

2004 00854A

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

課題番号 H16-創薬-006

HIV融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

平成17年3月

主任研究者 松岡 雅雄

(京都大学ウイルス研究所・教授)

目 次

I. 総括研究報告	
HIV融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の 開発に関する研究	----- 1
主任研究者・松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 主任研究者・松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授） 分担研究者・児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助手）	----- 4
2. 分担研究者・藤井信孝（京都大学薬学研究科・教授） 分担研究者・大高 章（京都大学薬学研究科・助教授）	----- 7
3. 分担研究者・千葉卓男（秋田工業高等専門学校・教授）	----- 30
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 36

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

研究要旨

複数の抗 HIV 剤を組み合わせた、highly active antiretroviral therapy (HAART) 療法は HIV 感染者の予後、quality of life を著しく改善した。しかし、HAART によっても HIV の駆逐は不可能であり長期に亘る抗 HIV 剤の服用によって耐性 HIV の出現が避けられず、その克服が求められている。そのためには新規標的に対する抗 HIV 剤の開発が有効であり、我々は HIV-融合 (fusion) 過程を標的とする薬剤の開発を目指し研究を行っている。初年度である本年度は、小分子化合物として2つの母核を見出し、ペプチド小分子化 (サイズを約 2/3 に縮小させた SC22EK) と非ペプチド化 (イソスター化) に成功し、さらに測定法の確立、耐性機序の解明といった新薬開発に必要な基礎的研究成果を得た。

分担研究者氏名・所属機関名及び
所属機関における職名：

藤井信孝 (京都大学薬学研究科・教授)
千葉卓男 (秋田工業高等専門学校・教授)
大高 章 (京都大学薬学研究科・助教授)
児玉栄一 (京都大学ウイルス研究所・助手)

A. 研究目的

エイズは HIV の感染によって引き起こされる難治性感染症であり、致死性であったが、現在は多剤併用療法の著しい効果によりコントロール可能な疾患へと変貌しつつある。しかし、HIV は多剤併用治療中でもわずかながらの複製を繰り返し、長期に亘る治療に伴い、薬剤耐性を獲得することが報告されている。この治療上最大の問題を解決するためには、耐性ウイルスに有効な新規の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤を開発するというだけでなく、新しい分子標的に対する薬剤の開発が必要不可欠である。

我々の研究グループは HIV 外皮蛋白質 gp41 によって引き起こされる細胞・HIV 膜融合 (fusion) を新しい分子標的として新規阻害剤の開発を試みている。HIV gp41 に由来するペプチド T-20 は現在 fusion を標的とした阻害剤として、米国等で臨床応用され大きな効果を持っている。しかし、T-20 は治療費の大幅な増加という問題があり、より安価で強い活性を持つペプチドの開発が必要である。一方でペプチド製剤は経皮投与に限られるという欠点を有

しており、経口投与可能な融合阻害活性を有する小分子化合物の開発は最重要課題である。

本研究の目的として未だ解明が進んでいない HIV 細胞融合の分子機序を明らかにし新薬開発のための分子基盤を確立する。具体的には以下の点を目指とする。1) 分担研究者、千葉によって合成された小分子化合物の抗 HIV 活性を検討し、その作用機序を明らかにする。2) 分担研究者、藤井、大高らによって合成された融合阻害ペプチドの活性を解析する。3) 現時点までに同定した有効な融合阻害剤に対する耐性ウイルスを誘導し、その性状を明らかとする。gp41 をターゲットにした新規抗 HIV 剤の開発は耐性ウイルス克服に有効であるばかりでなく HAART 療法の強化、感染予防薬としての可能性をも有するものと期待される。

本年度は、千葉によって小分子リード化合物の創薬、藤井・大高によるペプチドの小型化、非ペプチド化、松岡・児玉による簡便な抗ウイルス効果スクリーニング法の確立と耐性機序の解明を行った。

B. 研究方法

1) 小分子リード化合物の創薬

抗菌剤であるサルファ剤、カルバモイルアミノ酸、ナフトレンスルホン酸、ベンズイミダゾール、アマンタジンを出発原料としてそれぞれの化合物に含まれる官能基の性質を有効に利用して各種誘導体を化学合成した。

2) ペプチドの小分子化

C34 誘導体である SC35EK を用いてペプチ

ドの小分子化を試みた。X線解析からこれらのC末側はN36との結合が強固ではないと考えられたため、このC末側を欠失させたペプチドを合成した。

3) 融合阻害ペプチドの非ペプチド化

ペプチドのうち結合面以外の部位を非ペプチド化し、効果増強を試みた。SC34EKではEEもしくはKK配列はN末側との結合に直接関与しないため、この配列をD-ornithineや(E)-alkene dipeptideを用いた生体内安定型イソスターへの置換を検討した。この際、 α -helix構造が十分保たれる部位にこれらを置換した。

4) C34耐性ウイルスの解析

C34耐性ウイルスをdose escalating法によって誘導した。誘導されたウイルスのenv領域の塩基配列を決定し、変異部位を同定した。同定した変異を感染性クローン、pNL4-3に導入し、それらのC34感受性をMAGI (multinuclear activation of the β -galactosidase indicator)法で決定した。ウイルスの複製能はHIV-p24抗原産生量およびcompetitive HIV replication assayによって決定した。

5) HIV細胞融合の非感染系モデルの確立

HIV融合に重要な働きをするgp41領域のN-terminus heptad repeat (N-HR: N36)とC-HR (C34)を、大腸菌を用いてそれぞれMBPとGSTの融合蛋白として生成し、affinity columnを用いて精製した。ELISA用96ウエルプレートにGST-C34を固層化したのちBSAを用いてブロッキングを行った。固層化されたGST-C34にMBP-N36を反応させ、GST-C34に結合したMBP-N36を抗MBP抗体によって検出した。

6) 低分子およびペプチド性膜融合阻害剤の活性測定

分担研究者、藤井、千葉、大高らによって合成された種々の化合物の抗HIV活性は主にMAGI法にて検討した。

(倫理面への配慮)

基礎研究のみであり、倫理面に対する配慮は特に必要ないと判断した。

C/D. 研究結果と考察

1) 小分子化合物の活性

サルファー剤、ナフタレンスルホン酸を原料として合成展開した薬剤に抗HIV活性を有するものを見出した。サルファー剤にD-フェニルアラニンとL-イソロイシンを導入した薬剤が効果を示した (EC50 4.4 μ g/ml)。この結果から抗HIV活性を維持するためにはスルフ

ォニルイソロイシン構造が必要であることが判明した。今後活性向上のためにアセトアセチル基部位のアミノ酸の種類を変更することが必要であると考えられた。一方、ナフタレンスルホン酸誘導体ではEC50 0.24 μ g/mlと効果を示すものが合成できた。しかし、この誘導体はアゾ色素の構造を有しているため、副作用の低減のため、何らかの化学修飾が必要であると考えられた。これらすべての薬剤は分子量が1000以下であり、経口吸収の可能性を示唆した。他の薬剤を原料とした誘導体では抗HIV活性は見出せなかったが、今後、化学修飾を変更し活性の向上を図る予定である。

2) ペプチドの小分子化

SC35EKのC末端側はN-HRの中心的な部位と直接関与しないため、SC34EKのC末端側を6および13残基を除去したSC29EKとSC22EKを合成し、その活性を測定した。SC22EKは活性が低下したが、SC29EKはSC35EKとほぼ同等の効果を示した。SC35EKの基本となったC34からC末端側を除去するとその効果は100分の1にまで低下するが、その理由としてC34のC末側に α -helix構造を安定化させる構造があるため、C末端側を除去(C28)すると α -helix構造が非常に不安定になると考えられる。しかし、この α -helix構造を安定化させるために導入したEE-KK配列はこの構造を安定化し、活性を維持できたと考えられた。

3) 非ペプチド化による活性の影響

SC29EKの結合面でないアミノ酸EEまたはKKをイソスターで置換し、その効果を検討した。D-ornithineを用いた置換体では抗HIV活性が1/100以下に低下した。そのため、D-ornithineの代わりに(E)-alkeneを導入したが、活性は回復しなかった。置換はC末側に入れたほうが活性の低下が少なかったことからSC29EK配列の中でN末側に重要な部位があることを示唆していると考えられた。

4) C34耐性ウイルスの解析

C34耐性ウイルスのgp120にはアミノ酸欠失、gp41にはアミノ酸変異が認められた。gp41の3個の変異が耐性化に、3個は複製能の向上に関与しており、gp120の欠失は耐性及び複製能の両方に関与していた。耐性機序としてN-HR変異によるC34との結合力低下、C-HR変異による変異型N-HRとの結合力増加が考えられた。複製能回復変異における塩基置換は、Rev responsive element (RRE)領域中に存在し、耐性責任変異によって変化したRREの2次構造を補正していた。さらにgp41コード領域は

RREのみならず、tat や rev の一部をコードしていることから、HIV は変異を容易に導入することはできないと推測された。また、gp41 で検出された全ての変異位置は、gp41 結晶構造から C-HR と 3 量体 N-HR の結合表面に存在していないため N-HR と C-HR の結合表面に直接作用する薬剤は N-、C-HR の結合をより強く阻害することが考えられることから、融合をより効率的に阻害する可能性があることを示唆した。これらの結果は、HIV-1 の融合が化学療法における有効な標的の一つであることを示唆している。

5) HIV 細胞融合の非感染系モデルの確立

簡便かつ迅速に HIV 細胞融合活性を検出するために ELISA によって gp41 の N-および C-HR 結合を検出する方法を確立した。この方法において T-20 以外の融合阻害ペプチドの抗 HIV 活性を細胞とウイルスを用いた測定法と比べてほぼ同レベルで測定することが可能であった。そのため、MBP-N36 の長さを改変し、T-20 の結合部位を検討した。N36 を C 末側に延長した融合蛋白を用いると弱いながら T-20 の活性を測定できた。現在、これらの融合蛋白の精製度を向上させ、活性の高感度検出を試みている。T-20 の活性は現在のところ他の研究グループも含めて感染性 HIV を用いたアッセイ系でしか測定することに成功していないが、ペプチドの長さを改変することで測定が可能になったということは、これまで提唱されてきた T-20 の作用機序とは異なった作用機序を T-20 が有している可能性がある。この機序を今後解明することによって融合機序のうち解明されていない点を明らかにすること、および新規融合阻害剤の分子設計に重要な情報を提供すると考えられた。

E. 結論

本年度作製した小分子化合物の中ではサルファー剤誘導体とナフタレンスルホン酸誘導体に抗 HIV 活性が認められた。ペプチドの小分子化では SC35EK 誘導体から、13 アミノ酸を欠失させた SC22EK が活性を維持することが明らかとなった。これらのペプチドを非ペプチド化（イソスター化）したところ、活性は低下したが、活性を有するものの合成に成功した。C34 耐性 HIV の解析から融合に重要な役割をするアミノ酸を同定した。また、その耐性変異は複製能とバランスをとりながら導入され、容易には耐性化できないことを明らかとした。ELISA を応用することで HIV-融合を非感

染系で検討できるアッセイ法を樹立した。初年度である本年度では、小分子化合物の母核の同定、ペプチド小分子化と非ペプチド化の足がかりがつかめ、測定法の確立、耐性機序の解明といった新薬開発に必要な基礎的研究成果を得ることが可能であった。来年度以降、これらの結果を踏まえて融合阻害剤の開発を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

別添

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
分担研究者：京都大学ウイルス研究所 児玉 栄一

研究要旨

新規薬剤標的である HIV-細胞融合を阻害するペプチド、C34 に対して耐性化するためにはアミノ酸変異の蓄積が必要であることから HIV は融合阻害剤に対し容易には耐性化できないことを明らかとし、HIV-細胞融合阻害剤の有用性を示した。また、新規薬剤を迅速にかつ安全にスクリーニングするために ELISA 法を応用したアッセイ系を樹立した。これらの結果を踏まえて薬剤耐性 HIV の克服を目指す。

A. 研究目的

不治の病と考えられたエイズは、多剤併用療法の著しい効果によりコントロール可能な疾患へと変貌しつつあるが、未だ耐性ウイルスの克服という最大の問題は未解決のままである。このため HIV 感染症の治療には耐性ウイルスに有効な新規の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発だけでなく新しい分子標的に対する薬剤の開発が依然必要不可欠である。

HIV 外皮蛋白質 gp41 に由来するペプチド T-20 は融合阻害により抗 HIV 活性を有しており現在、米国等で臨床応用され大きな効果を上げている。しかし、T-20 は高価なため治療費の大幅な増加という問題があり、より安価で強い活性を持つペプチドの開発が必要である。一方でペプチド製剤は経皮投与に限られるという欠点を有しており、経口投与可能な融合阻害活性を有する小分子化合物の開発は最重要課題である。

本研究目的として未だ解明が進んでいない HIV 細胞融合の分子機序を明らかにし新薬開発のための分子基盤を確立する。具体的には以下の点を目指とする。1) 分担研究者、千葉によって合成された小分子化合物の抗 HIV 活性を測定し、その作用機序を明らかにする。2) 分担研究者、藤井、大高らによって合成された融合阻害ペプチドの活性を測定する。3) 現時点までに同定した有効な融合阻害剤に対する耐性ウイルスを誘導し、その性状を明らかとする。gp41 をターゲットにした新規抗 HIV 剤の開発は耐性ウイルス克服に有効であるばかりでなく HAART 療法の強化、感染予防薬としての可能性をも有するものと期待される。

B. 研究方法

1) C34 耐性ウイルスの解析

C34 耐性ウイルスを NL4-3 株を用いた dose escalating 法によって誘導した。誘導されたウイルスの env 領域の塩基配列を決定し、変異部位を同定した。同定した変異を感染性クローン、pNL4-3 に site directed mutagenesis 法によって導入し、それらの C34 感受性を MAGI (multinuclear activation of the β -galactosidase indicator) 法で決定し、責任耐性部位を同定した。またこれらのウイルスの複製能を HIV-p24 抗原産生量と competitive HIV replication assay によって決定した。さらにこれらの変異が融合に重要な意義を持つ α -ヘリックス構造にどのような変化をもたらすのかを circular dichroism 解析し、結合能の変化を T_m 値から詳細に解析した。

2) HIV 細胞融合の非感染系モデルの確立

HIV 融合に重要な働きをする gp41 領域の N-terminus heptad repeat (N-HR: N36) と C-HR (C34) を、大腸菌を用いてそれぞれ MBP と GST の融合蛋白として合成した。MBP-N36 と GST-C34 は affinity column を用いて精製した。ELISA 用 96 ウェルプレートに精製した GST-C34 (100 μ M) を 4 $^{\circ}$ C で 12 時間固層化し、3 回 PBS で洗浄し、BSA を用いてブロッキングを行った。さらに 3 回 PBS で洗浄し、PBS に溶解した MBP-N36 (100 μ M) を 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応させた。反応後、3 回 PBS でプレートを洗浄し、GST-C34 に結合した MBP-N36 をアルカリホスファターゼ標識された抗 MBP 抗体によって検出した。コントロールには C34 誘導体である SC34EK を用いた。

3) 低分子およびペプチド性膜融合阻害剤の活性測定

分担研究者、藤井、千葉、大高らによって合成された種々の化合物の抗 HIV 活性を MAGI 法にて検討した。MAGI 細胞は米国 National Institutes of Health より分与された。C34 誘導体に関しては本年度誘導された C34 耐性 HIV に対しても感受性を調べた。

(倫理面への配慮)

基礎研究のみであり、倫理面に対する配慮は特に必要ないと判断した。

C/D. 研究結果と考察

1) C34耐性ウイルスの解析

NL4-3 を C34 存在下で 93 経代することによって C34 に対して 84 倍耐性のウイルスを分離した。この耐性ウイルスの gp120 では連続する 5 アミノ酸が欠失しており (Δ FNSTW)、また、gp41 では計 7 つのアミノ酸置換が認められた (A30V、D36G、Q39H、I37T、I37K、N126K、L204I)。MAGI 法の結果、I37T、I37K および N126K は耐性化に関与しており、その中でも I37K が耐性責任変異であることが明らかになった。しかし、I37K のみでは十分な C34 耐性を得られず、高度耐性を獲得するためにはアミノ酸変異の蓄積が必要であることが示された。複製能解析の結果、A30V、D36G および L204I は複製能の向上に関与していることが明らかとなった。gp120 に認められた Δ FNSTW は耐性度の上昇と複製能の向上の両方に関与していた。これらの結果から、耐性化に関与する変異が先に挿入され、それらは同時に複製能を低下させるため、次に低下した複製能を向上させる変異が出現し、そして、耐性化に関与する変異と複製能を向上させる変異が交互に追加されてゆくことが示された。また、耐性責任変異である I37K は C34 との結合力を弱めるが、C-HR に存在する N126K は、I37K を有する変異 N-HR との結合力を回復させることが peptides binding assay により明らかとなった。A30 と D36 における塩基置換は、env やウイルスゲノム RNA を細胞核外へ輸送する Rev タンパクが結合する Rev responsive element (RRE) 領域中に存在し、I37 の置換によって変化した RRE の 2 次構造を補正するための 2 次変異と考えられた。さらに gp41 コード領域は RRE のみならず、tat や rev の一部をコードしていることから、HIV は融合阻害剤に対する変異を容易に導入することはできないと推測された。また、gp41 で検出された全てのアミノ酸変異位

置は、gp41 の結晶構造から C-HR と 3 量体 N-HR が直接結合すると考えられているそれぞれの結合表面に存在していないことが示され、C34 は N-および C-HR の結合面に直接作用していないことが考えられた。このことから N-HR と C-HR の結合表面に直接作用する薬剤は N-、C-HR の結合をより強く阻害することが考えられることから、HIV-1 の細胞融合または複製をより効率的に阻害する可能性があることを示唆した。これらの結果は、HIV-1 の融合阻害が HIV-1 の化学療法における有効な標的の一つであることを示唆している。

2) HIV細胞融合の非感染系モデルの確立

簡便かつ迅速に HIV 細胞融合活性を検出するために ELISA によって gp41 の N-および C-HR 結合を検出する方法を確立した。この方法でコントロールして使用した SC34EK は細胞とウイルスを用いて測定する MAGI 法と比べて感受性がやや低下 (5 倍程度) していたが、ほぼ同レベルで測定が可能であった。SC34EK の誘導体である SC34-4-1 や SC34 も同様に測定可能であった。N 末由来ペプチドである N36 も MAGI 法と同様に測定できた。しかし、臨床応用されている T-20 はこの方法では 100 μ M まで検討したが測定することができなかった。そのため、MBP-N36 の長さを改変し、T-20 の結合部位を検討した。N36 を C 末側に延ばした MBP-N36-89 融合蛋白を作成して検討したところ弱いながら T-20 の活性を測定できた。現在、これらの融合蛋白の精製度を向上させ、活性の高感度検出を試みている。T-20 の活性は現在のところ、感染性 HIV と細胞を用いたアッセイ系でしか測定することに成功していない。in vitro 系で測定できない原因は未だ不明であるが、今回、ペプチドの長さを改変することで測定が可能になったということは、これまで提唱されてきた T-20 の作用機序とは異なった作用機序を T-20 が有している可能性がある。この機序を今後解明することによって HIV-細胞融合機序のうち解明されていない点を明らかにすること、および新規融合阻害剤の分子設計に重要な情報を提供すると考えられた。

3) 低分子およびペプチド性膜融合阻害剤の活性測定

a) 低分子融合阻害剤

分担研究者、千葉によって合成された化合物を MAGI 法と ELISA 法にて検討したところ、MAGI 法では検出できたが、ELISA では検出されなかった薬剤を見出した。この薬剤が実際に gp41 以外を標的とした HIV 阻害剤であるかを現在検討中である。

b) ペプチド性融合阻害剤

分担研究者、藤井、大高によって合成されたペプチドの中ではC末側を欠失させたSC22EKがもっとも活性を有していた。その活性はT-20と比べて低下してはいたが、その程度は約10倍程度であった。このことからSC34EKのC末側はT-20と違い、あまり重要ではないことが示唆され、今後のペプチドデザインに重要な情報を呈すると考えられた。

E. 結論

C34耐性HIVの解析からHIV-細胞融合に重要な役割をするアミノ酸を同定した。また、その耐性変異は複製能とバランスをとりながら導入され、容易には耐性化できないことを明らかとした。ELISAを応用することでHIV-細胞融合モデルを非感染系で検討できるアッセイ法を樹立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions. *J Virol* 79:764-770, 2005.

Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Shintani M, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 2: synthesis and structure-activity relationships of 2-cyano and 2-hydroxy thiazolidenebenzenesulfonamide derivatives. *Bioorg Med Chem*. 13:949-961, 2005.

Kitano K, Kohgo S, Yamada K, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Mitsuya H, Ohru H. Attempt to reduce cytotoxicity by synthesizing the L-enantiomer of 4'-C-ethynyl-2'-deoxypurine nucleosides as antiviral agents against HIV and HBV. *Antivir Chem Chemother*, 14: 161-167, 2004.

Kohgo S, Yamada K, Kitano K, Iwai Y, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E,

Matsuoka M, Mitsuya H, Ohru H. Design, efficient synthesis, and anti-HIV activity of 4'-C-cyano- and 4'-C-ethynyl-2'-deoxy purine nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23: 671-690, 2004.

Hachiya A, Gatanaga H, Kodama E, Ikeuchi M, Matsuoka M, Harada S, Mitsuya H, Kimura S, Oka S. Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology*, 327: 215-224, 2004.

Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Nakahara H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 1: Design and synthesis of thiazolidenebenzenesulfonamides. *Bioorg Med Chem*, 12:6171-6182, 2004.

Hayakawa H, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Kodama E, Mitsuya H, Ohru H. Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1. *Antiviral Chem Chemother*, 15:169-187, 2004.

Futaki S, Nakase I, Suzuki T, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Sugiura Y. RNase S complex bearing arginine-rich peptide and anti-HIV activity. *J Mol Recognit*, 18:169-174, 2004.

2. 学会発表

Kodama E. HIV-1 fusion inhibitor-resistance and development of the new inhibitors. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy. Nov 17-19, 2004.

Kodama E, Masuda N, Orita M, Yamamoto O, Fujii M, Kageyama S, Ohta M, Hatta T, Inoue H, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, and Matsuoka M. HIV-1 Acquires Resistance to New NNRTI, Thiazol Derivatives, through Steric Hindrance with Multiple Mutations. 12th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, MA, 2005. 2. 22-25

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

エイズ医薬品等開発研究

研究分野 第3分野抗エイズ薬開発のための基盤技術開発等に関する研究

研究課題 HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発

代表:松岡雅雄 (京都大学ウイルス研究所)

分担研究項目

1. 融合過程を標的とする新規治療薬の創製
2. 融合阻害剤の設計・合成

(本年度上記2件の分担項目は相互協力関係の基に実施してきたので一括して報告する)

研究要旨

X-EE-XX-KK 分子設計概念を基盤にして創出した強力な gp41-標的型 HIV-1-Cell 膜融合阻害剤 SC35EK のエックス線結晶解析を参考にして、低分子化および非ペプチド化の研究を推進し、分子サイズの低減化および部分的非ペプチド化に成功した。また一連の誘導体の構造活性相関研究から、単純な(E)-アルケン型ジペプチドイソスターによる非ペプチド化の方法論の限界を認め、アミド結合の極性、静電気的特性、水素結合能を具備したフルオロアルケン型イソスターの立体選択的合成法について精査した。

1. 融合過程を標的とする新規治療薬の創製

A. 研究目的

HIV-1 が感染を成立させる際、ウイルスと標的細胞間の膜融合は必須の過程である。この膜融合過程において、HIV-1 エンベロープ蛋白質 gp41 の C 端及び N 端側 α -helix 領域である C-および N-region が逆平行型に相互作用し、6-helical bundle を形成することが必要であり (Figure 1)¹⁾、これらの領域は高度に変異を起こした HIV においても高く保存されている。これに基づき、6-helical bundle 構造形成阻害剤は多剤耐性克服型抗 HIV 剤の創薬標的として大きな注目を集めている。

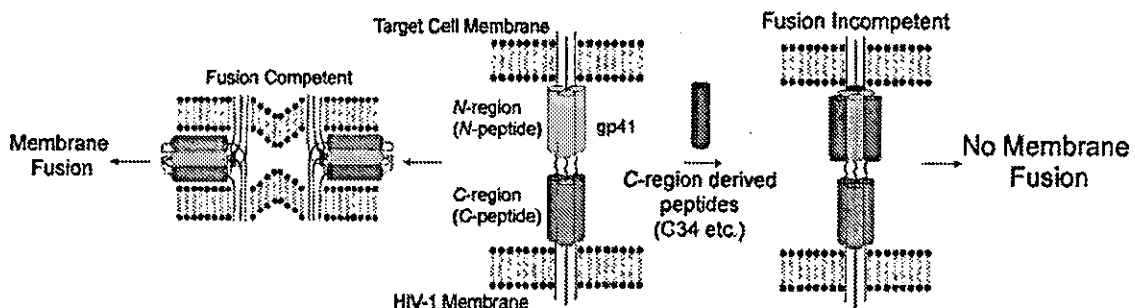


Figure 1. Mechanism of HIV-1/cell fusion and inhibition by C-peptide.

Table 1. Anti-HIV activity of C34 and SC35EK.

Peptides	Sequences	IC ₅₀ (nM)
C34	WMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELL	0.68
SC35EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKNEEELKK	0.39

IC₅₀ values are the concentrations for 50% inhibition of HIV-1 infection to HeLa cells based on MAGI assay.

当該研究グループでは、C-region 由来ペプチド (C-ペプチド) の一つである C34 を基盤とした抗 HIV ペプチドのデザイン・合成研究を展開してきた。その結果、極めて強力な抗 HIV 活性を示し、かつ水溶性の高いペプチドとして SC35EK を開発するに至った (Table 1)²⁾。ここでは、 α -helical な C34 ペプチドを N-region 相互作用面と溶媒接触面に区別化する戦略を採用した。この戦略は、N-region 相互作用面を形成するアミノ酸残基を X とした場合、この X 残基を α -helical peptide の一方の面へ提示することを目的とし、X-EE-XX-KK (E = Glu, K = Lys) の繰り返し配列を利用するものである (Figure 2)。ここで、 $i, i+4$ の関係に Glu, Lys 残基を配置することにより側鎖間の salt bridge 形成による α -helix 性の向上および水溶性の向上も期待できる。本年度は、SC35EK の低分子化について検討するとともに、生体内安定性の向上を目的として α -helix 性に大きく寄与している EE, KK ユニットの非ペプチド化を試みることにした。

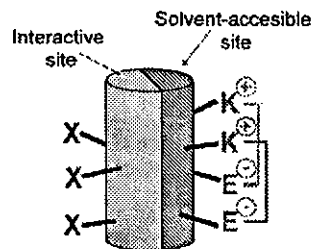


Figure 2. Design concept of SC35EK.

B. 研究方法および研究結果

(1) X 線構造解析に基づく SC35EK の低分子化 (Figure 3)

まず、SC35EK の低分子化について検討を行った。我々も含めいくつかの研究グループは、X 線構造解析により C34 あるいは C34 誘導体は N-region 由来ペプチドである N36 と相互作用し、6-helical bundle を形成することを明らかにしている^{2,3)}。これらの研究から、C34 と N36 は Figure 3

	C-terminus	interactive region	N-terminus	IC ₅₀ (nM)	relative potency
N36	LIRAQLQK	IGWVTLQLLHQQAEIARLLNNQQQVIDS			
C34		WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEK	NEQEEL	0.68	1
C28		WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEK			0.0078
SC35EK		WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQQKNEEELKK		0.39	1
SC29EK		WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKN		0.46	0.85
SC22EK		WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS		60	0.0065

Figure 3. Downsizing of SC35EK by deletion of C-terminal region.

で示す領域で相互作用しており、C34 の C 末端側は N-region との相互作用にそれほど関与していないという知見が得られている。したがって、C34 の C 末端側の残基を除去したペプチド、例えば C28 も強力な抗 HIV 活性が期待できる。しかし、実際には C28 はその抗 HIV 活性が C34 と比較して 100 分の 1 以下になることが報告されている⁴⁾。この活性の低下は α -helix 性の低下に起因するのではないかと推測した。C34 は C 末端部分と N 末端部分の α -helix 性が高いことが知られており、これらの部分が α -helix 形成において、重要な役割を果たしていると考えられる。そのため、C 末端側の残基を除去すると α -helix 構造を維持することが困難となり、結果として抗 HIV 活性が低下するのではないかと考えた。この仮説が正しいならば、配列のいかなる部分においても α -helix 性が高いようにデザインされた SC35EK については C 末端側の残基を除去しても α -helix 性は失われず、活性は保持されるのではないかと類推した。そこで、SC35EK から C 末端

の6残基を除去した SC29EK、13 残基を除去した SC22EK をデザイン、合成した。得られたペプチドについて抗 HIV 活性を評価した結果、SC29EK は SC35EK に匹敵する抗 HIV 活性を示した。また、SC22EK も SC35EK のおよそ 3 分の 1 の残基を除去したにもかかわらず高い活性を保持していた。これにより、当初の作業仮説の妥当性を確認することができた。

(2) EE, KK ユニットの非ペプチド化

低分子化したペプチド SC29EK, SC22EK 中の EE および KK 配列は *N*-region との相互作用に直接関与していないため、非水解性イソスターへの置換が比較的容易に行えるのではないかと推測し、生体内での安定性の向上を目的としてこれらの配列の非ペプチド化を試みることにした。

イソスターはペプチド結合を除去することによる α -helix 性の低下を最小限にとどめることを重視し、デザインした。以下二つのタイプのイソスターについて検討を行った。

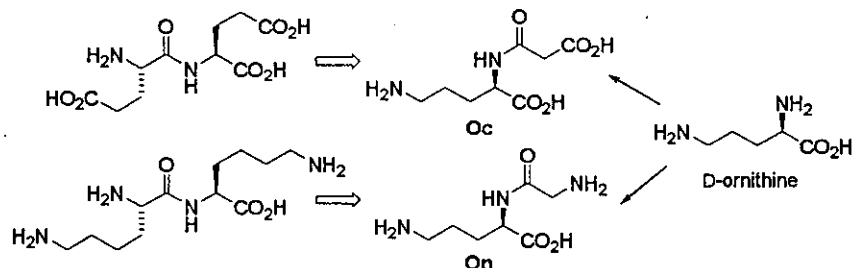


Figure 4. Replacement of EE or KK unit by D-ornithine analogues.

1. D-ornithine 誘導体の導入

最初に、側鎖の電荷を維持したまま、EE あるいは KK 間のペプチド結合を飽和炭化水素鎖へと置換することを考え、EE あるいは KK に相当するユニットとして Oc および On をデザインした (Figure 4)。

Oc, On はともに D-ornithine を出発原料として容易に合成可能であるという利点がある。Oc は D-ornithine の α -アミノ基に malonic acid を、On は glycine をそれぞれ縮合することにより、数工程で得られた。続いて、これらのユニットを組

Table 2. Anti-HIV activity of SC29EK analogues.

Peptides	Sequences	IC ₅₀ (nM)
SC29EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKN	0.46
SC29Orn1-1	WOCWDOnIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKN	>1000
SC29Orn1-2	WEEWDKKIOcYTOnIEELIKKSEEQQKKN	>1000
SC29Orn1-3	WEEWDKKIEEYTKKIOcLIOnSEEQQKKN	>1000
SC29Orn1-4	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS OcQQOnN	54.2
SC29Orn2-1	WEEWDKKIEEYTKKIOcLIOnS OcQQOnN	>1000
SC29Orn2-2	WEEWDKKIOcYTOnIOcLIOnSEEQQKKN	>1000
SC29Orn2-3	WOCWDOnIOcYTOnIEELIKKSEEQQKKN	>1000
SC29Orn2-4	WOCWDOnIEEYTKKIEELIKKS OcQQOnN	>1000
SC29Orn2-5	WEEWDKKIOcYTOnIEELIKKS OcQQOnN	>1000
SC29Orn2-6	WOCWDOnIEEYTKKIOcLIOnSEEQQKKN	>1000

み込んだ SC29EK 誘導体を合成し、抗 HIV 活性を評価した (Table 2)。その結果、ほとんどの化合物で活性の大幅な低下がみられたが、C 末端側の EE, KK 配列を Oc, On に置換した SC29Orn1-4 は顕著な活性を保持した。

次に、これらの誘導体の活性の有無が *N*-region との相互作用による複合体形成能力と関与していることを確認するため、CD による物理学的検討を行うことにした。SC29EK 誘導体 SC29Orn1-1-2-6 を等モルの N36 と混合し、CD を測定した結果、SC29Orn1-1, 1-4 および 2-4

と N36 の等モル混合物のみが α -helix 構造に特徴的なスペクトルを示した (Figure 5)。さらに、これらの誘導体と N36 のそれぞれ単独の CD 測定値の算術和と等モル混合物の CD 測定値を比較したところ、単独時と比べて混合時における α -helix 性の増大が確認された。このことから、これらの誘導体は N36 と相互作用し、複合体を形成していることが示唆された。また、これまでの他の C-ペプチドと N36 複合体は超遠心を用いた分子量測定および X 線構造解析の結果から、6 量体で存在することが明らかとなっており、先の 3 種の誘導体と N36 の等モル混合物も 6-helical bundle 構造を形成しているものと推測した。

そこで、SC29EK1-1, 1-4, 2-4 と N36 複合体の安定性を調べるために、複合体構造の熱力学的安定性の指標となる転移温度 T_m 値を測定した。4 - 90 °C における $[\theta]_{222}$ を測定し、4 °C の時を 6-helical bundle 構造が 100% folding、90 °C の時を 100% unfolding とみなし、50% unfolding にあたる温度を T_m 値と定義した。測定の結果、これらの誘導体と N36 の等モル混合物の T_m 値と誘導体の IC_{50} 値の間には相関関係が認められた (Table 3)。すなわち、 T_m 値の上昇に伴い IC_{50} 値が下降 (活性は上昇) する傾向がみられた。このことから、

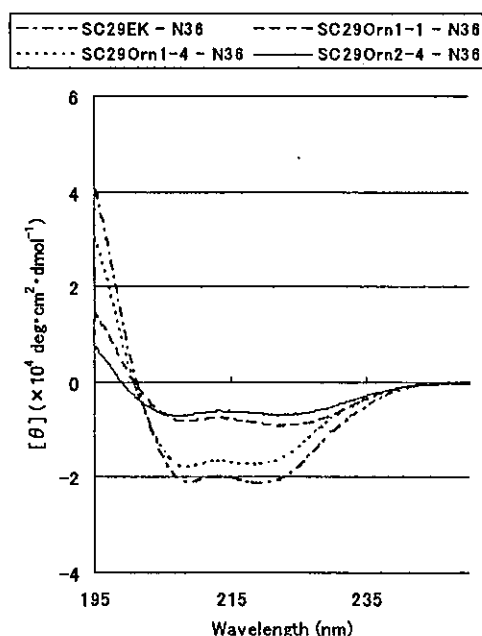


Figure 5. CD spectra of the mixtures of N36-SC22EK analogues.

SC29EK 誘導体の抗 HIV 活性はこれまでの C-ペプチドと同様に、N-region との相

Table 3. Anti-HIV activity and melting temperatures of SC29EK analogues.

Peptides	Sequences	T_m (°C)	IC_{50} (nM)
SC29EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKN	64.4	0.46
SC29Orn1-1	WocWDonIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKN	50.2	>1000
SC29Orn1-4	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSocQQOnN	60.2	54.2
SC29Orn2-4	WocWDonIEEYTKKIEELIKKSocQQOnN	47.6	>1000

互作用により形成される複合体の安定性に依存していることが示唆された。

また、N36 との複合体の形成が確認された 3 つの誘導体の配列から、両末端の EE, KK 配列のイソスターへの置換は α -helix 性に与える影響が比較的小さいと推測された。この理由の一つとして、末端部分の置換は内部の置換に比べてペプチド主鎖間の水素結合の消失が少ないことが考えられる。加えて、SC29EK は α -helix 性が高いため、イソスター導入部で α -helix 構造が部分的に壊れてしまっても、末端部分であれば全体としては α -helix 構造を維持できるためではないかと考察した。この仮説が正しいならば、N 末端の配列を置換しても複合体形成能力は保持されると考えられる。しかしながら、実際には複合体の安定性は大きく低下した。これは、C34 の N36 との複合体形成において特に重要であることが示唆されている C34 の N 末端部の 2 個の Trp および Ile の N36 trimer の C 末端側にある疎水性ポケットへの結合がその周辺の残基を置換したことで妨げられたことに起因するのではないかと推測される⁵⁾。

2. KK type (*E*)-alkene dipeptide isostere の導入

上述のように、EE, KK 配列の Oc, On による置換において良好な結果が得られなかったことから別のタイプのイソスターでの置換を検討することとした。ペプチド結合と構造相同性が高い等価体として(*E*)-alkene dipeptide

isostere (EADI)が知られている⁶⁾。そこでまず、生体内のペプチダーゼに認識されやすいことが報告されている KK

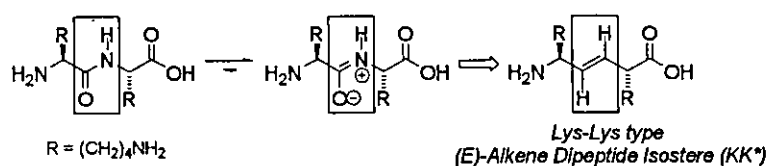
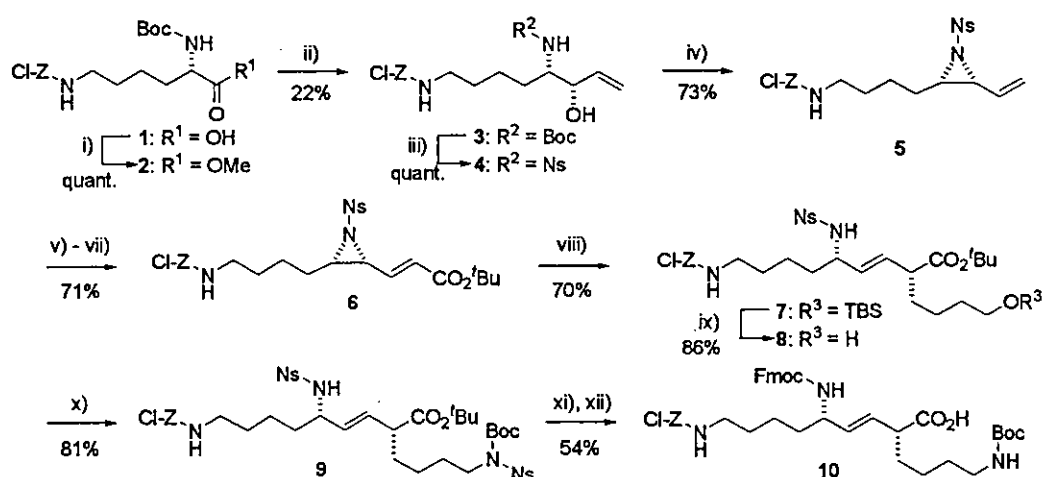


Figure 6. Replacement of an amide bond in Lys-Lys by (*E*)-alkene unit.

部分について対応する EADI の合成を行い、ペプチドへ導入することとした (Fig. 6)。

KK 型 EADI の合成を Scheme 1 に示した。鍵反応として、我々が開発したβ-アジリジノ-α,β-不

Scheme 1. Synthesis of Lys-Lys type alkene dipeptide isostere.



Regents: i) MeI, KHCO₃, DMF; ii) DIBAL-H, toluene, CH₂Cl₂, then LiCl, ZnCl₂, CH₂=CHMgCl, THF; iii) 4 M HCl-dioxane, then NsCl, 2,4,6-collidine, CHCl₃; iv) DIAD, Ph₃P, THF; v) O₃ gas, AcOEt; vi) Me₂S; vii) (EtO)₂P(O)CH₂CO₂^tBu, LiCl, DIPEA; viii) TBSO(CH₂)₄Cu(CN)Li•LiI•2LiCl, Et₂O, THF; ix) TBAF, THF; x) BocNHNs, DIAD, Ph₃P, THF; xi) PhSH, K₂CO₃, DMF, then Fmoc-OSu, DMF; xii) 4 M HCl-dioxane, then (Boc)₂O, Et₃N, THF.

飽和エステルに対する有機銅試薬による反応を利用した⁷⁾。Boc-Lys(Cl-Z)-OH 1 を出発原料として、メチルエステル化、Grignard 反応を経て、既知のアリルアルコール 3 へと誘導した。続いて、3 の Boc 基を Ns 基へと変換し、分子内光延反応によりアジリジンを形成させた後、オゾン酸化、Horner-Emmons 反応を行い、鍵合成基質であるβ-アジリジノ-α、β-不飽和エステル 6 に導いた。これを有機銅試薬による *anti*-S_N2' 型反応に付すことにより、立体選択的に 7 を得た。次いで、脱 TBS 化したアルコール誘導体 8 を光延反応によりアミン誘導体 9 へと誘導し⁸⁾、Ns 基の切断後、Fmoc 化、酸による Boc 基および *tert*-ブチル基の除去後、再 Boc 化を行うことにより、Lys-Lys 型 EADI 10 を合成した。

次に、得られた KK 型 EADI (KK*) をペプチドへと導入することとした。SC29EK 誘導体の構造活性相関研究の結果から SC29EK の C 末端部分は N-region との相互作用にそれほど関与していないという知見が得られたことから、さらなる低分子化を目指して、リード化合物として SC22EK を選択した。SC22EK の KK 部分へイソスターを導入した 3 種類の誘導体の合成を行い、抗 HIV

活性を評価した (Table 4)。その結果、C末端のKK残基を置換した誘導体 SC22KK1 は SC22EK より活性が低下したものの、抗 HIV 薬として市販されている逆転写酵素阻害剤 dideoxycytidine より高い活性を示した。

Table 4. Anti-HIV activity and melting temperatures of SC22EK analogues.

Peptides	Sequences	IC ₅₀ (nM)	T _m (°C)
SC22EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS	60	65.2
SC22KK1	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKK*S	168	64.2
SC22KK2	WEEWDKKIEEYTKK*IEELIKKS	>1000	52.8
SC22KK3	WEEWDKK*IEEYTKKIEELIKKS	>1000	53.0
ddC**		441	

** dideoxycytidine: nucleoside reverse transcriptase inhibitor

続いて、SC22EK 誘導体と N36 の等モル混合物についても、CD の測定を行ったところ、3 種類すべ

での誘導体と N36 の等モル混合物で複合体の形成が示唆された (Figure 7)。さらに、これらの誘導体と N36 複合体の熱力学的安定性の指標となる T_m 値の算出を行った。その結果、SC22KK1-N36 複合体は比較的高い T_m 値を示したのに対し、SC22KK2-N36、SC22KK3-N36 複合体の T_m 値は低いものであった (Table 4)。このことから、SC29EK 誘導体の場合と同様に、SC22EK 誘導体においても抗 HIV 活性の発現は N-region との複合体形成能に依存すると推測された。

また、KK 型 EADI の SC22EK への導入において、C 末端の残基を置換した誘導体で活性が保持されたことは、SC29EK へのイソスターの導入の結果と同様であった。これらの結果から、配列によらず、C 末端側の残基の置換はある程度許容されうると推測された。これは前述の通り、末端の配列のイソスターへの置換は α -helix 性に及ぼす影響が比較的小さいことおよび、C 末端部分は N-region との相互作用において重要な gp41 trimer の疎水性ポケットとの結合に対する寄与が比較的小さいことに起因するのではないかと考えられる。

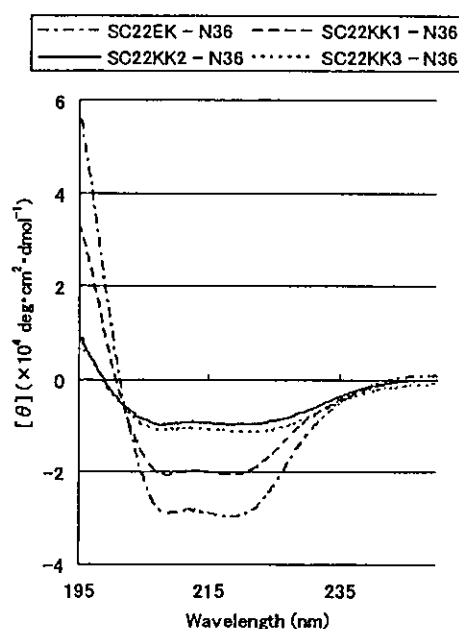


Figure 7. CD spectra of the mixtures of N36-SC22EK analogues.

【まとめ】

本年度の研究では N-region との相互作用に必須でないとして推測された SC35EK の C 末端側の残基を除去することにより SC35EK の低分子化に成功した。さらに、低分子化したペプチド SC29EK および SC22EK をリード化合物として、 α -helix 誘起配列である EE, KK ユニットの生体内安定型イソスターへの置換を検討し、高い抗 HIV 活性を保持した部分的非ペプチド化誘導体を見出した。また、構造活性相関研究の結果から、誘導体の抗 HIV 活性は 6-helical bundle 構造形成能に依存することを推定するとともに、SC29EK および SC22EK の C 末端の EE, KK ユニットの種々のイソスターへ置換され得るという知見を得ることができた。これらの知見は SC35EK の

さらなる低分子化および非ペプチド化研究において有用な情報になると考えられる。

【実験の部】

アジリジンエノエート 6 から 7 の合成

アルゴン雰囲気下、CuCN (2.19 g, 24.4 mmol)、LiCl (2.07 g, 48.8 mmol) の無水 THF 溶液 (45 mL) に、-78 °C で先に調製した TBSO(CH₂)₄Li (0.5 M, 48.8 mL, 24.4 mmol) の THF 溶液 (45 mL) を滴下し、4 °C に昇温後 10 分間攪拌した。これにアジリジンエノエート 6 (2.23 g, 4.07 mmol) を-78 °C でゆっくり滴下し、20 分間攪拌した。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 (100 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 = 4 : 1) で精製し、7 を油状物質として得た (2.23 g, 収率 70.3%)。

[α]_D²⁷ -35.5 (*c* 0.47, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.00 (s, 6H), 0.85 (s, 9H), 1.11-1.53 (m, 12H), 1.34 (s, 9H), 2.56-2.60 (m, 1H), 3.09-3.12 (m, 2H), 3.51 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.84-3.91 (m, 1H), 4.80 (s, 1H), 5.17 (s, 2H), 5.22 (dd, *J* = 15.4, 7.3 Hz, 1H), 5.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.37 (dd, *J* = 15.4, 8.3 Hz, 1H), 7.22-7.23 (m, 2H), 7.32-7.35 (m, 1H), 7.38-7.40 (m, 1H), 7.64-7.67 (m, 2H), 7.79-7.81 (m, 1H), 8.04-8.06 (m, 1H); LRMS (FAB) *m/z*, 782 (MH⁺, base peak), 524, 480, 356, 125, 73, 57; HRMS (FAB) *m/z*, calcd. for C₃₇H₅₇ClN₃O₉SSi (MH⁺), 782.3273, found 782.3246.

(E)-KK 型 EADI 10 の物理恒数およびスペクトルデータ

[α]_D²⁸ -12.9 (*c* 1.79, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.24-1.50 (m, 12H), 1.42 (s, 9H), 2.96 (br, 1H), 3.05 (br, 2H), 3.16 (br, 2H), 4.09-4.15 (m, 1H), 4.19 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.40 (br, 2H), 4.62 (br, 1H), 4.91 (br, 1H), 5.00 (br, 1H), 5.19-5.23 (m, 2H), 5.49 (br, 1H), 5.56 (br, 1H), 7.23-7.31 (m, 4H), 7.36-7.40 (m, 4H), 7.57 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H); LRMS (FAB) *m/z*, 748 (MH⁺, base peak), 648, 409, 178, 154, 125, 57; HRMS (FAB) *m/z*, calcd. for C₄₁H₅₁ClN₃O₈ (MH⁺), 748.3365, found 748.3381.

SC22EK, SC29EK および SC29EK 誘導体の合成

Rink-amide 樹脂上、通常の Fmoc 固相合成法により保護ペプチドを構築した。N 端は無水酢酸 (5 eq.)、pyridine (5 eq.) を加え、DMF 溶媒中 1 時間振とうすることでアセチル化を行った。この樹脂 (100 mg) を *m*-cresol : thioanisole : EDT : H₂O : TFA = 5 : 5 : 5 : 5 : 80 (v/v, 5 mL) で室温、2 時間処理した後、樹脂を濾去し、濾液にエーテルを加え、粗ペプチドを析出させた。その後、粗ペプチドを 0.1% TFA in H₂O に溶かし、HPLC により精製を行った。

SC22EK 誘導体の合成

上記と同様の方法で樹脂上に保護ペプチドを構築した。この樹脂 (100 mg) を *m*-cresol (250 μ L)、EDT (250 μ L)、thioanisole (600 μ L) 存在下、TFA (3.5 mL) を加え、10 分攪拌した後、0 $^{\circ}$ C 下 TMSBr (660 μ L) を加えて室温まで昇温し、1 時間処理した。以下、上記と同様の方法で SC22EK 誘導体を得た。

代表的化合物のデータ

Peptide	Formula	ISMS (MH) ⁺	
		Calcd.	Found
SC29EK	C ₁₇₀ H ₂₆₉ N ₄₃ O ₅₄	3780.3	3780.0
SC22EK	C ₁₃₄ H ₂₀₉ N ₃₁ O ₄₀	2895.4	2895.0
SC29Om1-4	C ₁₆₃ H ₂₅₆ N ₄₂ O ₅₂	3637.2	3637.5
SC22KK1	C ₁₃₅ H ₂₁₁ N ₃₀ O ₃₉	2879.4	2880.0

N36-SC35EK 誘導体-複合体の CD スペクトル測定

ペプチドを PBS (pH 7.4) に溶解させ、40 μ M に調製したものを試料溶液とし、25 $^{\circ}$ C、1 mm セルで CD スペクトルを測定した。ただし、N36 は PBS に難溶性のため、超純水に溶かした後、PBS を加えて濃度を調製した。N36-SC35EK 誘導体-複合体の温度変化に関しては、上記の試料溶液を 100 μ M に調整し、1 mm セルで 4 - 90 $^{\circ}$ C における $[\theta]_{222}$ の CD スペクトルを測定した。昇温速度を 1 $^{\circ}$ C/min とした。

抗 HIV 活性測定

試験方法 : MAGI-assay、感染標的細胞 : HeLa 細胞、ウイルス : HIV-1 (NL4-3)。抗 HIV 活性は HIV の感染を 50% 阻害する濃度 (50% inhibition concentration (IC₅₀)) で示した。

【参考文献】

- (1) Chan, D. C.; Kim, P. S. *Cell* 1998, 93, 681-684.
- (2) Otaka, A.; Nakamura, M.; Nameki, D.; Kodama, E.; Uchiyama, S.; Nakamura, S.; Nakano, H.; Tamamura, H.; Kobayashi, Y.; Matsuoka, M.; Fujii, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2937-2940.
- (3) (a) Chan, D. C.; Fass, D.; Berger, J. M.; Kim, P. S. *Cell* 1997, 89, 263-273; (b) Kemin, T.; Jin-huan, L.; Jia-huai, W.; Steven, S.; Min, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12303-12308.
- (4) (a) Wei, S.; Jie, L.; Hong, J.; Lin, R.; Shibo, J.; Min, L. *Biochemistry* 2000, 39, 1634-1642; (b) Hong, J.; Wei, F.; Temple B.; Shibo, J.; Min, L. *J. Virol.* 1999, 73, 8578-8586.
- (5) Chan, D. C.; Chutkowski, C. T.; Kim, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 15613-15617.
- (6) (a) Ibuka, T.; Habashita, H.; Otaka, A.; Fujii, N.; Oguchi, Y.; Uehara, T.; Yamamoto, Y. *J.*

Org. Chem. 1991, 56, 4370–4382; (b) Kessler, H.; Kranz, M. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 5359–5362.

(7) Toda, A.; Aoyama, H.; Mimura, N.; Fujii, N.; Ibuka, T. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 7053–7061.

(8) Fukuyama, T.; Cheung, M.; Kan, T. *Synlett* 1999, 8, 1301–1303.

2. 融合阻害剤の設計・合成

A. 研究目的

上記研究において、強力かつ特異的なペプチド性 HIV-1/Cell 膜融合阻害剤 SC35EK をリード化合物として、抗 HIV-1 活性を保持したまま分子サイズの低減化(35アミノ酸残基から22アミノ酸残基)およびオルニチン誘導體、アルケン型イソスター等を用いる部分的非ペプチド化に成功したが、導入したペプチドイソスターは期待した程の有効性を認めることが出来ず、部分的な活性低下を引き起こした。 α -ヘリックス構造を維持するためのペプチド結合固有の特性として、1) 水素結合能、および、2) 静電的極性、を欠落したイソスターの導入がその要因と判断される。融合阻害剤の今後の研究展開においてこれらの二つの特性を具備したペプチドイソスターの開発の必要性を痛感して、本年度はフルオロアルケン含有ジペプチドイソスターの立体選択的合成法に関する研究に重点を置いた。

感して、本年度はフルオロアルケン含有ジペプチドイソスターの立体選択的合成法に関する研究に重点を置いた。

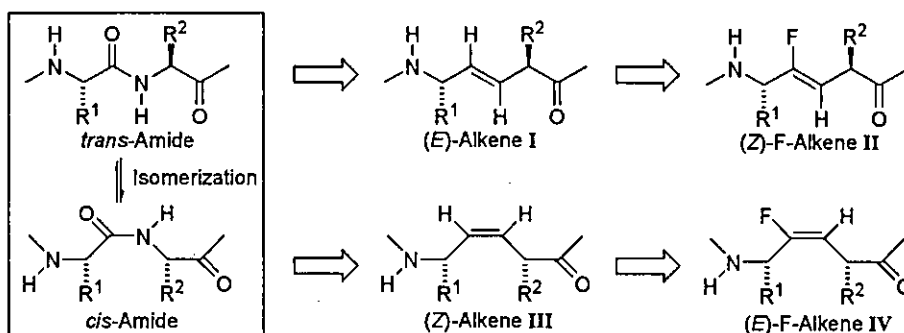


Figure 1. Native peptide bond and corresponding alkene or F-alkene isosteres.

構造変化を最小限に抑えた、ペプチド結合の非水解性等価体 (イソスター) への置換はペプチドリード創薬における重要な課題の一つである。代表的なペプチドイソスターとして、ペプチド結合を二置換アルケンで置換したアルケン型イソスターがある (Figure 1. I, III)。アルケン型イソスターはペプチド結合の二重結合性に基づいて考案されており、ペプチド結合に対して高い構造的相同性を有していると考えられる。しかし、このイソスターは、ペプチド結合が本来備えている双極子相互作用および水素結合能が欠如しているという欠点がある。一方、ペプチド結合をフルオロアルケンで置換したフルオロアルケン型ペプチドイソスター (II, IV) は、ペプチド結合に対し高い構造的相同性を有しているのみならず、

フッ素原子の存在によりアルケン型のイソスターには欠損している静電的相同性をも併せ持っているものと考えられている¹⁾。

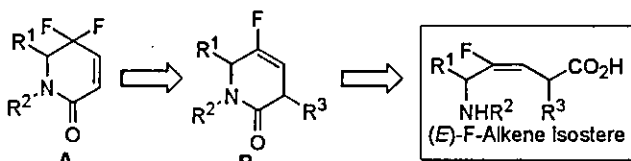


Figure 2. Strategy for synthesis of (E)-fluoroalkene peptide isostere.

また、このイソスターはアルケン型と同様に、トランス・シスの平衡状態にあるペプチド結合を一方に固定化することが可能であり、ペプチド

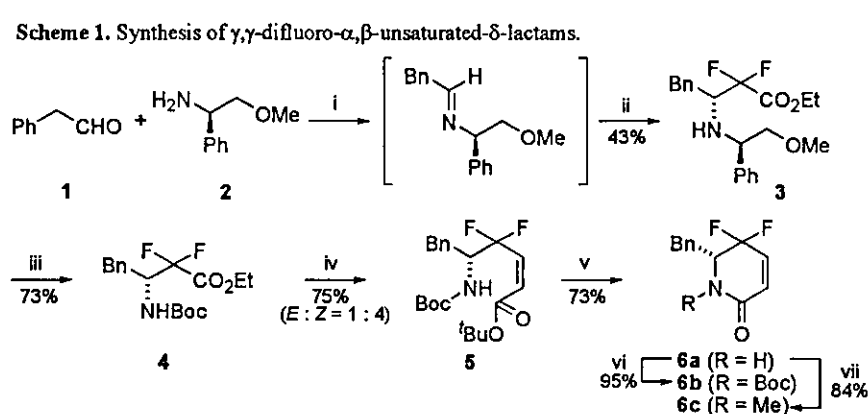
の機能解析を行う上でも有用なイソスターである。

我々は、以前に γ,γ -ジフルオロ α,β -不飽和エステルを基質とする有機銅試薬あるいはヨウ化サマリウムによる還元反応を利用した、トランス型ペプチド結合等価体である(*Z*)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成法を報告している²⁾。しかし、(*E*)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターの効率的な合成法は未だ確立されていない。我々は、(*E*)-フルオロアルケン含有ジケトピペラジンミメティクスBを合成し、そのアミド結合を切断すれば、効率的に(*E*)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターが合成できるのではないかと考えた (Figure 2)。本年度は、 γ,γ -ジフルオロ α,β -不飽和ラクタムAを基質とする、金属試薬を用いたBの合成法について精査した。また、得られたBのアミド結合切断法を検討し、生理活性ペプチドへの応用を指向した(*E*)-フルオロアルケン含有ジペプチドイソスターの合成を行った。

B. 研究方法および研究結果

1. 鍵合成基質 γ,γ -ジフルオロ α,β -不飽和ラクタムの合成

鍵合成基質である γ,γ -ジフルオロ α,β -不飽和ラクタムは Scheme 1 に示す合成経路により合成した。アルデヒド1とフェニルグリシノール由来のキラルアミン2から得られる光学活性イミンに対し、



Wilkinson 触媒存在下、 Et_2Zn とプロモジフルオロアセテートを作用させることにより、 β -アミノエステル3をジアステレオ選択的に合成した³⁾。続いて、 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ 存在下、水素化分解による不斉補助基の除去と Boc 化を同時に行うことで、4を良好な収率で得た。さらに、4のエステルをアルデヒドに還元後、NaIとDBUを用いた(*Z*)-選択的 Horner-Wadsworth-Emmons 反応⁴⁾に付すことにより、 α,β -不飽和エステルを $E:Z=1:4$ の比で得た。得られた (*Z*)型の不飽和エステル5の脱保護を行った後、閉環させることで γ,γ -ジフルオロ α,β -不飽和ラクタム6aを合成した。また、アミド窒素をBoc化、メチル化した *N*-Boc 体6b、*N*-メチル体6cも合成した。

2. 金属試薬による還元反応を利用したジケトピペラジンミメティクスの合成法の検討

我々はすでに、 γ 位に脱離基を有する α,β -不飽和エステルに対して有機銅試薬あるいはヨウ化サマリウムを作用させると、還元反応が効率的に進行することを明らかにしている²⁾。また、同基質に対する α -アルキル化法として、金属試薬による還元反応の中間体として生じるメタルエノラートを求電子剤で捕捉する手法を報告している²⁾。そこで、これらの反応を不飽和ラクタム6からのジ

ケトピペラジンミメティクスの合成に応用することとした。

(1) γ, γ -ジフルオロ- α, β -不飽和ラクタム 6 に対する金属試薬による還元反応の検討

まず、Phe-Gly 型の (*E*)-フルオロアルケンイソスターの前駆体であるジケトピペラジンミメティクス 7 を合成することを目的として、不飽和ラクタム 6 の金属試薬による還元反応について精査することとした (Table 1)。基質 6a-c に対し有機銅試薬 ($\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$) を作用させると、脱フッ素化を伴う還元反応が速やかに進行し、7a-c が良好な収率で得られた (entries 1-3)。ヨウ化サマリウムを用いた場合、プロトン源非存在下では基質 6a, b ともに、還元体が中程度の収率で得られた (entries 4

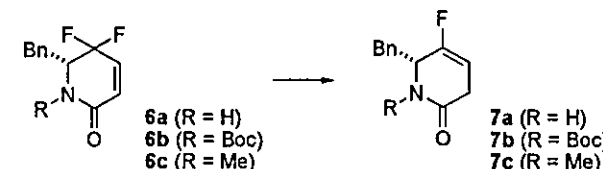
and 5)。一方、プロトン源として MeO、*t*-BuOH 存在下でヨウ化サマリウムを作

用させると、基質 6a, b を用いた場合、7a, b が高収率で得られた (entries 6, 8, 9)。しかし

(2) 金属試薬と求電子剤を用いた α -アルキル化反応の検討

次に、各種アミノ酸側鎖に対応する置換基を有するイソスターの合成を目指し、 γ, γ -ジフルオロ- α, β -不飽和ラクタム 6 の α 位への置換基導入を検討することとした (Table 2)。基質 6a に対し、有機銅試薬 ($\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$) による還元を行った後、求電子剤としてヨウ化メチルを作用させると α -アルキル化が中程度の収率で進行し、シス体 9a が優先的に得られた (entry 1)。しかしこの際、アミド窒素がアルキル化された化合物 8c が確認された。一方、臭化ベンジルを作用させるとトランス体 8b とシス体 9b がほぼ同じ割合で得られた (entry 2)。N-Boc 体 6b に対し、6a の場合と同様に、有機銅試薬として $\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ を作用させた場合、還元反応は進行するものの、開環体 11 の生成が確認され、 α -アルキル化は進行しなかった (entry 3)。開環体の生成は有機銅試薬中に平衡状態で存在する MeLi^5 に起因するものと考え、 MeLi が生成していないと考えられる Gilman 試薬を用いて反応を行った。この場合、開環反応は抑制されたが、 α -アルキル体の生成は認められなかった (entries 4 and 5)。N-メチル体 6c に対し、6a の場合と同様に、有機銅試薬 ($\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$) による還元を行った後、ヨウ化メチルを作用させると α -アルキル化

Table 1. Reduction of γ, γ -difluoro- α, β -unsaturated- δ -lactams 6a-c.



entry	substrate	reagent (equiv., solvent)	condition	product (yield ^a , %)
1	6a	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1)	-78 °C, 30 min	7a (70)
2	6b	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1)	-78 °C, 30 min	7b (68)
3	6c	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1)	-78 °C, 30 min	7c (72)
4	6a	SmI_2 (3 eq., THF)	0 °C, 60 min	6a (14), 7a (50)
5	6b	SmI_2 (3 eq., THF)	0 °C, 60 min	7b (60)
6	6a	SmI_2 (3 eq., THF: MeOH = 12 : 1)	0 °C, 60 min	7a (82)
7	6b	SmI_2 (3 eq., THF: MeOH = 13 : 1)	0 °C, 60 min	7a (97)
8	6c	SmI_2 (3 eq., THF: MeOH = 13 : 1)	0 °C, 60 min	7c (77)
9	6a	SmI_2 (3 eq., THF: <i>t</i> -BuOH = 15 : 1)	0 °C, 60 min	6a (7), 7a (88)
10	6b	SmI_2 (3 eq., THF: <i>t</i> -BuOH = 14 : 1)	0 °C, 60 min	6b (34), 7a (52)

^a Isolated yield.

Table 2. α -Alkylation of γ,γ -difluoro- α,β -unsaturated- δ -lactams **6a-c**.

entry	substrate	reagent (equiv., solvent)	product (yield ^a , %)
1	6a	Me ₃ CuLi ₂ ·LiI·3LiBr (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1), then MeI (8 eq.)	8c (6), 9a (39)
2	6a	Me ₃ CuLi ₂ ·LiI·3LiBr (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1), then BnBr (8 eq.)	8b (28), 9b (27), 10 (7)
3	6b	Me ₃ CuLi ₂ ·LiI·3LiBr (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1), then MeI (8 eq.)	11 (15)
4	6b	Me ₂ CuLi·LiI·2LiBr (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1)	7b (82)
5	6b	Me ₂ CuLi·LiI·2LiBr (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1), then MeI (8 eq.)	7b (30)
6	6c	Me ₃ CuLi ₂ ·LiI·3LiBr (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1), then MeI (8 eq.)	8c (29), 9c (31)
7	6c	Me ₃ CuLi ₂ ·LiI·3LiBr (2 eq., THF: Et ₂ O = 4 : 1), then BnBr (8 eq.)	8d (61)
8	6a	Sml ₂ (3 eq., THF), acetone (3 eq.)	7a (28), 8e + 9e (trace)
9	6b	Sml ₂ (3 eq., THF), acetone (6 eq.)	7b (15), 8f + 9f (trace)

^a Isolated yield.

が進行し、トランス体 **8c** とシス体 **9c** がほぼ同じ割合で得られた (entry 6)。また、臭化ベンジルを作用させた場合には、トランス体 **8d** のみを得られた (entry 7)。一方、鎖状の γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステルへの α -置換基導入において良好な結果が得られている例^{2a)}を参考に、求電子剤としてカルボニル化合物存在下、ヨウ化サマリウムを作用させたが、環状ラクタム **6a, b** において α -置換体はほとんど生成しなかった (entries 8 and 9)。

比較的良好な収率で α -アルキル体を得られた *N*-メチル体 **6c** を用い、有機銅試薬と求電子剤による還元的アルキル化反応について、さらに検討を行うこととした (Table 3)。反応溶媒を THF 主体の溶媒から Et₂O のみとするとシス体 **9c** の生成が優先される傾向が見られた (entry 2)。求電子剤としてより反応性が高いと考えられるメチルトリフラートを用いて反応を行ったところ、収率の改善が見られたが、ジアステレオ選択性についてはヨウ化メチルを用いた場合と同様であった (entries 3 and 4)。また、有機銅試薬として *n*-Bu₃CuLi₂·LiI を用いて同様に反応を行ったが、有機

Table 3. α -Alkylation of γ,γ -difluoro- α,β -unsaturated- δ -lactam **6c**.

entry	reduction ^a	alkylation (R ¹ -X)	solvent	yield ^b of 8+9 (%)	8 : 9
1	A	MeI (8 eq.) 0 °C, 2 hr	THF : Et ₂ O = 4 : 1	60	5 : 5
2	A	MeI (8 eq.) 0 °C, 2 hr	Et ₂ O	61	2 : 8
3	A	MeOTf (8 eq.) 0 °C, 2 hr	THF : Et ₂ O = 4 : 1	75	4 : 6
4	A	MeOTf (8 eq.) -78 °C, 2 hr	Et ₂ O	86	2 : 8
5	B	MeI (8 eq.) 0 °C, 2 hr	THF : Et ₂ O = 4 : 1	77	5 : 5
6	B	MeI (8 eq.) 0 °C, 2 hr	Et ₂ O	62	2 : 8
7	A	BnBr (8 eq.) -78 °C, 2 hr	THF : Et ₂ O = 4 : 1	61	10 : 0
8	A	BnBr (8 eq.) -78 °C, 2 hr	Et ₂ O	46	10 : 0

^a A: Me₃CuLi₂·LiI·3LiBr (2 eq.) at -78 °C for 30 min; B: *n*-Bu₃CuLi₂·LiI (2 eq.) at -78 °C for 30 min. ^b Isolated yield.