

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06953

研究課題名（和文）ヒドロキシプロリンを基盤とする汎用的プロテアーゼ阻害剤設計戦略の開発

研究課題名（英文）Development of a versatile design method for protease inhibitors based on hydroxyproline

研究代表者

小林 数也（Kobayashi, Kazuya）

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80647868

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、汎用的プロテアーゼ阻害剤設計戦略の確立を目指し、ヒドロキシプロリンを共通骨格として、アルツハイマー病の治療標的である β -セクレターゼ（BACE1）、および重症急性呼吸器症候群（SARS）の治療標的である SARS 3CLプロテアーゼ（3CLpro）に対する阻害剤の開発研究を行った。BACE1阻害剤の開発研究では、新規骨格に基づく阻害剤の構造活性相関情報を取得することができ、更なる高活性誘導体を創出するための足掛かりを得ることができた。SARS 3CLpro阻害剤の開発研究では、共通骨格に基づく阻害剤設計から、一桁 μ Mの活性を有する新規SARS 3CLpro阻害剤を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全く異なる2つのプロテアーゼを標的とした阻害剤の開発研究を、共通の基本骨格に基づく設計戦略に従って実施し、一定の阻害活性を有する誘導体を見出すことができたことから、本研究成果はプロテアーゼを対象とする創薬研究における新たな設計手法を示すことができたと考えている。プロテアーゼ阻害剤の新たな設計手法の確立は、医薬品開発研究をより飛躍させるために必要な物であり、本成果はその一助になりうるものとする。

研究成果の概要（英文）：To establish a universal strategy for the design of protease inhibitors, I have investigated the development of inhibitors against β -secretase (BACE1) and SARS (severe acute respiratory syndrome) 3CL protease (3CLpro), which are therapeutic targets for Alzheimer's disease and SARS, respectively, using hydroxyproline as a common backbone. In the case of the BACE1 inhibitors, we have obtained valuable structure-activity relationship information for a novel skeleton-based inhibitor. This information will be useful in developing highly active derivatives in the future. As for the SARS 3CLpro inhibitors, we have identified a new inhibitor with single digit μ M (IC50) activity from the design based on the common backbone.

研究分野：創薬科学

キーワード：プロテアーゼ阻害剤 ヒドロキシプロリン BACE1 SARS 3CLプロテアーゼ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼは、タンパク質分解酵素の総称であり、生体内において多様な生命現象に関与している。また、プロテアーゼは様々な疾患の原因ともなりうることから、疾患関連プロテアーゼを標的とした阻害剤開発は、治療薬開発における主要な方法論として多くの研究が行われている。

プロテアーゼ阻害剤の代表的な設計方法の一つに、substrate-based drug design と呼ばれる手法がある。本手法では、プロテアーゼが認識する基質ペプチドのアミノ酸配列を基に構造変換を行うことで阻害剤の設計を行うが、得られるペプチド性化合物は一般的に分子量が大きく、水溶性が高いことから、生体内安定性、経口吸収性などの点で問題が生じやすく、医薬品として開発を進めるためには、低分子化・非ペプチド化が必要であることが多い。

一方、低分子リード化合物を直接的に得る手法としては、ハイスループットスクリーニング (HTS) が汎用されているが、この手法では対象とするプロテアーゼ毎に HTS を実施しなければならず、またその成否は用いる化合物ライブラリーの質や量に依存するため、アカデミアレベルでの実施は難しい。

プロテアーゼ阻害に基づく医薬品開発研究をより飛躍させるためには、これら 2 つの手法の問題点を克服できるような、効率的で汎用的な新しい低分子型プロテアーゼ阻害剤の設計手法が不可欠であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒドロキシプロリンをテンプレート構造として応用することで、簡便で汎用的なプロテアーゼ阻害剤設計手法の確立を目指すことを目的とした (Fig.1)。ヒドロキシプロリンは、小さく固い五員環骨格上にイミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシ基という 3 つの反応点を有する生体イミノ酸である。カルボキシ基及びヒドロキシ基の立体化学を制御することで多様な空間配置が実現可能であり、有用なビルディングブロックの一つと考えられることから、本研究のテンプレート構造として採用した。本研究では、イミノ基にプロテアーゼ活性中心との相互作用部位 (warhead) を導入し、基質ペプチドの構造的特徴をカルボキシ基とヒドロキシ基上に配置することで、低分子阻害剤の設計を行い、合成した阻害剤の活性評価を行うことで、本テンプレート構造の有用性を評価することとした。

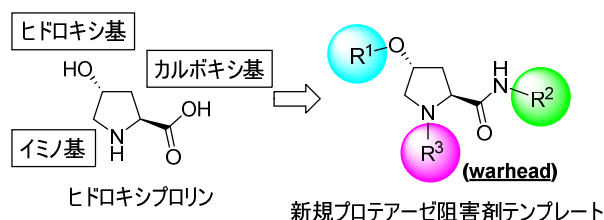


Fig.1. ヒドロキシプロリンと新規テンプレート構造

3. 研究の方法

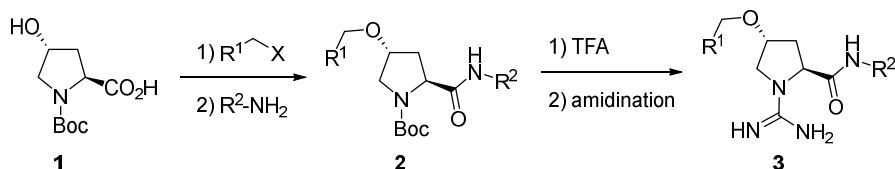
本研究では、ヒドロキシプロリンを利用した本戦略が、異なる種類のプロテアーゼに対して広く有効であることを明らかにするため、(1) アスパルティックプロテアーゼと (2) システインプロテアーゼを標的として、それぞれについてプロテアーゼ阻害剤の開発研究を行った。これらの構造最適化は、下記に示す共通の阻害剤設計戦略に基づいて実施した。

【阻害剤設計戦略】

1. ヒドロキシプロリンのイミノ基に、各プロテアーゼの活性中心と相互作用可能な官能基を導入する。
2. カルボキシ基とヒドロキシ基に、基質配列のプライムサイト及びノンプライムサイトに対応した置換基を導入する。
3. ヒドロキシプロリンの立体配置を制御し、適切な骨格を決定する。
4. 各置換基の構造変換を行い、最適構造を探索する。

(1) アスパルティックプロテアーゼ阻害剤の開発研究

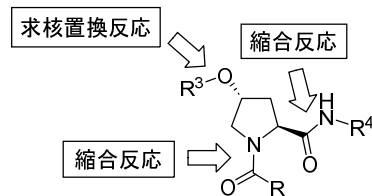
標的とするアスパルティックプロテアーゼとして、8-セクレターゼ (BACE1) を選択した。BACE1 は、アルツハイマー病の発症原因の一つとされるアミロイド β の産生に関わる酵素である。そのため、その阻害剤はアルツハイマー病の予防・治療薬になりうると期待されている。本研究では、低分子型 BACE1 阻害剤のファーマコフォアとして報告されているアミジノ基に着目し、ヒドロキシプロリンのイミノ基をアミジノ化したアミジノピロリジン骨格 **3** を基盤に新規阻害剤を設計し、誘導体合成と活性評価を行った (Scheme 1)。R¹、R² 基には、種々の疎水性置換基の導入を検討した。また、本検討において得られた高活性誘導体についてエナンチオマー及びジアステレオマーを合成し、立体化学に関する最適構造の探索も併せて行った。



Scheme 1. アミノピロリジン誘導体の合成経路

(2) システインプロテアーゼ阻害剤の開発研究

標的とするシステインプロテアーゼとして、SARS 3CL プロテアーゼ(3CLpro)を選択した。SARS (severe acute respiratory syndrome: 重症急性呼吸器症候群) は、SARS コロナウイルスによって引き起こされる呼吸器感染症であり、ウイルスの増殖に必須である SARS 3CLpro は、抗 SARS 薬の標的候補として期待されている。本研究では、システインプロテアーゼ阻害剤の warhead として、マイケルアクセプターとして機能するアクリルアミドおよび 2-ブチンアミドを選択し、アクリロイルピロリジン骨格 4 と 2-ブチノイルピロリジン骨格 5 を基盤とした阻害剤を設計し、誘導体の合成と活性評価を行った (Fig.2)。基質配列の特徴から、R³、R⁴基には、主に疎水性置換基の導入を検討した。また、warhead については、当初の予定とは異なる構造についても検討を行った。



アクリロイルピロリジン (4): R = CH=CH₂
2-ブチノイルピロリジン (5): R = C≡C-CH₃

Fig.2. システインプロテアーゼ阻害剤テンプレート

4. 研究成果

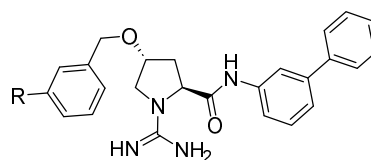
(1) アスパルティックプロテアーゼ阻害剤の開発研究

本研究課題実施前に見出した 3-メチルフェニル誘導体 6 (IC₅₀ = 115 μM) を基盤として、左側のピフェニル基に関して、末端ベンゼン環の複素環への置換を検討したところ、合成した 2-メチルピリジン-4-イル (7; IC₅₀ > 1500 μM)、3-メチルピリジン-5-イル (8; IC₅₀ = 885 μM) 及び 1-メチル-1*H*-ピラゾール-4-イル誘導体 (9; IC₅₀ = 686 μM) では、いずれも大幅な活性の低下が認められた (Fig.3)。これらの結果から、末端芳香環へのヘテロ原子の導入は、BACE1 との相互作用形成に置いて不利に働くことが示唆された。

並行して、3-メチルフェニル誘導体 6 のエナンチオマー及びジアステロマーを合成し、立体化学に関する最適構造の検討を行った。活性評価の結果、ピロリジンの立体配置は 2*S*,4*R* が最適であることが明らかとなった。

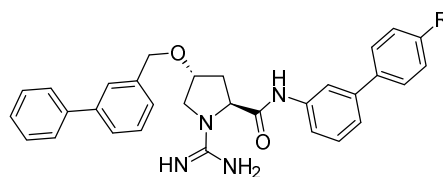
次に、右側のピフェニル基に関して、末端ベンゼン環への置換基の導入を検討した。メチル基を用いて置換位置の検討を行ったところ、パラ位へのメチル基の導入が活性の向上に寄与することが示されたため (10; IC₅₀ = 117 μM)、パラ位への各種置換基の導入を検討した。メトキシ基 (11; IC₅₀ = 316 μM) の導入は活性を大きく低下させたが、イソプロピル基 (12; IC₅₀ = 124 μM)、シアノ基 (13; IC₅₀ = 139 μM)、フルオロ基 (14; IC₅₀ = 140 μM) では活性の低下幅は小さく、トリフルオロメチル基 (15; IC₅₀ = 107 μM) の導入では、活性はわずかに向上した。これらの結果から、右側の末端芳香環パラ位では、かさ高い置換基が許容される一方で、置換基上のヘテロ原子およびハロゲン原子による相互作用が活性発現に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

これまでの検討から、左側のピフェニル基の末端ベンゼン環へ導入できる置換基には制限が大きいことが示唆されたため、左側の末端芳香環の構造を 3-メチルフェニルに固定し、右側のピフェニル基への置換基の導入について更なる検討を行った。末端ベンゼン環へのカルボニル基の導入を検討したところ、プレリミナリーなデータではあるものの、末端芳香環のオルト位にメトキシカルボニル基 (16; IC₅₀ = 116 μM) およびカルボキシ基 (17; IC₅₀ = 63 μM) を導入した誘導



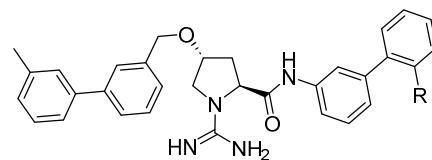
6 (R = 3-methylphenyl): IC₅₀ = 115 μM
7 (R = 2-methylpyridin-4-yl): IC₅₀ > 1500 μM
8 (R = 3-methylpyridin-5-yl): IC₅₀ = 885 μM
9 (R = 1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl): IC₅₀ = 686 μM

Fig.3. R¹ 誘導体の構造と BACE1 阻害活性



10 (R = Me): IC₅₀ = 117 μM
11 (R = OMe): IC₅₀ = 316 μM
12 (R = *i*-Pr): IC₅₀ = 124 μM
13 (R = CN): IC₅₀ = 139 μM
14 (R = F): IC₅₀ = 140 μM
15 (R = CF₃): IC₅₀ = 107 μM

Fig.4. R² 誘導体の構造と BACE1 阻害活性



16 (R = CO₂Me): IC₅₀ = 116 μM
17 (R = CO₂H): IC₅₀ = 63 μM

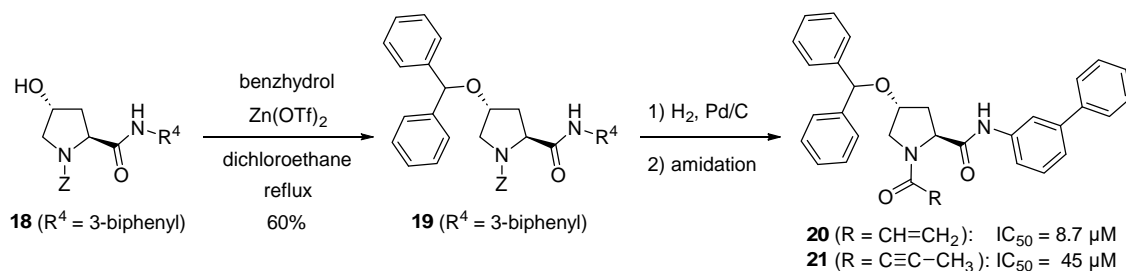
Fig.5. カルボニル誘導体の構造と BACE1 阻害活性

体で阻害活性が向上し、特に後者においてより大きな活性の変化が認められた。これらの結果から、オルト位周辺において BACE1 との間に新たな静電的相互作用が形成された可能性が示唆された。

当初の想定ほどに阻害活性を向上させることはできなかったものの、本研究においてヒドロキシプロリンに基づく新規骨格が BACE1 阻害剤として機能しうることを示すことができた。また、研究期間全体を通して、新規骨格に基づく BACE1 阻害剤の構造活性相関情報を取得することができ、更なる高活性誘導体を創出するための足掛かりを得ることができた。

(2) システインプロテアーゼ阻害剤の開発研究

R³置換基としてジフェニルメチル (DPM) 基を導入するために、エーテル化反応の条件検討を行った。検討の結果、トリフルオロメタンスルホン酸亜鉛(II)をルイス酸触媒として添加した条件でベンズヒドロールを反応させることで、収率良く目的化合物が得られることを見出した (Scheme 2)。本法により得られた DPM エーテル **19** を基に、warhead としてアクリロイル基または 2-ブチノイル基を有する誘導体を合成し、阻害活性評価を行ったところ、いずれの誘導体も期待通り SARS 3CLpro に対する阻害活性を示し、アクリロイル型誘導体 (**20**; IC₅₀ = 8.7 μM) は、2-ブチノイル型誘導体 (**21**; IC₅₀ = 45 μM) よりも約 5 倍高い活性を示した。



Scheme 2. DPM エーテル化反応とアクリロイル型及び 2-ブチノイル型誘導体の合成

次に、warhead をアクリロイル基に固定して、種々置換基を有する DPM 基を導入した誘導体の合成と活性評価を行った。フッ素 (**22**; IC₅₀ = 55 μM)、メチル基 (**23**; IC₅₀ = 191 μM)、メトキシ基 (**24**; IC₅₀ = 318 μM) を導入した誘導体では、いずれも活性は低下し、置換基がかさ高くなるにつれて活性がより低下する傾向が認められた (Fig.6)。これらの結果から、DPM 基のパラ位方向には置換基を許容できる十分なスペースが存在しないことが示唆された。また、DPM 基をベンジル基へと置換した誘導体 (**25**; IC₅₀ = 90 μM) では活性の低下が認められ、2つのフェニル基が活性発現に寄与していることが示された。続いて、R⁴置換基についても誘導体合成を行ったが、いずれの誘導体においても阻害活性は低下した。R⁴置換基については十分な検討が行えていないため、更なる検討が必要と考えている。

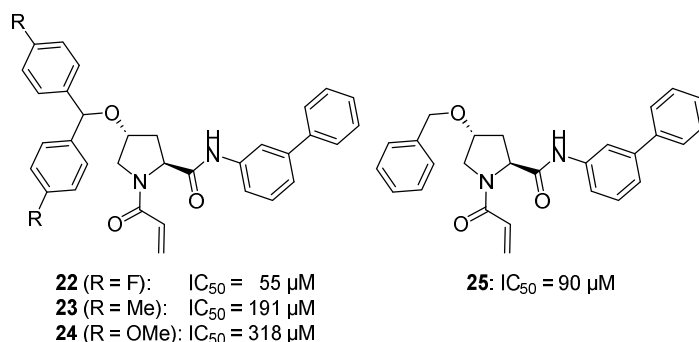


Fig. 6. R³誘導体の構造と SARS 3CLpro 阻害活性

アクリロイル基が、想定通りマイケルアクセプターとして機能していることを確認するために、warhead としてプロピオニル基を導入した誘導体を合成し、活性評価を行った。その結果、プロピオニル型誘導体 (**26**; IC₅₀ = 13 μM) は、アクリロイル型誘導体と同程度の活性を示すことが明らかとなった (Fig.7)。この結果は本阻害剤の warhead として必ずしもマイケルアクセプターが必要ではないことを示しており、現在、warhead 構造の最適化を目標として更なる誘導体合成に取り組んでいる。

研究開始時の目標であった nM オーダーの阻害活性には届かなかったものの、ヒドロキシプロリンをテンプレートとする阻害剤設計戦略に基づく誘導体合成の結果、一桁 μM の活性を有する新規 SARS 3CLpro 阻害剤を見出すことができた。Warhead の検討において、想定していた共有結合型の阻害様式ではなく、非共有結合型の阻害様式であることが示唆されたことから、今後はより広範に構造探索を展開する必要があると考えている。

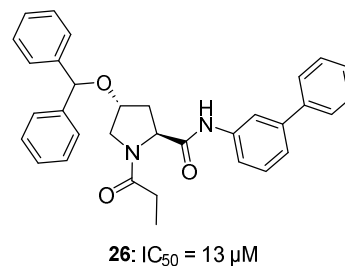


Fig. 7. プロピオニル型誘導体の構造と SARS 3CLpro 阻害活性

上記(1), (2)に記した研究を通して、ヒドロキシプロリンに基づく阻害剤設計戦略が、2つの異なるプロテアーゼ (BACE1、SARS 3CLpro) に対して有効であることを明らかにした。本手法

で設計される化合物は、比較的容易に多様な誘導体を合成可能であることから、コンビナトリアル合成と組み合わせで化合物ライブラリーを作成することができれば、より効率的な阻害剤探索の実施が期待できる。今後は、AI を利用した構造発生やヴァーチャルスクリーニング技術の活用を検討し、更なる阻害剤探索法の効率化を図るとともに、別種のプロテアーゼを対象とした阻害剤探索を実施し、ヒドロキシプロリンを基盤とする阻害剤設計法の有効性を検証していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 川上夏輝、木村蘭希、服部恭尚、大石真也、小林数也 |
| 2. 発表標題 N-アミジノピロリジン型BACE1阻害剤の立体異性体および複素環を有する誘導体の合成と活性評価 |
| 3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小紫香穂、木村蘭希、桑野芽、小林数也、服部恭尚、赤路健一 |
| 2. 発表標題 N-アミジノピロリジン型BACE 1 阻害剤：水酸基側鎖の構造活性相関研究 |
| 3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会 |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林数也、川上夏輝、谷口智奈美、田中美咲、木村蘭希、小紫香穂、桑野芽、池本茉由、服部恭尚、大石真也、赤路健一 |
| 2. 発表標題 ピロリジン環を基盤とするプロテアーゼ阻害剤設計とBACE1阻害剤への展開 |
| 3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林数也、川上夏輝、谷口智奈美、田中美咲、木村蘭希、小紫香穂、桑野芽、池本茉由、服部恭尚、大石真也 |
| 2. 発表標題 ヒドロキシプロリンを母核とするプロテアーゼ阻害剤の設計とBACE1阻害剤探索への適用 |
| 3. 学会等名 第40回メディシナルケミストリーシンポジウム |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|