

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32659  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659059  
 研究課題名(和文) 感染症治療をめざした可逆的システインプロテアーゼ阻害剤の創製研究  
 研究課題名(英文) Study on Medicinal Chemistry of Reversible Cysteine Protease Inhibitors for the Treatment of Infectious Diseases.  
 研究代表者  
 林 良雄 (HAYASHI YOSHIO)  
 東京薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：10322562

研究成果の概要(和文)：重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)が有するプロテアーゼの阻害剤創製を通じ、電子吸引性のアリアルケトン構造を基本的な阻害機構としたシステインプロテアーゼ阻害剤の創製手法の確立をめざした。過去の研究より得られた低活性な阻害剤を基に、初年度はトリペプチド型、最終年度はジペプチド型の強力な阻害剤創製に成功し、本阻害剤創製戦略が有効に機能することを確認できた。一方、阻害剤の効率的スクリーニング手法の確立に必要な、混ぜるだけで精製無しに基質をビオチニル化できる試薬の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：This work describes the establishment of common method for the development of cysteine protease inhibitors based on the aryl-ketone structure. As an example, from our preliminary inhibitor with a mild activity, we developed potent tri- and di-peptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors. The results suggested that our aryl-ketone strategy worked effectively in the development of viral cysteine protease inhibitors. In addition, we developed a solid phase reagent that can introduce biotin to the target molecules by a very simple procedure in order to obtain a high affinity substrate, which can be changeable to the potent inhibitor by introducing the aryl-ketone structure.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：医薬品化学，創薬化学，プロテアーゼ阻害剤，重症急性呼吸器症候群，ビオチニル化試薬，感染症，固相合成化学，システインプロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

2002年に中国南部で発生した重症急性呼吸器症候群(SARS)は、重篤な感染症として世界的な注目集めると共に、世界に大きな脅威を与えた。発生当時は未知の疾患で効果的な治療法がなかったため、世界中に急速に広がり、数ヶ月間で世界32カ国において8000人以上の感染者と700人以上の死亡者を出した<sup>[1]</sup>。その後、精力的な国際共同研究の成果として、本感染症の原因が新規コロナウイルスによることが特定され、

SARS コロナウイルス(CoV)と命名された。SARS-CoVは、プラス鎖RNAウイルスであり、ゲノム配列において既存のコロナウイルスと中程度のホモロジーを示した<sup>[2]</sup>。また複数のプロテアーゼをコードしており、その一つは二量体キモトリプシン様プロテアーゼ(3CL<sup>pro</sup>)としても知られているメインプロテアーゼM<sup>pro</sup>であった。3CL<sup>pro</sup>は、一般にコロナウイルス間でアミノ酸配列が高度に保存されたシステインプロテアーゼで、ウイルス粒子の複製に極めて重要なプロテアーゼである。

SARS-CoV では、ウイルス複製時に産生される巨大なポリペプチド pb1a と pb1b のプロセッシングを担っている。すなわち、SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> は、活性中心にシステイン残基を有し、触媒中心はその Cys145 と His41 により構成されるダイアッド構造により形成されており、標的タンパク質の加水分解反応では、システイン残基 (Cys145) の SH 基が求核基として、ヒスチジン残基 (His41) のイミダゾール基が酸塩基として働く。そして、SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> はウイルスの生活環に必要な不可欠な酵素であり、SARS 治療薬の開発の鍵となる分子標的と考えられている。

2002 年の SARS の流行は翌年に収まり、暫くはその再興を見なかったが、最近非常に致死率の高い HCoV-EMC と呼ばれる新しい SARS 様ウイルスの同定がなされ、重症呼吸器症候群に対する抗ウイルス剤開発の新たな必要性が提起された。SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> 阻害剤の創製においては、既に阻害活性を有する低分子化合物やペプチドミメティックスの報告が複数あるが、未だ有効な治療薬・治療法開発には全く至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) が有するプロテアーゼの阻害剤創製を通じ、電子吸引性のアリアルケトン構造を基本阻害活性機構としたシステインプロテアーゼ阻害剤の創製手法の確立である。

## 3. 研究の方法

過去の SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> 阻害剤研究において、マイルドな活性を持つ阻害剤 Z-Val-Leu-Ala(pyrrolidone-3-yl)-2-thiazole (**1**)<sup>[5]</sup> (図1) を創製できたので、これを基本化合物として創薬研究を進めた。化合物 **1** は Ki 値が 2.20 μM と、高活性阻害剤創製上、有効なリード化合物であった。初期の構造活性相関研究から、化合物 **1** の P1 位側鎖を構成するピロリドンが P1 位の立体配座を固定する構造として活性向上には必須であり、さらに P1' 位に相当するチアゾール基は、S1' ポケットと相互作用するのみならず、その強い電子吸引性から隣接するカルボニル基の分極を高め、当該カルボニル基が新電子剤として、活性中心の SH 基へ有効に作用する状況を与えていると思われた。本申請者は、他研究者により報告されている 3CL<sup>pro</sup> と既存化合物の複合体 X 線結晶解析の座標データを用い、化合物 **1** と 3CL<sup>pro</sup> のドッキングスタディーを実施し、得られた情報を基に、構造を変換・置換した誘導体を化学合成・活性評価することで、構造最適化を実施した。50 個以上の最終化合物を 2 年間で合成し、Ki 値が nM レベルの高い酵素阻害活性を示す有用なペプチドミメティックス阻害剤の創製に至った。

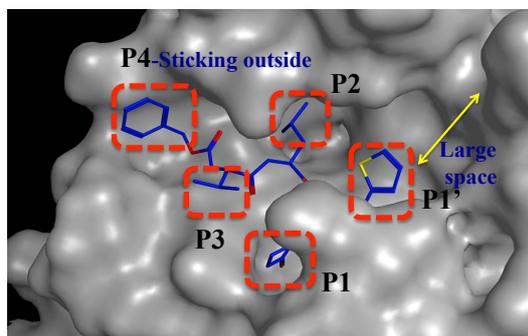
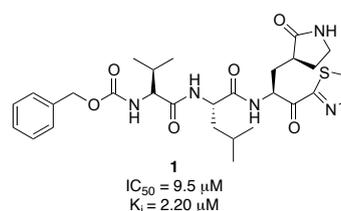


図1 リード化合物 **1** の化学構造と SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> とのドッキングシミュレーション

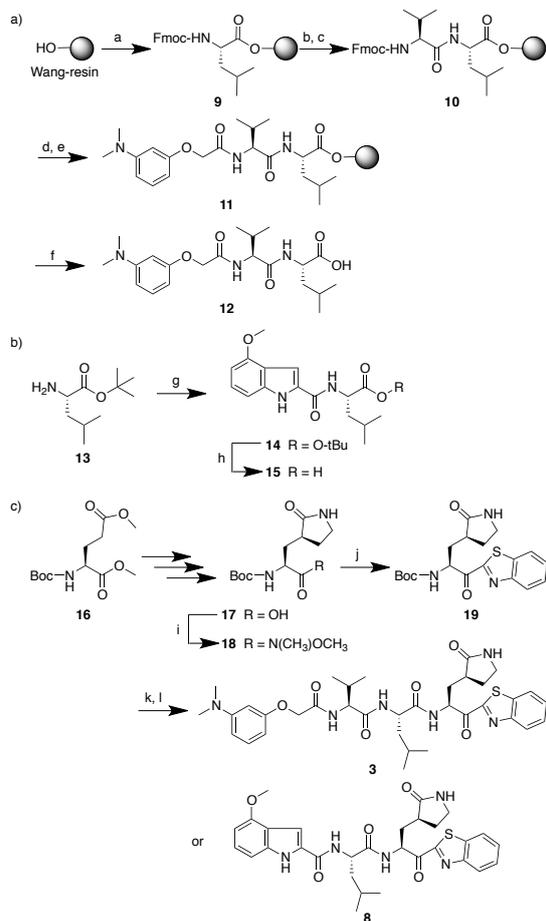
## 4. 研究成果

### (a) 阻害剤のデザイン

新規 SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> 阻害剤の創製として、先ず高活性トリペプチド型誘導体の合成をめざした。化合物デザインとして、リード化合物 **1** と SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> とのドッキングスタディーに基づき 3CL<sup>pro</sup> の基質認識部位から飛び出している P4 部位と比較的大きな空間を有する S1' 位を認識する P1' 部位の最適化を計画した (図1)。次いで、これら最適化の各段階で、P1, P2 部位及び P3 部位のさらなる最適化を実施することとした。

### (b) 阻害剤の合成

化学合成は、最終段階で2つのユニットを縮合することにより行なった。すなわち、左翼のジペプチドユニットと右翼のラクタムチアゾールユニットの縮合である。化合物 **3** 及び **8** の合成を Scheme 1 に例示した。ジペプチド **12** は Wang 樹脂を用いる Fmoc 固相合成法により合成した。樹脂に Fmoc アミノ酸を DMF 中、DMAP (4-dimethylaminopyridine) の存在下で DIC (N,N'-diisopropylcarbodiimid) を用いて導入後、ペプチド鎖の伸長反応及び脱保護・精製については、DIC-HOBt (4-hydroxybenzotriazole) 法に基づいて行なった (Scheme 1-a)。一方、ジペプチド型誘導体の合成では、左翼のジペプチドユニットの代わりに N-修飾保護アミノ酸を用いた。具体例として化合物 **15** は、4-methoxyindole-2-carboxylic acid と *tert*-butyl leucyl ester **13** を DMF 中、TEA 存在下に EDC-HOBt 法により縮合させ、その後 *t*-But 基を脱保護することで調製した (Scheme 1-b)。右翼ユニットを構成する鍵中間体 **19** は、光学活性なグルタミン酸エステルである化合物 **16** を bromoacetonitrile で処理した後、Pd/C を用いた



CN 基の還元、続く環化反応で側鎖にピロリドン構造を有するアミノ酸誘導体 17 を合成後、<sup>[5-7]</sup> *N,O*-dimethylhydroxylamine と化合物 17 を縮合させ、Weinreb amide 誘導体 18 に変換し、この Weinreb amide を benzothiazole と縮合させ調製した (Scheme 1-c)。そして化合物 19 の Boc 基を脱保護後、ペプチド 12 または 15 と縮合させることで、最終的に阻害剤 3 および 8 を合成した。

#### (c) トリペプチド誘導体の活性

デザインした全ての化合物は SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> に対する酵素阻害活性評価に附し、構造活性相関を行なった<sup>[8,9]</sup>。その結果、複数の有力な阻害剤を得、特に図2で示される阻害剤 2 と 3 は、それぞれ  $K_i$  値が 4.1 nM と 3.1 nM と、強力な阻害活性を示した。<sup>[7,9]</sup> これらのペプチドはより高活性な阻害剤を開発する上で魅力的な化合物である。本研究で得られた誘導体は、今後抗ウイルス活性を評価することを検討している。

#### (d) ジペプチド型阻害剤の創製

より有効で新規な抗 SARS 薬開発の可能性を追求するために、より低分子量の阻害剤開発を進めた。すなわち、図3に示すトリペプチド Z-Val

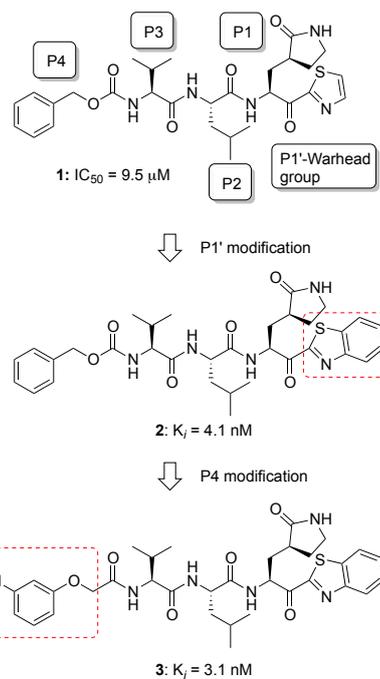


図2 リード化合物1からの構造最適化戦略

-Leu-Ala-(pyrrolidine-3-yl)-2-benzothiazole (2) から P3 位に相当する Val 残基を取り除いたジペプチド型阻害剤のデザイン、合成および生物活性評価を実施した。その結果、マイルドな酵素阻害活性を有するジペプチド型阻害剤を得ることに成功した。特に化合物 4 と 5 はそれぞれの  $K_i$  値が 0.39 μM と 0.33 μM と有意義な阻害活性を示した。合成した誘導体の構造活性相関から、P3 位に *N*-arylglycyl 構造を有する化合物は特に興味深い阻害剤であることが明らかになった。

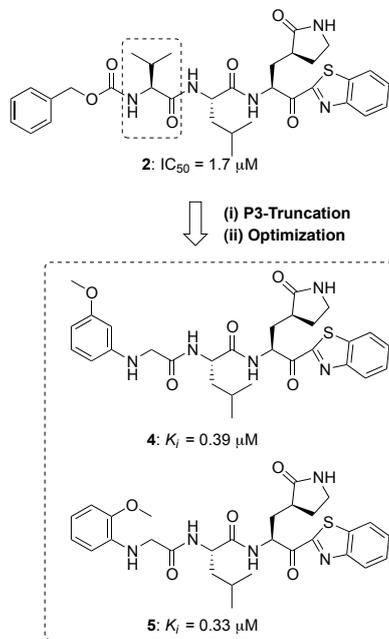


図3 化合物2からの構造最適化

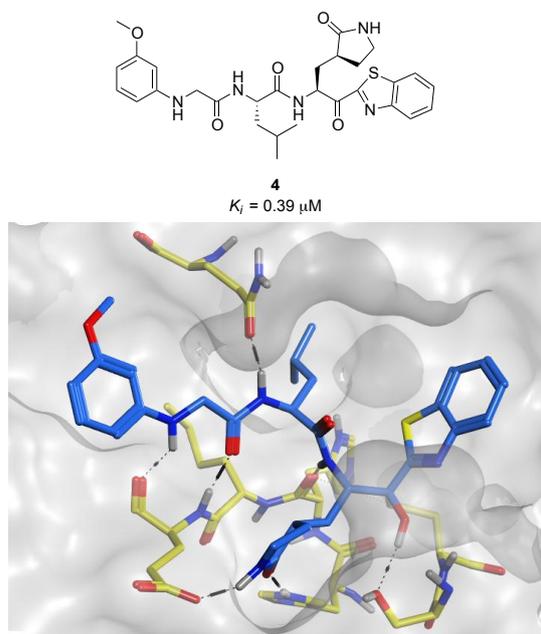


図4 化合物4のドッキングスタディー

加えて、化合物 4 の結合様式を molecular modeling により計算したところ、arylglycyl 基は P3 部位において、S3 および S4 ポケットと強固にフィットする構造であることが解った (図4)。そこで、この点に着目し、さらに化合物 4 をリードとして、P3 部位における構造最適化の誘導体合成

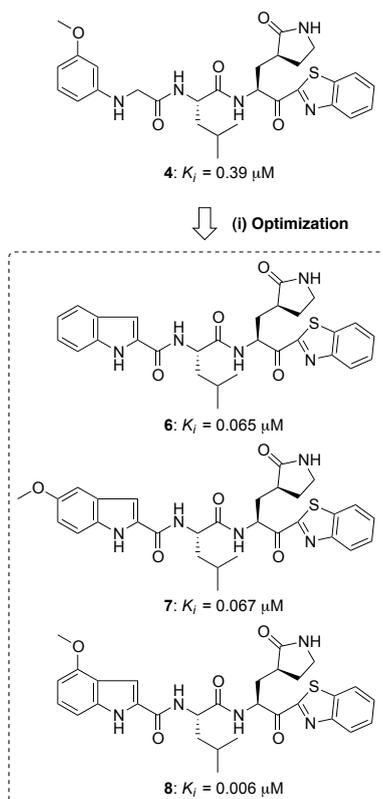


図5 化合物4からの構造最適化

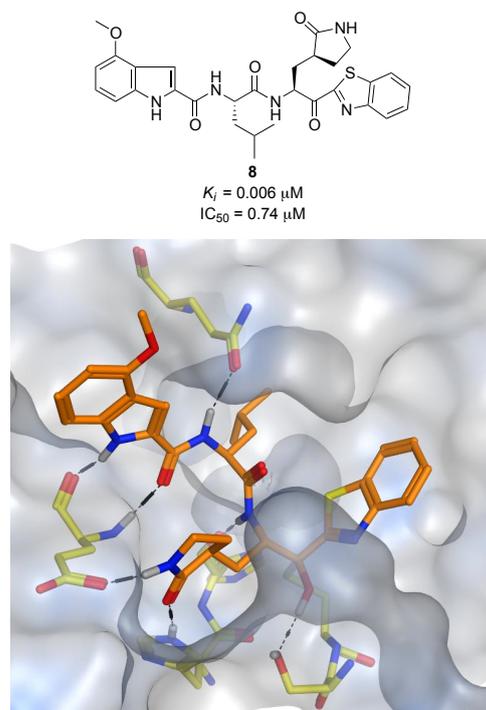


図6 化合物8のドッキングスタディー

を行なった結果、酵素阻害活性評価において、複数の有力なジペプチド型ミメティクスを見出した。図5の化合物 6~8 は、それぞれの  $K_i$  値が  $0.065 \mu\text{M}$ 、 $0.067 \mu\text{M}$ 、 $0.006 \mu\text{M}$  で、特に化合物 8 は注目すべき強力な阻害活性を示した。すなわち、化合物 8 の P3 位 4-methoxy-indole-2-carbonyl 構造は、SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> に対して強力な阻害活性を発揮する最適化された構造の一つであることが示唆された。化合物 8 における 3CL<sup>pro</sup> との結合相互作用を molecular modeling によって検討したところ (図6)、化合物 8 の Indole 環上アミン構造と Glu166 残基の間に新たな水素結合が示唆された。この相互作用は化合物 8 の強力な 3CL<sup>pro</sup> 認識を説明する上で重要と考えられる。現在まで SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> に対しこれほどの強力な阻害活性をもつジペプチド型化合物の報告はなく、我々の発見は初めての例であると考えている。従って、阻害剤 6~8 は、今後抗 SARS 薬開発において意義深い化合物であると言える。

#### (e) 固相担持型ビオチン化試薬の開発

本提案の課題研究の最終ゴールは、病態に関連する種々のシステインプロテアーゼに対して効率的に阻害剤を創製する共通的手法を創出・提供しようとするものである。当該システムのアイデアは、3つの要素から構成される。すなわち、①標的システインプロテアーゼに対して高い親和性を有する基質構造の獲得 (図7) と、② 阻害剤構造への変換、そして、③最終的に Drugable な阻害剤への最適化である。②及び③については、上記の

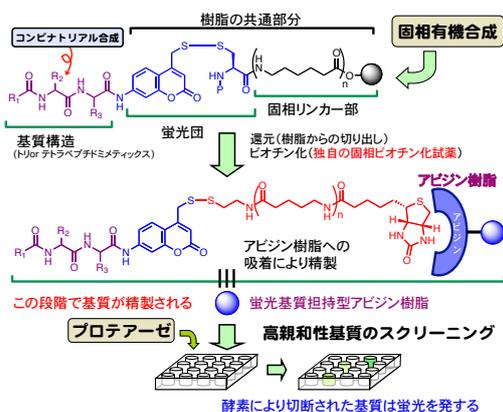
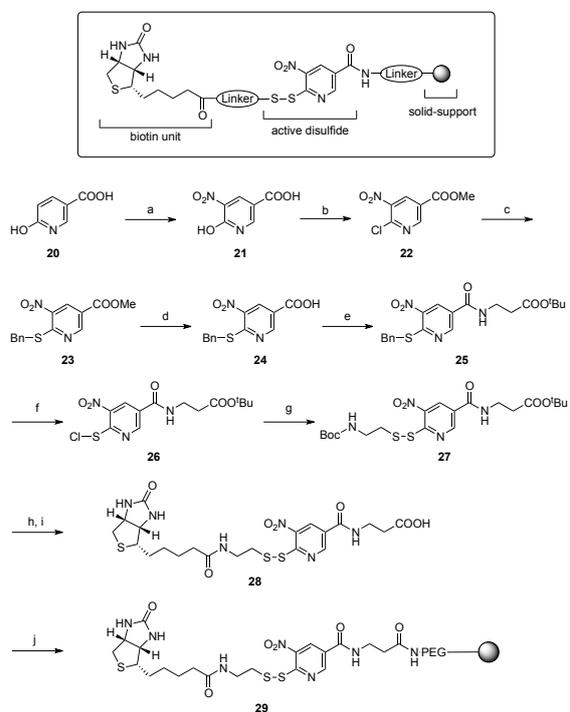


図7 ビオチン-アビジン系を合成基質精製に利用した高親和性基質スクリーニングシステム

SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> に対する阻害剤開発において、成果を上げることができた。副作用の少ない可逆的阻害機構をシステインプロテアーゼ阻害剤で表現できることを意味している。

本研究代表者は、①の高親和性基質を獲得するスクリーニングシステムの構築として、以下のシステムを提案している(図7)。すなわち、ジスルフィドを介して固相上に効率的に構築された種々の蛍光酵素基質を樹脂から



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) HNO<sub>3</sub>, Fuming (1.52), 50 °C, 18 h, 29%; (b) PCl<sub>5</sub>, POCl<sub>3</sub>, 100 °C, 3 h then MeOH, 0 °C, 1 h, 57%; (c) benzylmercaptan, Et<sub>3</sub>N, MeOH, reflux, 5 h, 92%; (d) LiOH·H<sub>2</sub>O, MeOH/H<sub>2</sub>O, 0 °C to rt, 15 h, quant.; (e) H-β-Ala-O<sup>t</sup>Bu·HCl, Et<sub>3</sub>N, DMT-MM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 18 h, 85%; (f) SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1,2-dichloroethane, rt, 3 h; (g) Boc-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-S-PMB, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -30 °C, 12 h, 83% (2 steps); (h) TFA, rt, 30 min; (i) Biotinyl-OSu, Et<sub>3</sub>N, DMF, rt, 17 h, 87%. (2 steps); (j) DIPCl, HOBt·H<sub>2</sub>O, amino-PEG-resin (0.42 mmol/g), DMF, rt, 16 h, then Ac<sub>2</sub>O, pyridine/DMF, rt, 0.5 h.

切断後、効率的に独自の固相担持型ビオチン化試薬によりビオチン化する。次いで、アビジンビーズで補足することにより、そのまま標的酵素によるスクリーニングに供するものである。アビジンビーズでのアフィニティー精製により高純度で蛍光酵素基質をアビジンビーズ上にアンカーすることができる。スクリーニングは、酵素の適切な基質認識による切断で生じたアミノクマリン誘導体が蛍光を発することで成し遂げられる。酵素基質となるペプチド鎖は、コンビナトリアル合成が適用可能で、スクリーニング効率向上をさらに促進できる。本システムの独創性は高いと思われる。このシステムの構築において、本研究では簡単な操作で多様なスクリーニング分子をビオチン標識できる新規固相標識ビオチン標識試薬 **29** の開発に成功した (Scheme 2)。

#### (f) まとめ

SARS ウイルスプロテアーゼ阻害剤の開発に向けた創薬研究において、アリアルケトン構造を基本阻害活性機構としたトリペプチド型およびジペプチド型ペプチドミメティック阻害剤をデザイン・合成し、それらの酵素阻害活性評価から、注目すべき強力な阻害活性を有する新規ペプチドミメティック化合物 **3**~**8** を創製した。特に化合物 **8** は高活性化合物で、今後の生物学的高次評価の結果が待たれる化合物である。これらの阻害剤研究は、アリアルケトン構造を基本阻害活性機構とする阻害剤創製戦略が有効に機能することを示唆している。SARS ウイルスプロテアーゼ阻害剤の研究では、当該ウイルスの抗ウイルス剤開発に貢献するとともに、今後近縁のウイルスに対する抗ウイルス剤の研究開発にも重要な知見を与えるものである。

#### (g) 参考文献

1. C. Drosten, S. Gunther, W. Preiser, S. Ven der Werf, H. R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolensnikova, R. A. M. Fouchier, A. Berger, A. M. Burguiere, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H. D. Klenk, A. D. M. E. Osterhaus, H. Schmitz, H. W. Doerr, N. Engl. J. Med. 348 (2003) 1967-1976.
2. K. Anand, J. Ziebuhr, P. Wadhvani, J. R. Mesturs, R. Hilgenfeld, Science 300 (2003) 1763-1767.
3. P. A. Rota, M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chem, W. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, W. J. Bellini, Science 300 (2003) 1394-1399.
4. A. M. Zaki, S. van Boheemen, T. M. Bestebroer, A. D. M. E. Osterhaus, R. A. M. N. Fouchier, Engl.

- J. Med. 367 (2012) 1814-1820.
5. T. Regnier, D. Sharma, K. Hidaka, U. Bacha, E. Freire, Y. Hayashi, Y. Kiso, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 2722-2727.
  6. S. Konno, P. Thanigaimalai, T. Yamamoto, K. Nakada, R. Kakiuchi, K. Takayama, Y. Yamazaki, F. Yakushiji, K. Akaji, Y. Kiso, Y. Kawasaki, E. Freire, Y. Hayashi, Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 412-424.
  7. Q. Tian, N. K. Nayyar, S. Babu, L. Chen, J. Tao, S. Lee, A. Tibbetts, T. Moran, J. Liou, M. Guo, T. P. Kennedy, Tetrahedron Lett. 42 (2001) 6807-6809.
  8. U. Bacha, J. Barrila, B. Gabelli, Y. Kiso, L. M. Amzel, E. Freire, Chem. Biol. Drug Des. 72 (2008) 34-39.
  9. K. Akaji, H. Konno, H. Mitsui, K. Teruya, Y. Shimamoto, Y. Hattori, T. Ozaki, M. Kusunoki, A. Sanjoh, J. Med. Chem. 54 (2011) 7962-7973.

## 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 3 件)

- 1) Sho Konno, Thanigaimalai Pillaiyar, Takehito Yamamoto, Kiyohiko Nakada, Rie Kakiuchi, Kentaro Takayama, Yuri Yamazaki, Fumika Yakushiji, Kenichi Akaji, Yoshiaki Kiso, Yuko Kawasaki, Shen-En Chen, Ernesto Freire, Yoshio Hayashi. Design and synthesis of new tripeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors containing an electrophilic arylketone moiety. Bioorganic & Medicinal Chemistry 21(2), 412-424 (2013).  
DOI : org/10.1016/j.bmc.2012.11.017
- 2) Kentarou Fukumoto, Kumi Adachi, Akihiro Kajiyama, Yuri Yamazaki, Fumika Yakushiji, Yoshio Hayashi. Development of a solid-supported biotinylation reagent for efficient biotin labeling of SH groups on small molecules. Tetrahedron Lett. 53, 535-538 (2012).  
DOI : org/10.1016/j.tetlet.2011.11.089
- 3) Pillaiyar Thanigaimalai, Sho Konno, Takehito Yamamoto, Yuji Koiwai, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, Kenichi Akaji, Yuko Kawasaki, Shen-En Chen, Aurash Naser-Tavakolian, Arne Schön, Ernesto Freire, Yoshio Hayashi. Design, synthesis, and biological evaluation of novel dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors: Structure-activity relationship study. Eur. J. Med. Chem. 65, 436-447 (2013).  
DOI : org/10.1016/j.ejmech.2013.05.005

〔学会発表〕 (計 5 件)

- 1) Sho Konno, Development of SARS Coronavirus 3CL protease inhibitors with an electrophilic arylketone structure. 8<sup>th</sup> AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, December 1, 2011, Tokyo, Japan.
- 2) Sho Konno, Design, Synthesis and Evaluation of Tripeptidomimetics with arylketone as inhibitors of SARS-CoV 3CL

Protease. 48<sup>th</sup> Japanese Peptide Symposium, September 28, 2011, Sapporo, Japan.

- 3) Takehito Yamamoto, The development of tripeptide-type SARS Coronavirus 3CL protease inhibitors: Structure-activity relationships at P4 moiety. The Pharmaceutical Society of Japan, March 29, 2012, Sapporo, Japan.
- 4) Takehito Yamamoto, Development of tripeptide-type SARS coronavirus 3CL protease inhibitors with an electrophilic 2-benzothiazole ketone structure. 244th ACS National Meeting & Exposition, Philadelphia, PA, United States, August 19-23, 2012 (2012).
- 5) Sho Konno, Peptidic cysteine protease inhibitors with an arylketone warhead for SARS Coronavirus. PEM6 (6th Peptide Engineering Meeting), Atlanta, Georgia, UAS, November 2, 2012.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hinka-toyaku.s2.weblife.me/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 良雄 (HAYASHI YOSHIO)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 10322562

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし