

厚生労働科学研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

HIV 侵入動的超分子機構を標的とする
耐性克服型化学療法剤の開発

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤井 信孝

平成15（2003）年4月

目 次

I. 総括研究報告		
HIV 侵入動的超分子機構を標的とする耐性克服型化学療法剤の開発		
藤井 信孝	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 多剤耐性 HIV 型プロテアーゼ阻害剤の合成と非ペプチド化に関する研究		
竹本 佳司	-----	59
2. 合成品の抗 HIV 活性の評価及び作用機序研究		
中島 秀喜	-----	67
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	73
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	79

HIV 侵入動的超分子機構を標的とする耐性克服型化学療法剤の開発

主任研究者 藤井信孝 京都大学大学院薬学研究科教授

分担研究者 大高 章 京都大学大学院薬学研究科助教授

分担研究者 玉村啓和 京都大学大学院薬学研究科講師

分担研究者 竹本佳司 京都大学大学院薬学研究科教授

分担研究者 中島秀喜 聖マリアンナ医科大学医学部教授

分担研究者 黒川 勉 武田薬品工業株式会社戦略研究室室長

研究要旨

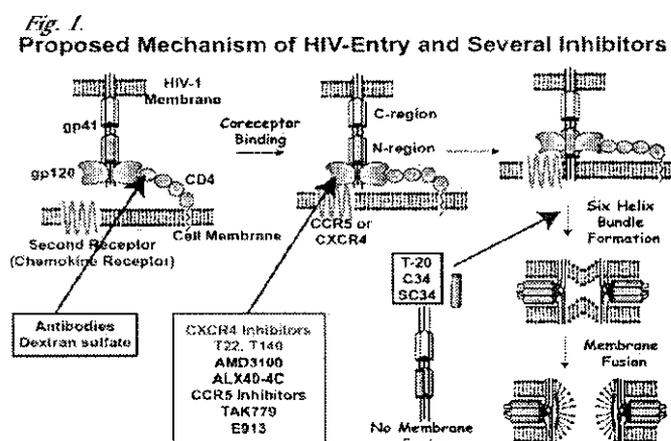
本研究では、作用機序の異なる 2 種類の抗 HIV 剤 (HIV 第二受容体 (CXCR4) 拮抗剤 T140 および gp41 標的膜融合阻害剤 SC34) を基盤分子として設定し、“ペプチドリード医薬品の理論的かつ実践的な開発戦略研究”により蓄積した独創的な合成基盤技術を活用して、多剤耐性型 HIV を克服できる真に有効な化学療法剤の開発を目指した研究を行い、これらの化合物の医薬品としての適合化研究を推進するとともに、多剤耐性型 HIV 株に有効なプロテアーゼ阻害剤の開発研究を実施した。

A. 研究目的

逆転写酵素阻害剤(RTI)、プロテアーゼ阻害剤(PI)のカクテル療法(HAART)を用いるエイズ化学療法が実施されて6年以上が経過した現在、その有効性と問題点が臨床の場で明らかにされつつある。また、グローバルな観点から、多剤耐性型 HIV 株による新たなブレイクスルーがエイズ感染症の拡大・再流行を引き起こすことは、近未来に予測可能な大きな問題点である。この問題に対処するためには RTI および PI の類縁化合物の有効性を検討していくだけでは不十分であり、これらとは異なる作用機序を有する新規な化学療法剤の臨床開発が切望されている。

本研究事業では HIV-侵入の動的超分子機構に焦点を宛てて、我々が見出した 2 種類の鍵物質 (T140 および SC34) を基に、現行の HAART 療法を補完して、多剤耐性克服型のエイズの化学療法の確立に寄与することのできる臨床上有効な抗 HIV 剤の開発を目的にしている (Fig. 1)。

宿主側のケモカイン受容体を標的とする各種薬物のエイズ化学療法剤としての応用には、主要な CCR5-および CXCR4-ケモカイン受容体の機能的損傷に由来する副作用の検討が必須であり、実際に CCR5 および CXCR4 に対する各先行化合物 (SCH-C、AMD3100) は副作用により臨床試験が中断



N. Fujii, et al., Expert Opinion Invest. Drug., 12, 185-195 (2003)
A. Otaka, et al., Angew. Chem. Int. Ed., 41, 2937-2940 (2002)

されている。一方 gp41 を標的とする T20 は RTI, PI-多剤耐性型 HIV 株を標的として臨床の場に提供されたが、すでにこの T20 耐性臨床株の出現と高額医療費が大きな問題となっており、膜由来ペプチドであることからその難溶解性の問題も指摘されている。本事業では、創薬支援技術として定着しつつある X線結晶解析、高分解能 NMR を用いる構造生物学的手法を利用しつつ独自のペプチド・蛋白質化学および非ペプチド化技術を活用してこのような問題点を克服することにより、臨床上有効な HIV-侵入阻害剤を開発し、現行の HAART 療法の革新を計る。

初年度に、1) T140 を範とする生体内安定型誘導体の開発、2) 環状ペプチドを範とする立体配座固定創薬テンプレート概念の活用により低分子リード化合物の発見 (Fig. 2)、3) SC34EK の創出と X線結晶解析等、当初の計画を大幅に上回る研究成果を挙げており、本研究に関連して本年度 2 件の国際特許出願を準備中である。研究を実用化に結びつける可能性は高いと判断している。新規な化学療法剤を導入した HAART 療法の革新は世界の HIV 感染者およびエイズ患者が切望しているものであり、本研究を推進することの意義は大きい (Fig. 3)。

B. 研究方法

研究実施に当たっては下記の研究組織と役割分担で進めたが相互に緊密な研究連絡を行いながら研究を実施した。

分担研究テーマ：

- 1) HIV 第二受容体拮抗剤及び膜融合阻害剤の分子設計と高次評価 (藤井)
- 2) HIV-gp41 蛋白質を標的とする膜融合阻害剤の合成と低分子化 (大高)
- 3) CXCR4 拮抗剤の低分子化、非ペプチド化 (玉村)
- 4) 多剤耐性克服型 HIV プロテアーゼ阻害剤の開発研究 (竹本)
- 5) 合成品の抗 HIV 活性の評価および作用機序研究 (中島)
- 6) 新規抗 HIV 剤の薬物動態、安全性の評価及び工業化研究 (黒川)

具体的には、藤井、大高、玉村は総括研究班として HIV 第二受容体拮抗剤および膜融合阻害剤の創薬展開を目指した研究に取り組み、竹本は多剤耐性克服型 HIV プロテアーゼ阻害剤の開発研究を分担し、中島はこれら一連の化合物の生物活性評価と作用機序の解析を分担した。また一連の化合物の医薬品としての適合化研究を進めるに当たり、企業研究者の立場から黒川の研究協力を得た。本研究の効率化を計るために、研究組織に記載した研究者以外に下記の研究者の研究協力を仰いだ。

Stephen C. Peiper 教授 (Medical College of Georgia, Augusta, 米国)、Tsvee Lapidot 教授 (Weizmann Inst.,

Fig. 2. 環状ペプチドを範とする
立体配座固定創薬テンプレートの活用
(ペプチド・蛋白質から“ドラッグライク”構造への橋渡し)

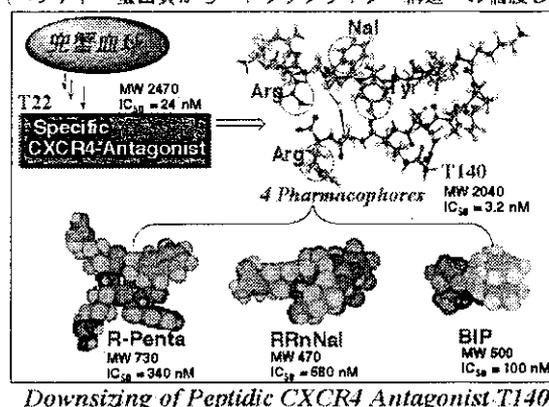


Fig. 3. HIV / AIDS Today

Significant Advances in HIV-therapeutics Have Been Achieved by HAART, but Nobody Has Been Cured Yet.

HIV / AIDS Is Still a Disease That Nobody Wants to Have.

多剤耐性 HIV 株に有効な薬物の開発が今後の課題

イスラエル)、山本直樹教授(東京医科歯科大学)、田中勇悦教授(琉球大学)、松岡雅雄教授(京都大学)、小林祐次教授(大阪大学)、満屋裕明教授(熊本大学)、辻本 元 教授(東京大学)、五十嵐理恵 助教授(聖マリアンナ医科大学)、浜地 格 教授(九州大学)、Renu B. Lal 博士(Centers for Disease Control, CDC, Atlanta)、Jan Burger 博士(Freiburg Univ., ドイツ)、Thomas Kipps 教授(U.C. San Diego, 米国)

初年度において所期の目的を上回る研究成果を挙げることができたので、本年度は当初の年次計画を前倒しして研究を実施した。具体的には、所期の研究目標を確実に達成するために、以下の5点を重点項目とした研究を実施した。

(1) HIV-第二受容体拮抗剤 T140 誘導体の医薬品としての適合化研究、高次評価

感染小動物モデルでの実験が停滞している点が初年度の反省点であるが、初年度において見出した生体内安定型 T140 誘導体、高活性低分子誘導体 CXCR4 antagonist の量的合成と薬物動態に関する検討を実施した上で *in vivo* 高次評価を行い、有効性を検証した。

(2) T140 リード低分子誘導体の開発研究

初年度において環状ペプチドをテンプレートとする T140-pharmacophore の空間的スクリーニング法により T140 に匹敵する高活性誘導体 FC131 の創出に成功した。本年度は本物質の立体構造の解析、CXCR4 とのドッキング研究を推進することにより更なる低分子化合物の分子設計研究/SAR 研究を実施した。

(3) 有機金属試薬の特性を活用したペプチド性抗 HIV 剤の高活性非ペプチド化研究

上述の T140-リード高活性低分子誘導体を基盤分子としてアルケン型ジペプチドイソスターを導入した一連の誘導体を合成し、CXCR4 拮抗活性、抗 HIV 活性について評価した。また、T140 や FC131 の非ペプチド化に関する合成基盤技術の充実にも重点をおいた研究を推進した。

なお、上記項目(1)～(3)で得られた生体内安定型 T140 誘導体は逐次興味を持っていただけの研究者に対して秘密保持契約のもとに試料提供し、CXCR4 の生理的機能の損傷によって予想される副作用の問題点も平行して検証を進めている。

(4) gp41-標的型膜融合阻害剤 SC34EK の *in vivo* 高次評価、低分子化および N-36 リード膜融合阻害剤の創出

初年度において構造生物学および蛋白質化学を駆使した研究から T20 を凌駕する膜融合阻害剤 SC34EK を見出し、N36 との共結晶化にも成功した。Spring 8 により得られた X 線解析の構造情報を基に、更なる低分子誘導体の分子設計研究・SAR 研究を推進した。また同様なコンセプトにより gp41-N-端部(N-36)を基にした *de novo* 分子設計により新規の作用機序を有する膜融合阻害剤の創出を試みた。

(5) 耐性 HIV 型プロテアーゼ阻害剤の合成と非ペプチド化

初年度において二環性異項環化合物の独自の効率的合成法を、HIV プロテアーゼ阻害剤の P2 部位の非ペプチド化に応用して、ヘキサヒドロピラン環を有する強力な HIV プロテアーゼ阻害剤を見出した。本年度は立体選択的合成法、量的合成法を検討するとともに非ペプチド化、多剤耐性型 HIV に対する高次評価を実施した。

C. 研究結果

上記の研究項目の内、項目(1)～(4)は主任研究者(藤井)と分担研究者(大高、玉村)の総括研究班として共同で実施したので総括研究報告書として取りまとめる。また項目(5)は主として竹本が分担し、一連の化合物の活性評価は分担研究者、中島が主として担当したのでそれぞれ分担研究報告書として取りまとめる。

I. HIV 第二受容体拮抗剤 (CXCR4 拮抗剤) の生体内安定型誘導体の開発と低分子化、非ペプチド化を目的とした研究

近年、ケモカイン受容体 CXCR4 に関わる様々な疾患が報告されている。まず、T 細胞指向性 HIV-1 (X4-HIV-1) が T 細胞に侵入する際、CD4 に結合した後に CXCR4 をコレセプターとして使用することが 1996 年に明らかとなった¹⁾。また、2000 年から 2001 年にかけて、肺癌²⁾、メラノーマ³⁾、乳癌⁴⁾等の癌細胞の特定の臓器への転移が、癌細胞膜表面に高度に発現した CXCR4 と転移先臓器から遊離されている内在性のリガンド SDF-1 との相互作用に起因することが明らかとなった。これら以外にも、慢性リウマチ性関節炎の炎症部における CD4⁺メモリー T 細胞の浸潤は CXCR4 と SDF-1 との相互作用によることが指摘されている⁵⁾。それゆえ、CXCR4 アンタゴニストは、これらの疾病に対する新規治療薬として非常に注目を集めている。我々は、カプトガニの生体防御ペプチドである tachyplesin I、polyphemusin II を基に CXCR4 の特異的拮抗剤 T140、TN14003 や TC14012 を見出し⁶⁾、またこれらの T140 誘導体の活性ファルマコフォアを基に低分子誘導体 (環状ペプチド) FC131 を見出している (Figure 1)。本研究では、14 残基のペプチド性化合物である T140 誘導体を基にして、さらに強力な CXCR4 拮抗活性を有し、生体内安定性を向上させた化合物の創製を行うこととした。さらに、FC131 の詳細な構造活性相関研究を実施し、また FC131 のアミド結合の一部に(E)-アルケン型ジペプチドイソスター (EADI) や還元アミド型イソスターを導入し、非ペプチド化について検討することとした。

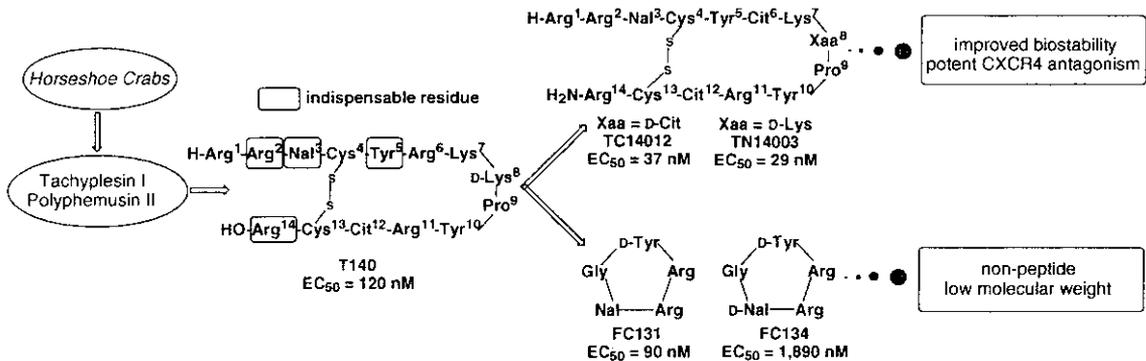


Figure 1. Structures and Anti-HIV Activity of T140 and FC131 Analogs.

[方法・結果]

CXCR4 拮抗活性と生体内安定性の向上した 4F-benzoyl-TE14011-Me の創出

藤井研究室では以前、T140 の C 末端のカルボン酸をアミド型とし、Arg⁶ を Cit (L-citrulline) に置換した誘導体 TN14003、および、さらに TN14003 の D-Lys⁸ を D-Cit に置換した誘導体 TC14012 が T140 よりも強力な CXCR4 拮抗活性および抗 HIV 活性を有することを見出している⁶⁾。この際、強力な CXCR4 拮抗活性および抗 HIV 活性を保持したまま、塩基性残基 Arg⁶ と D-Lys⁸ が変換可能であるという構造活性相関を見出した。また、これらの化合物は T140 に比較してマウスの血清中でより安定であり、かつ毒性が軽減されている。まず本研究では、T140 の C 末端をアミド型にし、6 位と 8 位の残基を中性の Cit と酸性の Glu の組み合わせにより置換した誘導体 TE14011~TE14013 を合成した。これらの化合物の中では TE14011 が前述の TN14003 や TC14012 よりも若干高い抗 HIV 活性を有していた (Table 1)。また、マウスの血清中で全く安定であった。

Table 1. Biological Activities of T140 Derivatives in Two Different Assays.

Compd.	Sequence ^a	EC ₅₀ ratio ^b	EC ₅₀ (nM) ^c		IC ₅₀ (nM) ^d
			No. 1	No. 2	
T140	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH	1	6.6	120	0.90
TN14003	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	1.2		142	N.T.
TC14012	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	0.31		37	N.T.
TE14011	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	0.24	1.6	29	0.46
TE14012	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Glu-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	2.6		17	N.T.
TE14013	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Glu-Lys-DGlu-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	3.8		25	N.T.

^a Each peptide has a disulfide linkage, which is shown by a solid line.

^b EC₅₀ ratio is EC₅₀ of each compound/EC₅₀ of T140.

^c EC₅₀ values are the concentration for 50% protection of HIV-induced cytopathogenicity in MT-4-cells.

^d IC₅₀ values are based on the concentration for 50% inhibition of binding of ¹²⁵I-SDF-1α to CXCR4.

続いて、この TE14011 の生体内安定性をさらに向上させるため、*in vitro* において比較的容易に安定性試験を行うことが可能で、種々の代謝酵素を含むラット肝臓ホモジネートを用いてスクリーニングを行うこととした⁷⁾。TE14011 を肝ホモジネート中 37 °C でインキュベートしたところ、TE14011 の主に N 末端から Arg¹、Arg²、Nal³ (L-3-(2-naphthyl)alanine) の 3 個のアミノ酸の切断が確認され、一部は C 末端から Arg¹⁴ の 1 残基の切断も確認された (Figure 3a)。以前の研究で、T140 を構成する各アミノ酸の Ala 置換により Arg²、Nal³、Tyr⁵、Arg¹⁴ の 4 残基が高い抗 HIV 活性発現に必須のファルマコフォアであることが明らかにされており、TE14011 からこれらのアミノ酸が切断されれば大幅に活性が低下すると考えられる⁸⁾。実際、別途に合成した TE14011 の N 末端の 3 残基を欠く化合物 (des-[Arg¹、Arg²、Nal³]-TE14011) にはほとんど抗 HIV 活性が確認されなかった (EC₅₀ > 2 μM)。

そこで、TE14011 の N 末端からのアミノ酸の切断を抑制するため、N 末端に様々な化学修飾を施した化合物を合成し (Figure 2)、これらの化合物の肝ホモジネート中での挙動を精査した。その結果、TE14011 の N 末端に何らかの化学修飾を加えれば N 末端からの 3 つのアミノ酸の切断が抑制できることが確認されたものの、今度は C 末端の Arg¹⁴ の切断が顕著に確認された (Figure 3b, c)。また、これらの化合物の抗 HIV 活性を評価したところ、4-fluorobenzoic acid を縮合させた 4F-benzoyl-TE14011 の活性が TE14011 と比較して 1 桁上昇していることがわかった (Table 2)。TE14011 に限らず TN14003 や TC14012 の N 末端に 4-fluorobenzoic acid を縮合させても同様の結果となったことから、T140 誘導体の N 末端の 4-fluorobenzoyl 基は新たなファルマコフォアであると判断された。

一方、4F-benzoyl-TE14011 の C 末端の Arg¹⁴ も抗 HIV 活性発現に必須の残基であり、このアミノ酸が切断されれば大幅に活性が低下すると考えられる⁸⁾。実際、別途に合成した C 末端の Arg¹⁴ を欠く des-[Arg¹⁴-NH₂]-4F-benzoyl-TE14011 では 3 桁の活性の低下が確認された (EC₅₀ ratio = 450)。4F-benzoyl-TE14011 の高い抗 HIV 活性を維持させるために Arg¹⁴ の切断を抑制する必要があるため、4F-benzoyl-TE14011 の C 末端にも化学修飾を施した化合物を

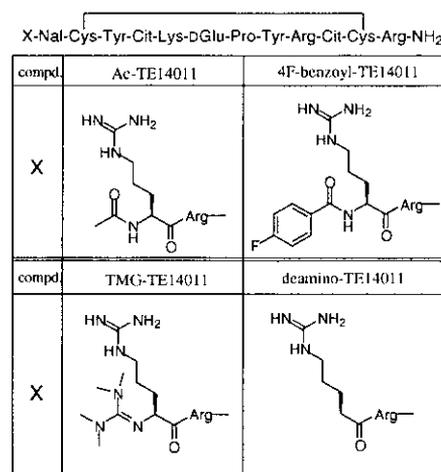


Figure 2. Structures of N-terminal-modified TE14011 Analogs.

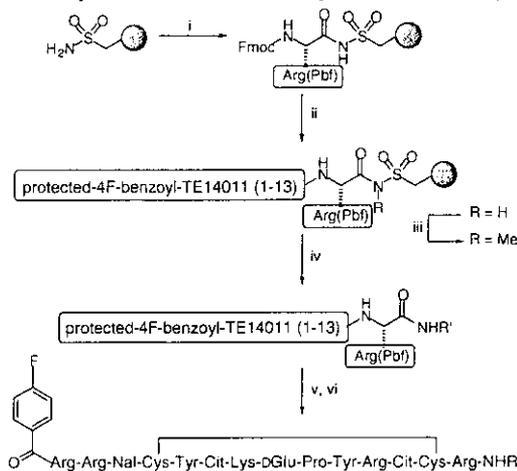
Table 2. Inhibitory Activities of TE14011 Derivatives in Two Different Assays.

Compd.	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
TE14011	40	0.46
Ac-TE14011	28	1.4
4F-benzoyl-TE14011	2.4	1.5
TMG-TE14011	130	N.T.
deamino-TE14011	28	N.T.
4F-benzoyl-TE14011-Me	2.7	1.9
4F-benzoyl-TE14011-Et	6.1	3.0
4F-benzoyl-TE14011-Pr ⁱ	14	3.3
4F-benzoyl-TE14011-Ty	17	2.7

合成した (Scheme 1)。まず、これらの化合物の肝ホモジネート中での挙動を調べたところ、4F-benzoyl-TE14011 の C 末端に何らかの化学修飾を加えれば C 末端からの Arg の切断に抵抗を示すことが確認でき、24 時間インキュベートした後に元の化合物をほぼ定量的に回収した (Figure 3d)。また、これらの化合物の抗 HIV 活性を評価したところ、修飾基がかさ高くなるにつれ活性が低下する傾向が見られたが、メチルアミド化した化合物で 4F-benzoyl-TE14011 とほぼ同程度の高活性を維持していることが確認された (Table 2)。

次に、どのような酵素が TE14011 誘導体を分解するのか精査することとした。aminopeptidase、carboxypeptidase のような exopeptidase に加え、TE14011 の塩基性アミノ酸や芳香族アミノ酸を特異的に認識する可能性のある trypsin、cathepsin、chymotrypsin のような endopeptidase を 1 種類ずつ TE14011 誘導体とインキュベートし、化合物の挙動を調べた。その結果、TE14011 のような N 末端が無保護のペプチドは aminopeptidase により速やかに分解されたのに対して、N 末端をアセチル基や 4-fluorobenzoyl 基で保護した TE14011 誘導体は全く分解されなかった。また、4F-benzoyl-TE14011 のような C 末端がアミド型のペプチドは carboxypeptidase により分解されたのに対して、C 末端をアルキルアミドで保護した誘導体は全く分解されなかった。それゆえ、TE14011 は肝ホモジネートに含まれる aminopeptidase 様酵素と carboxypeptidase 様酵素によって

Scheme 1. Synthesis of C-terminal-N-alkylamidated 4F-benzoyl-TE14011.



Reagents: (i) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, DIPEA, PyBOP; (ii) Fmoc-based SPPS; (iii) TMS-CHN₂; (iv) substituted amine (H₂NR' = methylamine, ethylamine, isopropylamine or tyramine); (v) thioanisole, TFA, *m*-cresol, 1, 2-ethanedithiol; (vi) AcONH₄ buffer pH 7.9.

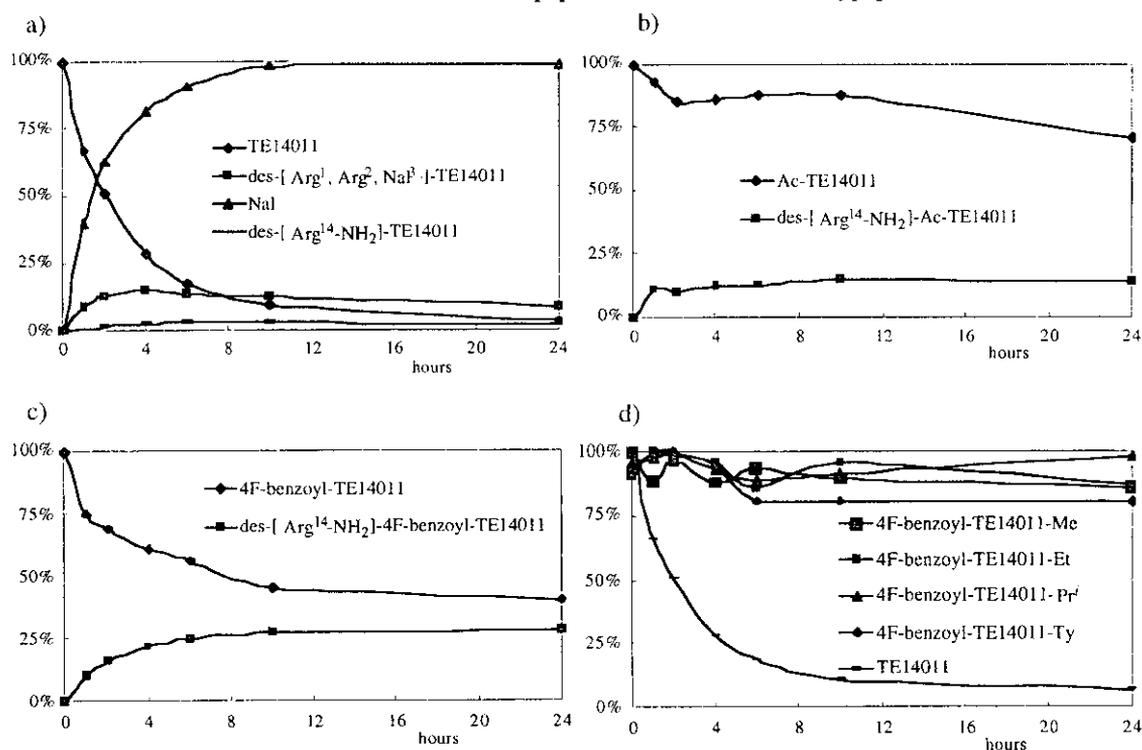


Figure 3. Degradation of TE14011 Derivatives in Rat Liver Homogenate.

(a) TE14011, (b) Ac-TE14011, (c) 4F-benzoyl-TE14011, (d) C-terminal-N-alkylamidated 4F-benzoyl-TE14011; HPLC peak area ratios are shown with the passage of time (0, 1, 2, 4, 6, 10 and 24 hrs).

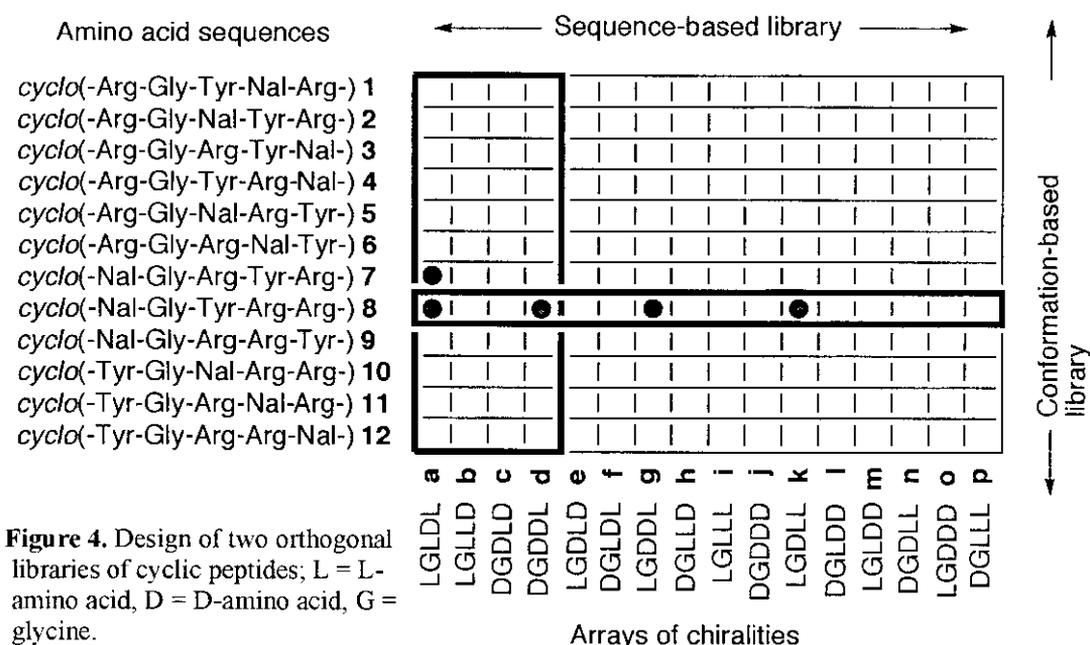
それぞれ N 末端と C 末端から切断されるが、両末端に化学修飾を加えることによりこれらの酵素による分解に抵抗を示したものと判断される。また、全ての TE14011 誘導体は 1 時間以内に endopeptidase により複数の断片に切断された。

新規 Focused Orthogonal Library を活用した高活性 CXCR4 アンタゴニスト T140 の低分子化と FC131 の開発：立体配座固定ペプチドリード創薬テンプレートの応用研究

ケモカイン受容体 CXCR4 は、HIV-1 の宿主細胞への吸着・細胞融合過程に co-receptor として関与することが知られており、CXCR4 を標的とした抗 HIV 剤は HAART 療法における治療薬の選択肢の一つとして非常に有用なものであると考えられている。加えて、近年、癌転移、リウマチ、B 細胞慢性骨髄性白血病等の難治性疾患における重要な役割が指摘されたことから、CXCR4 は創薬標的として大きな注目を集めている。

我々は、これまでに強力な CXCR4 アンタゴニスト活性を有する T140 を見出し (Figure 1)、さらに、T140 のアラニンスキャンを通して、その活性に必須な残基が Arg²、Nal³、Tyr⁵、Arg¹⁴であることを明らかにした。

今回、T140 の低分子化および必須ファルマコフォアの空間配置の同定を目的として、これらの必須残基に Gly を加えた 5 残基からなる環状ペプチドライブラリーを構築し、CXCR4 アンタゴニスト活性及び抗 HIV 活性を評価した。



[結果と考察] アミノ酸の配列とキラリティーの組み合わせにより、192 種類のペプチドからなるライブラリーが考えられるが、我々は、高活性誘導体を効率的に見い出すことを目的として、二つの focused orthogonal library を活用することとした (Figure 4)。

Kessler らは、環状 RGD ペプチド、*cyclo*(-L-Arg-Gly-L-Asp-D-Phe-L-Val-) と *cyclo*(-L-Arg-Gly-L-Asp-L-Phe-D-Val-) がそれぞれ異なる type II' β/γ ターン構造をとることを明らかにしている。我々はこれを基に、*cyclo*(-L-Xaa¹-Gly²-L-Xaa³-D-Xaa⁴-L-Xaa⁵-) と *cyclo*(-L-Xaa¹-Gly²-L-Xaa³-L-Xaa⁴-D-Xaa⁵-)、およびそれらのエナンチオマーである *cyclo*(-D-Xaa¹-Gly²-D-Xaa³-L-Xaa⁴-D-Xaa⁵-) と *cyclo*(-

D-Xaa¹-Gly²-D-Xaa³-D-Xaa⁴-L-Xaa⁵-) の計 4 種類の配列を選び、コンフォメーションを基盤とした 48 種類のペプチドからなるライブラリー (conformation-based library) を構築した。活性評価の結果、高い CXCR4 アンタゴニスト活性及び抗 HIV 活性を有する化合物 **7a**, **8a**, **8d** を見い出すことができた。

Table 3. Anti-HIV activities of T140 and cyclic peptides in the sequence-based library.

compound	IC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	compound	IC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b
T140	0.004	0.060			
8a	0.1-1.0	4.3	8j	1.0 -10	17
8d	0.16	0.28	8k	0.004	0.038
8e	0.1-1.0	20	8l	1.0 -10	>200
8f	0.1-1.0	>200	8m	0.1-1.0	11
8g	0.008	0.11	8n	0.1-1.0	0.76
8h	>10	27	8o	0.1-1.0	8.2
8i	14	2.4	8p	0.1-1.0	4.4

^aIC₅₀ values are based on the inhibition of ¹²⁵I-SDF binding to CXCR4-expressed CHO cells.

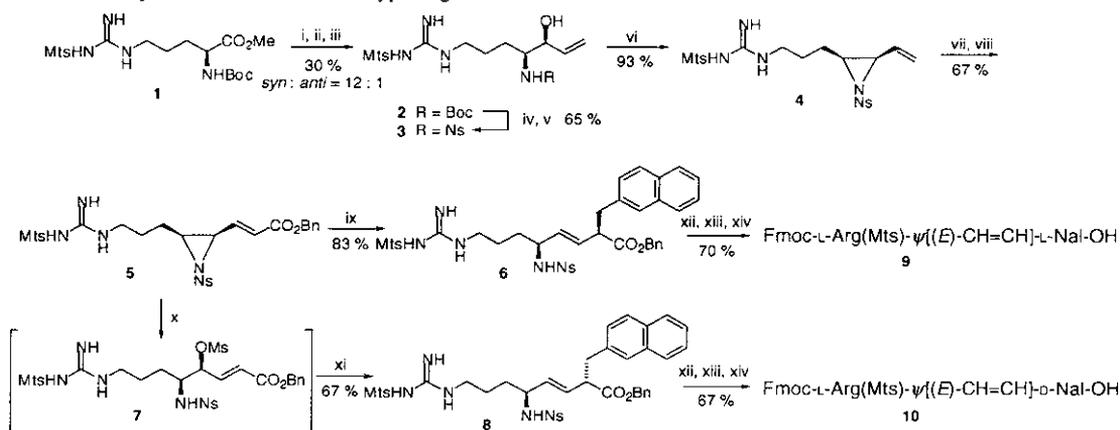
^bEC₅₀ values are based on the inhibition of HIV-induced cytopathogenesis in MT-4 cells.

次に conformation-based library から得られた *cyclo*-(L/D-Nal¹-Gly²-L/D-Tyr³-D-Arg⁴-L-Arg⁵-) **8a**, **8d** に着目し、これらの 2, 4 及び 5 位の残基が共通していることから、Nal¹ 及び Tyr³ についてのエピマー **8f**, **8g** を合成した。その結果、**8g** がより強力な活性を有することを見い出した。そこで、二段階目として *cyclo*-(L/D-Nal¹-Gly²-L/D-Tyr³-L/D-Arg⁴-L/D-Arg⁵-) の配列を基盤として、そのすべての立体異性体 (16 種類) からなる sequence-based library を合成し活性を評価した (Table 3)。その結果、このライブラリーの中から、**8g** の D-Arg⁴ についてのエピマー **8k** (*cyclo*-(L-Nal¹-Gly²-D-Tyr³-L-Arg⁴-L-Arg⁵-) が T140 に匹敵する活性を有することを見い出した (IC₅₀=0.004 μ M)。

Arg-Nal および Nal-Gly イソスターの合成と FC131 への導入

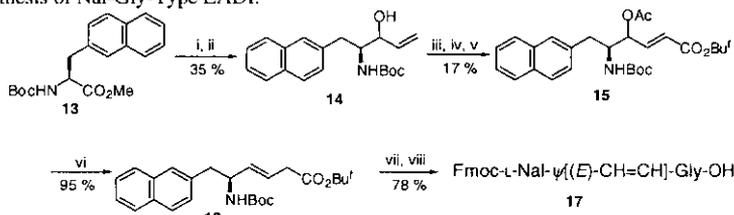
前述の様に、我々は、T140 のファルマコフォアである 4 個のアミノ酸と Gly からなる環状ペプチドライブラリーを構築し、特に(-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-)の配列からなる化合物群に高い CXCR4 拮抗活性を見出している。中でも FC131 (-D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-) は T140 に匹敵する抗 HIV 活性を有している。これにより、T140 を基にした CXCR4 アンタゴニストとしてのペプチド側鎖の最適な空間配置は明らかになったが、アミド結合の活性への寄与は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、FC131 のアミド結合を EADI や還元アミド型イソスターに置き換え、抗 HIV 活性発現に必要なアミド結合を明らかにするため、既知の合成法により合成可能な Arg-Nal および Nal-Gly のイソスターを合成することとした。Boc-L-Arg(Mts)-OMe **1** を原料として、Grignard 反応と Mitsunobu 反応とオゾン分解と Horner-Emmons 反応によりイソスターの主鎖骨格を構築することで *cis*-(*E*)- β -アジリジノ- α,β -不飽和エステル **5** を得た後、これに有機亜鉛銅複合試薬を反応させることにより、立体選択的に LL 型のイソスター **6** を得た。また、合成中間体 **5** のアジリジン環をメタンスルホン酸 (MSA) により立体選択的に開環した後、有機亜鉛銅複合試薬を作用させることにより、立体選択的に LD 型のイソスター **8** を得た。続いて、**6**, **8** の選択的な脱保護と Fmoc 化により、それぞれ目的とする EADI **9**, **10** へと導いた。なお、アリルアルコール **2** の相対配置は、*syn* 体、*anti* 体それぞれに対応するオキサゾリジノン **11**, **12** に誘導し、¹H-NMR の NOE を比較することにより決定した¹⁰⁾。

Scheme 2. Synthesis of L,L- and L,D-type Arg-Nal EADIs .



Reagents: (i) DIBAL-H, toluene, CH_2Cl_2 ; (ii) $\text{CH}_2=\text{CHMgCl}$, THF; (iii) flash column; (iv) anisole, 4 M HCl-Dioxane; (v) Ns-Cl, pyridine, CHCl_3 ; (vi) Ph_3P , DEAD, THF; (vii) O_3 , CH_2Cl_2 , then Me_2S ; (viii) $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bn}$, LiCl, DIPEA, MeCN; (ix) 2-naphthylmethylCu(CN)ZnBr \cdot 2LiCl, THF; (x) MSA, CHCl_3 ; (xi) 2-naphthylmethylCu(CN)ZnBr \cdot BF $_3$, THF; (xii) PhSH, K_2CO_3 , MeCN, DMSO; (xiii) Fmoc-OSu, Et_3N , THF, H_2O ; (xiv) thioanisole, TFA; (xv) NaH, DMF.

Scheme 3. Synthesis of Nal-Gly-Type EADI.

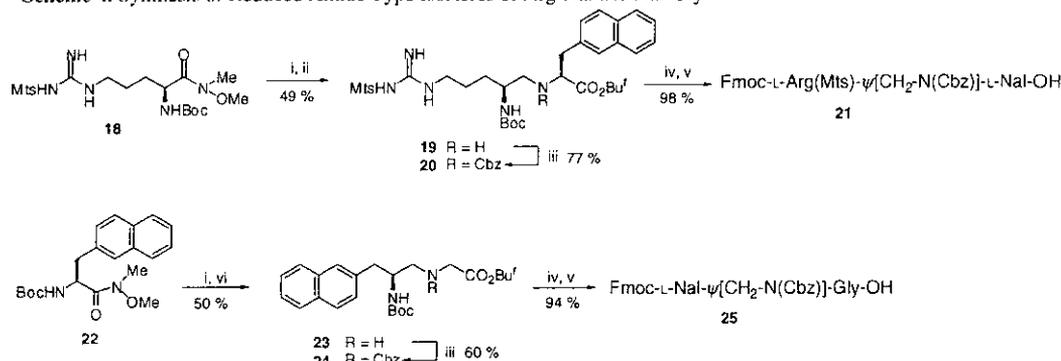


Reagents: (i) DIBAL-H, toluene, CH_2Cl_2 ; (ii) $\text{CH}_2=\text{CHMgCl}$, THF; (iii) Ac_2O , DMAP, pyridine; (iv) O_3 , CH_2Cl_2 then Me_2S ; (v) $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bu}'$, LiCl, DIPEA, MeCN; (vi) SmI_2 , tBuOH , THF; (vii) anisole, TFA; (viii) Fmoc-OSu, Et_3N , THF, H_2O .

次に、L-Nal-Gly 型の EADI の合成を行った (Scheme 3)。まず、Boc-L-Nal-OMe 13 を原料として既知の反応により 5 工程で γ -アセトキシ- α,β -不飽和エステル 15 を合成した。続いて 15 を代表的な 1 電子還元剤である SmI_2 により 16 とし、これを脱 Boc 基、脱 *tert*-ブチルエステルの後、Fmoc 基で再保護することにより目的とする EADI 17 へと導いた。さらに、Arg-Nal および Nal-Gly の還元アミド型イソスターも併せて合成することとした (Scheme 4)。Boc-L-Arg(Mts)-NMe(OMe) 18 を DIBAL 還元後、還元的アミノ化反応により H-L-Nal-OBu' と反応させ、得られた 19 の 2 級アミンを Cbz 基により保護して 20 とし、脱保護と Fmoc 化を行うことにより Arg-Nal 型の還元アミド型イソスター 21 を合成した。また、Nal-Gly 型の還元アミド型イソスター 25 も同様の方法で合成した。

次に、合成したイソスターを環状ペプタペチドに導入した (Scheme 5)。Fmoc 固相合成法により保護ペプチド樹脂 28 を得た後、保護ペプチド鎖 29 を樹脂から切断し、続いてアジド法で環化した後、全保護基の除去を行い、イソスターを含む FC131、FC134 誘導体を得た。

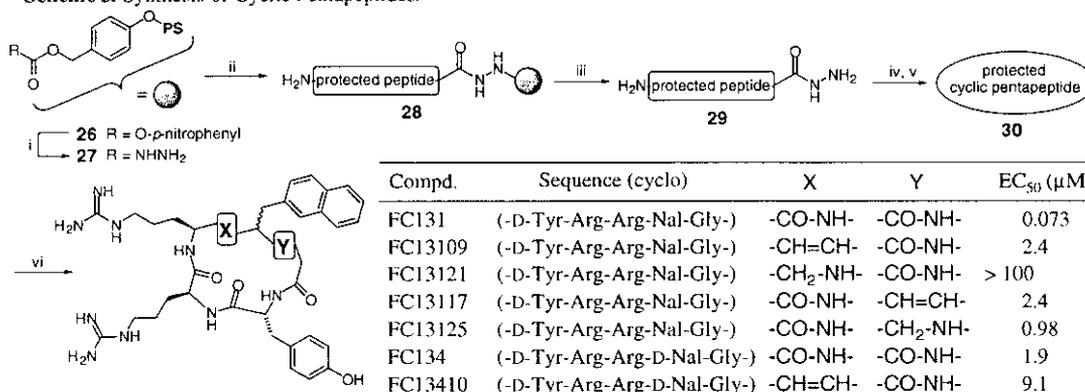
Scheme 4. Synthesis of Reduced Amide Type Isoesters of Arg-Nal and Nal-Gly.



Reagents: (i) DIBAL-H, toluene, CH_2Cl_2 ; (ii) H-Nal-OBu^t, AcOH, NaBH(OAc)₃, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, DMF; (iii) Cbz-Cl, Et₃N, DMF; (iv) anisole, TFA; (v) Fmoc-Osu, Et₃N, THF, H₂O; (vi) H-Gly-OBu^t-AcOH, NaBH(OAc)₃, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, DMF.

最後に、合成した FC131、FC134 誘導体の抗 HIV 活性を評価した。Arg-Nal 間にイソスターを導入した FC13109、FC13121、FC13410 に大幅な活性の低下が確認され、Arg-Nal 間のアミド結合の重要性を検証する結果となった。FC13121 が大幅に低下したのは、アミド結合を還元アミド型にしたことにより Arg-Nal 間の平面性が失われ、ペプチド全体の構造が変化したためだと推定される。また、Nal-Gly 間にイソスターを導入した FC13117、FC13125 は他の誘導体に比べて活性を維持していたものの、同様に Nal-Gly 間のアミド結合の重要性を検証する結果となった。

Scheme 5. Synthesis of Cyclic Pentapeptides.



Reagents: (i) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, DMF; (ii) Fmoc-based SPPS; (iii) 10% TFA, CHCl_3 ; (iv) HCl, isoamylnitrite, DMF; (v) DIPEA, DMF; (vi) TMSBr, thioanisole, TFA, *m*-cresol, 1, 2-ethanedithiol.

[結論]

本研究では、T140 誘導体の生体内安定化を目的とした Lead Optimization により、*in vitro* の安定性試験において安定で、さらに T140 よりも 1 桁高い抗 HIV 活性を有する CXCR4 アンタゴニスト 4F-benzoyl-TE14011-Me の創製に成功した。また、ここで合成したいくつかの誘導体が *in vitro* および *in vivo* の試験において癌転移抑制活性を有することを確認した¹¹⁾。さらに、環状ペプチドを用いる立体配座固定創薬テンプレートを活用して T140 に匹敵する CXCR4 拮抗剤 FC131 を開発し、さらに、FC131 の部分的な非ペプチド化を行うことにより、活性発現におけるアミド結合 (Arg-Nal、Nal-Gly 間) の重要性を明らかにし、今後の非ペプチド化研究に有用な情報を得た。これらの知見は、抗 HIV 剤だけでなく癌転移抑制剤の創製研究にも役立つと思われる。

[実験の部]

4F-benzoyl-TE14011-Me の合成

sulfonamide resin 上、Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4 eq.)、DIPEA (6 eq.)、PyBOP (3 eq.)を加え CHCl₃ 溶媒中、20 °C で 8 時間震盪する操作を 2 回くり返すことで、C 末端の Arg¹⁴ を縮合した。その後は通常の Fmoc 固相合成法により保護ペプチド鎖を構築した。得られた樹脂 (670 mg, 0.09 mmol) に 2 M TMS-CHN₂-ヘキサン溶液 (1.8 mL, 3.6 mmol) を加え、THF (5 mL) 溶媒中で室温、4 時間震盪した。樹脂を THF、DMF、CHCl₃ で洗浄後、2 M メチルアミン-THF 溶液 (4.5 mL, 9.0 mmol) を加え、室温 48 時間震盪した。樹脂を濾去した後、反応液を減圧濃縮し、*m*-cresol : 1, 2-ethanedithiol : thioanisole : TFA = 5 : 5 : 5 : 80 (v/v, 20 mL) で 0 °C、2 時間処理した。反応液を減圧濃縮後、氷冷下でエーテル (30 mL) を加えペプチドを析出させた。ペプチドは遠心分離器で沈澱させエーテルを除去し、この洗浄操作を 3 回くり返した。粗ペプチドを酢酸アンモニウム水溶液 (200 mL) で pH 7.9 に調整後、室温で空気酸化した。HPLC、ゲル濾過により精製し、目的とするペプチド 4F-benzoyl-TE14011-Me (2.6 mg, 1.2 %) を得た。

$[\alpha]_D^{24} - 30.0$ (c 0.10, H₂O); ISMS calcd. for C₉₇H₁₄₁FN₃₂O₂₁S₂, 2174.5, found 2175.0.

ラット肝臓ホモジネート中での安定性試験

PBS (85 mL) にラットの肝臓 (21.4 g) を 0 °C で加えホモジナイズした後、遠心分離器で組織を除き、上清を PBS で 40 % (v/v) に希釈した。TE14011 誘導体 (100 nmol) の PBS 溶液 (100 μL) を 40 %ラット肝臓ホモジネートの PBS 溶液 (100 μL, 内部標準として 0.1 % (v/v) *m*-cresol を含む) と混合させ、37 °C でインキュベートした。0、1、2、4、6、10、24 時間後に各 10 μL サンプルングし、0.1 M 塩酸水溶液 (190 μL) を加えて酵素群を失活させた。ここに 6 M グアニジン塩酸塩-1 M トリス緩衝液 (pH 7.5, 300 μL) を加えてタンパク変性させ、HPLC で親化合物と分解化合物のピーク面積を求めた。この際、内部標準として加えた *m*-cresol のピーク面積によりペプチドのピーク面積を補正した。また、各ピークは ISMS で同定し、主な化合物については別途合成品と HPLC 上打ち合わせるにより確認した。

L-Arg-L-Nal 型 EADI 6 の合成

アルゴン雰囲気下、CuCN (219 mg, 2.5 mmol)、LiCl (207 mg, 4.9 mmol)の無水 THF 溶液 (3 mL) に、-78 °C で 0.5 M 2-naphthylmethyl-ZnBr (4.9 mL, 2.5 mmol) の THF 溶液を滴下し、4 °C に昇温後 15 分間攪拌した。これは α,β-不飽和エステル 5 (273 mg, 0.41 mmol) の無水 THF 溶液 (9 mL) を -78 °C でゆっくり滴下し、30 分攪拌した。TLC で原料の消失を確認後、4 °C に昇温して飽和塩化アンモニウム-28 %アンモニア水の 1 : 1 溶液 (10 mL) とエーテル (10 mL) を加え、室温で攪拌し、青色を呈したところでエーテル抽出した。有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO₄ で乾燥、減圧濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル = 1 : 2) で精製し、6 を油状物質として得た (274 mg, 収率 82.6 %)。

$[\alpha]_D^{33} - 80.9$ (c 0.61, CHCl₃); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 1.30-1.41 (br, 2H), 1.51-1.60 (br, 2H), 2.04 (s, 3H), 2.26 (s, 6H), 2.95-3.00 (br, 2H), 2.95-3.00 (br, 2H), 3.20-3.25 (m, 1H), 3.85-3.95 (br, 1H), 4.93 (s, 2H), 5.24 (dd, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H), 5.50 (dd, *J* = 15.4, 8.4 Hz, 1H), 5.67 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 5.90-6.00 (br, 3H), 6.89 (s, 2H), 7.05-7.28 (m, 7H), 7.42-7.77 (m, 9H), 7.96-8.00 (m, 1H); LRMS (ISMS) *m/z*, 814.0; HRMS (FAB) *m/z*, calcd. for C₄₂H₄₆N₅O₈S₂ (MH⁺), 812.2788, found 812.2803.

L-Arg-D-Nal 型 EADI 8 の合成

アルゴン雰囲気下、CuCN (269 mg, 3.0 mmol) の無水 THF 懸濁液 (4 mL) に、-78 °C で 0.5 M 2-naphthylmethyl-ZnBr (6.0 mL, 3.0 mmol) の THF 溶液を滴下し、4 °C に昇温後 15 分間攪拌した。再び 78 °C に冷却した後、これに γ-メシロキシ-α,β-不飽

和エステル **7** (0.75 mmol) の無水 THF 溶液 (6 mL) を -78 °C でゆっくり滴下し、1 時間攪拌した。TLC で原料の消失を確認後、4 °C に昇温して飽和塩化アンモニウム-28 %アンモニア水の 1 : 1 溶液 (10 mL) とエーテル (10 mL) を加え、室温で攪拌し、青色を呈したところでエーテル抽出した。有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO₄ で乾燥、減圧濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル = 1 : 2) で精製し、**8** を油状物質として得た (408 mg, 収率 67.2%)。[α]_D²⁵ -41.7 (c 0.60, CHCl₃); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 1.47-1.58 (br, 4H), 2.25 (s, 3H), 2.66 (s, 6H), 2.81-2.91 (br, 2H), 2.98-3.06 (m, 2H), 3.15-3.23 (m, 1H), 3.78-3.88 (m, 1H), 4.98 (s, 2H), 5.09 (dd, *J* = 15.5, 8.0 Hz, 1H), 5.49 (dd, *J* = 15.5, 8.2 Hz, 1H), 5.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.00-6.18 (br, 3H), 6.89 (s, 2H), 7.10-7.26 (m, 7H), 7.37-7.76 (m, 9H), 7.95-7.98 (m, 1H); LRMS (ISMS) *m/z*, 814.0; HRMS (FAB) *m/z*, calcd. for C₄₂H₄₆N₅O₈S₂ (MH⁺), 812.2788, found 812.2775.

L-Nal-Gly 型 EADI 16 の合成

アルゴン雰囲気下、Sm (900 mg, 6.0 mmol) の無水 THF 懸濁液 (20 mL) に、室温で CH₂I₂ (322 μL, 4.0 mmol) の無水 THF 溶液 (20 mL) を滴下し、溶液が濃緑色を呈すまで 2 時間攪拌することにより SmI₂ (0.1 M) の無水 THF 溶液を調製した。一方、別の反応容器で、アルゴン雰囲気下、γ-アセトキシ-α,β-不飽和エステル **15** (600 mg, 1.28 mmol) の無水 THF 溶液 (16 mL) に、4 °C で *tert*-BuOH (8 mL, excess) を滴下し、続いて先程調製した SmI₂ の無水 THF 溶液 (38 mL, 3.8 mmol) を滴下し、4 °C で 1 時間攪拌した。TLC で原料の消失を確認後、4 °C で飽和塩化アンモニウム水溶液 (10 mL) とエーテル (10 mL) を加え、室温で攪拌し、黄色を呈したところでエーテル抽出した。有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO₄ で乾燥、減圧濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル = 4 : 1) で精製し、**16** を結晶として得た (530 mg, 収率 95.0%)。

mp 80-82 °C; [α]_D²⁵ 11.0 (c 1.10, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.37 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 2.93 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz), 2.98 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz), 4.48-4.59 (br, 1H), 5.43 (t, 1H, *J* = 11.2 Hz), 5.55 (dd, 1H, *J* = 15.6, 5.6 Hz), 5.61-5.69 (m, 1H), 7.31-7.46 (m, 3H), 7.60-7.62 (br, 1H), 7.74-7.80 (m, 3H); LRMS (ISMS) *m/z*, 412.0; HRMS (FAB) *m/z*, calcd. for C₂₅H₃₄NO₄ (MH⁺), 412.5418, found 412.2491. Anal. Calcd.: C, 72.96; H, 8.08; N, 3.40. Found: C, 73.17; H, 8.17; N, 3.39.

[参考文献]

- 1) Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E.; Berger, E. A. *Science*, **1996**, 272, 872.
- 2) Koshiba, T.; Hosotani, R.; Miyamoto, Y.; Ida, J.; Tsuji, S.; Nakajima, S.; Kawaguchi, M.; Kobayashi, H.; Doi, R.; Hori, T.; Fujii, N.; Imamura, M. *Clin. Cancer Res.*, **2000**, 6, 3530.
- 3) Robledo, M. M.; Bartolomé, R. A.; Longo, N.; Rodríguez-Frade, J. M.; Mellado, M.; Longo, I.; Muijen, G. N. P.; Sánchez-Mateos, P.; Teixidó, J. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 45098.
- 4) Muller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M. E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S. N.; Barrera, J. L.; Mohar, A.; Verástegui, E.; Zlotnik, A. *Nature*, **2001**, 410, 50.
- 5) Nanki, T.; Hayashida, K.; El-Gabalawy, H. S.; Suson, S.; Shi, K.; Girschick, H. J.; Yavuz, S.; Lipsky, P. E. *J. Immunol.*, **2000**, 165, 6590.
- 6) Tamamura, H.; Omagari, A.; Hiramatsu, K.; Gotoh, K.; Kanamoto, T.; Xu, Y.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Hattori, T.; Yamamoto, N.; Nakashima, H.; Otaka, A.; Fujii, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1897.
- 7) Gazal, S.; Geleman, G.; Ziv, O.; Karpov, O.; Litman, P.; Bracha, M.; Afargan, M.; Gilson, C. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1665.
- 8) Tamamura, H.; Omagari, A.; Oishi, S.; Kanamoto, T.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Nakashima, H.; Otaka, A.; Fujii, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 2633.
- 9) Tamamura, H.; Yamashita, M.; Nakajima, Y.; Sakano, K.; Otaka, A.; Fujii, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 2983; Oishi, S.; Tamamura, H.; Yamashita, M.; Odagaki, Y.; Hamanaka, N.; Otaka, A.; Fujii, N. *J. Chem. Soc., Perkin*

Trans. I, **2001**, 2445.

10) Ibuka, T.; Habashita, H.; Otake, A.; Fujii, N. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 4370.

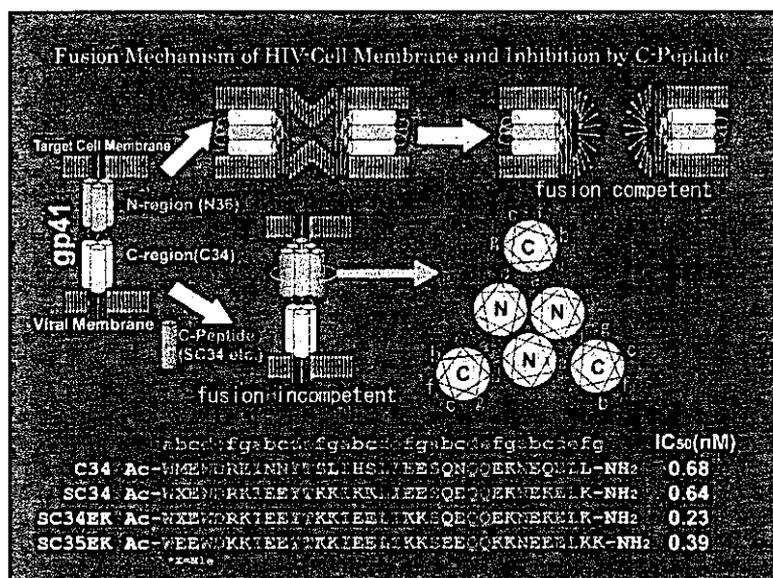
11) Mori, T.; Doi, R.; Masui, T.; Koizumi, M.; Toyoda, E.; Tulachan, S. S.; Ito, D.; Kami, K.; Fujimoto, K.; Hiramatsu, K.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Imamura, M. *J. Biol. Chem.*, submitted.

II. HIV-gp41 蛋白質を標的とする膜融合阻害剤の合成と低分子化

HIV 表面蛋白質の gp120 および gp41 と宿主細胞表面の CD4 および HIV 第二受容体（ケモカイン受容体、CCR5、CXCR4 等）との間の動的超分子機構が、HIV 感染、膜融合に大きく関与することが提唱されている。そこで構造生物学的手法を駆使した解析が精力的に推進されており、新規な抗 HIV 剤開発の格好の標的となっている。実際に本年度より、Trimeris-Roche 社より gp41 標的型膜融合阻害剤、T20 (Pentafuside)が上市され、HAART 療法の経過とともに浮上してきた多剤耐性 HIV 株に対して顕著な薬効を示す薬剤として臨床の場で使用されるようになってきた。しかし T20 の臨床応用に関連して、下記の問題点が指摘されている。

- 1) 水に対する難溶解性
- 2) 耐性株の出現
- 3) 逆転写酵素阻害剤や HIV プロテアーゼ阻害剤に比して極めて高額な治療費

このような状況下、我々は新しい分子設計コンセプトにより SC34EK および SC35EK を創出し、溶解性の問題を克服し、これらの薬物が T20 耐性株にも極めて高い有効性を示すことを明らかにした。さらに、Spring 8 を用いる X線解析等の構造生物学的手法を駆使して、上記の問題点を克服してより有効な HIV-gp41 標的型膜融合阻害剤を開発するために、本年度は下記の研究を実施した。



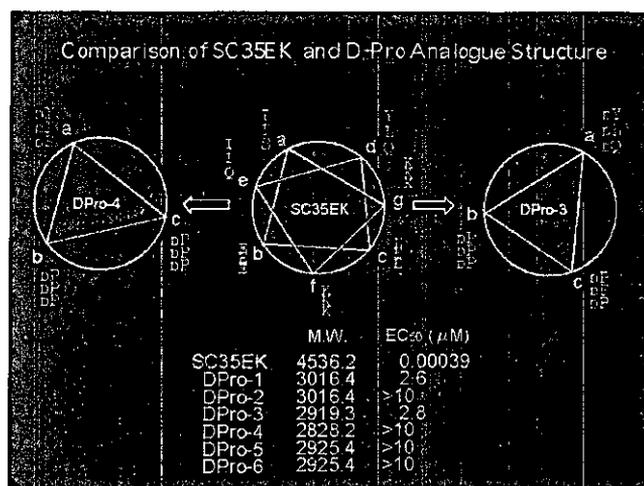
[方法と結果]

1) SC34 の低分子化研究

我々はこれまでに、独自の de novo デザイン概念を用いて HIV の膜融合を阻害する SC34 や SC35EK など gp41 標的型 HIV-cell 融合阻害剤の開発研究を行って来た。本年度はこれらの低分子化を目的として Type II-Pro helix を活用することとした。通常の α -helix は7残基で約10Åの

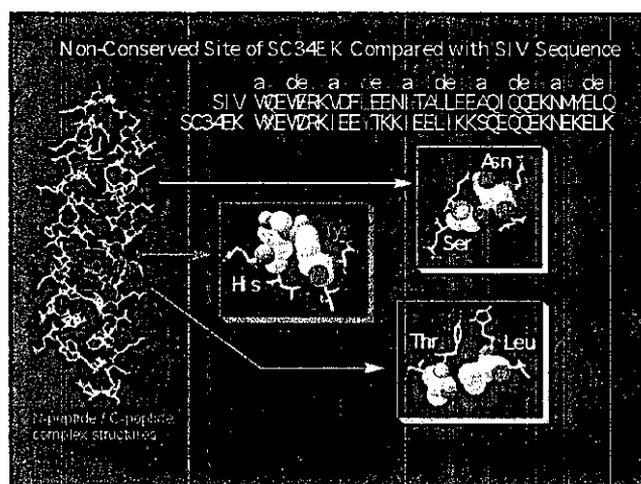
長さを有する。一方、Type II-Pro Helix は3残基で約10 Åの長さとなる。したがって、 α -helical peptideの一部をType II-Pro Helixに置換することにより大幅な低分子化を実現できる。ただし、天然型のL-Proを用いると左巻きhelixとなることから、D-Proを用いることにより、helixの回転方向の調整を行った。

一連の化合物を合成して、抗HIV活性を評価したところD-Pro-1、およびD-Pro-3にmMオーダーの有意な活性を認めた。活性的には十分な値ではないが新たなリード化合物を創出することができた。



2) SC34EK の構造最適化研究

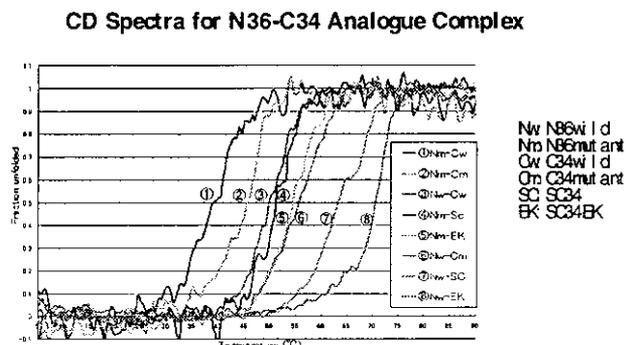
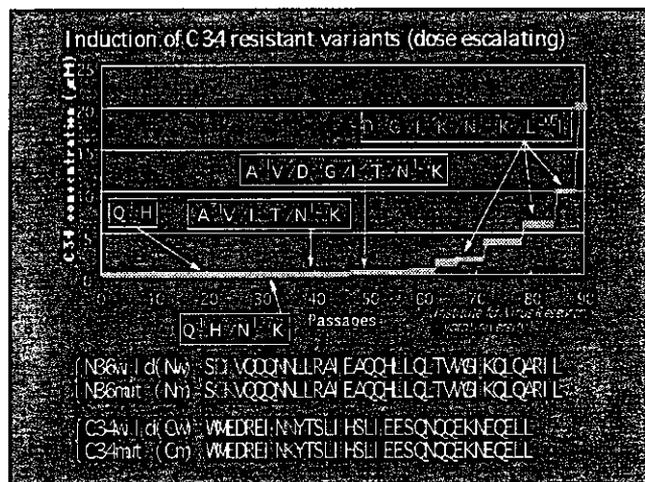
我々はSC34EKおよびN36より形成される6-helical bundle構造体の結晶化に成功し、Spring 8を用いて2.1 Åの解像度でのX線解析図を取得している。本年度はこの解析結果およびP. Kim博士らにより報告されているC34-N36の解析図を参考にして、特にSC34-N36の相互作用部位（インターフェース）における構造解析を行った。またSIV（類人猿免疫不全ウイルス）との配列比較から保存性の低いと考えられる3箇所のアミノ酸（11位—Tyr、12位—Thr、22位—Ser）に置換を加えることとした。コンピューターシミュレーションにより、これらの相互作用部位には空間的な余裕があることが推定されたことから、同系列若しくはより嵩高いアミノ酸に置換した9種類のペプチド（11-Trp体、12-Asn, Leu, Ile体、22-Thr, Asn, Gln, Leu, Ile体）を合成した。これらのペプチドの物理化学的性質および抗HIV活性については現在検討中である。



3) C34 耐性株誘導実験と耐性発現の物理化学的研究

HIVはC34存在下での継代培養により変異を起し、比較的容易に実験的耐性株が出現することが報告されている。共同研究者の京都大学ウイルス研究所の松岡、児玉両博士らは耐性株の出現とそのアミノ酸置換様式に関する詳細な検討を行っている。特に変異株のgp41領域でのア

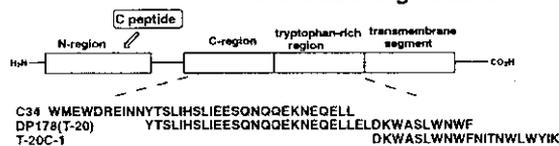
ミノ酸置換様式に関して、耐性獲得に伴う置換様式の推移等に対しても詳細な解析を行っている。我々は、この変異株に対応する C34 および N36 ペプチドを合成し、CD スペクトルを用いて、耐性変異による 6-helical bundle 構造の安定性の変化に関して精査した。その結果、耐性獲得と 6-helical bundle 構造の形成能との間に有意な相関関係が有ることを明らかにした。また我々が見いだした SC34EK は C34 耐性株に対しても低濃度で高い感受性を有することを明らかにした。



4) HIV 膜融合における clustering inhibitor の合成

HIV と標的細胞との膜融合は、エンベロップ蛋白質の一つである gp41 構造変化とこれに引き続いて起こる 6-helical bundle 形成と bundle 体のオリゴマー化によって進行すると考えられている。藤井研究室で開発された SC34 等の C34 誘導体は gp41 の N 領域に結合し、6-helical bundle 構造の形成を妨げることににより活性を発現する。これに対して、C34 の C 端の 23 残基と Trp-rich sequence を含む T20 は、C34 と同様の作用の以外に、先述の bundle 体のオリゴマー化阻害作用を有し、これが抗 HIV 活性に関係していることがいくつかの研究により示唆されている。

De Novo Design Concepts of the Clustering Inhibitor



Introduce the XEEXXKK motif structure

- Promote α -helix formation by forming intramolecular salt bridges
- Enhance solubility to aqueous solvent
- Present the X residues at appropriate positions to examine necessary residues



Anti-HIV Activities of Synthesis Peptides

Peptide	Sequence	EC ₅₀ (μ M)
T-20C-1	Ac-DKWASLWNWFNITNWLWYIK-NH ₂	1.7
T-20C-2	Ac-EEWAKKWEEFNKKNEEWYKK-NH ₂	>10
T-20C-3	Ac-DEEASKKNEENIKKWEEYIK-NH ₂	>10
T-20C-4	Ac-KKEESLKKWEEIKKLEEIK-NH ₂	3.1
T-20C-5	Ac-KKWEELWKKFEETNKKWEEK-NH ₂	2.7
T-20C-6	Ac-DKKAEEWNKKNEENWKKYEE-NH ₂	4.6
T-20C-7	Ac-DKKKSEENWKKIEEWLKKIE-NH ₂	>10
T-20C-8	Ac-EKWKKLEEWFKKTEELWKKK-NH ₂	>10

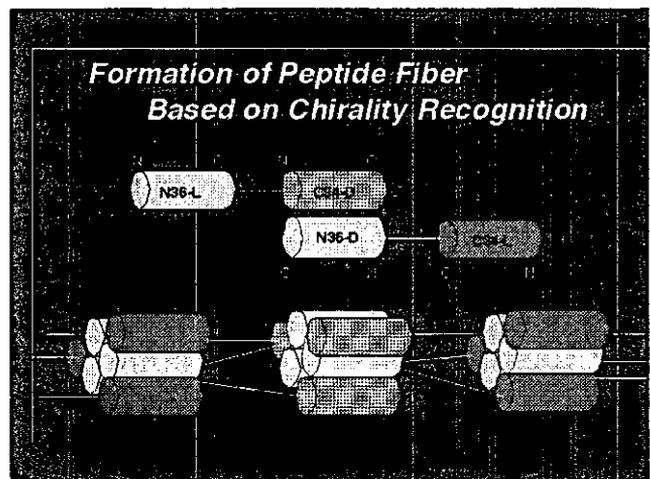
そこで、本研究では clustering inhibitor (オリゴマー化阻害剤) としての Trp-rich sequence に着目した。この配列は膜近傍において α -helix を形成すると考えられている。そこで、オリゴマー化阻害に必須な残基の同定を行うべく、 α -helix 形成作用を有する XEEXXKK motif を利用し、前述の配列をスキャンした。その結果、抗 HIV 活性を持つ新規のペプチド (T-20C-4,5,6) を見出した。今後は高活性化並びに作用機序の解明を行う予定である。

5) 6-helical bundle 構造を利用した fiber の de novo design

先述のように標的細胞との膜融合の際に、gp41 に由来する N36 と C34 (SC34) は 6-helical bundle を形成する。もちろん自然界において N36、C34 を構成するアミノ酸は L 体であるが、これらの両方が D 体で構成されていても同様に 6-helical bundle 構造をとると考えられる。一方、L 体の N36 と D 体の C34 あるいは L 体の C34 と D 体の N36 はその chirality が異なるため、相互作用しないと推測される。すなわち、L 体の N36 と D 体の C34、D 体の N36 と L 体の C34 を結合させたペプチドを合成し、混合することにより、peptide fiber を作成できるのではないかと考えた。

N36(L)-SC34(D)、N36(D)-SC34(L)はチオエステルを用いた cysteine ligation 法により調製した。さらに、この 2 つのペプチドを混合し、fiber 形成を原子間力顕微鏡で解析した。

今後は、ここで得られた Fiber の構造的な特性に関して詳細に解析し、エイズ化学療法剤としての活用も視野に入れた研究展開を行う予定である。



[考察]

前年度の SC34EK および SC35EK の開発研究を基盤にして、Type II-Pro Helix を活用した低分子化研究、Clustering Inhibitor という新概念での抗 HIV 剤の分子設計、合成研究を通じて、mM オーダーの一連の新規リード化合物を創出した。これらの化合物は活性的には未だ不十分であるが、更なる活性増強により、今後の創薬展開が可能であると判断される。特に、C34 耐性株の誘導実験で得られた知見は今後の構造活性相関研究に極めて有益である。SC34EK-N36 の特異的な分子認識、分子集合を利用した 6-helical bundle 構造を有する fiber 形成は新素材、とりわけ、HIV -1 ウイルスの吸着除去等への展開が可能であり、今後、構造有機化学レベルでの精密な構造確認の基にナノテクを活用して臨床応用を目指す。

III. ペプチド性 CXCR4 拮抗剤の非ペプチド化に関する合成基盤の整備研究

III-I. (Z)-アルケン型ジペプチドイソスターを構成単位とするジケトピペラジンミメティクスの合成研究

T140 の低分子化、非ペプチド化研究の一環として環状ペプチドを範とする立体配座固定創薬テンプレートの創出に関する研究を行った。前年度までに、ペプチドミメティクスの一種である(E)-アルケン型ジペプチドイソスター (EADI) による局所立体配座固定法を、インテグリン $\alpha_3\beta_3$ アンタゴニストに代表される環状ペプチドに応用し、これらに関する構造活性相関研究を行っている¹。一方、2,5-ジケトピペラジン (DKP) は、環状ペプチドの最小単位であり、この高度に規制された骨格は、数多くの生理活性化合物の共通構造モチーフとして見出されている² (Figure 1)。こうしたことから DKP 骨格は、創薬研究におけるリード化合

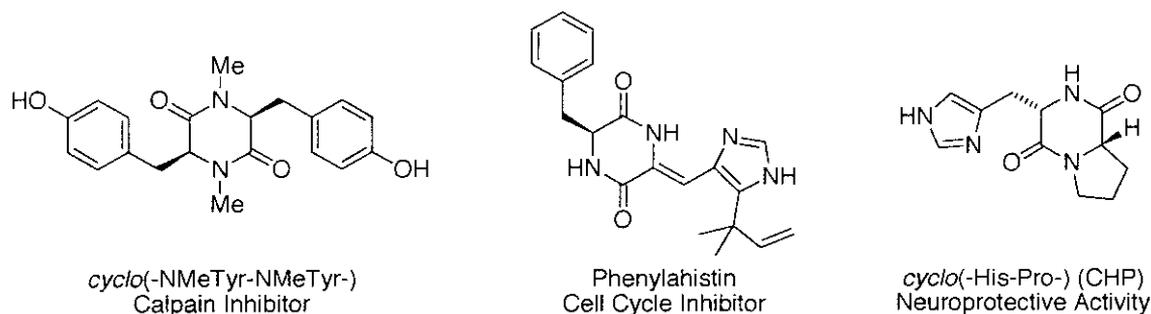


Figure 1. Bioactive compounds containing 2,5-diketopiperazine structure

物の探索において、適切な部位へと官能基を配置するための母核構造、すなわち創薬テンプレートとして活用されている³。本研究では、DKP 骨格のアミド結合の一つを、構造的に類似した(Z)型アルケンに置換することで、非ペプチド化及びさらなる立体配座固定を行うことにより、新規の創薬テンプレートとしての DKP ミメティクスを創製できるのではないかと考えた (Figure 2)。

DKP ミメティクスの合成を計画する際、最も重要となるのは、如何にして側鎖のキラリティーを制御しながら(Z)型アルケンを構築するか、という点である。1998 年、Guibé らは、キラルアミノ酸より誘導したアリルアミンと、不斉アルキル化を利用して得たキラルな α -アルキルビニル酢酸を縮合した後、ルテニウム触媒による閉環オレフィンメタセシス (RCM) 反応を行うことにより、DKP ミメティクスを得る合成経路を報告した⁴。しかしながら、このような収束型合成法は、リード化合物探索において必要となる効率的なライブラリー構築に応用するには不適である。そこで我々は、迅速なライブラリー構築にも適用可能な、 α -アミノ酸を出発原料とする DKP ミメティクスの新規立体選択的合成法の確立を目的として、本研究に着手した。

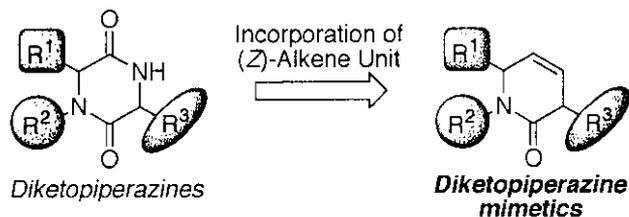


Figure 2. Design of diketopiperazine mimetics

【結果・考察】

(1) 合成戦略 (Scheme 1)