

研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2006～2008
課題番号：18209005
研究課題名（和文） プロテアーゼの分子認識に基づく難病治療薬のデザインと
医薬化学研究
研究課題名（英文） Design and medicinal chemistry research on drugs for difficult
diseases based on molecular recognition of proteases
研究代表者
木曾 良明（KISO YOSHIAKI）
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40089107

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・創薬化学
キーワード：プロテアーゼ、分子認識、プロテアーゼ阻害剤、ドラッグデザイン

1. 研究計画の概要

我々は基質遷移状態概念に基づいて、アスパラギン酸プロテアーゼに属するHIVプロテアーゼ阻害剤のデザインと合成を行い、ヒドロキシメチルカルボニル(HMC)イソステアが、理想的な遷移状態ミミックであることを見いだした。さらに、低分子化にも成功した。このKNI化合物は「Nature Reviews: Drug Discovery」に取り上げられるなど大きな反響を呼び、これらの低分子HIVプロテアーゼ阻害剤は、次世代抗HIV薬として期待されている。

そこでHMCイソステアを含むジペプチド型HIVプロテアーゼ阻害剤をデザインすることにより、組織移行性の高い低用量抗HIV薬の開発をめざす。さらに、ジペプチド型低分子HIVプロテアーゼ阻害剤は、既存薬耐性ウイルスに効力を示しており、変異のパターンも異なっていることから耐性と副作用の問題点克服の可能性があり、変異酵素と阻害剤の分子認識解析に基づいてデザインすることは重要である。

このようなアスパラギン酸プロテアーゼにおける有用な阻害剤設計の方法論を、マラリア発症に重要な役割を果たすplasmepsin類、アルツハイマー病に関与しているアミロイドβペプチドを生成するβセクレターゼ(BACE1)、成人T細胞白血病発症に重要なHTLV-1プロテアーゼに応用して、マラリア、アルツハイマー病、白血病のような難病克服を目指した分子認識に基づく治療薬のデザイン・合成と構造最適化・プロドラッグ等の医薬化学研究を行いその開発への指針を示す。

2. 研究の進捗状況

(1) プロテアーゼと阻害剤との相互作用解析に基づいて理想的な遷移状態ミミックであるHMCイソステアを含む組織移行性の高い低用量抗HIV薬の開発を目指した。その結果、P2/P3に非天然型D-アミノ酸を導入したKNI-1931やKNI-1909が極めて高いHIVプロテアーゼ阻害活性を有し、かつ薬剤耐性HIVにおいても効果を示すことを見いだした。

(2) アルツハイマー病治療薬をめざしたBACE1阻害剤研究においては、P4位に、様々な水素結合受容基を有する化合物を合成し、そのうち、KMI-574が培養細胞中及びin vitroで高いBACE1阻害活性を示した。また、HMCイソステアを含む新しいアミノ酸フェニルチオノルスタチンを組み入れたペプチドKMI-538が強いBACE1阻害活性を示した。さらに、P2位にイソフタル型芳香族基を導入し、構造変換を進めて、ケリドン酸残基を有する新規小分子型BACE阻害剤の合成に成功した。

(3) SARS治療薬をめざした、コロナウイルスプロテアーゼ研究においては、C末端にトリフルオロメチルケトン基を有するペプチドが強い阻害活性を有することを示した。

(4) ATL治療薬をめざした、HTLV-1プロテアーゼ研究においては、オクタペプチドKNI-10161の小分子化を進め、ヘキサペプチドKNI-10166やテトラペプチドKNI-10635が阻害活性を有することを見出した。

(5) マラリア治療薬をめざしたPlasmepsin阻害剤研究においては、高活性阻害剤KNI-10006をリードとして構造活性相関研究を進め、Ki値がnM以下という高活性の化合物KNI-10283、KNI-10333、KNI-10538等を見いだした。これらは細胞毒性も低かった。

以上のように、難病治療薬をめざして分子

認識に基づく阻害剤研究を着実に進めている。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

本課題において目的としている種々の疾病関連アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の合成はそれぞれ順調に進展し、より高活性な阻害剤を多数見いだすことに成功し、医薬品化の為の構造最適化も進んだ。またそれらの詳細な相互作用様式は、最新の装置・新技術を用いた高度な分析法にて解明されつつある。

4. 今後の研究の推進方策

本課題は順調に進展してきているので、今までどおり構造活性相関研究を強力に推進するとともに、国内外の共同研究者と連携を深め、分子認識解析・動的構造を考慮した分子設計を行う。具体的には以下に示す様に研究を進める予定である。

- ① 変異 HIV-1 プロテアーゼに感受性の KNI-577 及び KNI-764 をリードとしてコンフォメーション規制型 HIV プロテアーゼ阻害剤をデザインし合成する。
- ② 基質遷移状態ミミックの HMC 部分の立体構造の異なる化合物の NMR 解析から、HIV プロテアーゼと阻害剤との相互作用をさらに詳細に解析する。その結果を基に新しい阻害剤をデザインする。
- ③ 変異 HIV 酵素と阻害剤の X 線結晶回折による結晶構造を基に分子認識解析を行い、相互作用を考慮して副作用の軽減をはかり薬剤耐性を克服する新規な抗エイズ薬の論理的分子設計を行う。
- ④ プラスメプシン活性中心の構造に基づき、阻害剤と活性部位の相互作用を考慮して、プラスメプシン I, II, IV, HAP の阻害剤のデザインと合成を進め、体内動態や阻害活性のバランスの良い化合物を探索する。
- ⑤ BACE1 阻害剤の親水性部分を疎水性官能基で置換し、膜透過性のよい阻害剤を設計する。また分子認識を基にして、ペプチドの一部を芳香族化合物で置換し、低分子化した BACE1 阻害剤を設計する。
- ⑥ BACE1 阻害剤の細胞でのアッセイを行ない、膜透過性の高い阻害剤を設計する。
- ⑦ クリックペプチドを利用した A β ペプチド凝集の評価系を構築する。
- ⑧ A β ペプチドは溶液中ではランダムコイル構造をとり、分子間で特異な β シート構造をとり凝集する。オリゴマーにはモノマーには見られないターン構造があり、 β シート構造をミミックする化合物を分子認識に基づいて設計することにより凝集阻害剤の設計が可能だと思われる。設計された凝集阻害剤はクリックペプチドを用いて評価を行なう。
- ⑨ 好中球ばかりでなく、免疫系や内分泌系など、様々な組織に作用するクリプタイドを効率的に同定するため、様々な活性ペプチドの

一次および二次構造情報から、活性を示す構造の共通性を明らかにし、それに基づき新規活性ペプチドを予測・同定することで、心筋梗塞、リウマチなどに対する新規の創薬リード化合物を提供する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 4 件)

- ① M. Adachi, T. Kimura (16 番目), Y. Kiso (18 番目) 他 16 名: Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 4641-4646 (2009). 査読有
- ② Y. Hamada, Y. Kiso: Recent progress in the drug discovery of non-peptidic BACE1 inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 4, 391-416 (2009). 査読有
- ③ S. Nakatani, T. Kimura (11 番目), Y. Kiso (13 番目), 他 10 名: Combination of Non-natural D-amino acid derivatives and allophenylnorstatine-dimethylthioprolin scaffold in HIV protease inhibitors have high efficacy in mutant HIV. *J. Med. Chem.*, 51, 2992-3004 (2008). 査読有
- ④ J.-T. Nguyen, A. Yamani, Y. Kiso: Views on amyloid hypothesis and secretase inhibitors for treating Alzheimer's disease: Progress and problems. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 4295-4312 (2006) 査読有
- ⑤ Y. Sohma, Y. Kiso: "Click peptide": chemical biology-oriented synthesis of Alzheimer's disease-related amyloid β peptide (A β) analogues based on the "O-acyl isopeptide method". *ChemBioChem*, 7, 1549-1557 (2006). 査読有

[学会発表] (計 1 4 2 件)

- ① Y. Kiso: Defying difficult diseases: Synthesis of peptidomimetic protease inhibitors, prodrug forms and click peptides. *Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Applications*, 2007.10.17 (Port Douglas, Australia)

[図書] (計 4 件)

- ① Y. Kiso, A. Taniguchi, Y. Sohma: Click peptides: design and applications. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (Ed. T.P. Begley), Vol. 1, 379-383 (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: β セクレターゼ阻害活性を有する新規化合物

発明者: 木曾良明 権利者: 木曾良明

種類: 特許(通常) 番号: 特願2007-164845

[その他]

新聞掲載: 2009年3月10日

「HIV増殖の必須たんぱく質 全原子構造を解明」などの見出しで、HIVプロテアーゼと KNI-272 の複合体の構造解明研究が日本経済新聞、京都新聞などの新聞に掲載された。