

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：2021～2023

課題番号：21K05417

研究課題名（和文）SARS 3CLプロテアーゼ阻害剤の高活性化と抗COVID-19薬への展開

研究課題名（英文）Optimization of SARS 3CL protease inhibitor and development of anti-COVID-19 drug

研究代表者

服部 恭尚 (hattori, Yasunao)

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20567028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではCOVID-19治療薬の開発を目指し、デカヒドロイソキノリン型骨格を有するSARS 3CLプロテアーゼ阻害剤の設計と合成を行った。設計した3種類の阻害剤について合成を進め、2種類は阻害剤の前駆体までの合成を完了した。もう1種類の阻害剤はプロテアーゼと相互作用可能な置換基導入の足掛かりになる官能基導入において条件検討を行い、収率の改善に成功し、高立体選択的に官能基導入されていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、COVID-19治療薬は存在するが、制限もあり課題もある。COVID-19の原因ウイルスであるSARS-CoV-2は増殖にSARS 3CLプロテアーゼを必須とすることから、本酵素の阻害剤は有望な抗COVID-19薬の標的となりうる。本研究では3種類の阻害剤候補化合物の設計と合成を行い、既存の治療薬や阻害剤と異なる骨格を有する化合物の合成がほぼ完了した。これまでの研究より、本化合物は阻害活性を有すると考えられることから、構造活性相関研究の前向きな進展を期待できる。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated design and synthesis of decahydroisoquinoline type SARS 3CL protease inhibitors to develop a therapeutic agent for COVID-19. We designed three types of inhibitors and completed the synthesis of the inhibitor precursor for two types. For another type of inhibitor, we performed the conditions for adding the functional group, which introduces the substituent to interact with the protease. We succeeded in improving the yield and confirmed that the functional group was introduced with high stereoselectivity.

研究分野：生物有機化学

キーワード：COVID-19 SARS 3CLプロテアーゼ 阻害剤 デカヒドロイソキノリン

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome : SARS) は 2002 年に流行が確認された、新種のコロナウイルス (SARS-CoV-1) を発症の原因とする 21 世紀初の新興感染症である。2012 年には類似のコロナウイルス (MERS-CoV) が原因の中東呼吸器症候群 (Middle East Respiratory Syndrome : MERS) が報告された。さらに、2019 年末には中国で新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の流行が確認され、SARS-CoV-2 がその原因ウイルスであることが明らかとなった。COVID-19 はコロナウイルスを原因とする感染症では初めてのパンデミックとなったが、これは SARS と MERS を含めてコロナウイルスに対して有効なワクチンも医薬品も存在しない状態であったことが原因である。抗 SARS 薬の有望な標的分子と考えられている SARS 3CL プロテアーゼ (SARS 3CL<sup>pro</sup>) は SARS-CoV-1 の増殖に必須のキモトリプシン様の酵素である。SARS-CoV-1 と SARS-CoV-2 の 3CL<sup>pro</sup> は相同性が高く立体構造も保持されているため、SARS 3CL<sup>pro</sup> 阻害剤は SARS-CoV-2 に対しても効果を期待できる。従って、SARS 3CL<sup>pro</sup> 阻害剤は抗 COVID-19 薬へ展開可能と考えられる。

### 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに SARS 3CL<sup>pro</sup> の基質配列に基づくペプチド型阻害剤 (Akaji, K.; Konno, H.; Hattori, Y. *et al. J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7962.), ペプチド型阻害剤から展開したよりドラッグライクな構造を有するデカヒドロイソキノリン型阻害剤 (Shimamoto, Y.; Hattori, Y.; Akaji, K. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 876.), 阻害剤の活性向上と不安定なアルデヒドに代わる有望な新規 warhead を見出した阻害剤の開発 (Ohnishi, K.; Hattori, Y.; Akaji, K. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 425.) を達成している。

本研究では、研究代表者が最適化したパラジウム触媒を用いた立体選択的環化反応 (Hattori, Y.; Makabe, H. *et al. Org. Lett.* **2008**, *10*, 717.) を応用し、効率的構築に成功している *trans* 型デカヒドロイソキノリン型阻害剤のさらなる構造最適化による抗 COVID-19 薬シード化合物の開発を目的とする。研究項目は、(1) 新たな相互作用様式を獲得することを指向したデカヒドロイソキノリン型阻害剤の設計と (2) 設計したデカヒドロイソキノリン型阻害剤の合成である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新たな相互作用を獲得することを指向したデカヒドロイソキノリン型阻害剤の設計

これまでの研究からデカヒドロイソキノリン型阻害剤では、デカヒドロイソキノリン環から伸長する置換基が活性に影響を与えることを明らかにしている。そこで本研究では、①デカヒドロイソキノリン環 4 位から伸長する置換基の構造を変化させた阻害剤、②デカヒドロイソキノリン環の窒素原子から伸長する置換基を 1 位に移動した阻害剤、③デカヒドロイソキノリン環の窒素原子から伸長する置換基に水素結合可能な官能基を導入した阻害剤、の 3 種類のデカヒドロイソキノリン型阻害剤を設計した。

#### (2) 設計したデカヒドロイソキノリン型阻害剤の合成

設計した阻害剤はいずれも市販の光学活性なシクロヘキサジメタノールを出発物質とし、研究代表者が最適化した 2 価パラジウム触媒を用いた立体選択的環化反応によってデカヒドロイソキノリン環を構築することで合成可能である。アミド置換基および 1 位と 4 位の置換基については、それぞれの合成経路において最も適切と考えられる段階で導入することとした。また、相互作用に必須の warhead を有するヒスチジン部分は合成の終盤で連結する方法を採った。

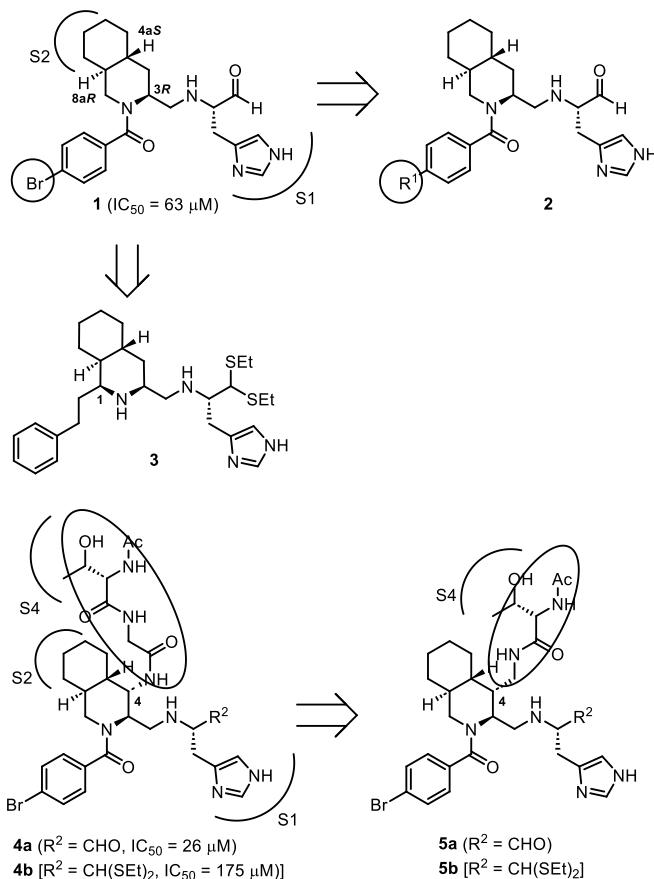
### 4. 研究成果

#### (1) 新たな相互作用を獲得することを指向したデカヒドロイソキノリン型阻害剤の設計

これまでの研究からデカヒドロイソキノリン型阻害剤では、i) 立体化学が阻害活性に影響を与えること、ii) アミド置換基は当初想定していた S4 ポケット方向ではなく酵素表面側に位置していること、iii) 新規相互作用基としての 4 位置換基は活性向上に補助的な効果がある

こと、iv) アルデヒドに代わる warhead としてジチオアセタールが有望であること、を明らかにしている。i) の立体化学は (3*S*, 4*aR*, 8*aS*) よりも (3*R*, 4*aS*, 8*aR*) が良い結果を与えたため、この立体化学に固定する。ii) のアミド置換基は、ベンゼン環上に水素結合可能な官能基を導入することで酵素とのさらなる相互作用を可能とする。また、アミド置換基をデカヒドロイソキノリン環 1 位に移動することで新たな相互作用獲得を期待した。iii) については、スレオニルアミノメチル基の導入を行う。iv) の warhead はジチオアセタールが有効であったことからジチオアセタールとアルデヒドを選択した。

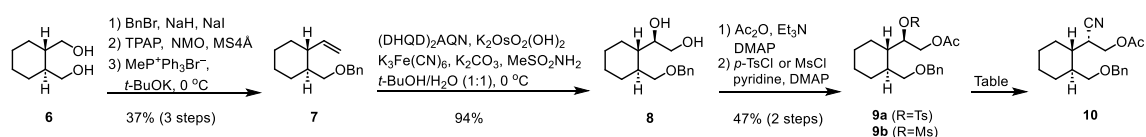
以上のことから、①デカヒドロイソキノリン環 4 位から伸長する置換基の構造を変化させた阻害剤 **5**、②デカヒドロイソキノリン環の窒素原子から伸長する置換基を 1 位に移動した阻害剤 **3**、③デカヒドロイソキノリン環の窒素原子から伸長する置換基に水素結合可能な官能基を導入した阻害剤 **2**、の 3 種類の阻害剤を合成候補化合物として設計した。



## (2) 設計したデカヒドロイソキノリン型阻害剤の合成

### ①デカヒドロイソキノリン環 4 位から伸長する置換基の構造を変化させた阻害剤 **5**

市販の光学活性なシクロヘキサジメタノール (**6**) を出発物質とし、ベンジル基により片側のヒドロキシ基を保護した後、残ったヒドロキシ基を酸化して Wittig 反応で増炭し末端オレフィン **7** とした。オレフィン **7** に対して Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応を行いジオール **8** とした後、ジオール **8** の 1 級ヒドロキシ基を Ac 基で保護し、残った 2 級ヒドロキシ基を脱離基としてシアノ基の導入を試みた。種々の条件を検討したが、低収率または分解となった。低収率の条件も再現性が悪く、この方法を断念することとした。

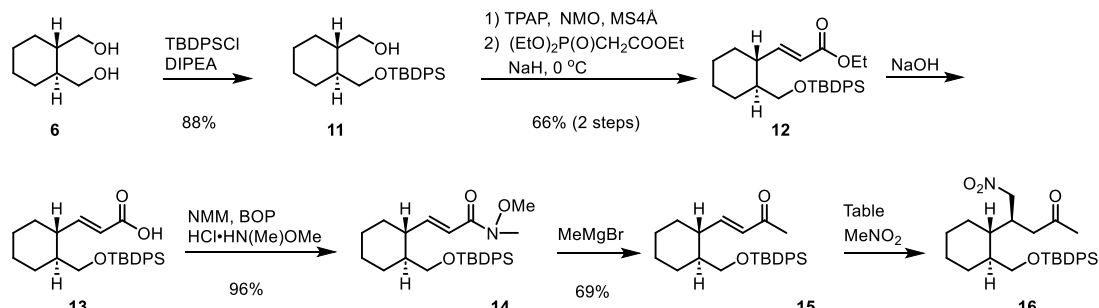


entry	R	conc. (M)	solvent	reagent (eq.)	temp. (°C)	time (h)	yield (%)
1	Ts	0.027	DMSO	KCN (2.0)	90	4	21
2	Ts	0.027	DMSO	KCN (3.2)	90	72	N.D. <sup>a</sup>
3	Ms	0.043	DMSO	KCN (2.0)	90	2	N.D.
4	Ms	0.024	DMSO	KCN (2.0)	40 → 50	24	N.D.
5	Ts	0.5	DMSO	NaCN (2.0)	50	24	33 <sup>b</sup>
6	Ts	0.5	DMSO	NaCN (2.0)	90	4	N.D.
7	Ts	0.5	DMSO	NaCN (2.0)	50	4	N.D.
8	Ts	0.5	DMSO	NaCN (2.0), HMPA (10.0), MS4Å	50	4	N.D.
9	Ts	0.5	DMSO	NaCN (2.0), HMPA (10.0)	50	4	N.D.
10	Ts	0.5	DMSO	NaCN (2.0), 18-crown-6 (10.0)	50	4	N.D.
11	Ts	0.5	DMSO:H <sub>2</sub> O (3:2)	NaCN (2.0), HMPA (10.0)	50	4	N.D.

<sup>a</sup> Not detected, <sup>b</sup> Including inseparable impurities.

次に、同じ出発物質 **6** に対して、TBDPDS 基により片側のヒドロキシ基を保護し **11** とした後、残ったヒドロキシ基を酸化して Horner-Wadsworth-Emmons 反応により  $\alpha, \beta$ -不飽和エステル **12** とした。このエステル **12** に対してマイケル付加によりニトロメチル基の導入を試みたが反応は進行しなかった。

そこで、付加反応の基質をエステル **12** からケトン **15** に変更したところ、ニトロメチル基の導入に成功し高収率で **16** を得る条件を見出した。なお、 $^1\text{H}$  NMR 上ではジアステレオマーの存在は確認できず、選択性も良好であった。現在、この条件を用いて合成を進めている。

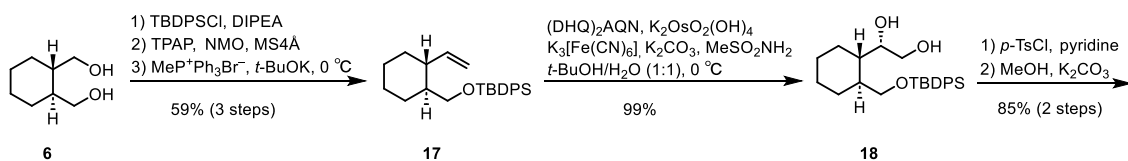


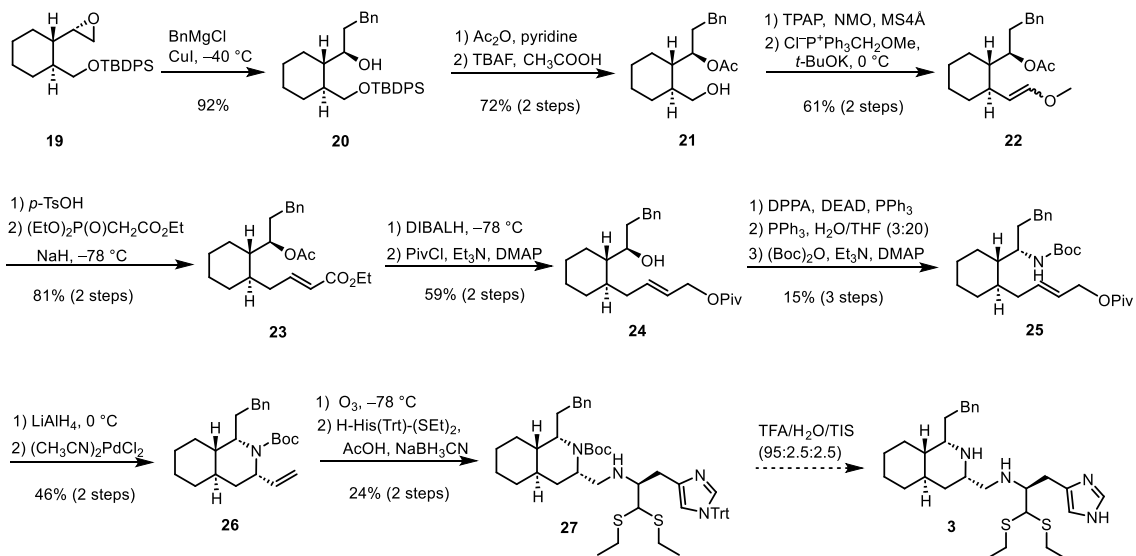
entry	R	conc. (M)	reagent (eq.)	temp. (°C)	time (h)	yield (%)
1	OEt	0.25	TMG (1.0)	0	72	N.R. <sup>a</sup>
2	Me	0.25	TMG (2.6)	0	72	N.D. <sup>b</sup>
3	Me	0.25	TMG (1.0)	0	72	47
4	Me	0.25	TMG (2.0)	0	24	4
5	Me	0.25	TMG (0.2)	0	72	5
6	Me	0.25	TMG (1.0)	50	72	5
7	Me	0.5	TMG (0.2)	r.t.	24	17
8	Me	0.5	TMG (0.2)	0 → 100	24	16
9	Me	0.75	TMG (0.2)	80	35	N.D.
10	Me	0.5	TMG (0.6)	100 → 0	24	56
11	Me	0.25	TMG (0.6)	100	24	95

<sup>a</sup> N.R.: no reaction, <sup>b</sup> N.D.: Not detected

## ②デカヒドロイソキノリン環の窒素原子から伸長する置換基を1位に移動した阻害剤 **3**

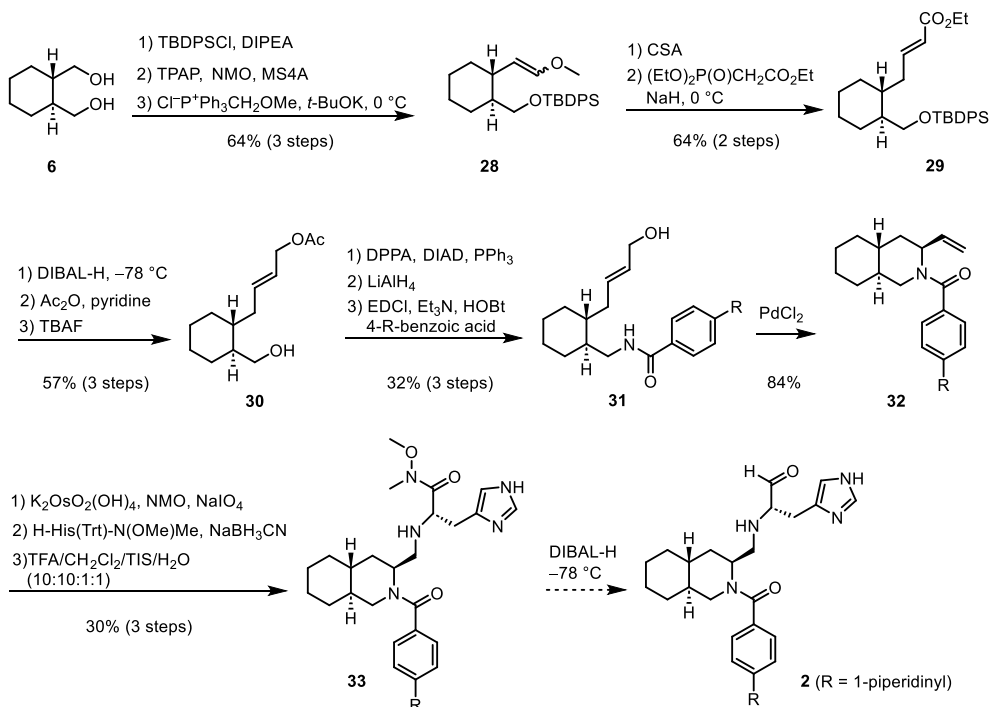
市販の光学活性なシクロヘキサンジメタノール (**6**) を出発物質とし、TBDPDS 基により片側のヒドロキシ基を保護した後、残ったヒドロキシ基を酸化して Wittig 反応で増炭し末端オレフィン **17** とした。オレフィン **17** に対して Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応を行いジオール **18** とした。ジオール **18** の1級ヒドロキシ基をトシル化して塩基処理することでエポキシ化した **19** を得た後、アルキル化することでアルコール **20** とした。アルコール **20** をアセチル化して TBDPDS 基を脱保護することで得られたヒドロキシ基を酸化して増炭することで化合物 **22** とした。メチルビニルエーテルをアルデヒドとし、Horner-Wadsworth-Emmons 反応によりエステル **23** を得た後、DIBAL 還元して得られた1級ヒドロキシ基のみを Piv 基で保護してアルコール **24** とした。残った2級ヒドロキシ基をアジド化して還元し、Boc 基で保護することで化合物 **25** を得た。Piv 基を還元した後、環化することでデカヒドロイソキノリン骨格 **26** の構築に成功した。その後、二重結合をオゾン分解し、還元的アミノ化でヒスチジン部分の導入を行い、Trt 基を脱保護することで阻害剤の前駆体 **27** を得た。





③デカヒドロイソキノリン環の窒素原子から伸長する置換基に水素結合可能な官能基を導入した阻害剤 **2**

市販の光学活性なシクロヘキサジメタノール (**6**) を出発物質とし、TBBDPS 基により片側のヒドロキシ基を保護した後、残ったヒドロキシ基を酸化して Wittig 反応で増炭して **28** を得た。メチルビニルエーテルをアルデヒドとした後、Horner-Wadsworth-Emmons 反応を行いエステル **29** とした。DIBAL 還元して得られたヒドロキシ基をアセチル基で保護した後、TBBDPS 基を脱保護してアルコール **30** とした。アルコール **30** をアジド化した後に還元して得られるアミノ基と種々のカルボン酸 [下図では 4-(1-piperidinyl)benzoic acid] を例に記載] を縮合することで水素結合可能な官能基を有する置換基を導入し環化前駆体 **31** を得た。2 価パラジウム触媒を用いた立体選択的環化反応によりデカヒドロイソキノリン骨格 **32** の構築に成功した。その後、二重結合の酸化的開裂、還元的アミノ化でヒスチジン部分の導入を行い、Trt 基を脱保護することで阻害剤の前駆体 **33** を得た。



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 佐野陽菜、及川慧人、遠藤龍生、照屋健太、服部恭尚、赤路健一、矢野成和、今野博行
2. 発表標題 フタルイミド型SARS-CoV 3CL protease阻害剤の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 板野一就、西脇侑司、島恭平、岸本翔、大西康司、吉澤慎一郎、小林数也、服部恭尚、赤路健一
2. 発表標題 1位を置換したデカヒドロイソキノリンを有する SARS 3CLプロテアーゼ阻害剤の設計と合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部恭尚、吉澤慎一郎、小林数也、赤路健一
2. 発表標題 オキサ-デカリン型SARS 3CLプロテアーゼ阻害剤の設計と合成、阻害活性評価ならびに立体化学
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野陽菜、遠藤龍生、照屋健太、服部恭尚、矢野成和、今野博行
2. 発表標題 SARS-CoV 3CL proteaseを標的としたフタルイミド型阻害剤の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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
研究 分 担 者	今野 博行  (Konno Hiroyuki)  (50325247)	山形大学・大学院理工学研究科・教授   (11501)	

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
---------	---------