

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590110
 研究課題名（和文） 膜透過性改善を目指したHTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成研究
 研究課題名（英文） Synthetic study of membrane permeable inhibitor of HTLV-I protease
 研究代表者
 木村 徹（KIMURA TOORU）
 京都薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：70204980

研究成果の概要：

アスパルチックプロテアーゼ阻害剤の設計は、基質遷移状態概念誘導体を基質の切断部位に組み込み、これを基に構造変換を行うといった手法が一般的である。我々が既に合成したHTLV-I プロテアーゼの基質部位 p19/p24 に相当するオクタペプチド(PQVL*PVMH)に HMC を導入し多少の構造変換を行った化合物 KMI-10162 は、HTLV-I プロテアーゼ阻害活性を有していた。そこでこの化合物をリードに、膜透過性を上昇させるようデザインした阻害剤を合成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	510,000	3,310,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬科学

キーワード：医薬品化学・プロテアーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

我々は HIV プロテアーゼやマラリアプロテアーゼ、アルツハイマー病関連の BACE1 等のアスパルチックプロテアーゼ阻害剤開発研究を行ってきている。本研究では HTLV-I プロテアーゼ阻害剤のデザイン及び化学合成を行うが、これには上記の研究で得たノウハウが非常に役立つ。特にデザインの点では、HIV プロテアーゼ阻害剤で試みた水溶性プロドラッグ化の手法や、ダブルドラッグの手法は、阻害剤の物性改善を目指した本研究に有益な知見を含む。また上記の研究により確立

された阻害剤の合成方法、低分子化の手法は、そのまま HTLV-I プロテアーゼ阻害剤合成にも適用できる。

一方、阻害剤開発にて評価系の確立は最も重要と考えられる。我々は既に酵素活性を有する HTLV-I プロテアーゼ誘導体の合成に成功しており、ペプチド型ではあるが阻害活性を有する化合物を見いだした。これを基に阻害剤設計のリードとすることが出来る。

2. 研究の目的

HTLV-I はヒト成人白血病(ATL)やHTLV-I 脊

髄症 (HTLV-I associated myelopathy = HAM), 熱帯性瘻性脊髄麻痺 (TSP: HAM と同一の疾患) を引き起こす病原ウイルスであり, エイズウイルス (HIV) とよく似たレトロウイルスである. HTLV-I による ATL や HAM の発症する確率は低い, 日本では九州を中心に 100 万人といわれるキャリアーが存在し HAM や ATL の危険にさらされている. HTLV-I は HIV と同じ様にウイルス固有のアスパルティックプロテアーゼ (HTLV-I protease) を有しており, ウイルスが成熟するためには必須である. エイズ治療では, プロテアーゼ阻害剤と逆転滋酵素阻害剤を併用するカクテル療法によりエイズによる死亡者は激減した. HTLV-I の引き起こす上記疾病に対してもプロテアーゼ阻害剤は治療薬として大いに期待出来る. 我々は従来から HIV プロテアーゼやアルツハイマー関連の BACE1 等のアスパルティックプロテアーゼの高活性阻害剤合成に成功している. また我々は HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の評価系を既に確立したが, その際比較的大きなサイズのペプチドではあるが, 阻害活性を有する化合物を見いだしている. しかしペプチド骨格を大きく残したままでは細胞膜透過性等の薬物動態が望ましくないと考えられ, 抗ウイルス活性も期待できない. よって阻害剤の分子サイズを縮小する必要があるが, 安易な低分子化は極端な活性低下をもたらすことが分かった.

本研究では膜透過性を考慮したデザインを行った HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成を行う. 上記目的の為, HIV プロテアーゼ阻害剤において顕著な効果のあった親水性の強い逆転滋酵素阻害剤とのダブルドラッグも合成する.

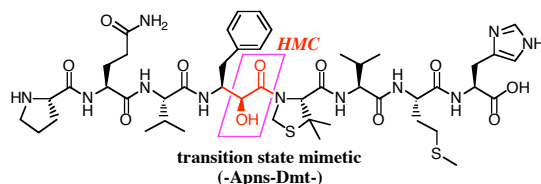
3. 研究の方法

アスパルティックプロテアーゼ阻害剤の設計は, 基質遷移状態概念誘導体を基質の切断部を組み合わせ, これを基に構造変換を行って, 強い活性及び薬物として必要な物性を有する化合物を見いだすといった手法が一箱的である. 我々は従来より遷移状態ミミックとして hydroxymethylcarbonyl (HMC) が有用であり, かつユニークな相互作用をもたらすことを示してきた. 実際に HTLV-I プロテアーゼの基質部を p19/p24 に相当するオクタペプチド (PQVL*PVMH) に HMC を導入し, 多少の構造変換を行った化合物 KMI-10162 は HTLV-I プロテアーゼ阻害活性を有していた. そこでこの化合物をリードに, 膜透過性を上昇させるようなデザインを行って阻害剤を合成した.

(1) 阻害剤の低分子化

オクタペプチド型の阻害剤 KMI-10162 では, 分子サイズが大きすぎ薬物として不適であることは明白である. よって低分子化を検討

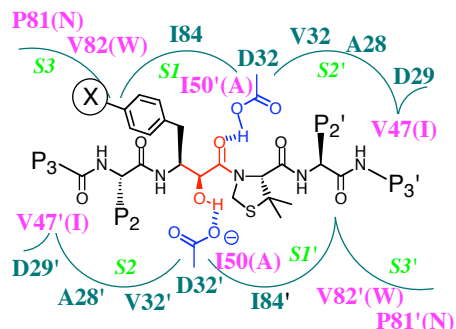
しなければならないが, 安易な低分子化は極端な活性低下をもたらすので, ヘキサペプチド相当の分子を当蔓のターゲットとする. この分子の P3, P2, P2' 及び P3' 部を構造変換して, 強い活性を有するリード化合物を見いだすことにした.



HTLV-I プロテアーゼ阻害剤 KMI-10162 の構造

(2) P3 の構造変換

上記によって得たリード化合物の P3 部位の修飾を行なって物性の改善, 特に親水性の向上を目指す. P2 部位は比較的小さめの疎水性ポケットと言われており, 親水性の官能基を導入することは活性の面で著しく不利になると考えられる. 一方 P3 部位は酵素の外部に面しており, 親水性の官能基を導入した場合でも活性の低下を最小限で押さえられる可能性がある. また S3 サブサイトは HIV の場合と比べて HTLV-I ではアミノ酸置換が見られる. その為, HIV プロテアーゼ阻害剤とは異なるデザインが要求されると考えられる.



プロテアーゼのサブサイトを構成するアミノ酸

(3) P3' の構造変換

レトロウイルスのプロテアーゼは C2 対称であるため, S3 および S3' サブサイトは基本的に同一である. よって 2) と同様の考えに基づき P3' のデザインを行う. しかし阻害剤自体は非対称であるため, 分子間相互作用に多少の違いがあるのは当然であり, 同等と思われる官能基を導入しても活性に差が現れるかもしれない. また将来的には P3' を持たない阻害剤を開発したいと考えているので, P3 の誘導化の方により力を入れるものとする.

(4) P1 の構造変換

P1 部位は疎水性のポケットに結合していると考えられるが, その先を延長すると S3

サブサイトに到達できる。そこで X で示す部分に適当な性質をもつ官能基を組み込むことで、活性の上昇と物性の改善を両立できるかもしれない。実際に HIV プロテアーゼの阻害薬ではピリジン環を導入したもの (indinavir, atazanavir) が認可されている。

(5) 阻害活性の評価

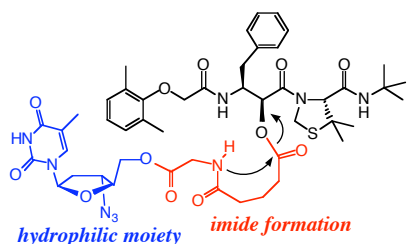
(1) から (4) で合成した化合物の評価は、すでに確立した HTLV-I プロテアーゼのアッセイにより阻害活性を測定して行う。また同時に HIV プロテアーゼに対する活性も測定し、HTLV-I と HIV の違いについても考察する。

(6) (2) から (4) の再検討

平成 17 年度の計画で行った (2) から (4) の結晶を詳細に検討し、さらに進んだ化合物のデザイン及び合成を行う。また P3, P1, P3' に導入した官能基で特に良好なものが得られた場合、それらを組み合わせ合わせた化合物の合成も行う。特に P3, P1 は競合する可能性があるため、組み合わせによって大きく活性が変化する可能性がある。

(7) プロドラッグ化の検討

HIV プロテアーゼ阻害剤では、分子が高い疎水性を持つ為、本質的な酵素阻害活性は強いにも関わらず抗ウイルス活性をほとんど示さない化合物があった。このような化合物を有効に利用するために、親水性を高めることを目的としたプロドラッグ化の手法を確立し、実際に薬物の物性改善に成功している。図は HIV プロテアーゼ阻害剤 KNI-272 の O→N 分子内アシル転位型プロドラッグを示す。このプロドラッグ化により遊離アミノ基が出現し親水性が上昇するため、塩酸塩等の形で水溶性は 1000 倍以上上昇した。また十二指腸からの吸収は、親化合物は吸収補助剤なしでは低い吸収率しか示さなかったのに対して、プロドラッグは水溶液中で十分な吸収を示した。この手法は抗ガン剤パクリタキセルにも応用し、溶解性を改善することが出来た。当研究室では他に、分子内イミド形成反応を利用した水溶性プロドラッグ化の手法や、ダブルドラッグ等の物性改善に顕著な効果のある手法を確立している。よってこれらの方



HIV プロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤を組み合わせたダブルドラッグ

法を HTLV-I プロテアーゼ阻害剤にも適用する。

4. 研究成果

(1) 阻害剤の低分子化

オクタペプチド型の阻害剤 KMI-10162 をて低分子化、構造活性相関研究の結果テトラペプチド型阻害剤でも活性を有する化合物を見いだした。この構造をリードとし構造変換を行った。

(2) P3 の構造変換

上記によって得たリード化合物の P3 部位の修飾を行なって物性の改善、特に親水性の向上を目指した。阻害活性は N-アシルアミノ酸を導入した場合に最も高い活性を示したが、疎水性、水溶性に問題があることが解った。そこで水溶性向上を目的とした官能基を含む誘導体を合成、構造活性相関研究を行ったところ、遊離アミノ基を有する非天然アミノ酸フェニルグリシンが最も有望であることを見いだした。

(3) P3' の構造変換

P3' を持つ阻害剤は分子量の増加に見合う活性増強が見られなかった。また P2' がバルキーな脂肪族アミンであると高い活性を示すことを見いだしたので、P3' 部位を持つ阻害剤の有用性は低下した。

(4) P1 の構造変換

P1 部位を延長した化合物をいくつか合成したが、期待したほどの活性は有していなかった。

(5) プロドラッグ化の検討

AZT とプロテアーゼ阻害剤を結合させたダブルドラッグを合成した。親水性は若干向上したと思われるが、抗ウイルス活性の向上は見られなかった。基になるプロテアーゼ阻害剤の構造を再検討する必要があると思われる。

以上の結果、膜透過性に必要な親水性と疎水性のバランスが考慮されたテトラペプチド型阻害剤 KNI-10680 (Mw 653) を見いだすことに成功した。これは比較的小さい分子量と、ヘキサペプチド型阻害剤にも匹敵する高い酵素阻害活性を有しており、治療薬を目指した HTLV-I プロテアーゼ阻害剤のリードとなると考える。

また、本研究で得られた結果は、マラリア原虫プロテアーゼ "plasmepsin" やアルツハイマー病関連プロテアーゼ "BACE-1" などの他のプロテアーゼの阻害剤設計、合成にも有用な知見であり、これらの治療薬としての発展にも寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(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 1 1 件)

- ① Meihui Zhang, Jeffrey-Tri Nguyen, Henri-Obadja Kumada, Tooru Kimura, Maosheng Cheng, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Locking the two ends of tetrapeptidic HTLV-I protease inhibitors inside the enzyme. *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (14), 6880-6890 (2008). 査読有
- ② Meihui Zhang, Jeffrey-Tri Nguyen, Henri-Obadja Kumada, Tooru Kimura, Maosheng Cheng, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Synthesis and activity of tetrapeptidic HTLV-1 protease inhibitors possessing different P3-cap moieties. *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (10), 5795-5802 (2008). 査読有
- ③ Jeffrey-Tri Nguyen, Meihui Zhang, Henri-Obadja Kumada, Ayako Itami, Keiji Nishiyama, Tooru Kimura, Maosheng Cheng, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Truncation and non-natural amino acid substitution studies on HTLV-I protease hexapeptidic inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18** (1), 366-370 (2008). 査読有
- ④ Ei'ichi Ami, Koichiro Nakahara, Akihiko Sato, Jeffrey-Tri Nguyen, Koushi Hidaka, Yoshio Hamada, Shingo Nakatani, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Synthesis and antiviral property of allophenylnorstatine-based HIV protease inhibitors incorporating D-cysteine derivatives as P2/P3 moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (15), 4213-4217 (2007). 査読有
- ⑤ Tooru Kimura, Jeffrey-Tri Nguyen, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Yasuhiro Ariei, Yasuko Matsui, Yoshio Hayashi and Yoshiaki Kiso: Chipping at large, potent human T-cell leukemia virus type 1 protease inhibitors to uncover smaller, equipotent inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (12), 3276-3280 (2007). 査読有
- ⑥ Zyta Ziora, Soko Kasai, Koushi Hidaka, Ayaka Nagamine, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Design and synthesis of BACE1 inhibitors containing a novel norstatine derivative (2*R*, 3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-(phenylthio)butyric acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (6), 1629-1633 (2007). 査読有
- ⑦ Mariusz Skwarczynski, Mayo Noguchi, Shun Hirota, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Development of first photoresponsive prodrug of paclitaxel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (17), 4492-4496 (2006). 査読有
- ⑧ Yoshio Hamada, Naoto Igawa, Hayato Ikari, Zyta Ziora, Jeffrey-Tri Nguyen, Abdellah Yamani, Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Kazuki Saito, Yoshio Hayashi, Maiko Ebina, Shoichi Ishiura, Yoshiaki Kiso: β -Secretase inhibitors: Modification at the P4 position and improvement of inhibitory activity in cultured cell. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (16), 4354-4359 (2006). 査読有
- ⑨ Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Mariusz

Skwarczynski, Taku Yoshiya, Fukue Fukao, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: "O-Acyl isopeptide method" for the efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides: use of "O-acyl isodipeptide unit". *Tetrahedron Letters*, **47** (18), 3013-3017 (2006). 査読有

- ⑩ Mariusz Skwarczynski, Youhei Sohma, Mayo Noguchi, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: O-N Intramolecular acyloxy migration of typical protective groups in hydroxyamino acids. *J. Org. Chem.*, **71** (6), 2542-2545 (2006). 査読有
- ⑪ Tooru Kimura, Yoshio Hamada, Monika Stochaj, Hayato Ikari, Ayaka Nagamine, Hamdy Abdel-Rahman, Naoto Igawa, Koushi Hidaka, Jeffrey-Tri Nguyen, Kazuki Saito, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Design and synthesis of potent β -secretase (BACE1) inhibitors with P1' carboxylic acid bioisosteres. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (9), 2380-2386 (2006). 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① Jeffrey-Tri Nguyen, Meihui Zhang, Ayako Itami, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Maosheng Cheng, Yoshiaki Kiso: Road to HTLV-I protease inhibition. International Symposium on Integrated Medicinal Science (Kyoto, Japan) 2008.12
- ② J.-T. Nguyen, M. Zhang, A. Itami, H. Maegawa, K. Nishiyama, T. Kimura, Y. Hayashi, M. Cheng and Y. Kiso: Rational Drug Design of HTLV-I Protease Inhibitors from Octapeptides to Tetrapeptides. 20th American Peptide Symposium: Peptides for Youth (Montreal, Canada) 2007.7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 徹 (KIMURA TOORU)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70204980