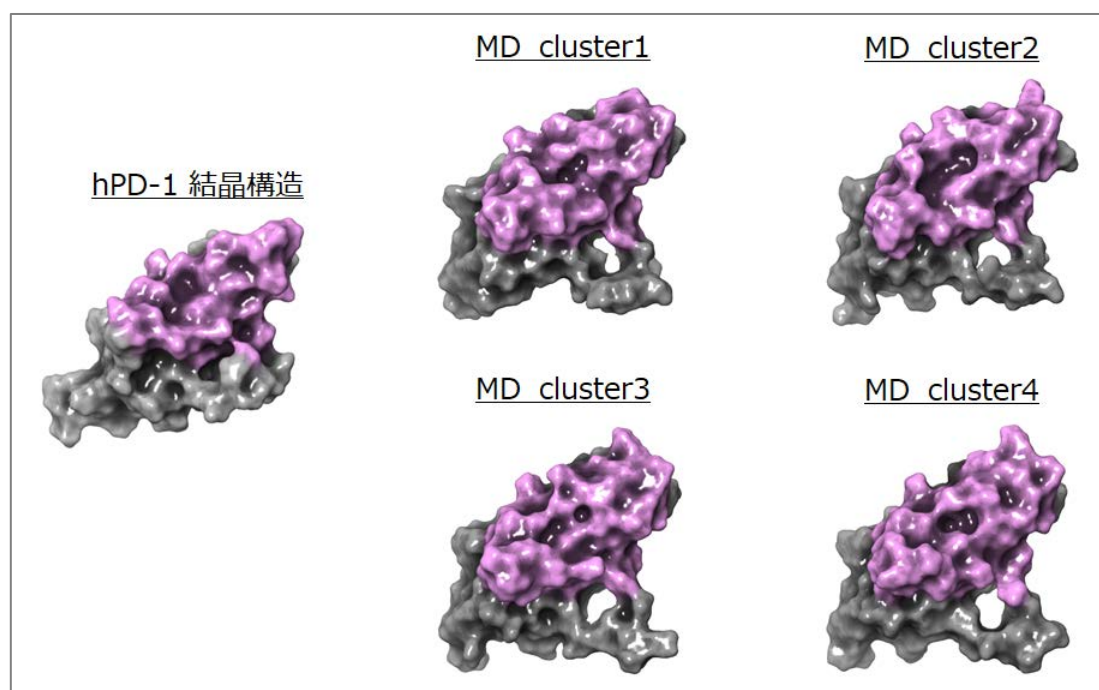


図 3-7. マッピング表面の設定結果

次に、設定したマッピング表面に対して、CSFDB および Fsubsite プログラムを用いた類似サブサイト探索およびフラグメントマッピングを実施した。解析の結果、図 3-8 に示すように各マッピング表面に対して多数のフラグメントがマッピングされる結果が得られた。

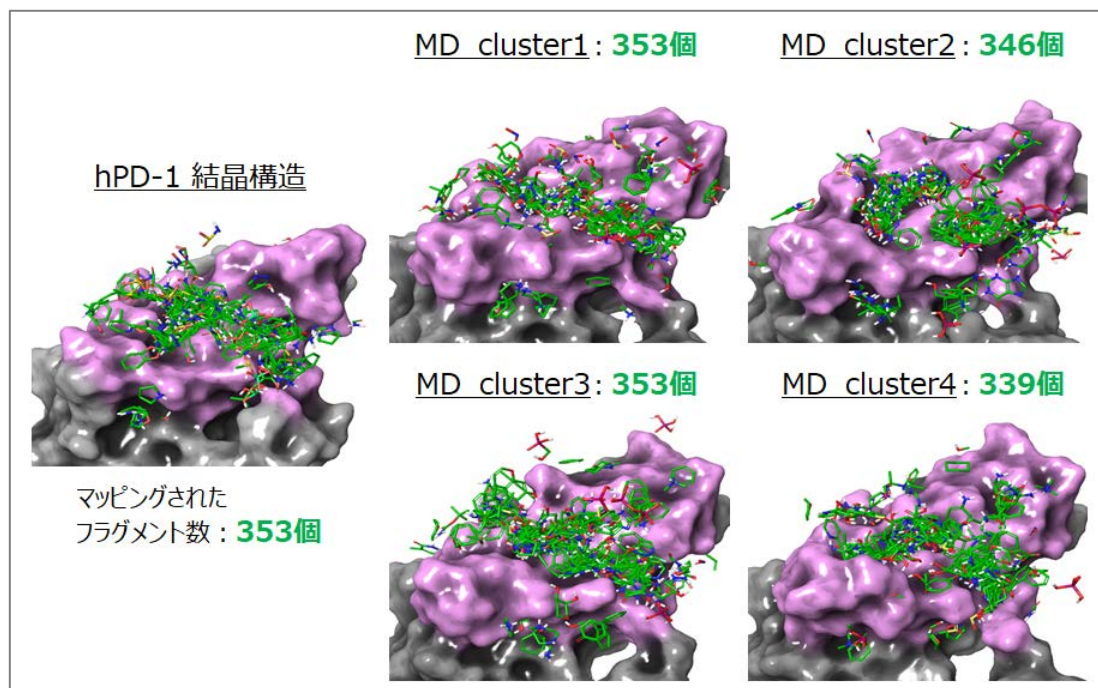


図 3-8. フラグメントマッピングの結果

フラグメントマッピングの結果から、よりサブサイトにフィットしているフラグメントを用いて 3D feature query を構築するために、前章に記載した方法に従って代表フラグメントの選抜を行った。各フラグメントについて hPD-1 との複合体モデルを構築後、エネルギー極小化計算を行った。続いて、リファインメントされた hPD-1/フラグメント複合体モデルを用いて prime_mmgsa により結合自由エネルギー計算を行い、MM/GBSA 値を算出した。そして、同解析値の上位 20 個を代表フラグメントとして選抜した。これら解析について hPD-1 結晶構造および 4 つの MD サンプルング構造に対して実施した。以上の解析の結果得られた hPD-1 結晶構造および MD_cluster1~4 にマッピングされた代表フラグメントを図 3-9 (a) ~ (e)に示す。

(a) hPD-1結晶構造

代表フラグメント：20個

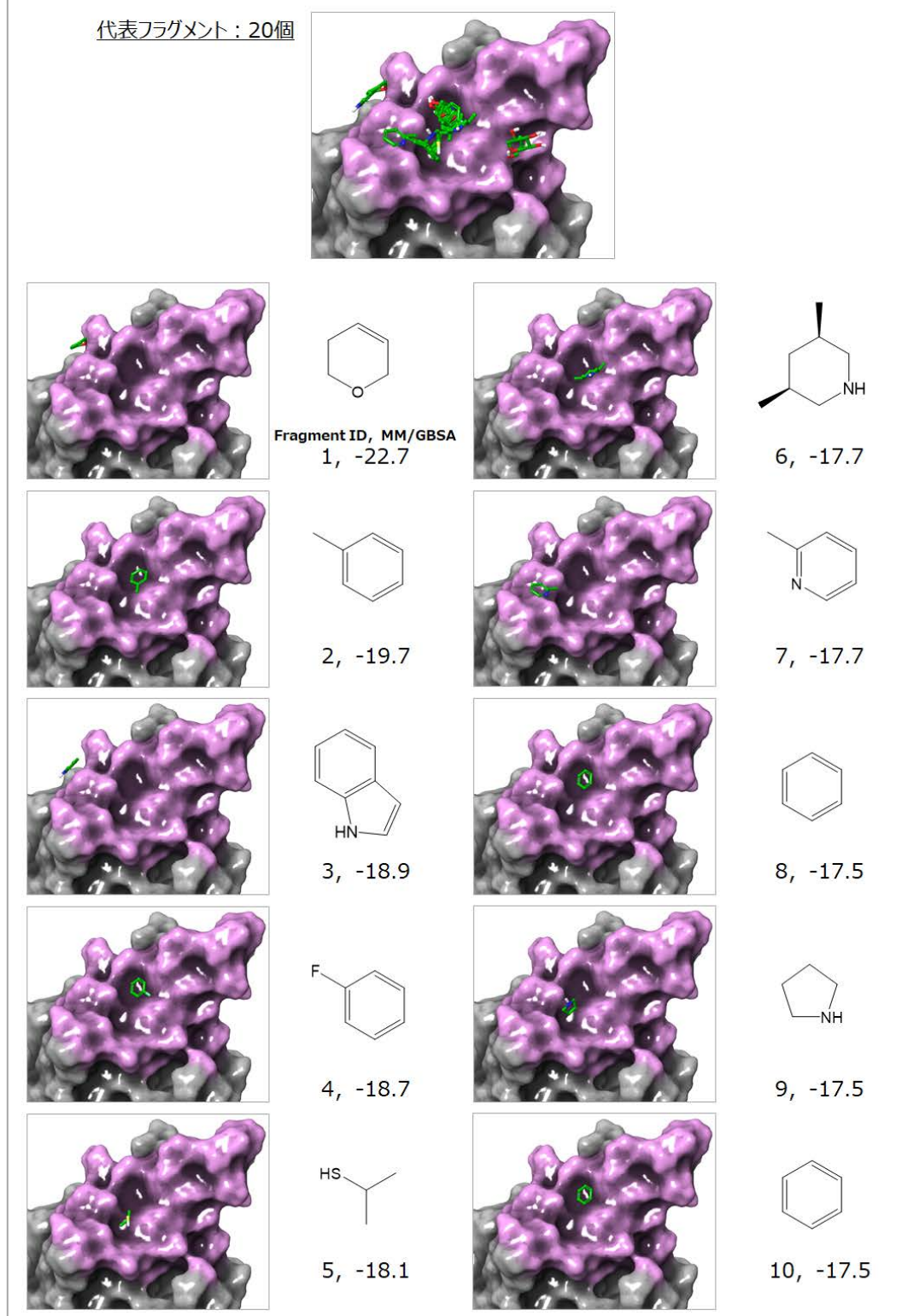


図 3-9 (a). 代表フラグメント：hPD-1 結晶構造 (Fragment ID: 1-10)

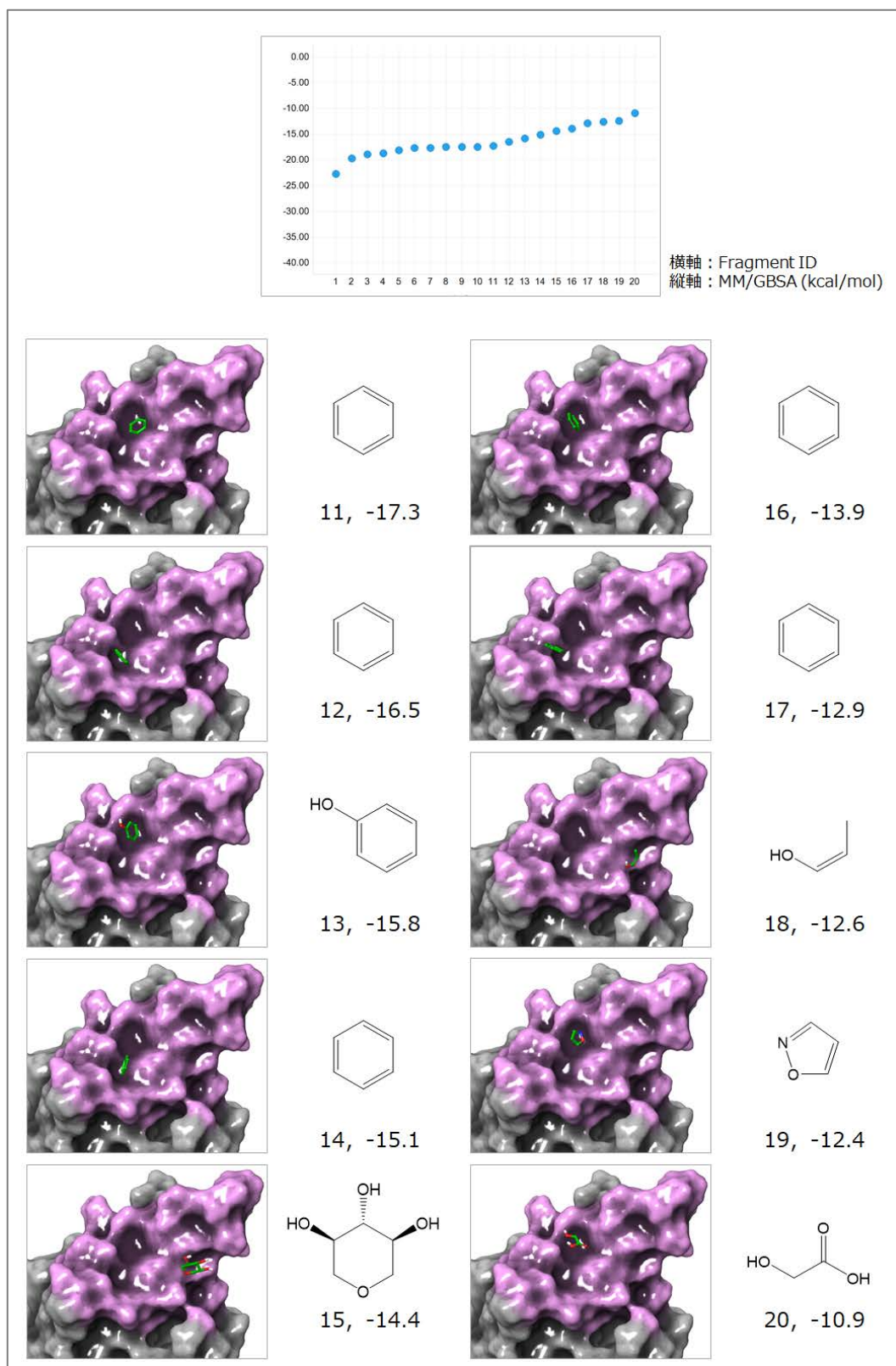


図 3-9 (a). 代表フラグメント : hPD-1 結晶構造 (Fragment ID: 11-20)

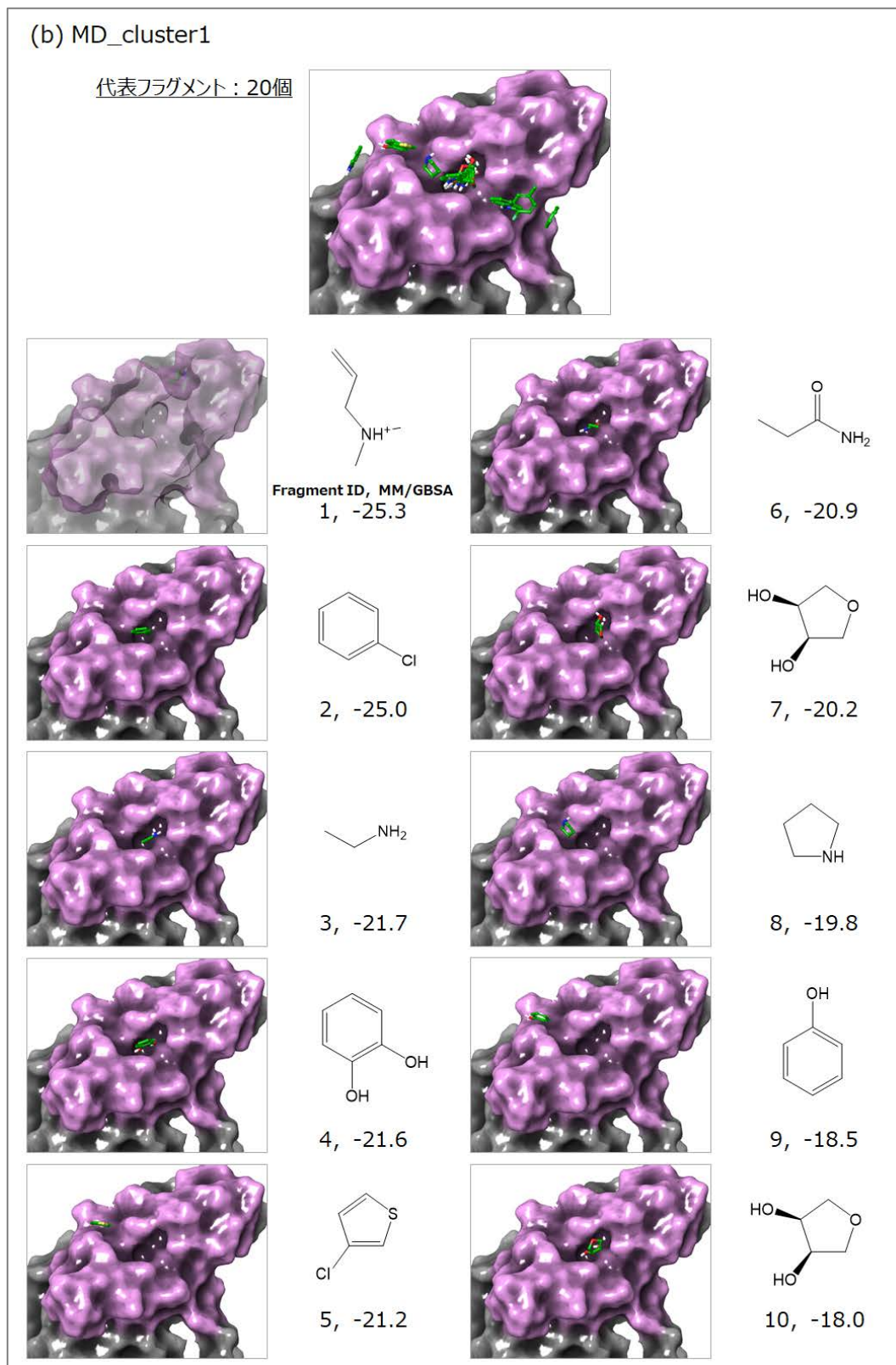


図 3-9 (b). 代表フラグメント：MD_cluster1 (Fragment ID: 1-10)

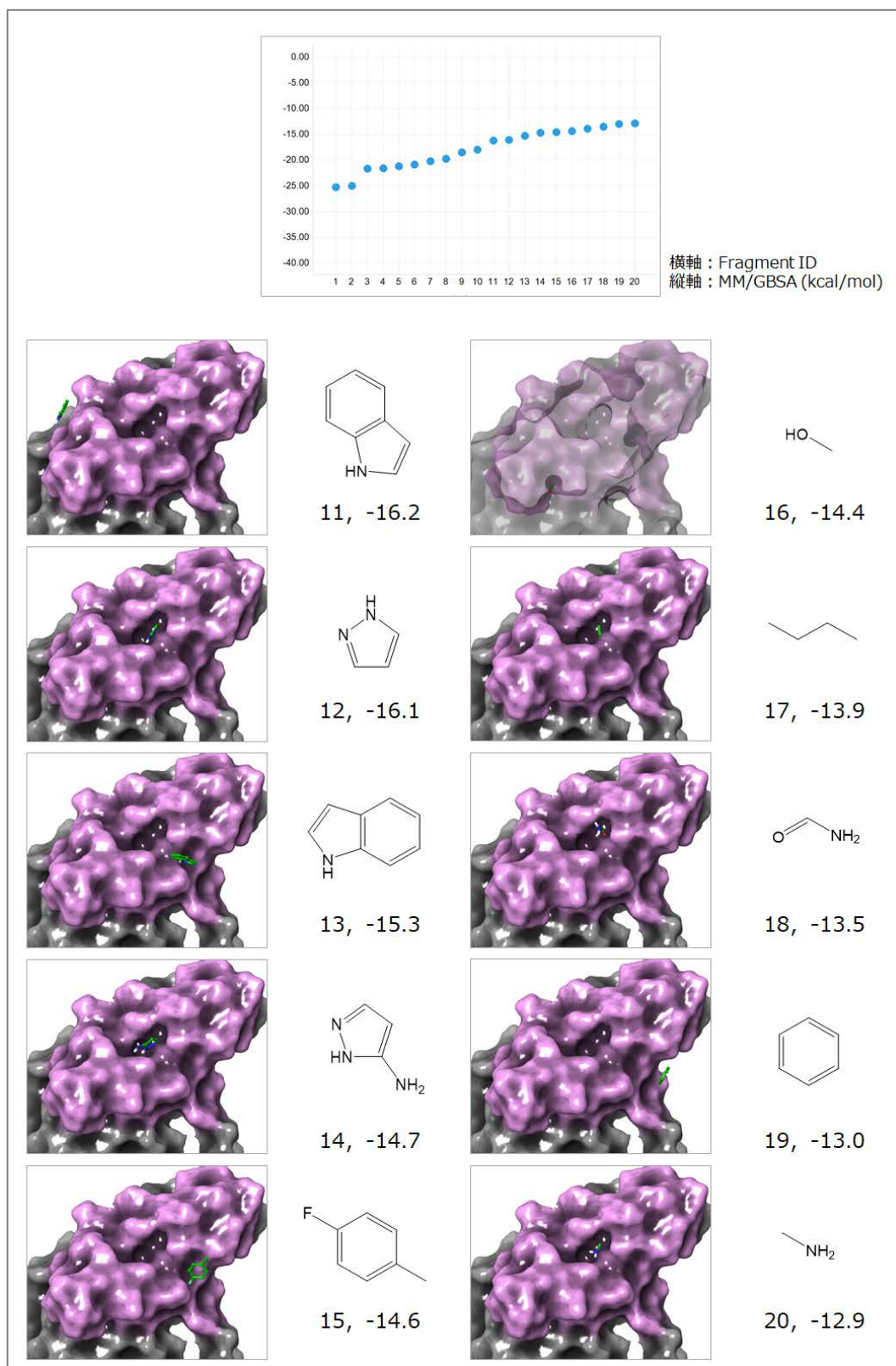


図 3-9 (b). 代表フラグメント : MD_cluster1 (Fragment ID: 11-20)

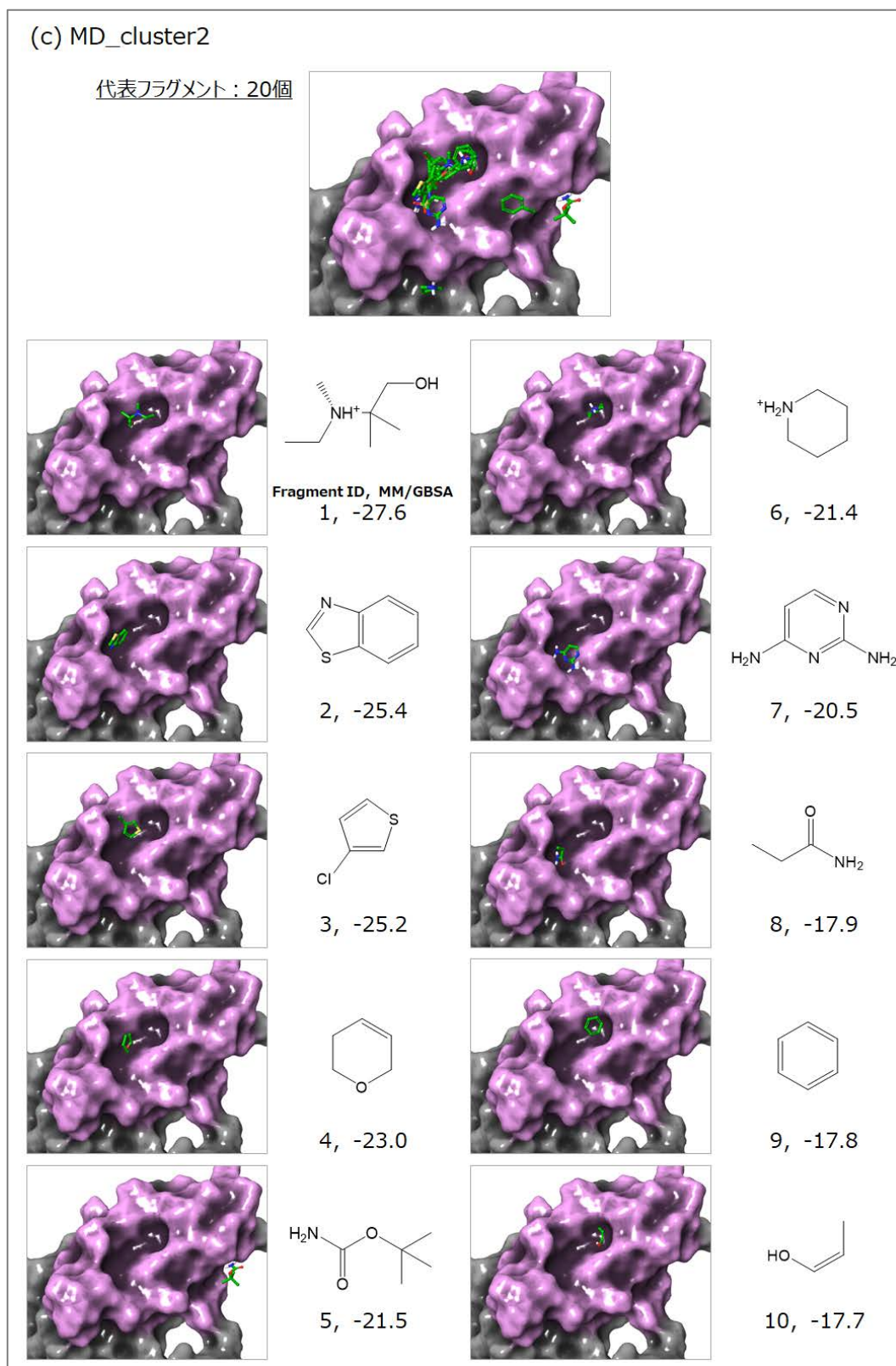


図 3-9 (c). 代表フラグメント：MD_cluster2 (Fragment ID: 1-10)

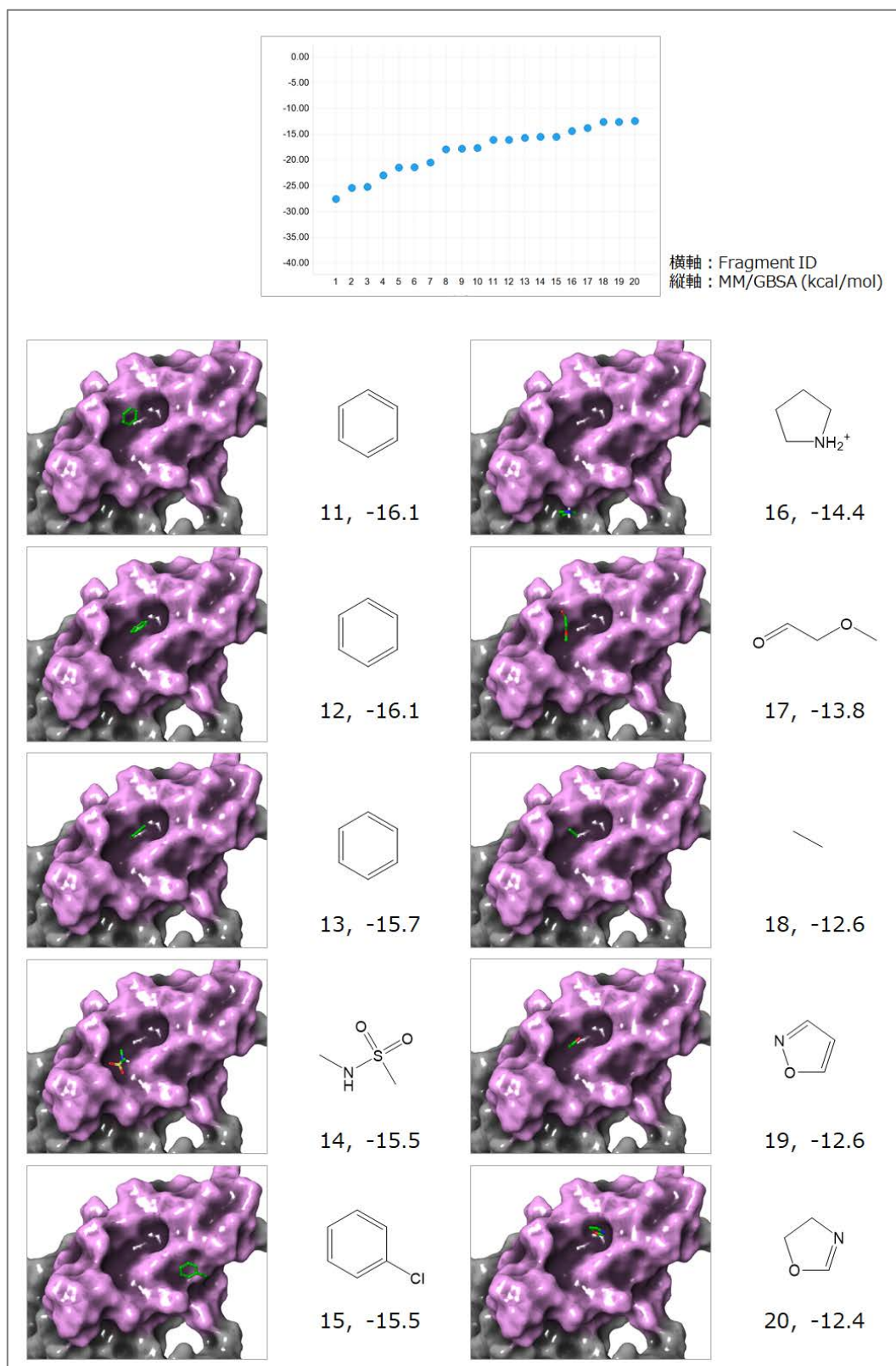


図 3-9 (c). 代表フラグメント : MD_cluster2 (Fragment ID: 11-20)

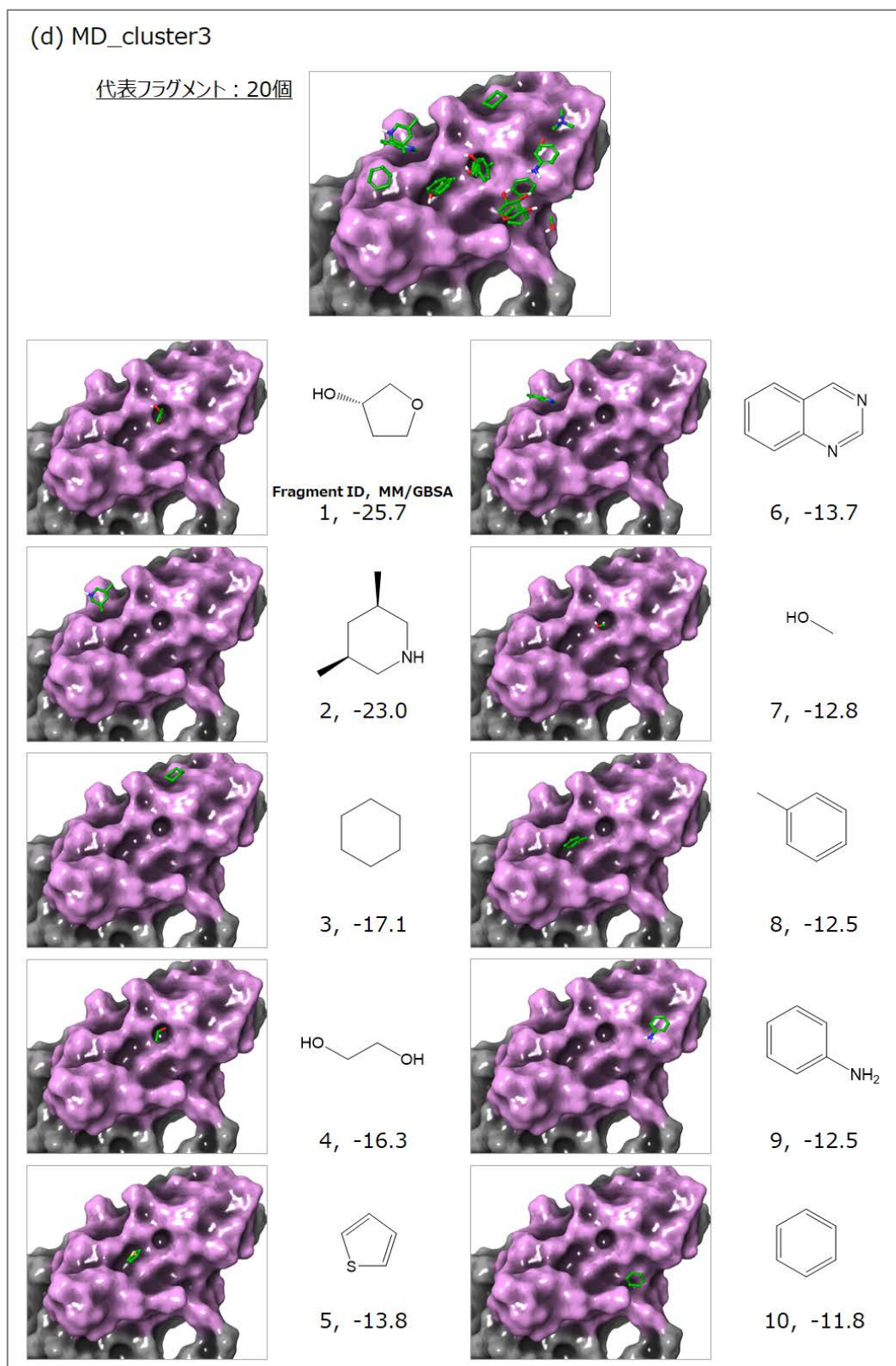


図 3-9 (d). 代表フラグメント：MD_cluster3 (Fragment ID: 1-10)

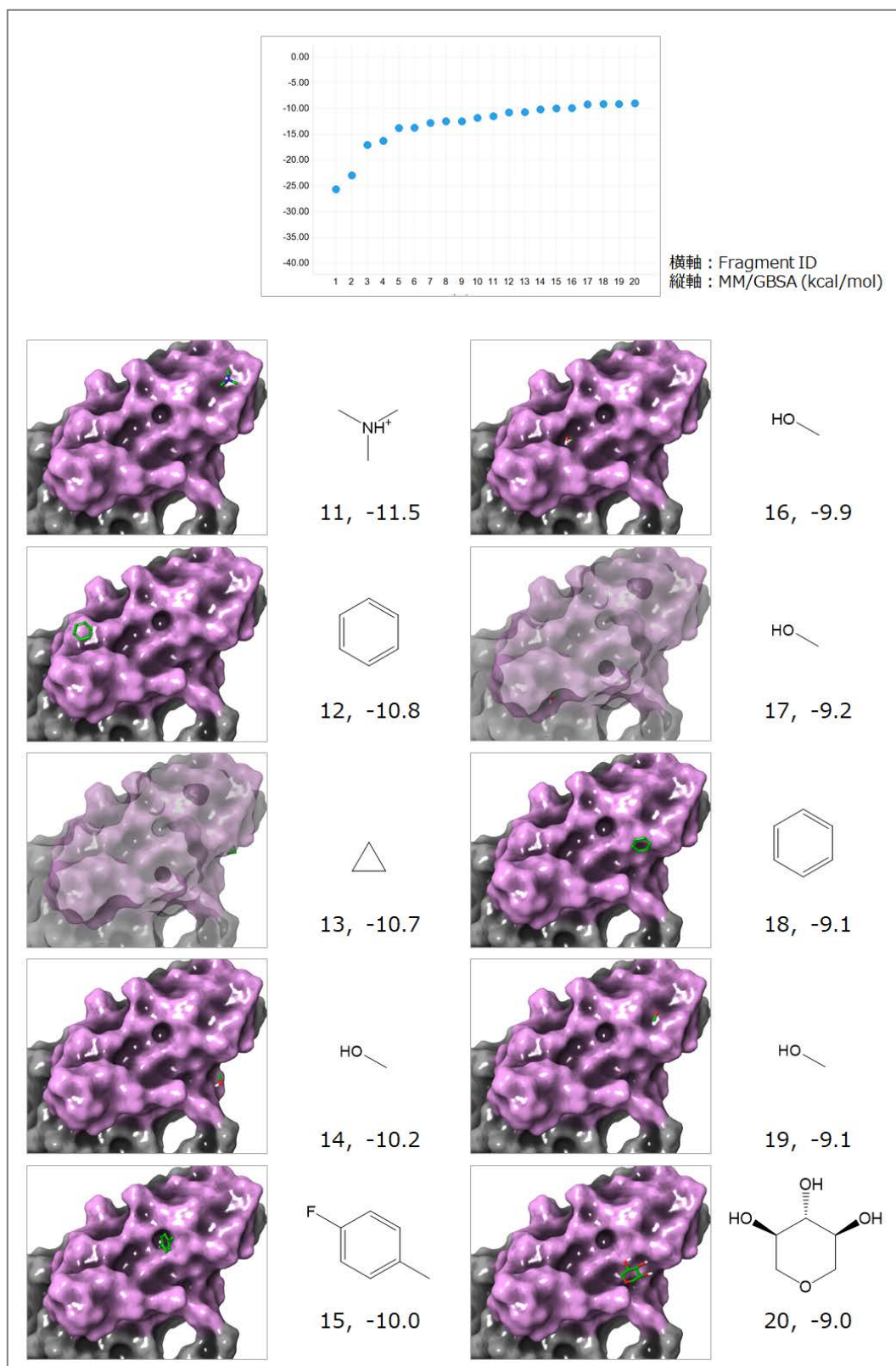


図 3-9 (d). 代表フラグメント : MD_cluster3 (Fragment ID: 11-20)

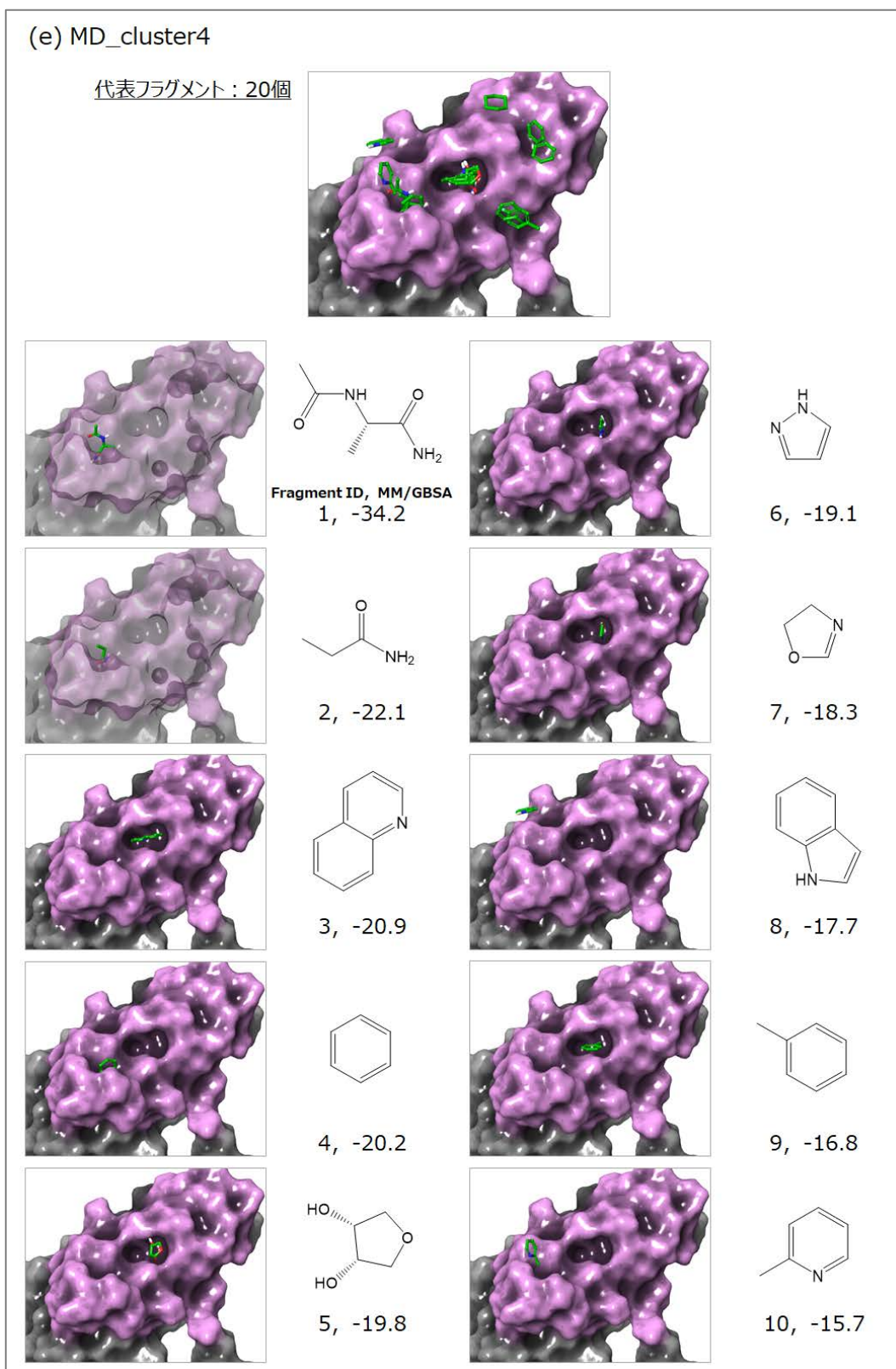


図 3-9 (e). 代表フラグメント：MD_cluster4 (Fragment ID: 1-10)

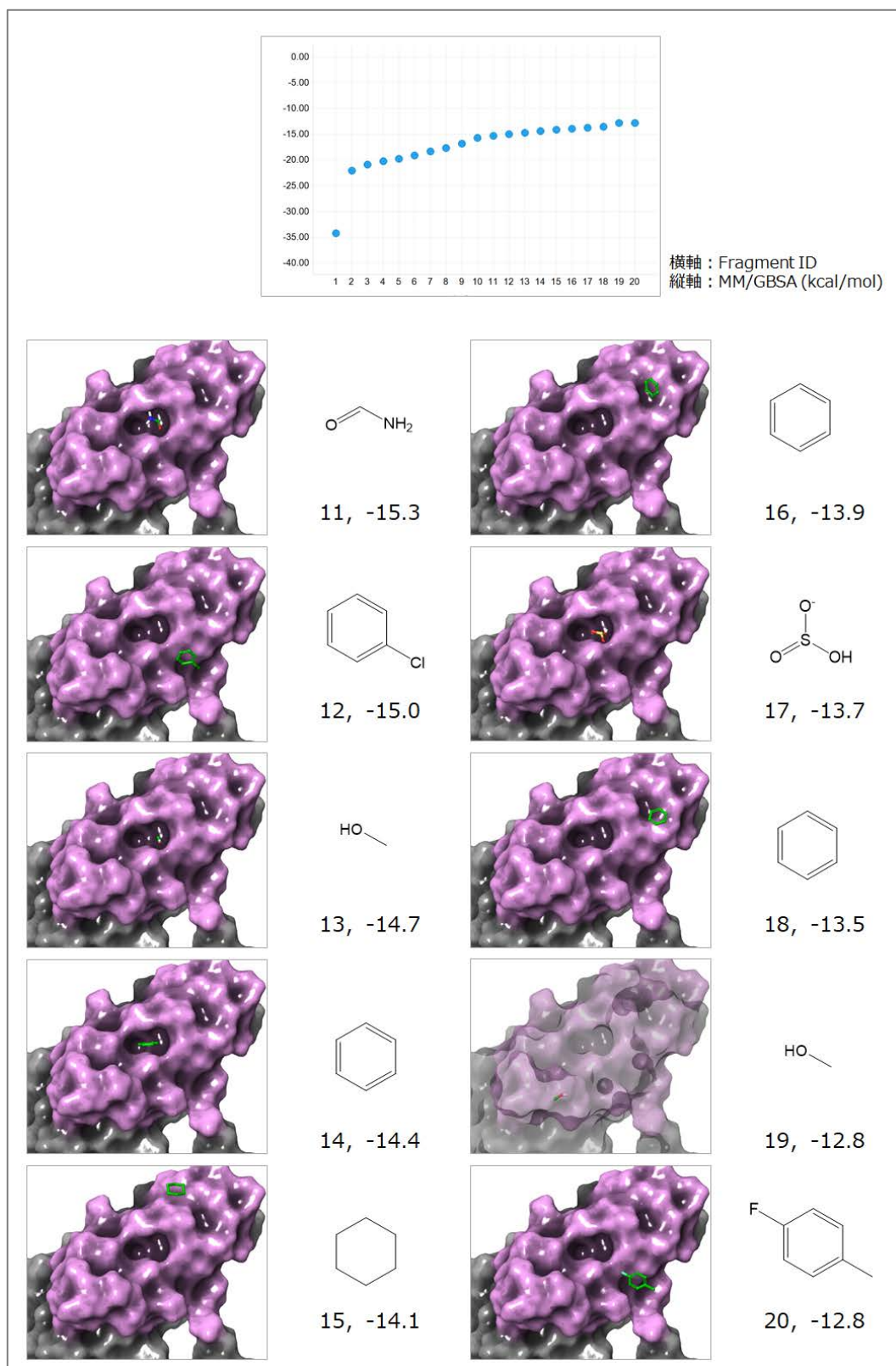


図 3-9 (e). 代表フラグメント : MD_cluster4 (Fragment ID: 11-20)

第3節 3D feature query の構築と探索プロトコルの設定

3D feature query の構築

前述までの解析の結果得られた hPD-1 結晶構造および MD_cluster1~4 にマッピングされた代表フラグメントについて、それらの配置から目視により近接しているフラグメントを集約するサイト分類を行った。図 3-10 にサイト分類の結果を示す。

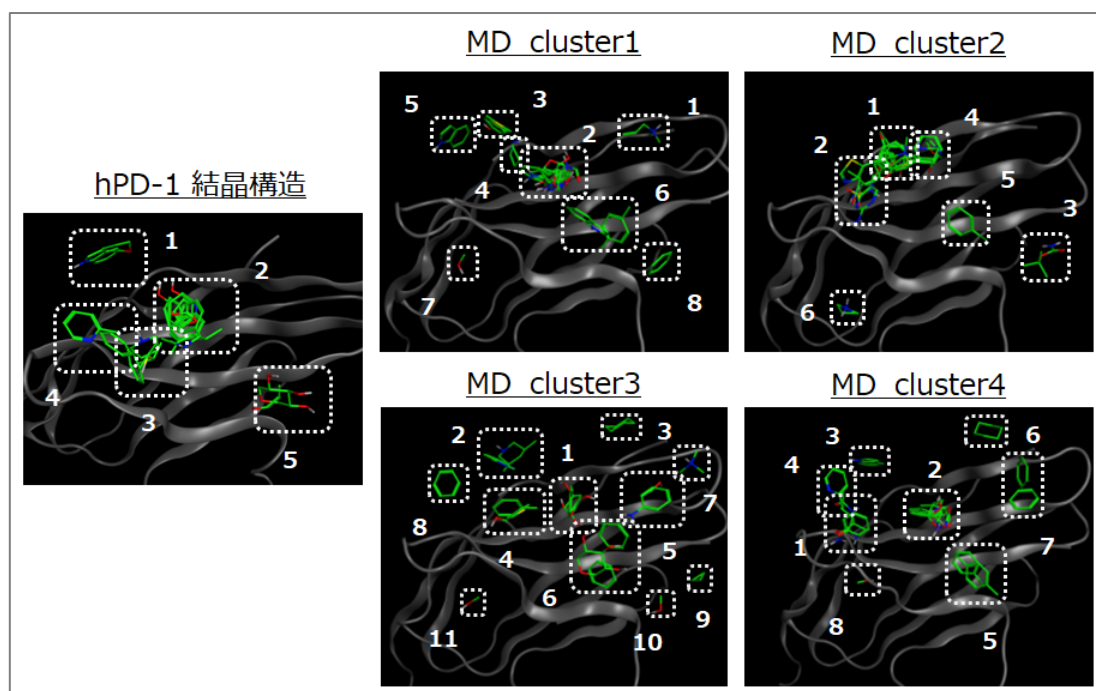


図 3-10. 代表フラグメントのサイト分類

続いて、MOE の Pharmacophore Editor により、分類された各サイトに属するフラグメントの脂溶性官能基がすべて納まるような脂溶性 feature（脂肪族，芳香族，またはいずれかの feature）を各々配置した。そして、各フラグメントの極性

官能基に対しては，該当する極性 feature（水素結合ドナー，水素結合アクセプター，またはいずれかの feature）を配置し，この際，2.5Å 内の半径の球でまとめられる同種の feature を 1 つに集約した．加えて，マッピング表面に属する hPD-1 のアミノ酸残基の重原子に排除体積 feature を配置した．以上の設定を行った結果，図 3-11 に示す 3D feature query を構築した．

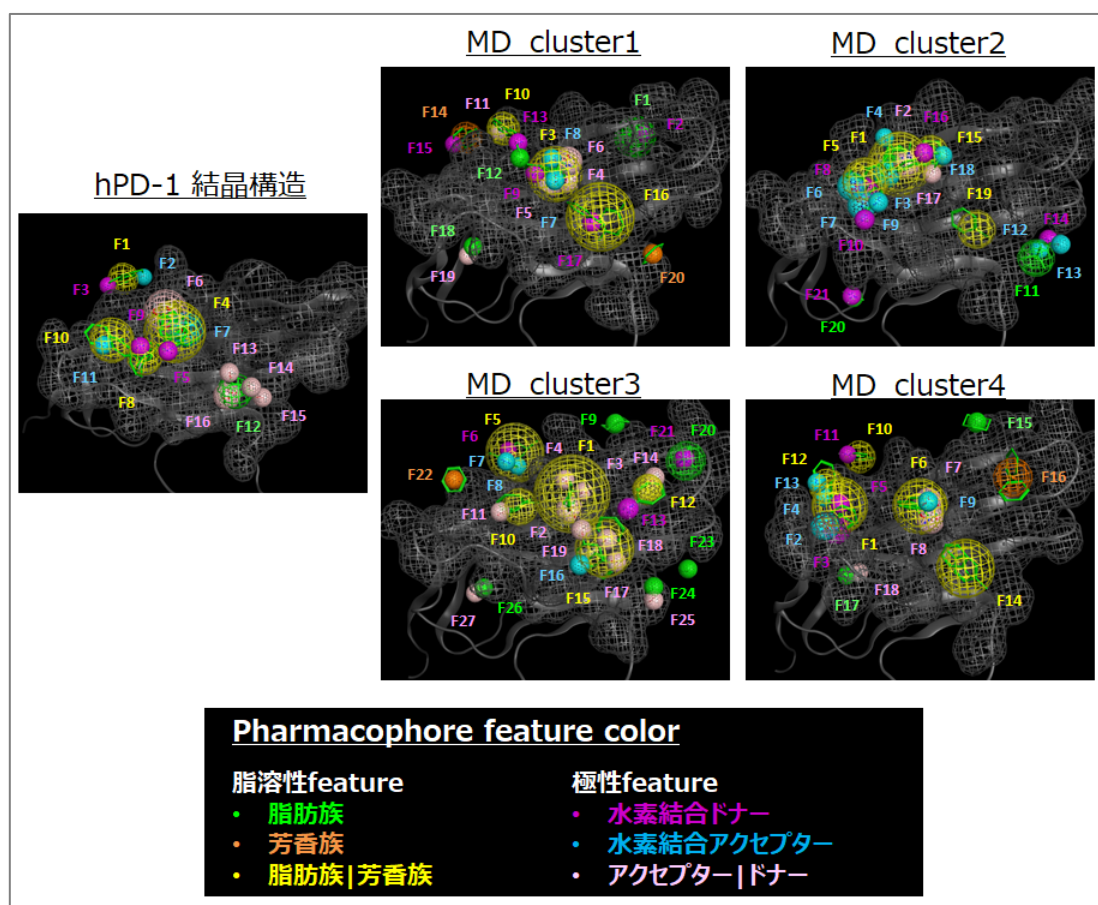


図 3-11. 3D feature query

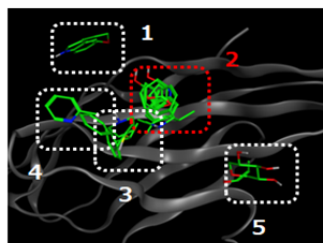
探索プロトコルの設定

構築した hPD-1 結晶構造および MD_cluster1～4 の 3D feature query を VS に使用する際の探索プロトコルの設定を行った．まず，サイト分類の結果を基に，各 3D feature query において中央に位置しているサイトを必須サイトとし，その他

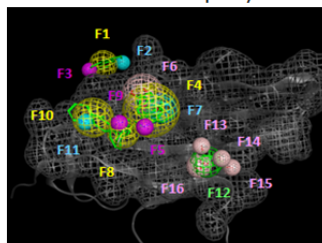
のサイトを任意サイトとした．そして，必須サイトにおいては脂溶性 feature と少なくとも 1 箇所以上の極性 feature を満たすことを条件に含めた．また，任意サイトについてはいずれかのサイトの脂溶性 feature を少なくとも 1 箇所以上満たすことを条件に含めた．以上の内容を踏まえた各 3D feature query の探索プロトコルを図 3-12 (a) ～ (e) に示す．

(a) hPD-1結晶構造

代表フラグメントのサイト分類



3D feature query



必須サイト: **Site 2**

- 脂溶性feature (F4)
- 極性feature (F5, 6, 7) の内, 1箇所以上

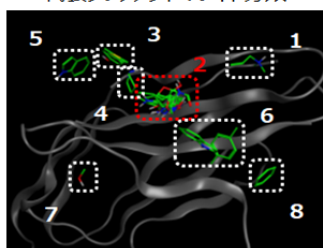
任意サイト: **Site 2以外**

- 脂溶性feature (F1, 8, 10, 12) の内, 1箇所以上

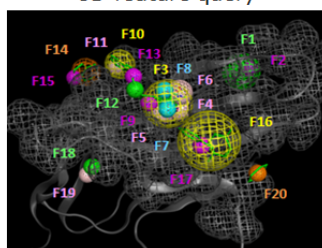
Site	Feature No.	Feature
1	F1	脂溶性 芳香族
	F2	アクセプター
	F3	ドナー
2	F4	脂溶性 芳香族
	F5	ドナー
	F6	ドナー アクセプター
	F7	アクセプター
3	F8	脂溶性 芳香族
	F9	ドナー
4	F10	脂溶性 芳香族
	F11	アクセプター
5	F12	脂溶性
	F13	ドナー アクセプター
	F14	ドナー アクセプター
	F15	ドナー アクセプター
	F16	ドナー アクセプター

(b) MD_cluster1

代表フラグメントのサイト分類



3D feature query



必須サイト: **Site 2**

- 脂溶性feature (F3)
- 極性feature (F4, 5, 6, 7, 8, 9) の内, 1箇所以上

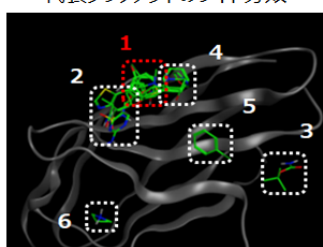
任意サイト: **Site 2以外**

- 脂溶性feature (F1, 10, 12, 14, 16, 18, 20) の内, 1箇所以上

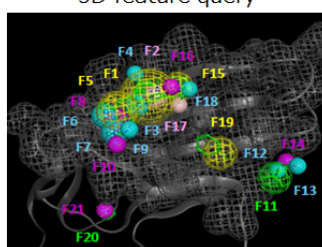
Site	Feature No.	Feature
1	F1	脂溶性
	F2	ドナー
2	F3	脂溶性 芳香族
	F4	ドナー アクセプター
	F5	ドナー アクセプター
	F6	ドナー アクセプター
	F7	アクセプター
	F8	アクセプター
	F9	ドナー
	F10	脂溶性 芳香族
3	F11	ドナー アクセプター
	F12	脂溶性
4	F13	ドナー
	F14	芳香族
5	F15	ドナー
	F16	脂溶性 芳香族
6	F17	ドナー
	F18	脂溶性
7	F19	ドナー アクセプター
	F20	芳香族

(c) MD_cluster2

代表フラグメントのサイト分類



3D feature query



必須サイト: **Site 1**

- 脂溶性feature (F1)
- 極性feature (F2, 3, 4) の内, 1箇所以上

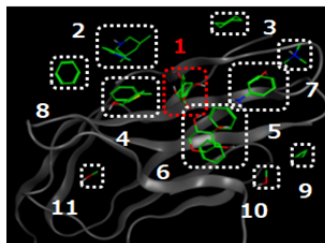
任意サイト: **Site 1以外**

- 脂溶性feature (F5, 11, 15, 19, 20) の内, 1箇所以上

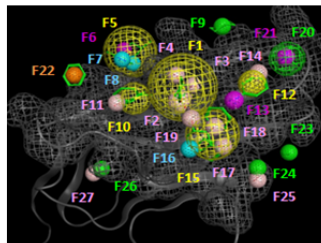
Site	Feature No.	Feature
1	F1	脂溶性 芳香族
	F2	ドナー アクセプター
	F3	アクセプター
	F4	アクセプター
2	F5	脂溶性 芳香族
	F6	アクセプター
	F7	アクセプター
	F8	ドナー
	F9	アクセプター
	F10	ドナー
3	F11	脂溶性
	F12	アクセプター
	F13	アクセプター
	F14	ドナー
4	F15	脂溶性 芳香族
	F16	ドナー
	F17	ドナー アクセプター
	F18	アクセプター
5	F19	脂溶性 芳香族
	F20	脂溶性
6	F21	ドナー

(d) MD_cluster3

代表フラグメントのサイト分類



3D feature query



必須サイト: **Site 1**

- 脂溶性feature (F1)
- 極性feature (F2, 3, 4) の内, 1箇所以上

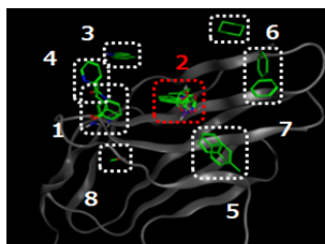
任意サイト: **Site 1以外**

- 脂溶性feature (F5, 9, 10, 12, 15, 20, 22, 23, 24, 26) の内, 1箇所以上

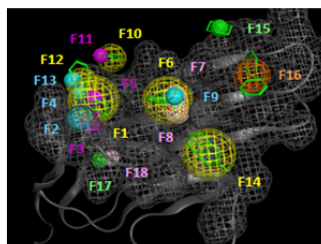
Site	Feature No.	Feature
1	F1	脂溶性 芳香族
	F2	ドナー アクセプター
	F3	ドナー アクセプター
	F4	ドナー アクセプター
2	F5	脂溶性 芳香族
	F6	ドナー
	F7	アクセプター
	F8	アクセプター
3	F9	脂溶性
4	F10	脂溶性 芳香族
5	F11	ドナー アクセプター
	F12	脂溶性 芳香族
	F13	ドナー
	F14	ドナー アクセプター
6	F15	脂溶性 芳香族
	F16	アクセプター
	F17	ドナー アクセプター
	F18	ドナー アクセプター
7	F19	ドナー アクセプター
	F20	脂溶性
8	F21	ドナー
9	F22	芳香族
10	F23	脂溶性
11	F24	脂溶性
	F25	ドナー アクセプター
	F26	脂溶性
	F27	ドナー アクセプター

(e) MD_cluster4

代表フラグメントのサイト分類



3D feature query



必須サイト: **Site 2**

- 脂溶性feature (F6)
- 極性feature (F7, 8, 9) の内, 1箇所以上

任意サイト: **Site 2以外**

- 脂溶性feature (F1, 10, 12, 14, 15, 16, 17) の内, 1箇所以上

Site	Feature No.	Feature
1	F1	脂溶性 芳香族
	F2	アクセプター
	F3	ドナー
	F4	アクセプター
	F5	ドナー
2	F6	脂溶性 芳香族
	F7	ドナー アクセプター
	F8	ドナー アクセプター
	F9	アクセプター
3	F10	脂溶性 芳香族
	F11	ドナー
4	F12	脂溶性 芳香族
	F13	アクセプター
5	F14	脂溶性 芳香族
6	F15	脂溶性
7	F16	芳香族
8	F17	脂溶性
	F18	ドナー アクセプター

図 3-12. 3D feature query の探索プロトコル: (a) hPD-1 結晶構造,

(b) MD_cluster1, (c) MD_cluster2, (d) MD_cluster3, (e) MD_cluster4

第 4 節 3D pharmacophore-based VS

PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子性化合物の候補を選抜するために、前述までの検討により得られた hPD-1 結晶構造と MD サンプルング構造、そして 3D feature query および探索プロトコルを用いて市販化合物 (Namiki DB) を対象とした VS を実施した。Namiki DB には 500 万をこえる多くの化合物が収載されていたため、3 段階の *in silico* スクリーニング方法を用いて候補化合物の絞り込みを行った。1 段階目のスクリーニングとして pharmacophore search を行った。500 万化合物について OMEGA により立体配座集団を 1 化合物あたり最大 200 配座生成した後、MOE の pharmacophore search の機能を用いて 3D feature query の探索プロトコルの条件を満たす化合物を抽出した。続いて 2 段階目のスクリーニングでは、マッピング表面を探索範囲としたドッキングを行った。1 化合物あたり最大 10 ポーズ出力し、ドッキングスコアである ChemScore が上位 (15 以上) のドッキングポーズを抽出した。さらに 3D feature query との照合を行うことで探索プロトコルの条件を満たすドッキングポーズを抽出した。1 化合物あたり複数ポーズが抽出された場合には、ChemScore が最大のポーズを選抜し、3rd screening の入力ポーズとした。3 段階目のスクリーニングでは、2 段階目のスクリーニングで得られたドッキングポーズと hPD-1 タンパク質との複合体モデルについてエネルギー極小化計算および結合自由エネルギー計算を行い MM/GBSA 値を算出、その値が上位 (-40 kcal/mol 以下) の化合物を抽出した。以上の解析を行った結果、この時点で計 448 化合物が抽出された。1st screening から 3rd screening の解析内容の詳細について図 3-13 に示す。

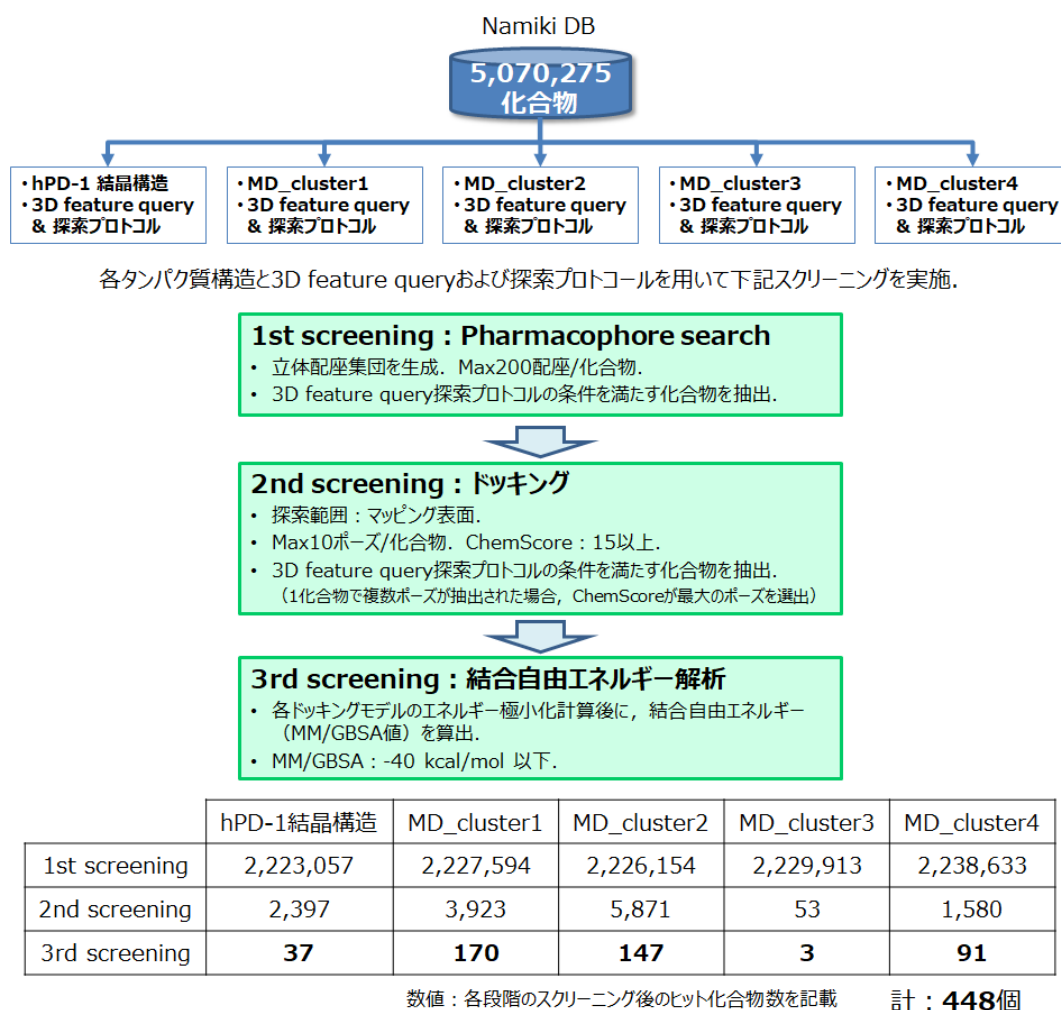
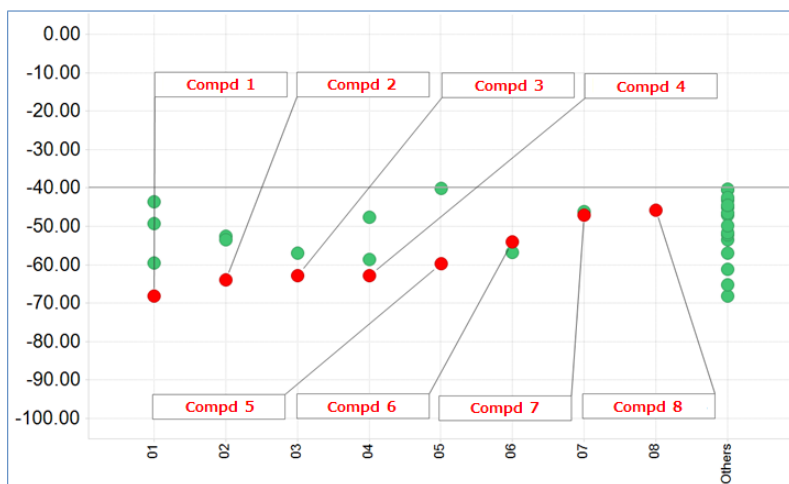


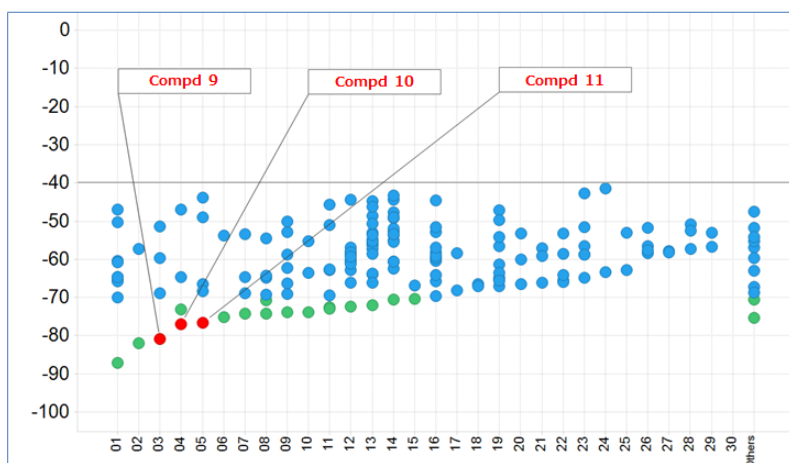
図 3-13. 3D pharmacophore-based VS：1st～3rd screening の結果

続いて、3rd screening までに絞り込まれた化合物について、Pipeline Pilot の Cluster Molecular module による構造クラスタリングを実施するとともに、各構造クラスターに渡って結合自由エネルギーの解析値である MM/GBSA の値が上位のものについて購入可能性について調査を行った。図 3-14 において、購入可能性を確認した化合物を緑色のプロットで示しており、実際に購入した化合物を赤色のプロットで示した。最終的に、計 25 化合物を候補化合物として購入し、*in vitro* アッセイを実施した。

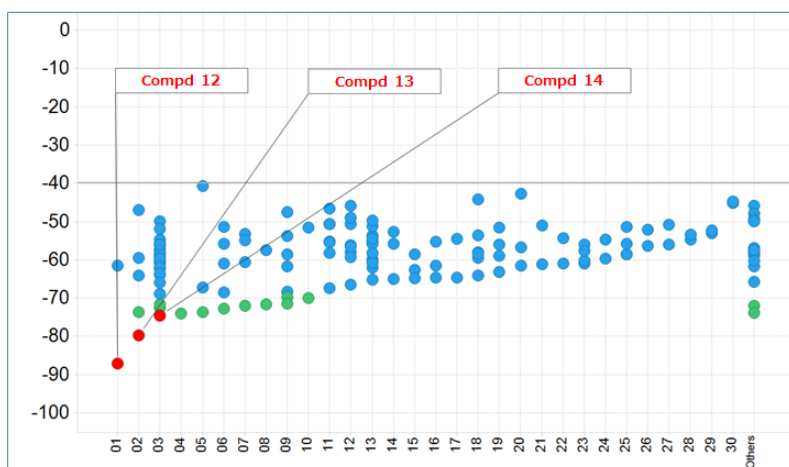
(a) hPD-1結晶構造



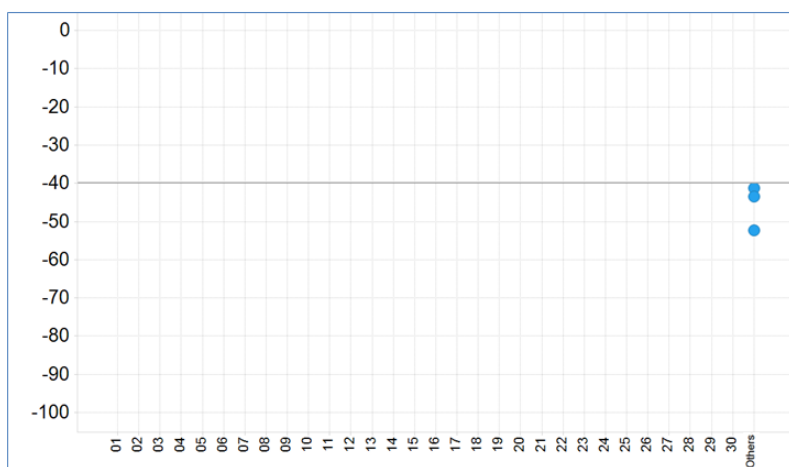
(b) MD_cluster1



(c) MD_cluster2



(d) MD_cluster3



(e) MD_cluster4

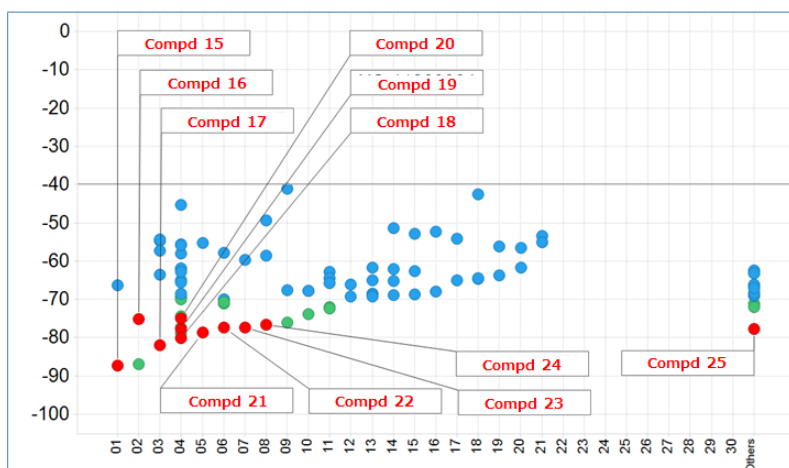


図 3-14. 候補化合物の選抜結果

縦軸：結合自由エネルギー解析値（MM/GBSA，単位：kcal/mol）

横軸：構造クラスター

緑色のプロット：購入可能性を確認した化合物

赤色のプロット：候補化合物（Compd 1～25）

第5節 候補化合物の *in vitro* アッセイ

候補化合物の hPD-1/hPD-L1 の PPI 阻害能を評価するため、ELISA 法によるアッセイを実施した。その結果、表 3-2 に示すように compound 3 が化合物濃度 100uM で阻害率 21%の hPD-1/hPD-L1 PPI 阻害能を有することが確認された。

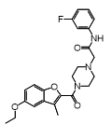
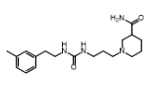
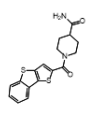
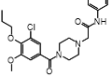
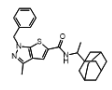
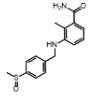
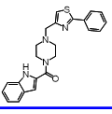
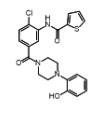
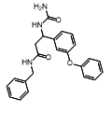
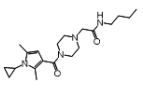
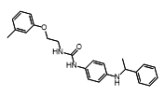
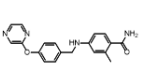
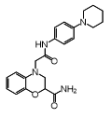
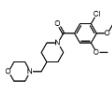
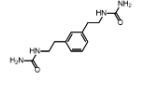

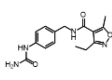

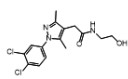
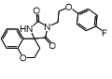
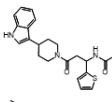
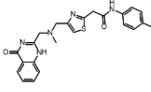
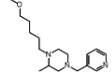
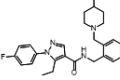
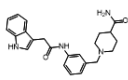
Compound	%inhibition (化合物濃度)	Compound	%inhibition (化合物濃度)	Compound	%inhibition (化合物濃度)
1 	0 (100uM)	11 	3 (100uM)	21 	1 (50uM)
2 	0 (100uM)	12 	-3 (50uM)	22 	-2 (100uM)
3 	21 (100uM)	13 	-7 (75uM)	23 	-5 (100uM)
4 	0 (100uM)	14 	-12 (50uM)	24 	-5 (100uM)
5 	3 (100uM)	15 	-6 (100uM)	25 	-4 (100uM)
6 	0 (100uM)	16 	-8 (100uM)		
7 	2 (100uM)	17 	3 (100uM)		
8 	4 (100uM)	18 	-3 (100uM)		
9 	-4 (75uM)	19 	-2 (100uM)		
10 	-8 (100uM)	20 	-13 (100uM)		

表 3-2. 候補化合物の *in vitro* アッセイ結果

第 4 章 考察

第1節 ヒット化合物の阻害メカニズム

3D feature query-based VS で選抜された化合物の *in vitro* アッセイの結果, compound 3 が阻害率 21% (化合物濃度 100uM) で hPD-1/hPD-L1 の PPI を阻害することが確認された. そこで, compound 3 がどのように hPD-1/hPD-L1 の PPI を阻害しているのか考察を行うために以下に示す検討を行った. まず compound 3 の hPD-1 に対する相互作用様式について確認を行った. 図 4-1 に hPD-1/compound 3 のドッキングモデルと相互作用様式の模式図を示す. Compound 3 は, 静電的な相互作用として hPD-1 E136 とのイオン相互作用および Y68 との水素結合を形成していた. 加えて, Y68 とは π - π スタッキングを形成していた. さらに, hPD-1 の M70, L122, I134 の疎水性領域に compound 3 のピペラジン〜インドール環が配置されていてポケットの形状にフィットするとともに, 上記の静電相互作用を周囲の水分子からシールドしている効果が考えられた.

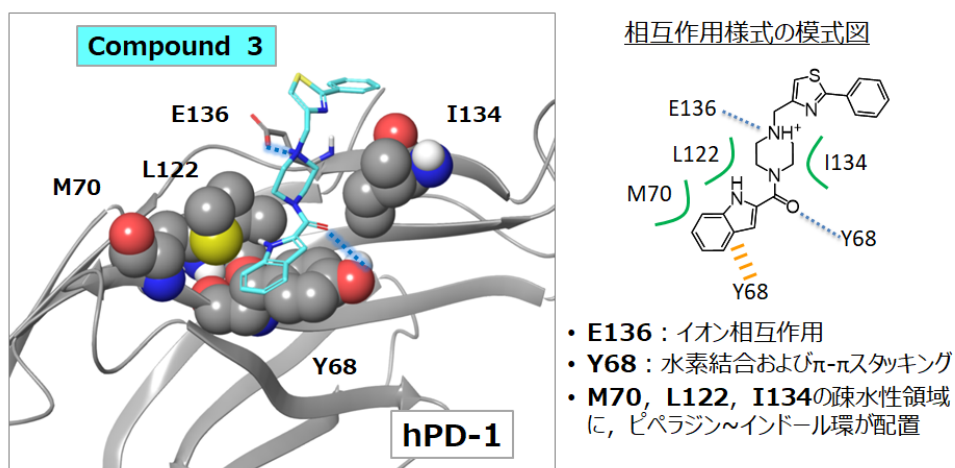


図 4-1. hPD-1/compound 3 ドッキングモデルと相互作用の模式図

続いて、hPD-1/hPD-L1 複合体の X 線結晶構造 (PDB ID: 4ZQK) が現在明らかにされているので、hPD-1/compound 3 ドッキングモデルとの比較を行った。hPD-1 に対する hPD-L1 および compound 3 の相互作用様式の比較を行った結果を図 4-2 に示す。4ZQK の構造において、hPD-1 E136 に対して R113 がイオン相互作用を形成していたが、compound 3 についても図 4-1 で示したように、hPD-1 E136 に対してピペラジン環内のカチオン化した窒素原子がイオン相互作用を形成していた。また、4ZQK の構造において hPD-L1 Y123 が hPD-1 のサブポケットを埋めているが、compound 3 についてもピペラジン～インドール環部分が同ポケットを埋める形になっていた。

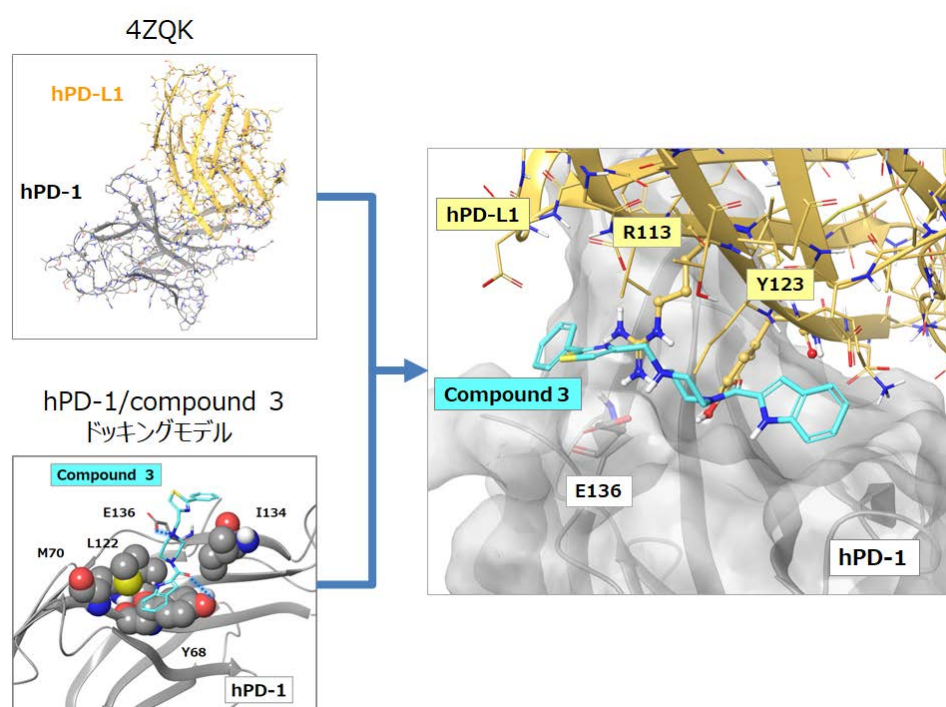


図 4-2. hPD-1 に対する hPD-L1 および compound 3 の相互作用様式の比較

以上の結果から、compound 3 は hPD-1/hPD-L1 の PPI を一部模倣することで、直接的に hPD-1/hPD-L1 PPI を阻害している可能性が考えられた。

また、hPD-1/compound 3 ドッキングモデルと *in silico* フラグメントマッピングの結果について比較を行った。Compound 3 は hPD-1 結晶構造の 3D feature query からヒットした化合物であるため、同構造を対象に解析を行った *in silico* フラグメントマッピングの結果について確認を行った。その結果、図 4-3 に示す 3 つのフラグメント (Fragment ID: 13, 20, 14) が、前述までの考察から compound 3 の活性発現に重要と示唆される相互作用ポイントにマッピングされていることが確認された。Fragment ID:13 は E136 と水素結合を形成すると共に M70, L122, I134 からなる脂溶性空間を充填しており、Fragment ID:20 は E136 および Y68 と水素結合を形成、Fragment ID:14 は Y68 と π - π スタッキングを形成していた。本研究では、holo 体の相互作用情報を使用していないが、上記のように結果として key ファーマコフォアの検出に至ったことから、*in silico* フラグメントマッピング手法の有用性を示せたものと考えられる。

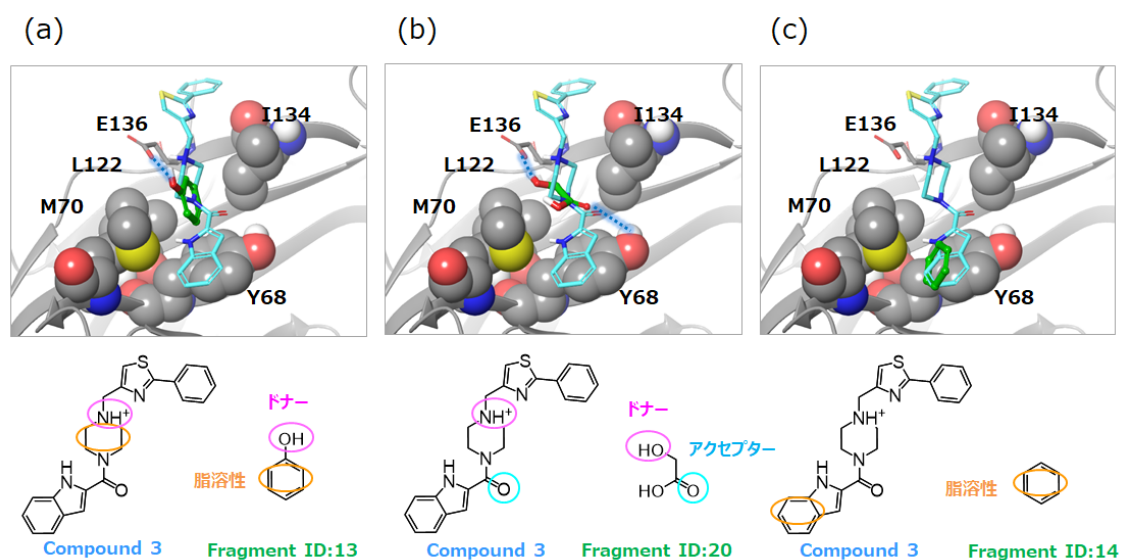


図 4-3. hPD-1/compound 3 ドッキングモデルと *in silico* フラグメントマッピングの結果の比較

第2節 ヒット化合物のリガンドデザイン

前節の考察の結果, compound 3 は hPD-1/hPD-L1 の PPI を一部模倣して会合相互作用を阻害している可能性が示唆されたが, 一方でその阻害活性は弱いため活性向上を図る必要がある. そこで, リガンドデザインのアイデアを得るために, hPD-1/compound 3 ドッキングモデルと *in silico* フラグメントマッピングの結果を比較した. その結果, 図 4-4 に示すように compound 3 近傍において, まだリガンドでは埋められていないサイトとして, Site 1, 4, 5 が残されていた. そこで, これらサイトにおいて, どのような 3D feature query を設定しているか, またどのような相互作用が期待されるか考察を行ったので以下に詳細を示す.

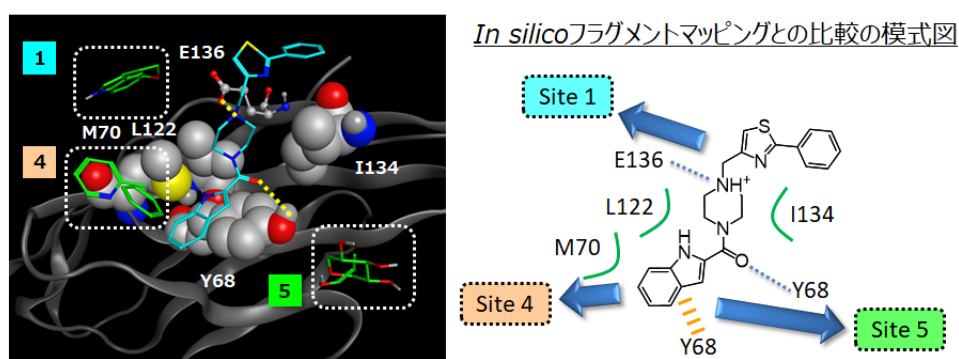


図 4-4. ドッキングモデルと *in silico* フラグメントマッピングの結果の比較

まず, Site 1 および Site 4 については図 4-5 (a) に示す 3D feature query を設定しており, compound 3 を起点に, Site 1 に対して脂溶性+アクセプターの feature を満たす側鎖を, Site 4 に対して脂溶性+アクセプターの feature を満たす側鎖を伸長することが望ましいと考えられた. そして, このようなリガンドの修飾によって, Site 1 では R139 との π - π スタッキングと水素結合の形成, Site 4 では M70 の疎水性領域の充填と T76 との水素結合の形成が期待される. また, Site 1 と Site

4 については図 4-5 (b) に示すように PPI 界面に接していないことから、ここで示したデザイン案は、hPD-1 に対する結合親和性を高めることで、PPI 阻害活性向上を目指した方針になる。

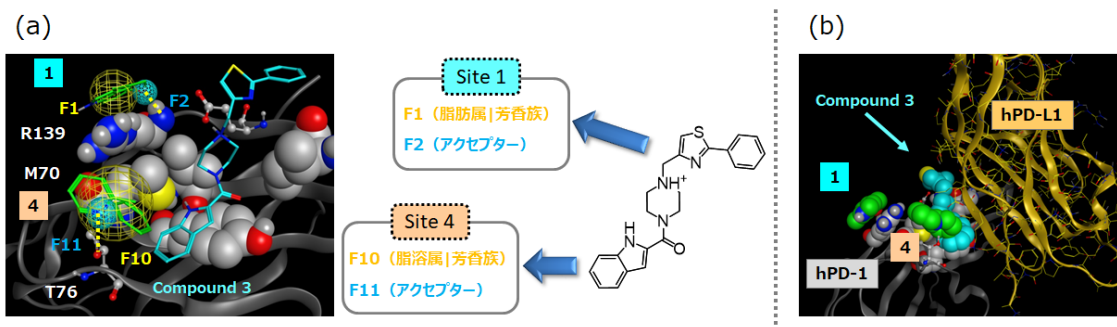


図 4-5. Site 1, Site 4 への分子伸長デザイン : (a) ドッキングモデルと 3D feature query の比較, (b) hPD-1/hPD-L1 PPI に対する Site 1, Site 4 の位置関係の比較

一方、Site 5 では図 4-6 (a) に示す 3D feature query を設定していた。Compound 3 を起点に、Site 5 に対して脂溶性+アクセプターを満たす側鎖を伸長することが望ましいと考えられた。このリガンドの修飾により、Site 5 では V64, I126 の疎水性領域の充填、N66, K78 との水素結合の形成が期待される。また、Site 5 については図 4-6(b) に示すように PPI 界面に接していることから、ここで示したデザイン案は、hPD-L1 の結合を直接妨害して PPI 阻害活性を高める方針になる。

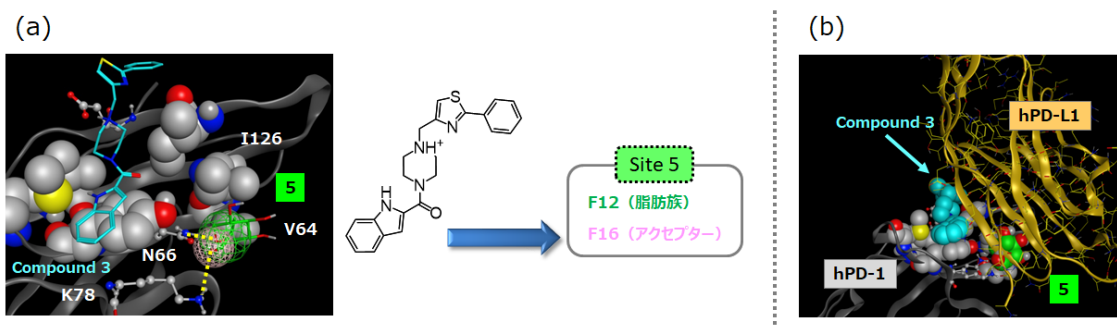


図 4-6. Site 5 への分子伸長デザイン : (a) ドッキングモデルと 3D feature query の比較, (b) hPD-1/hPD-L1 PPI に対する Site 5 の位置関係の比較

以上の考察結果を踏まえると、図 4-7 に示す compound 3 を起点としたリガンドデザイン案が考えられる。すなわち、Site 1 への脂溶性（脂肪族もしくは芳香族）+ アクセプターの官能基を有する側鎖の伸長、Site 4 への脂溶性（脂肪族もしくは芳香族）+ アクセプターの官能基を有する側鎖の伸長、そして Site 5 への脂溶性（脂肪族）+ アクセプターの官能基を有する側鎖の伸長である。このような構造展開を図ることで、今後ポテンシャルのより高い hPD-1/hPD-L1 阻害剤を見出すことが期待される。

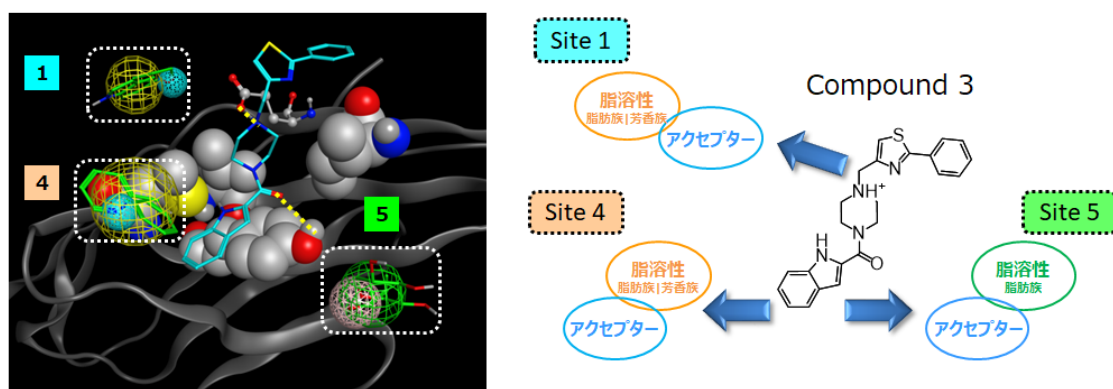


図 4-7. Compound 3 を起点としたリガンドデザイン案のまとめ

第 5 章 結論

PD-1/PD-L1 の PPI を標的とした抗体医薬品によるがん免疫療法が臨床現場で行われるようになり、これまで治療が困難であったような症例を含め、がんと闘病している患者を救っている。一方、抗体薬の課題として投与法が点滴静注に限られることや高額な医療費がかかること、免疫原性の問題があることから、治療法の選択を狭めることや治療効果が十分に発揮されないといった懸念が考えられた。

そこで、本研究では新規抗がん剤の開発を目指して *in silico* 創薬技術による PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子性化合物の探索を実施することにした。一般的に PPI は低分子化合物による創薬ターゲットとしては高難度と区分され、PD-1/PD-L1 についても同様の条件であったが、*in silico* フラグメントマッピング手法を活用することで PD-1 タンパク質の PPI 界面上にリガンドファーマコフォア仮説を立て、その情報を基に VS によって市販化合物から候補化合物の選抜を行った。そして、選抜した候補化合物についてアッセイを行った結果、阻害率 21%（化合物濃度 100uM）で hPD-1/hPD-L1 PPI を阻害する compound 3 を見出した。これまでに hPD-L1 に結合することで同 PPI を阻害する低分子阻害剤は報告されているが、hPD-1 に結合することで同 PPI を阻害する低分子阻害剤は報告されていない。実験的には確認できていないが、compound 3 は、hPD-1 に結合することで hPD-1/hPD-L1 PPI を阻害する可能性が高い初めての低分子性化合物と考えられる。

近年になり、hPD-1/hPD-L1 の holo 体構造が明らかとなったことから、hPD-1 に対する hPD-L1 と compound 3 の相互作用様式を比較したところ compound 3 は hPD-L1 の相互作用を一部模倣しており、それにより hPD-1/hPD-L1 の会合相互作用を阻害している可能性が示唆された。加えて、本研究では holo 体の情報を使用していないが、上記のように、結果として key ファーマコフォアを検出

するに至った．このことから *in silico* フラグメントマッピングの有用性が示されたものと考えられる．また，compound 3 は低活性であるが，ドッキングモデルと *in silico* フラグメントマッピングの結果を確認したところ，compound 3 近傍にはまだ使われていないフラグメントがマッピングされているサイトが存在していることから，これらの情報を基にリガンドデザインを行うことによって，より有望な PD-1/PD-L1 の PPI を阻害する低分子性化合物が創出されることが期待される．

以上

謝辞

本研究を行うにあたり，終始，ご指導，ご鞭撻をいただきました北里大学薬学部 創薬物理化学教室 広野 修一 教授に謹んで厚くお礼申し上げます。

そして，日頃の研究活動においてご指導，ご協力下さいました北里大学薬学部 創薬物理化学教室 山乙 教之 講師，中込 泉 助教，吉田 智喜 助教，小澤 新一朗 助教および講座研究員 増田 陽介氏，加藤 晴敏氏に深く感謝申し上げます。

また，CSFDB と Fsubsite プログラム，Schrodinger 社 SMDD (Small-Molecule Drug Design) suite アプリケーション，MOE (CCG)，OMEGA (OpenEye)，GOLD (CCDC)，Pipeline Pilot (BIOVIA)，これらの計算化学に関するソフトウェアを活用することによって，本研究を推進することができました。深く感謝申し上げます。

最後に，本研究の遂行を陰ながら支えてくれた家族に感謝いたします。

2019 年 3 月

酒匂 佑介

引用文献

- [1] Ishida, Y.; Agata, Y.; Shibahara, K.; Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992, 11, 3887-3895.
- [2] Riella, L.V.; Paterson, A. M.; Sharpe, A. H.; Chandraker, A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant.* 2012, 12, 2575-2587.
- [3] Ostrand-Rosenberg, S.; Horn L. A.; Haile, S. T. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol.* 2014, 193, 3835-3841.
- [4] Wang, X.; Teng, F.; Kong, L.; Yu, J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther.* 2016, 12, 5023-5039.
- [5] Barber, D. L, Wherry, E. J.; Masopust, D.; Zhu, B.; Allison, J. P.; Sharpe, A. H.; Freeman, G.J. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006, 439, 682-687.
- [6] Catakovic, K.; Klieser, E.; Neureiter, D.; Geisberger, R. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell Commun Signal.* 2017, 15, 1-16.
- [7] Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007,121, 1-14.
- [8] Vinay, D. S.; Ryan, E. P.; Pawelec, G.; Talib, W. H.; Stagg, J.; Elkord, E.; Lichtor, T.; Decker, W. K.; Whelan, R. L.; Kumara, H. M. C. S.; Signori, E.; Honoki, K.; Georgakilas,

A. G.; Amin, A.; Helferich, W. G.; Boosani, C. S.; Guha, G.; Ciriolo, M. R.; Chen, S.; Mohammed, S. I.; Azmi, A. S.; Keith, W. N.; Bilsland, A.; Bhakta, D.; Halicka, D.; Fujii, H.; Aquilano, K.; Ashraf, S. S.; Nowsheen, S.; Yang X.; Choi B. K.; Kwon, B. S. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015, 35, S185-S198.

[9] Dömling, A.; Holak, T. A. Programmed death-1: therapeutic success after more than 100 years of cancer immunotherapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014, 53, 2286-2288.

[10] Topalian, S. L.; Drake, C. G.; Pardoll, D. M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* 2015, 27, 450–461.

[11] Shin, D. S.; Ribas, A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr Opin Immunol.* 2015, 33, 23-35.

[12] Sharma, P.; Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015, 348, 56-61.

[13] Hoos, A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov.* 2016, 15, 235-47.

[14] Chupak, L. S.; Zheng, X. Compounds Useful as Immunomodulators. WO2015034820, March 2015.

[15] Chupak, L. S.; Ding, M.; Martin, S. W.; Zheng, X.; Hewawasam, P.; Connolly, T. P.; Xu, N.; Yeung, K.-S.; Zhu, J.; Langley, D. R.; Tenney, D. J.; Scola, P. M.; Mingo, P. A. Compounds Useful as Immunomodulators. WO2015160641, October 2015.

[16] Guzik, K.; Zak, K. M.; Grudnik, P.; Magiera, K.; Musielak, B.; Törner, R.; Skalniak,

L.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A. Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. *J. Med. Chem.* 2017, 60, 5857–5867.

[17] Skalniak, L.; Zak, K.M.; Guzik, K.; Magiera, K.; Musielak, B.; Pachota, M.; Szelazek, B.; Kocik, J.; Grudnik, P.; Tomala, M.; Krzanik, S.; Pyrc, K.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T.A. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget.* 2017, 8, 72167-72181.

[18] Miller, M. M.; Mapelli, C.; Allen, M. P.; Bowshe, M. S.; Boy, K. M.; Gillis, E. P.; Langley, D. R.; Mull, E.; Poirier, M. A.; Sanghvi, N.; Sun, L. Q.; Tenney, D. J.; Yeung, K. S.; Zhu, J.; Reid, P. C.; Scola, P. M.; Cornelius, L. A. (Bristol-Myers Squibb Company) US20140294898 A1, October 2014.

[19] Magiera-Mularz, K.; Skalniak, L.; Zak, K. M.; Musielak, B.; Rudzinska-Szostak, E.; Berlicki, Ł.; Kocik, J.; Grudnik, P.; Sala, D.; Zarganes-Tzitzikas, T.; Shaabani, S.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A. Bioactive Macrocyclic Inhibitors of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017, 56, 13732-13735.

[20] Weinmann, H.; Cancer Immunotherapy: Selected Targets and Small-Molecule Modulators. *ChemMedChem* 2016, 11, 450–466.

[21] Zarganes-Tzitzikas, T.; Konstantinidou, M.; Gao, Y.; Holak, T. A.; Krzemien, D.; Zak, K.; Dubin, G.; Dömling, A. Inhibitors of Programmed Cell Death 1 (PD-1): A Patent Review (2010–2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* 2016, 26, 973–977.

[22] Zhan, M.M.; Hu, X. Q.; Liu, X. X.; Ruan, B. F.; Xu, J.; Liao, C. From Monoclonal Antibodies to Small Molecules: The Development of Inhibitors Targeting the PD-1/PD-

L1 Pathway. Drug Discovery Today 2016, 21, 1027–1036.

[23] Park, S.; Mann, J.; Li, N. Targeted Inhibitor Design: Lessons from Small Molecule Drug Design, Directed Evolution, and Vaccine Research. Chem. Eng. Process. Tech. 2013, 1: 1004.

[24] Yamaotsu, N.; Hirono, S. *In silico* fragment-mapping method: a new tool for fragment-based/structure-based drug discovery. J. Comput. Aided Mol. Des. 2018, 32(11), 1229-1245.

[25] Kozakov D.; Grove LE.; Hall DR.; Bohnuud T.; Mottarella SE.; Luo LQ.; Xia B.; Beglov D.; Vajda S. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. Nat. Protoc. 2015, 10, 5, 733-755

[26] Brenke R.; Kozakov D.; Chuang GY.; Beglov D.; Hall D.; Landon MR.; Mattos C.; Vajda S. Fragment-based identification of druggable ‘hot spots’ of proteins using Fourier domain correlation techniques. Bioinformatics 2009, 25, 5, 621-627

[27] Sandor M.; Kiss R.; Keseru GM. Virtual fragment docking by glide: a validation study on 190 protein-fragment complexes. J. Chem. Inf. Model 2010, 50, 6, 1165-1172

[28] Kawatkar S.; Wang HM.; Czerminski R.; Joseph-McCarthy D. Virtual fragment screening: an exploration of various docking and scoring protocols for fragments using glide. J. Comput. Aided Mol. Des. 2009, 23, 8, 527-539

[29] Nikolic D.; Blinov N.; Wishart D.; Kovalenko A. 3D-RISM- Docc: a new fragment-based drug design protocol. J. Chem. Theory Comput. 2012, 8, 9, 3356-3372

[30] Imai T.; Oda K.; Kovalenko A.; Hirata F.; Kidera A. Ligand mapping on protein

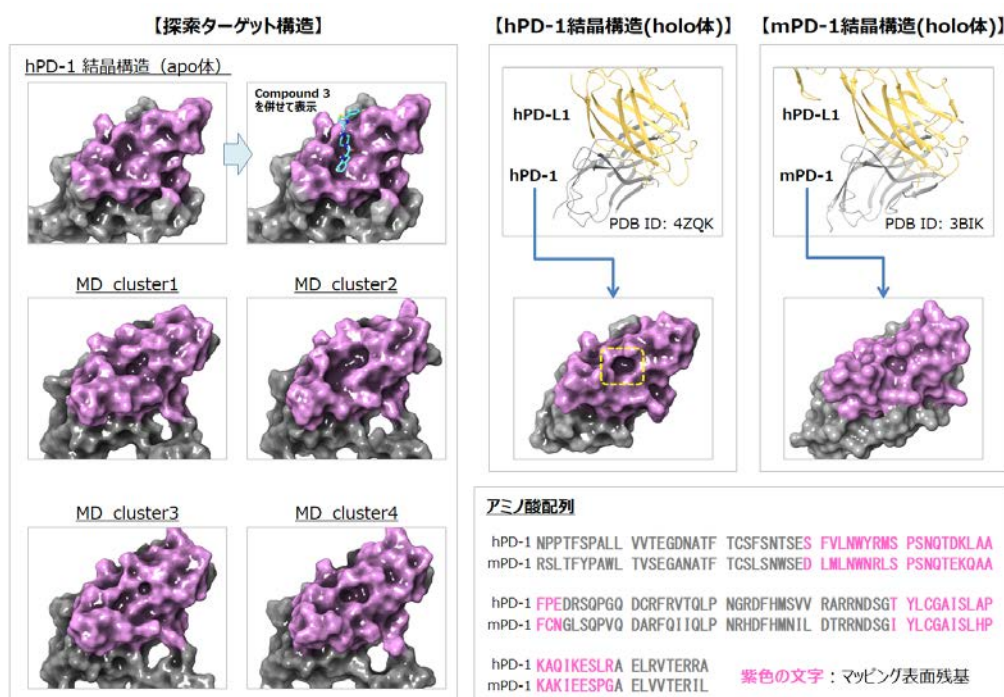
surfaces by the 3D-RISM theory: toward computational fragment-based drug design. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 34, 12430-12440

[31] Iwase, K.; Hirono, S. Estimation of active conformations of drugs by a new molecular superposing procedure. J. Comput. Aided Mol. Des. 1999, 13, 499-512.

付録

探索ターゲット構造と hPD-1 結晶構造 (holo 体) および mPD-1 結晶構造 (holo 体) のマッピング表面の比較

本文において探索ターゲット構造のマッピング表面を示したが、hPD-1 結晶構造 (holo 体) および mPD-1 結晶構造 (holo 体) についても特定したマッピング表面残基を基にマッピング表面を描画し、比較を行った (付録図 1)。その結果、hPD-1 結晶構造 (holo 体) において点線の四角枠で囲っている部分が hPD-L1 の凸面部分が結合している箇所であり (図 3-1 参照)、いずれのマッピング表面においても共通しているサブポケットであった。本研究で見出した compound 3 についても同ポケットを埋めるドッキングモデルが得られており、阻害剤探索におけるファーマコフォアポイントである可能性が示唆される。



付録図 1. 探索ターゲット構造と hPD-1 結晶構造 (holo 体) および mPD-1 結晶構造 (holo 体) のマッピング表面の比較

學術誌掲載論文

SDRP Journal of Computational Chemistry & Molecular Modelling (ISSN: 2473-6260)

Virtual screening for small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 protein-protein interaction using *in silico* fragment mapping method

DOI: 10.25177/JCCMM.3.1.1

Research

Received Date: 21st Nov 2018Accepted Date: 04th Dec 2018Published Date: 07th Dec 2018

Copy rights: © This is an Open access article distributed under the terms of International License.

**Yusuke Sako^{*}, Noriyuki Yamaotsu, Shuichi Hirono^{*}**

School of Pharmacy, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

CORRESPONDENCE AUTHOR

Yusuke Sako

E-mail address: dl15101@st2.pharm.kitasato-u.ac.jp

Shuichi Hirono

E-mail address: hironos@pharm.kitasato-u.ac.jp

CITATION

Yusuke Sako, Virtual screening for small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 protein-protein interaction using *in silico* fragment mapping method(2018)SDRP Journal of Computational Chemistry & Molecular Modelling 2(4)

ABSTRACT

Inhibition of the immunity checkpoint pathway of PD-1/PD-L1 by monoclonal antibodies is effective in the clinical treatment of certain cancers and several anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies have been approved for therapeutic use. Against this background, attention has now focused on the search for small molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 protein-protein interaction (PPI). In this study, we have performed a virtual screening for such small molecule inhibitors using PD-1 as a target. First, a 3D feature query for the screening was constructed making the most of the *in silico* fragment mapping method, and then the 3D feature query-based virtual screening of a commercial compound database was carried out. The compounds selected from the screening were then subjected to an *in vitro* assay (ELISA) to test for PPI inhibitory ability against PD-1/PD-L1. As a result of the assay, one molecule was identified to be a potential seed compound for small molecule PD-1/PD-L1 inhibitors.

Key words: Fragment-based drug discovery, *in silico*

fragment mapping, PD-1/PD-L1 inhibitor, virtual screening

1. INTRODUCTION

Recently our group developed a novel *in silico* fragment mapping method [1]. Initially, a database was created, known as Canonical Subsite Fragment DataBase (CSFDB), comprising pairs of subsite-fragments derived from X-ray crystal structures of known protein-ligand complexes. In addition, a fragment-mapping program, Fsubsite, was developed to map chemical groups (fragments) onto a protein surface. When we have a 3D structure of a target protein, Fsubsite searches for similar subsites on that surface from CSFDB. If a similar subsite is found, fragments combined with the subsite in CSFDB are placed onto the target protein surface. Thus, this method acts as a knowledge-based fragment mapping tool. In a previous study that validated that the procedure was able to identify appropriate fragments mapped onto the target protein [1]. These findings suggested that the method could be utilized for the

construction of 3D feature queries for virtual screening. Here, we applied this method to identify small molecules that inhibit PD-1/PD-L1 protein-protein interaction.

PD-1 (programmed death-1) is expressed on the surface of activated T cells and is associated with apoptosis [2]. PD-L1, a ligand of PD-1, is naturally expressed on the surface of antigen presenting cells. PD-1 and PD-L1 are immune checkpoint proteins that act as suppressors to suppress T cell responses. The immune checkpoint pathway is normally suppressed by interaction between PD-1 and PD-L1, which maintains self-tolerance and limits collateral tissue damage [3]. However, cancer cells also express PD-L1 and utilize its immunosuppression function to avoid being killed by T cells [4-5]. When T cells are repeatedly exposed to tumor antigens expressing PD-L1, they lose their ability to attack cancer cells [6-7]. The scenario outlined here is considered to be a mechanism related to cancer immune evasion [8-9].

In recent years, anticancer treatment based around the inhibition of the immunity checkpoint pathway by targeting PD-1/PD-L1 interaction has been the focus of intense research. Indeed immunotherapy with monoclonal antibodies based on the inhibition mechanism can bring about the effect of anti-tumor (i.e. suppression and attenuation of cancer cell proliferation/infiltration) and long-term remission in patients with various cancer types [10-14]. To date, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) has approved two anti-PD-1 antibodies, nivolumab (Opdivo, Bristol-Myers Squibb) and pembrolizumab (Keytruda, Merck), together with three anti-PD-L1 antibodies, atezolizumab (Tecentriq, Genentech/Roche), durvalumab (Imfinzi, AstraZeneca) and avelumab (Bavencio, EMD Serono, Inc.).

By contrast, development of small molecule inhibitors of the PD-1/PD-L1 pathway is at a relatively early stage by comparison to antibody drugs. Indeed, there are only a few reports of such small molecule inhibitors [15-17]. For example, small compounds have been reported that stabilize dimer formation of PD-L1 and exhibit PD-1/PD-L1 inhibitory activity [18-21]. In addition, cyclic peptides have also been reported that bind to the PPI interface on PD-L1 to

directly inhibit PPI of PD-1/PD-L1 interaction [22-23]. The advantages of small molecules over antibody drugs are that production costs are kept low, oral administration is possible, and immunogenicity problems can be eliminated. For these reasons, development of small molecule PPI inhibitors of PD-1/PD-L1 has attracted a great deal of attention.

In this study we aimed to identify small molecule PPI inhibitors of PD-1/PD-L1 using an *in silico* screening approach. The PPI interface is a wide shallow surface similar to the PD-1/PD-L1. Although PD-1/PD-L1 PPI is generally acknowledged to be a highly difficult drug discovery target for small molecule inhibitors, we made a pharmacophore hypothesis using an *in silico* fragment mapping method with PD-1 as the target. We then performed 3D feature query-based virtual screening for small molecule PPI inhibitors of PD-1/PD-L1.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *In silico* fragment mapping method

To make a pharmacophore hypothesis for exploring PPI inhibitors of PD-1/PD-L1, we performed Fsubsite using CSFDB. The outlines of CSFDB and Fsubsite are described below.

2.1.1. CSFDB

It is considered that subsites on proteins to which similar atomic groups bind have similarities between them. Based on this idea, the ligands in the known protein-ligand X-ray crystal structure database were divided into fragments and amino acid residues were also extracted in the vicinity of those fragments as subsites (Figure 1). Specifically, 3D structures of protein-ligand complexes in PDBbind v.2013 core set were used to create a subsite-fragment database. The database was composed of 195 protein-ligand complexes in 65 protein clusters. Ligands in the database were divided into fragments using Fragmenter of JChem 6.3.0 (ChemAxon Ltd., Budapest, Hungary, 2014). A set of residues within 4 Å of each fragment were defined as the subsite using SYBYL-X 2.1.1 (Certara, L. P., Princeton, NJ, USA, 2013). Finally

similar subsites of the subsite-fragment set were grouped into one representative subsite and 482 subsite-fragment pairs were obtained as CSFDB.

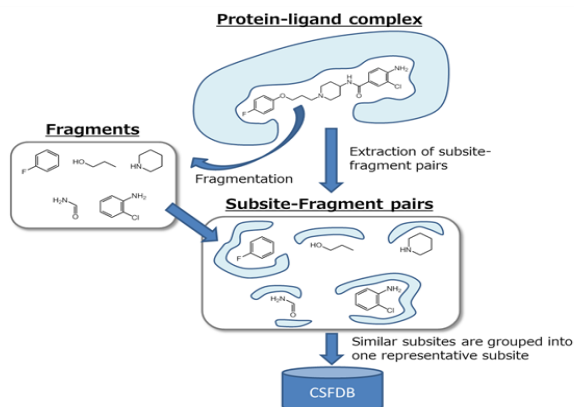


Figure 1: Conceptual diagram illustrating CSFDB.

2.1.2. Fsubsite

The Fsubsite program superposes each subsite of CSFDB onto the mapping surface of a target protein using SUPERPOSE algorithm [24]. The Fsubsite represents functional groups of amino acids as property spheres of five types based on their physicochemical properties as follows: hydrophobicity, aromatic ring structure, hydrogen-bond donor, hydrogen-bond acceptor and hydrogen-bond donor/acceptor. Using the above rules, the surface of the target protein is searched in the CSFDB database. Once a similar subsite is found, a fragment bound to the subsite in CSFDB is mapped onto the target protein. This knowledge based *in silico* fragment mapping method and the schematic procedure for fragment mapping by Fsubsite is shown in Figure 2.

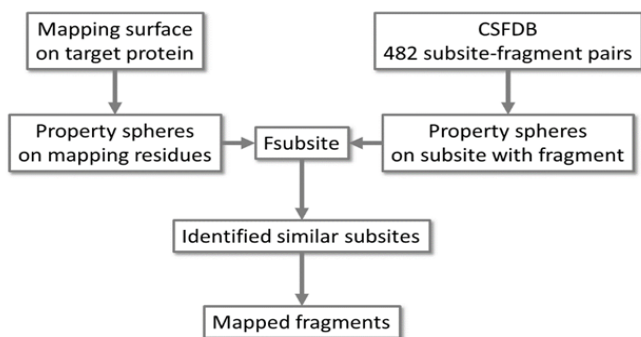


Figure 2: Schematic of the procedure for *in silico* fragment mapping.

2.2. 3D feature query construction and 3D feature query-based virtual screening

The workflow of this study is shown in Figure 3. Initially, we set the mapping surface for Fsubsite using human apo PD-1 (PDB ID: 3RRQ). *In silico* fragment mapping using Fsubsite was then performed on the set mapping surface. In addition we prioritized the mapped fragments and constructed a 3D feature query based on the selected representative fragments. Using the query obtained in this way, candidate compounds were selected by performing 3D feature query-based virtual screening of commercially available compound database. Finally, these compounds were purchased and an *in vitro* assay was performed to check their ability to inhibit PPI between human PD-1/human PD-L1.

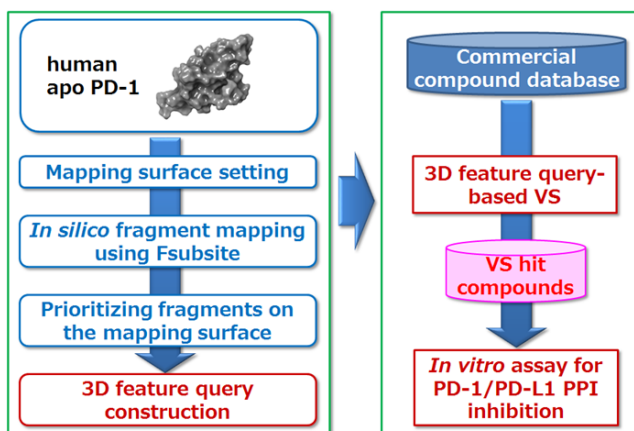


Figure 3: Workflow of 3D feature query construction and 3D feature query-based virtual screening.

3. RESULTS

3.1. *In silico* fragment mapping method

3.1.1. Mapping surface setting

Using human apo PD-1 (PDB ID: 3RRQ) as an analysis target, the mapping surface was set according to the following procedure. When this study was initiated, the complex structure of human PD-1/human PD-L1 (PDB ID: 4ZQK) had not been solved. Alternatively, two complex structures of mouse PD-1/human PD-L1 (PDB ID: 3BIK, 3SBW) had been solved. Hence, using the mouse PD-1/human PD-L1 (PDB ID: 3BIK, 3SBW), amino acid residues of mouse PD-1 within 6 Å from each human PD-L1 were extracted (i.e. amino acid residues close to the PPI interface of mouse PD-1). Then we compared amino acid se-

quences of mouse and human PD-1. Based on the above information we set the mapping surface on 3RRQ. The resulting mapping surface is shown in Figure 4 highlighted in magenta.

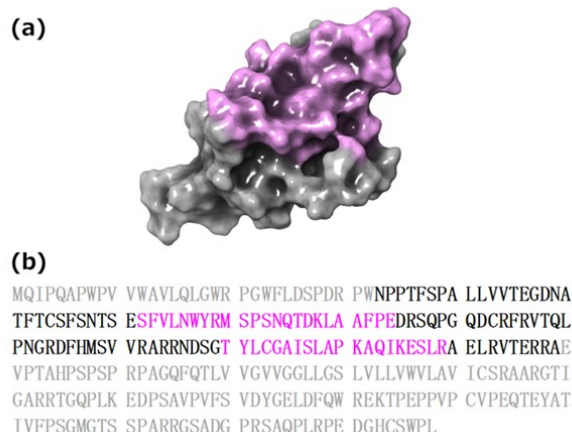


Figure 4: (a) Molecular surface of hPD-1 with the mapping region highlighted in magenta. (b) Full length sequence of hPD-1 (Uniprot Q15116). Residues highlighted in magenta correspond to amino acids making up the mapping surface. Residues shown in grey correspond to amino acids that cannot be assigned in the crystal structure.

3.1.2. Fragment mapping results using Fsubsite and prioritizing fragments on the mapping surface

Using the mapping surface, a similar subsite was searched from CSFDB. Where a similar subsite was found, a fragment bound to the subsite in that database was then mapped onto the mapping surface. Using this procedure, 353 fragments were mapped onto the mapping surface as shown in Figure 5 (a). Next, for each fragment, a complex model with hPD-1 was constructed and then minimization was performed using macromodel (Schrodinger 2015-2). At this stage, position restraints were applied to the protein heavy atoms with 100 kcal/mol. The rmsd of heavy atoms in each fragment before and after minimization were also measured. Those with a value of more than 3 Å were eliminated from the screen (i.e. fragments that did not fit their subsites). Furthermore, for each hPD-1/fragment complex model that satisfied the above threshold, the binding free energy was calculated using prime mmgbsa (Schrodinger 2015-2, job_type=ENERGY). Finally the top 20 fragments of MM/GBSA values were extracted as representative fragments (Figure 5 (b)).

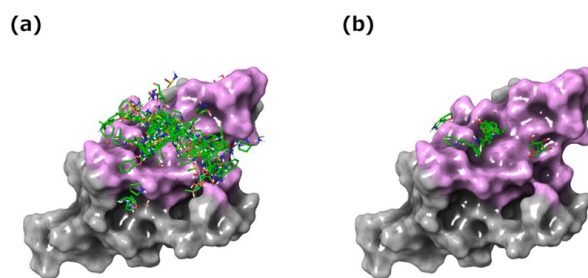


Figure 5: *In silico* fragment mapping results. (a) 353 fragments mapped on the mapping surface. (b) Twenty selected representative fragments mapped on the mapping surface.

3.2. 3D feature query construction and 3D feature query-based virtual screening

3.2.1. 3D feature query construction

Based on the representative fragments, a 3D feature query was constructed according to the following procedure (using MOE 2012 Pharmacophore Editor). Procedure 1: Representative fragments were classified into five sites based upon visual inspection of their arrangement on the mapping surface (Figure. 6 (a)). Procedure 2: At each site, a hydrophobic feature was positioned such that all of the hydrophobic groups of the fragments would fit. Procedure 3: The polar feature corresponding to the polar functional group of each fragment was positioned. In this case, the same kind of features gathered by a sphere of radius ≤ 2.5 Å were combined into one. Procedure 4: An excluded volume feature was placed on heavy atoms of amino acid residues belonging to the mapping surface. As a result, the 3D feature query shown in Figure 6 (b) was constructed.

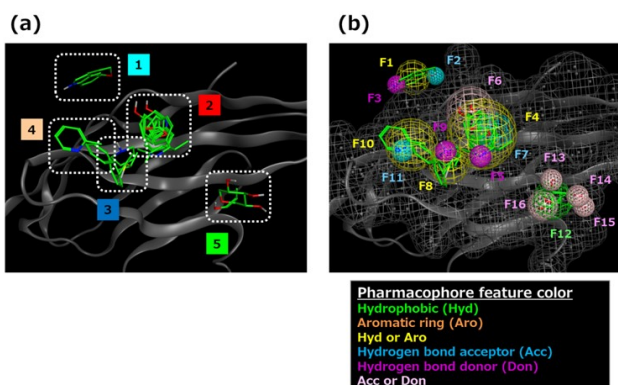


Figure 6: 3D feature query construction results. (a) Clustered representative fragments. (b) 3D feature query. Green indicates hydrophobic feature (Hyd);

yellow indicates Hyd or aromatic ring feature (Aro); cyan indicates hydrogen bond acceptor feature (Acc); purple indicates hydrogen bond donor feature (Don); pink indicates Acc or Don. Each feature is numbered respectively. Gray colored mesh shows the excluded volume feature.

3.2.2. Protocol for 3D feature query-based virtual screening

Table 1 shows the protocol for virtual screening using the constructed 3D feature query. This was a prerequisite to satisfy the hydrophobic feature and at least one polar feature of site 2 located at the center of five sites. An additional prerequisite was that the hydrophobic feature of one of the remaining four sites had to be satisfied. Compounds with a total score of 3 or more were considered to meet the requirements of a hit in the 3D feature query-based virtual screening.

Table 1: Protocol for 3D feature query-based virtual screening.

Site	Query_No.	Feature	Score
1	F1	Hyd Aro	1
	F2	Acc	-
	F3	Don	-
2	F4	Hyd Aro	1 ^a
	F5	Don	1 ^b
	F6	Don Acc	
	F7	Acc	
3	F8	Hyd Aro	1
	F9	Don	-
4	F10	Hyd Aro	1
	F11	Acc	-
5	F12	Hyd	1
	F13	Don Acc	-
	F14	Don Acc	-
	F15	Don Acc	-
	F16	Don Acc	-

Total score of 3 or more needed for virtual screening of hits

^a Essential feature. ^b At least one of three features is essential.

3.2.3. 3D feature query-based virtual screening

In order to explore the inhibition of PPI between hPD-1/hPD-L1 mediated by small compounds, a 3D feature query-based virtual screening procedure was carried out according to the protocol shown in Figure 7. Firstly, up to 200 conformations per compound were generated using Omega (version 2.4.6 OpenEye) for commercial compounds (Namiki, about 5 million compounds). Next, a pharmacophore search (MOE 2012) was performed using the 3D feature query for the obtained conformations and about 2 million compounds satisfying the requirements of the protocol described above were extracted. Docking simulation was performed for the extracted compounds using GOLD (version 5.2 CCDC) with the amino acid residues on the mapping surface of hPD-1 as the search

region. From the docking output, 2,397 compounds satisfying the requirements of the aforementioned protocol and Chemscore (value of ≥ 15) were extracted. A complex model of these compounds and hPD-1 was then constructed. After minimization using macromodel (Schrodinger 2015-2) to optimize each complex model, binding free energy (MM/GBSA) was calculated using prime_mmgbsa (Schrodinger 2015-2, job_type=ENERGY). For 95 compounds with the highest binding affinity values, structural clustering using Cluster Molecules module (Pipeline Pilot 9.1, FCFP_6) was performed. Availability of the compound was also verified. Finally, eight candidate compounds shown in Figure 8 were selected.

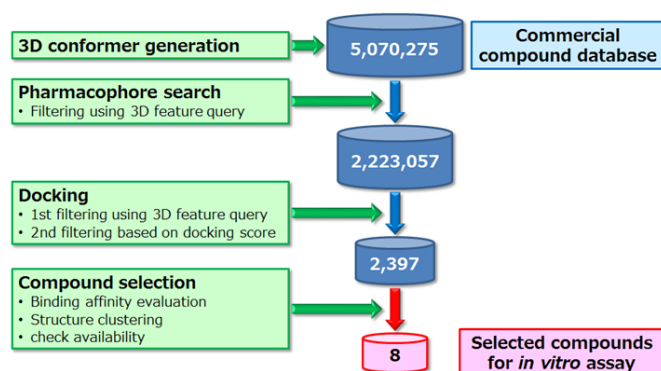


Figure 7: Overview of 3D feature query-based virtual screening.

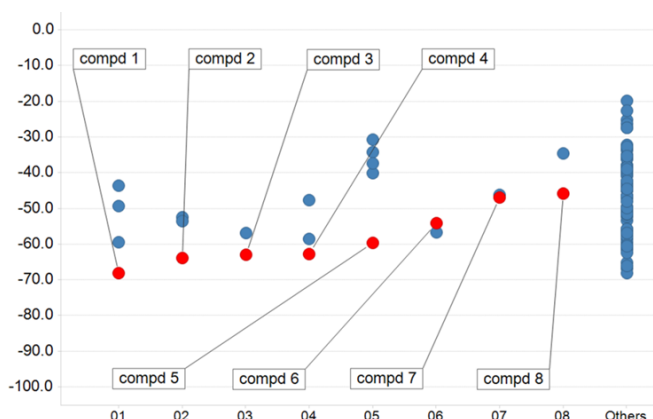


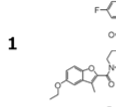
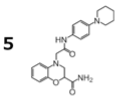
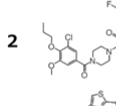
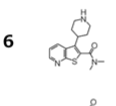
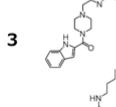
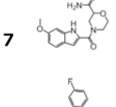
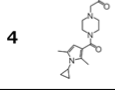
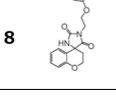
Figure 8: 3D feature query-based virtual screening results. Vertical axis indicates MM/GBSA value (kcal/mol). Horizontal axis indicates molecular clusters. Red plots correspond to selected compounds used in the *in vitro* assay.

3.3. Assay results of *in vitro* hPD-1/hPD-L1 PPI inhibition

Selected compounds were subjected to an *in vitro* assay (ELISA) in order to evaluate their ability to inhibit hPD-1/hPD-L1 PPI. This assay was carried out at BPS Bioscience. (Catalog #72005, hPD-1 [Biotinylated]:hPD-L1 Inhibitor Screening Assay Kit). Each compound was made up at a concentration of 100 μ M and biotinylated hPD-1 was mixed with hPD-L1 immobilized on a plate. The plate was then incubated for 2 hours at room temperature. After washing the plate, streptavidin-HRP (horseradish peroxidase), which is a luminescent label, was added and the degree of luminescence measured. The above test was performed twice on eight compounds. These

experiments confirmed that compound 3 inhibits PPI of hPD-1/hPD-L1 at an inhibition rate of 21% (Table 2). The following analysis was carried out to confirm whether the inhibitory activity is influenced by PAINS or compound aggregation. We applied the PAINS filter of Schrodinger 2018-1 CANVAS to our hit compound, it passed through the filter. Then, we performed Schrodinger 2018-1 QikProp to our hit compound and as the result its predicted aqueous solubility (QPlogS) is -5.54 within recommended range (from -6.5 to 0.5). For the reasons mentioned above, we think that the risk of false positive is low.

Table 2: *In vitro* assay results of hPD-1/hPD-L1 PPI inhibition.

Compound	%inhibition ^a	Compound	%inhibition ^a
	0		3
	0		0
	21		2
	0		4

^a Values represent the mean of two experiments.

3.4. Complex model of hPD-1/compound 3 and the interaction mode

A complex model of hPD-1 and compound 3, which displayed inhibitory activity, is shown in Figure 9. The cationic nitrogen atom of piperazine ring of compound 3 forms an ionic interaction with the E136 side chain of hPD-1. There is also a hydrogen bond between the carbonyl group of the amide bond of compound 3 and the Y68 side chain of hPD-1. In terms of nonpolar interactions, there is π - π interaction between the indole ring of compound 3 and the Y68 side chain of hPD-1. In addition, the piperazine ring is surrounded by hydrophobic amino acid residues, such as M70, L122 and I134, which are involved in van der Waals interactions.

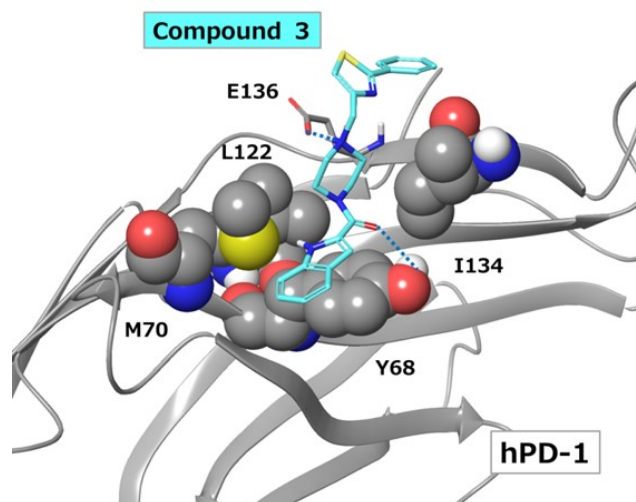


Figure 9: Docking model of compound 3 bound to hPD-1. Blue dashed lines indicate ionic interactions or hydrogen bonds.

4. DISCUSSION

Because the X-ray crystal structure of human PD-1/human PD-L1 (PDB ID: 4ZQK) is now also solved, we are able to examine the protein-protein interaction site. The crystal structure of hPD-1/hPD-L1 was overlapped with the hPD-1/compound 3 complex model. Specifically, the function of Schrodinger 2015-2 structure alignment was used and superposition of each hPD-1 protein backbone was performed. Based on the overlaid structures the interaction mode between compound 3 and hPD-L1 toward hPD-1 was compared as shown in Figure 10. As noted above, the nitrogen atom of the piperazine ring of compound 3 forms an ionic interaction with E136 of hPD-1. Likewise, R113 of hPD-L1 also forms an ionic interaction with E136 of hPD-1. In addition, Compound 3 overlaps with Y123 of hPD-L1. It is considered that Compound 3 fills the subsite where Y123 belongs in the complex of hPD-1/hPD-L1. Nonetheless, hydrogen bond interaction and π - π interaction with the hPD-1 Y68 side chain in the complex model of hPD-1/compound 3 were not observed in the hPD-1/hPD-L1 crystal structure. We also compared the results of the

3D feature query and *in silico* fragment mapping with the hPD-1/compound 3 complex model. As shown in Figure 11 (a), compound 3 satisfied the hydrogen bond donor/acceptor feature (F6), the hydrogen bond acceptor feature (F7) and two hydrophobic features (F4, F8). Thus, compound 3 appears to mimic the interaction between hPD-1 E136 and hPD-L1 R113. This interaction may contribute to the expression of inhibitory activity displayed by compound 3. Hence, the method adopted in this study is effective for detecting key pharmacophores. Furthermore, from the comparison *in silico* fragment mapping result with the hPD-1/compound 3 complex model, two sites (site 1 and 4) were identified where fragments mapped near compound 3 (Figure 11 (b)). By optimizing the interaction based on the results for compound 3 so as to satisfy these site features, it may be possible to identify compounds with greater inhibitory activity. Thus, although compound 3 has relatively low hPD-1/hPD-L1 inhibition activity, we believe that the approach used in this study can be further optimized to develop small molecules that are effective in PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade.

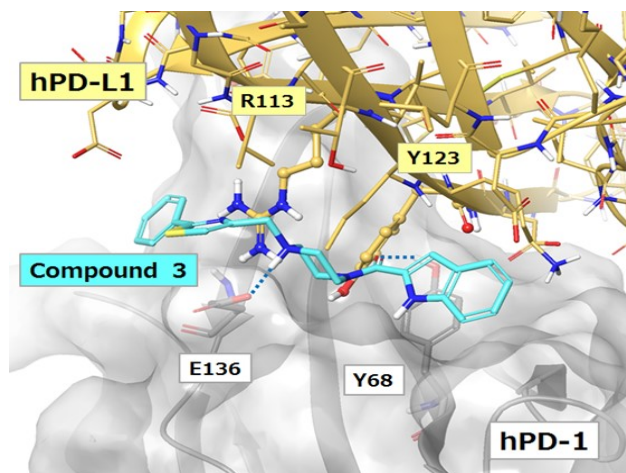


Figure 10: hPD-L1 overlaid on the hPD-1/compound 3 docking model. Blue dashed lines indicate ionic interactions or hydrogen bonds.

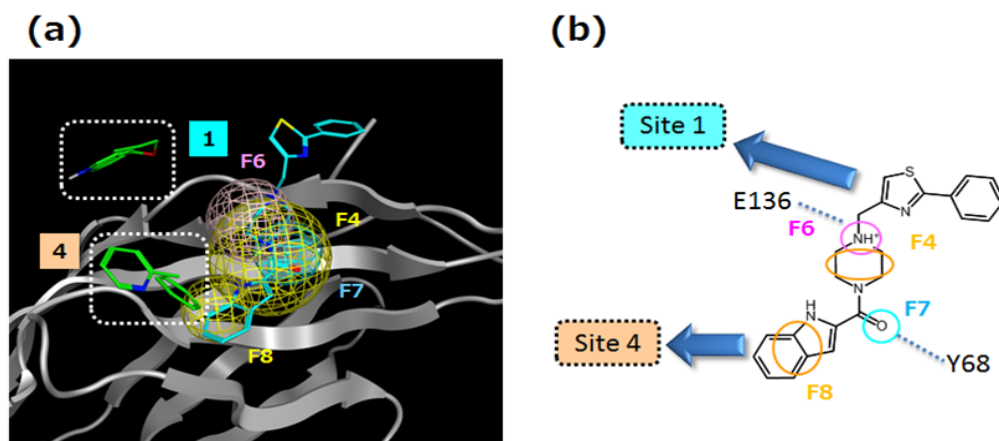


Figure 11: (a) Comparison between hPD-1/compound 3 docking model and the 3D feature query and *in silico* fragment mapping result. (b) Schematic picture of (a).

5. CONCLUSION

To explore PPI inhibitors of hPD-1/hPD-L1, we constructed a 3D feature query using an *in silico* fragment mapping method targeting the hPD-1 apo structure followed by 3D feature query-based virtual screening. As a result, a small compound that inhibits PPI of hPD-1/hPD-L1 was identified. Our findings show that the *in silico* fragment mapping method is an effective means of identifying such inhibitors. Furthermore, by using this method, it is possible to create a 3D feature query that can elucidate likely pharmacophores on the target structure. We anticipate that this novel methodology will be utilized to identify hit compounds and for lead optimization.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Japan Society for the Promotion of Science KAKENHI (Grant No. 15K07899).

REFERENCES

- [1] Yamaotsu, N.; Hirono, S. *In silico* fragment-mapping method: a new tool for fragment-based/structure-based drug discovery. *J Comput Aided Mol Des*, **32**(11), 1229-1245 (2018). [View Article](#)
- [2] Ishida, Y.; Agata, Y.; Shibahara, K.; Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. **1992**, *11*, 3887-3895. [View Article](#)
- [3] Riella, L.V.; Paterson, A. M.; Sharpe, A. H.; Chandraker, A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant*. **2012**, *12*, 2575-2587. [View Article](#)
- [4] Ostrand-Rosenberg, S.; Horn L. A.; Haile, S. T. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol*. **2014**, *193*, 3835-3841. [View Article](#)
- [5] Wang, X.; Teng, F.; Kong, L.; Yu, J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. **2016**, *12*, 5023-5039. [View Article](#)
- [6] Barber, D. L.; Wherry, E. J.; Masopust, D.; Zhu, B.; Allison, J. P.; Sharpe, A. H.; Freeman, G.J. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **2006**, *439*, 682-687. [View Article](#)
- [7] Catakovic, K.; Klieser, E.; Neureiter, D.; Geisberger, R. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell Commun Signal*. **2017**, *15*, 1-16. [View Article](#)
- [8] Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. **2007**, *121*, 1-14. [View Article](#)
- [9] Vinay, D. S.; Ryan, E. P.; Pawelec, G.; Talib, W. H.; Stagg, J.; Elkord, E.; Lichter, T.; Decker, W. K.; Whelan, R. L.; Kumara, H. M. C. S.; Signori, E.; Honoki, K.; Georgakilas, A. G.; Amin, A.; Helferich, W. G.; Boosani, C. S.; Guha, G.; Cirio, M. R.; Chen, S.; Mohammed, S. I.; Azmi, A. S.; Keith, W. N.; Bilsland, A.; Bhakta, D.; Halicka, D.; Fujii, H.; Aquilano, K.; Ashraf, S. S.; Nowshen, S.; Yang X.; Choi B. K.; Kwon, B. S. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. **2015**, *35*, S185-S198. [View Article](#)
- [10] Dömling, A.; Holak, T. A. Programmed death-1: therapeutic success after more than 100 years of

- cancer immunotherapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2014**, *53*, 2286-2288. [View Article](#)
- [11] Topalian, S. L.; Drake, C. G.; Pardoll, D. M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 450-461. [View Article](#)
- [12] Shin, D. S.; Ribas, A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr Opin Immunol.* **2015**, *33*, 23-35. [View Article](#)
- [13] Sharma, P.; Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **2015**, *348*, 56-61. [View Article](#)
- [14] Hoos, A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov.* **2016**, *15*, 235-47. [View Article](#)
- [15] Weinmann, H.; Cancer Immunotherapy: Selected Targets and Small-Molecule Modulators. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 450-466. [View Article](#)
- [16] Zarganes-Tzitzikas, T.; Konstantinidou, M.; Gao, Y.; Holak, T. A.; Krzemien, D.; Zak, K.; Dubin, G.; Dömling, A. Inhibitors of Programmed Cell Death 1 (PD-1): A Patent Review (2010-2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 973-977. [View Article](#)
- [17] Zhan, M.M.; Hu, X. Q.; Liu, X. X.; Ruan, B. F.; Xu, J.; Liao, C. From Monoclonal Antibodies to Small Molecules: The Development of Inhibitors Targeting the PD-1/PD-L1 Pathway. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 1027-1036. [View Article](#)
- [18] Chupak, L. S.; Zheng, X. Compounds Useful as Immunomodulators. WO2015034820, March 2015.
- [19] Chupak, L. S.; Ding, M.; Martin, S. W.; Zheng, X.; Hewawasam, P.; Connolly, T. P.; Xu, N.; Yeung, K.-S.; Zhu, J.; Langley, D. R.; Tenney, D. J.; Scola, P. M.; Mingo, P. A. Compounds Useful as Immunomodulators. WO2015160641, October 2015.
- [20] Guzik, K.; Zak, K. M.; Grudnik, P.; Magiera, K.; Musielak, B.; Törner, R.; Skalniak, L.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A. Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5857-5867. [View Article](#)
- [21] Skalniak, L.; Zak, K.M.; Guzik, K.; Magiera, K.; Musielak, B.; Pachota, M.; Szelazek, B.; Kocik, J.; Grudnik, P.; Tomala, M.; Krzanik, S.; Pyrc, K.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T.A. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget.* **2017**, *8*, 72167-72181. [View Article](#)
- [22] Miller, M. M.; Mapelli, C.; Allen, M. P.; Bowshe, M. S.; Boy, K. M.; Gillis, E. P.; Langley, D. R.; Mull, E.; Poirier, M. A.; Sanghvi, N.; Sun, L. Q.; Tenney, D. J.; Yeung, K. S.; Zhu, J.; Reid, P. C.; Scola, P. M.; Cornelius, L. A. (Bristol-Myers Squibb Company) US20140294898 A1, October 2014.
- [23] Magiera-Mularz, K.; Skalniak, L.; Zak, K. M.; Musielak, B.; Rudzinska-Szostak, E.; Berlicki, Ł.; Kocik, J.; Grudnik, P.; Sala, D.; Zarganes-Tzitzikas, T.; Shaabani, S.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A. Bioactive Macrocyclic Inhibitors of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2017**, *56*, 13732-13735. [View Article](#)
- [24] Iwase, K.; Hirono, S. Estimation of active conformations of drugs by a new molecular superposing procedure. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1999**, *13*, 499-512. [View Article](#)