

200500994A

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17年度 総括研究報告書

平成18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）	----- 5
分担研究者・児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助手）	
2. 分担研究者・藤井信孝（京都大学薬学研究科・教授）	----- 10
3. 分担研究者・千葉卓男（秋田工業高等専門学校・教授）	----- 18
4. 分担研究者・大高 章（徳島大学ヘルスバイオサイエンス部・教授）	----- 21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 30

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**

抗 HIV 剤を組み合わせた highly active antiretroviral therapy (HAART) により HIV 感染者の予後は著明に改善したが HAART によっても HIV の根絶は不可能であり長期に亘る服用が必要である。このため耐性ウイルスの出現は避けられず耐性ウイルスにも有効な新規の抗 HIV 剤の開発が必要とされている。我々は HIV-融合過程を標的とする薬剤開発を目指し研究を進めている。本年度は我々が開発した極めて高い融合阻害活性を有する SC34 に対する耐性ウイルスの解析を行い融合阻害剤に対する耐性機序を明らかにした。新規低分子 HIV-1 膜融合阻害剤の探索のためのアルファスクリーンシステムを用いた新規ハイスループットスクリーニングシステムを構築した。また、これまでに見出された SC35EK の非ペプチド化を目的としたフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立した。

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（徳島大学ヘルスバイオ  
サイエンス部・教授）  
児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助手）

**A. 研究目的**

不治の病と考えられた HIV 感染症は複数の抗 HIV 剤を組み合わせた highly active antiretroviral therapy (HAART) 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ている。しかし、HIV の根絶は不可能なままであり、そのコントロールには長期の服薬が絶対条件である。このような長期の服用に伴い耐性ウイルスの出現は避けられない問題となっている。このような耐性ウイルスに対しては新たな複製ステップを標的とする新規薬剤が有効である。

我々の研究グループは HIV 外皮タンパク質 gp41 により引き起こされる細胞・HIV 膜融合 (fusion) を新たな分子標的として新規阻害剤の開発を進めている。既に米国等で臨床応用されている HIV gp41 由来ペプチド T-20 は大きな効果を上げているものの高価であり治療費の大幅な増加という問題がある。このため、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が待ち望まれている。

本研究の目的は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ことである。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。融合ステップ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、松岡・児玉による耐性機序の解明と耐性ウイルスにも有効なペプチドの同定、藤井・大高によるペプチドの小型化、非ペプチド化、新規スクリーニングシステムの構築、千葉による小分子リード化合物の創薬を行った。

**B. 研究方法**

1) SC34 に対する耐性ウイルスの解析  
耐性ウイルスを NL4-3 株と MT-2 細胞を用いた dose escalating 法によって誘導し、その責任変異を同定した。これらの変異が融合にどのような意義を持つかを感染性リコンビナント HIV において検討した。

## 2) 耐性 HIV に対する効果

SC34, T-20 に対する耐性変異を有するウイルスを作製し耐性ウイルスに対する効果を解析した。長期に亘る HAART によって薬剤耐性を獲得した臨床分離株を HIV 感染患者から分離し、これらに対する SC34 誘導体の効果を健常人末梢リンパ球で検討した。効果判定は PBMC 培養上清中に放出された HIV 粒子中の p24 量から判定した。

## 3) ペプチド融合阻害剤の設計・合成

フルオロアルケン型ジペプチドイソスターを合成するには、2 つの不斉点に挟まれたフルオロアルケン骨格を構築しなければならない。これまでに有機銅試薬、及びヨウ化サマリウムを用いた一電子還元によるフルオロアルケン骨格の合成法を見出している。本研究では、有機銅試薬を用いた一電子還元によるフルオロアルケン骨格の合成法を基盤として、アミノ酸の側鎖に相当する官能基の位置、及び立体選択的導入法について検討を行った。

## 4) 融合過程を標的とする新規治療薬スクリーニングシステムの構築

Heptad repeat (HR)1 と HR2 の結合において、HR2 は 3-helical bundle をとった HR1 の外側に結合する。HR1 の 3-helical bundle には、N 末端領域と C 末端領域に 2ヶ所のトリプトファンに富んだ配列を認識するポケットが存在し、T-20 は N 末端側の、C34 や SC35EK は C 末端側のポケットを含む配列を認識して 3-helical bundle とそれぞれ結合すると考えられている。

研究グループでは、スループットの高い化合物の展開を可能にするために、洗浄操作を必要としない連続的な試薬の分注による均一系での反応でアッセイを行うことが可能な AlphaScreen システムを活用することとした。AlphaScreen システムは、2 つのビーズに結合した分子が近傍に位置する際に、単波長光照射によって発生する一重項酸素の作用により得られる蛍光を検出するシステムで、さまざまなタグ化タンパク質等を利用して均一系でのアッセイ系が可能である。研究グループでは、HR1 及び HR2 の化学合成ペプチドを利用したアッセイ系を構築するべく、これに適用可能なヒスチジンタグ検出システムを用いることとした。アッセイ系に用いる HR1 及び HR2 に相当するペプチドは、N 末端ビオチン標識体及び N 末端 His6 標識体として、それぞれ化学合成した。この際、T-20 の結合領域と SC35EK の結合領域それぞれについてスクリーニング可能になるようペプチドを調製し、アッセイを行った。

## 5) 小分子リード化合物の創薬

抗菌活性を示すベンゾイルピリジン誘導体を合成した後、オキシムに誘導した化合物、ベンズイミダゾール環を有するフェニルケトン誘導体とそのオキシムの 2 種類、三環性芳香族化合物キサントノール、キサントン及びキサントニカルボン酸の 3 種類、N-ミリスチル(C14)フェニルグリシン、N-保護トリプトファン 3 種類:スルファニルイソロイシンとアセトアセチルトリプトファンから合成したヒドラジノ誘導体、ジフェニルイミダゾールチオ酢酸及びジフェニルオキサゾールチオ酢酸の 2 種類、イサチンチオセミカルバジドからのベンズイミダゾールメチルチオエーテル誘導体、アダマンタン誘導体 2 種類、アミノメチレンベンズイミダゾールアセトニトリル 2 種類の計 20 種類を合成した。

## (倫理面への配慮)

該当事項なし

## C. 研究結果

### 1) SC34 に対する耐性ウイルスの解析

SC34 は C34 に EK 置換を導入したペプチドであり優れた水溶性と高い抗 HIV 活性を示す。SC34 に対する耐性ウイルスを誘導した所、gp41 領域に 12 個の変異が導入されていた。導入された変異のうち、I37K、Q56R、N126K、N163D は単独で耐性を付与したが、その程度は非常に弱く耐性獲得には複数の変異蓄積が必須であることが示された。SC34 のアミノ酸配列を一部入れ替えた SC34EK は SC34 耐性ウイルスに対しても 5 倍程度しか感受性が低下せず非常に類似したペプチドが交差耐性を示さないことが明らかとなった。EK 置換が耐性ウイルスの抑制に有効であることが示された。

### 2) 多剤耐性 HIV に対する SC34, SC34EK の効果

T-20 耐性 HIV が同定されているが、これらの耐性ウイルスに対する SC34 誘導体の効果を検討した。T-20 耐性に寄与する変異、V38A、N43D、N43K を有する pNL4-3 由来の HIV 感染性クローンを使用し、作成した。これらのウイルスは SC34 及び SC34EK は低い交差耐性を示すものの、T-20 で見られるような高度耐性化は認められなかった。SC34 誘導体は C34 耐性 HIV に対するとときと同様に T-20 耐性 HIV にも効果を示すことを確認した。

日本で分離された多剤臨床分離株 3 株と感受性株 1 株に対する抗 HIV 効果を p24 法で検討した。日本では融合阻害剤が使用されていないこともあり、ウイルス株間での感受性にばら

つきはあるもののすべてのウイルス株において T-20 と SC34 誘導体は感受性であった。また、臨床分離株の gp41 領域のアミノ酸配列を決定したところ、SC34 誘導体が結合する N-helix 領域のアミノ酸配列は高度に保存されていたが、C-helix 領域はアミノ酸配列に置換が見られた。

臨床応用されている T-20 のアミノ酸を置換し、その活性の変化を解析した。T-20 に SC34EK で用いた EK 置換を導入し、活性が上昇するかを検討した。EK 置換を受けた T-20 はその効果が約 5 倍上昇し、C34 を EK 置換した場合とほぼ同様の結果が得られた。

### 3) 融合阻害剤の設計・合成

鍵中間体となるキラル補助基を分子内に有する  $\delta$ -amino- $\gamma$ -difluoro- $\alpha\beta$ -unsaturated sulfonamides は以前報告した合成法を応用して合成した。簡便な合成法を目指し、有機銅試薬による一電子還元と不斉アルキル化反応を One-Pot 反応で行うこととした。しかしながら、銅エノラートは反応性が低いため求電子剤との反応が遅く非効率的であることから、反応性の良いスズエノラートに変換し、求電子剤と反応させることにした。その結果、種々のアルキルハライドと効率よく反応し、高立体選択的に L-Xaa<sup>1</sup>- $\psi$ [(Z)-CF=CH]-L-Xaa<sup>2</sup>型ジペプチドイソスターの合成が可能であることを見出した。また、本法を応用することにより、フェニルアラニン (Phe) 側鎖となるベンジル基、アスパラギン酸 (Asp) やアスパラギン (Asn) 側鎖へ展開可能なオキシカルボニルメチル基、アルギニン (Arg)、グルタミン酸 (Glu) 及びグルタミン (Gln) 側鎖に展開可能なアリル基といった官能基を含む Xaa<sup>2</sup> 側鎖が導入され、高官能性フルオロアルケンジペプチドイソスターの合成が可能となった。

同様の合成経路において、不斉補助基として R-sultam を用いることにより、ジアステレオマーに相当する L-Xaa<sup>1</sup>- $\psi$ [(Z)-CF=CH]-D-Xaa<sup>2</sup>型ジペプチドイソスターが、いくぶん低収率ながら高立体選択的合成が可能であることを明らかにした。

29 アミノ酸から成る SC29EK も SC35EK に全く劣らない抗 HIV 活性を示した。これは、従来の天然配列の結果とは大きく異なる点である。さらに、7 残基を除いた SC22EK も、活性は低下するものかなり強力な抗 HIV 活性を維持していることが明らかとなった。

### 4) 融合過程を標的とする新規治療薬スクリーニングシステムの構築

C34 や SC35EK のように、HR1 の C 末端側のポケットに結合して阻害活性を示す低分子化合

物を探索するための評価系として、biotin-N36 と His6-C34 もしくは His6-SC35EK の等モル濃度の組み合わせについて検討し HR1 ペプチドと HR2 ペプチドの結合に基づくシグナルが検出された。

次に T20 のように HR1 の N 末端側のポケットに結合して阻害活性を示す化合物探索のための評価系として、biotin-HR1 (536-571) と His6-T20 もしくは His6-T20EK の等モル濃度の組み合わせについて検討を行った。その結果、His6-T20 を用いた系では、シグナルの検出が見られなかったものの、His6-T20EK を用いた系では、800nM 以上の濃度でシグナルの検出が見られた。

上記の実験をもとに、biotin-N36/His6-SC35EK、biotin-N36/His6-C34 及び biotin-HR(536-581)/His6-T20EK 相互作用について、それぞれ 150nM、300nM、1.5 $\mu$ M のタグ化ペプチドを用いて、ポジティブコントロールとなる阻害剤による阻害実験を行った。阻害剤として、C34、SC35EK、T20 および T20EK を用いた。

まず、biotin-N36/His6-SC35EK を用いた系では、C34 および SC35EK が、それぞれ IC<sub>50</sub> = 10-30、1-3  $\mu$ M 程度の阻害効果を示した。一方、T20 及び T20EK は 30 $\mu$ M でも阻害効果を示さなかった。

同様に、biotin-N36/His6-C34 を用いた系についても阻害実験を行ったところ、C34 及び SC35EK が、それぞれ IC<sub>50</sub> = 10、1-3  $\mu$ M 程度で阻害効果を示した。

続いて、biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK を用いた系で阻害実験を行ったところ、T20 及び T20EK により、それぞれ IC<sub>50</sub> = 30、10-30  $\mu$ M 程度の阻害活性が得られた。興味深いことに、この系では、C34 及び SC35EK もまた、それぞれ IC<sub>50</sub> = 30-100 nM、0.3-1  $\mu$ M 程度の強力な阻害活性を示した。HR1 領域のビオチンタグペプチドとして C34 及び SC35EK を認識する領域を含む biotin-HR1(536-581)を用いたため、この結合に伴う阻害活性が見られたものと考えられる。

### 5) HIV-細胞融合阻害活性を有する小分子化合物の創成

抗菌活性を示すベンゾイルピリジン誘導体を合成した後、オキシムに誘導した化合物 3 種類：抗 RS ウイルス活性を示すベンズイミダゾール環を有するフェニルケトン誘導体とそのオキシムの 2 種類：DNA などにインターカレーションしやすい三環性芳香族化合物キサンテノール、キサントン及びキサンテンカルボン酸の 3 種類：N-ミリスチル (C14) フェニルグリシン：N-保護トリプトファン 3 種類：スルファニルイソロイシンとアセト

アセチルトリプトファンから合成したヒドラジノ誘導体:ジフェニルイミダゾールチオ酢酸及びジフェニルオキサゾールチオ酢酸の2種類:麻疹ウイルスに活性のあるイサチンチオセミカルバジドからのベンズイミダゾールメチルチオエーテル誘導体:アダマンタン誘導体 2種類:アミノメチレンベンズイミダゾールアセトニトリル 2種類の計 20 種類を合成し、スクリーニングした。抗 HIV 活性は確認されたが融合阻害活性を示す化合物を見出すことはできなかった。

#### D. 考察

融合阻害剤 (C34) に対する耐性ウイルスの解析から、耐性獲得機序はペプチドの結合力低下であることを明らかにしている。gp41 をコードする部位は Rev responsive element (RRE) もコードしているために RRE 構造を保つような2次変異も必要であり、融合阻害剤に対する耐性獲得を困難にしていると考えられる。今年度の研究から C34 の誘導体である SC34 に対する耐性獲得は多くのアミノ酸変異を必要としていることが明らかとなった。また SC34 に類似したペプチドである SC34EK は SC34 耐性ウイルスにも有効であり交差耐性を示さないという知見は、より耐性ウイルスが出現しにくいペプチドを作成することが可能であり、併用することによって耐性ウイルスの出現を強力に抑制できることを示している。SC34EK で、その有効性が明らかにされた EK 置換を T-20 にも応用し活性の上昇を認めた。このことから EK 置換が膜融合機序を有するウイルス一般への普遍化できる可能性を示している。

今年度の研究によりジペプチドの2つの立体中心について、N 端側を原料アミノ酸により、C 端側をキラル補助基の作用によって導入することが可能であり、同時にフルオロアルケンを選択的に構築することが可能であることを明らかにした。本知見をもとに、現在研究グループでは、Glu-Glu 及び Lys-Lys ジペプチドに相当するフルオロアルケン型ジペプチドの合成に取り組んでいる。今後、HIV-1 膜融合阻害剤 SC35EK の Glu-Glu 及び Lys-Lys 部位にこれらのアルケンイソスターを組み入れ、構造活性相関を行う予定である。高活性化に必須なユニットとされるこれら2つのジペプチド部位を、ahelix 性を保持しながら非ペプチド化することにより、生体内安定性や薬物動態特性の向上が期待される。SC34EK の低分子量化に向けた研究では SC29EK も SC35EK に全く劣らない抗 HIV 活性を示し、さらに7残基を除いた SC22EK も活性を保持していた。このペプチドと非ペプチ

ド化を組み合わせる事により安定で活性の強いペプチドの創成を目指す。

我々は ELISA を用いた融合阻害活性を有する小分子化合物のスクリーニング系を既に構築しており、本年度に確立した AlphaScreen システムを用いたスクリーニング系と組み合わせることにより、より正確なスクリーニングが可能になるものと期待される。

小分子化合物の合成では十分な融合阻害活性を有する化合物を見出すことはできなかったが、これまでに同定した融合阻害活性を有する小分子化合物を基盤により強い活性を有する化合物の同定を目指して研究を進めている。

#### E. 結論

今年度の研究から融合阻害活性を有するペプチドに対する耐性機序は結合力低下、RRE 構造の維持などの共通の機構を有するもののペプチドの改変により変異部位は大きく変化することが明らかとなった。このことから異なるペプチドの併用は耐性出現阻止に大きな効果があると予想される。ペプチドの小分子量化、非ペプチド化と組み合わせることによって、臨床開発に向け大きな前進が期待される。小分子化合物としてヒドラジノアセトアセチルアミノ酸誘導体、ナフタレンスルホン酸誘導体、ジヒドロピリミドン誘導体、アゾ色素誘導体を合成し、6 剤 (16 年度)、2 剤 (17 年度) が新たに細胞レベルで抗 HIV 効果を示すことを見出している。これらの化合物をリードとして今後は更に活性の強い化合物の創成を試みる。

本研究の遂行によって新たな融合阻害剤を開発し、耐性ウイルスにも有効でかつ耐性が出現しない治療法の確立を目指す。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### 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   | 別添 |
| 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

アミノ酸置換を施した HIV-細胞融合を阻害するペプチド SC34 誘導体に対する新規耐性機序と現在使用されている T-20 耐性 HIV に対する交差耐性の有無を検討した。また、多剤耐性臨床分離株への効果も検討した。

### A. 研究目的

多剤併用療法（HAART）は human immunodeficiency virus (HIV) の複製を強力に抑制し、結果として後天性免疫不全症候群（エイズ）をコントロール可能な疾患へと変貌させつつある。このおかげで大多数の HIV 感染患者の quality of life (QOL) は大きく改善されてきている。しかし長期に亘る薬剤投与は耐性ウイルスの出現という問題を引き起こし、その克服は未解決のままである。このため耐性ウイルスに有効な新規の逆転写酵素 (RT) 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 (Trimeris-Roche 社、Fuzeon) は HIV と宿主細胞との融合を阻害し、現在、米国やヨーロッパ等で臨床応用され大きな効果を上げている。しかし T-20 は合成ペプチド製剤であるため治療費の大幅な増加という問題があ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。

本研究では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。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も有するものと期待される。本年度は C34 のアミノ酸を EK 置換した SC34 の耐性ウイルスを誘導し、同様に T-20 に EK 置換を導入した T-20EK の効果判定を行った (Figure 1)。

### B. 研究方法

1) SC34 に対する耐性ウイルスの解析  
耐性ウイルスを NL4-3 株と MT-2 細胞を用いた dose escalating 法によって誘導し、その責任変異を同定した。これらの変異が融合にどのような意義を持つかを感染性リコンビナント HIV において検討した。

2) 多剤耐性 HIV に対する効果  
長期に亘る HAART によって薬剤耐性を獲得した臨床分離株を HIV 感染患者から分離し、これらに対する SC34 誘導体の効果を健常人末梢リンパ球で検討した。効果判定は PBMC 培養上清中に放出された HIV 粒子中の p24 量から判定した。

3) T20 のアミノ酸の変更  
T-20 の低分子化を目的とし、T-20 のアミノ酸配列を SC34 誘導体と同様に EK による置換を試みた。

4) HIV 細胞融合の非感染系モデルによるスクリーニング  
HIV gp41 領域の N-terminus heptad repeat (N-HR: N36) と C-HR (C34) をそれぞれ MBP と GST の融合蛋白として大腸菌で合成し、これらの結合を ELISA で検出するスクリーニング法を確立しており、これを応用し、今年度合成した小分子化合物をスクリーニングした。さらに使用する N 領域のペプチドの長さを変更し、小分子化合物の結合サイトの同定を試みた。

#### （倫理面への配慮）

基礎的研究であり、特に必要ないと考えられた。

### C. 研究結果

1) SC34 耐性ウイルスの誘導  
C34 に EK 置換を導入した SC34 の耐性ウイルスを分離した。SC34 耐性ウイルスは gp41 領

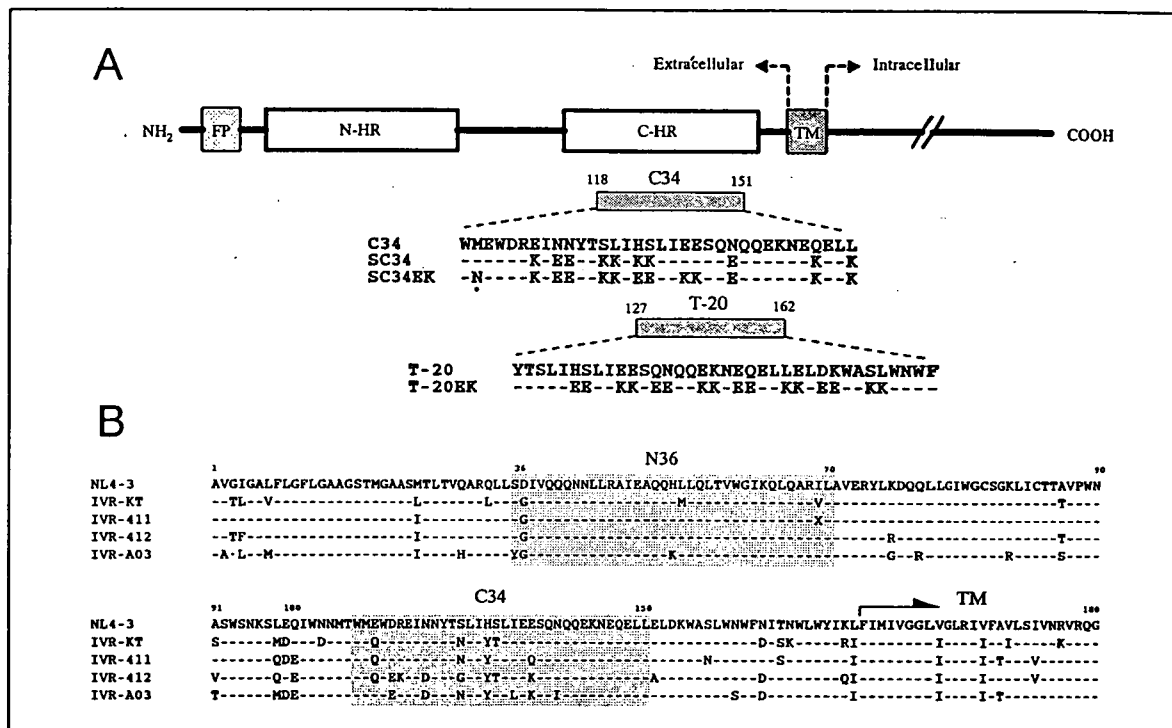


Figure 1. SC34誘導体と臨床分離株の gp41アミノ酸配列.

(A) HIV gp41の構造を示す。Fusion peptide (FP), N-terminal heptad repeat region (N-HR), C-terminal heptad repeat region (C-HR), transmembrane domain (TM)とC34およびSC34のアミノ酸配列を示す。SC34EKにおける\*はnorleucineを示す。アミノ酸番号はNL4-3株を基にしている。(B) 臨床分離株(KT, IVR411, IVR412, IVR-A03)のアミノ酸配列を示す。N36とC34に相当する部位を灰色で示す。NL4-3株と同じ配列はハイフンで、アミノ酸欠出はドットで示した。X gray. Identical amino acid to NL4-3 is indicated as Deleted amino acid is indicated as a dot. X in amino acid sequence indicates the mixture of I and V for IVR411で見られるXはイソロイシンとバリンの配列を持つウイルスが共存していることを示す。

域に12個の変異が導入されており、約350倍耐性化していた。導入された変異のうち、I37K, Q56R, N126K, N163Dだけが単独で耐性を示したが、その程度は5倍以下と非常に弱くSC34に対してHIVは容易に耐性化できないと考えられた。SC34のアミノ酸配列を一部入れ替えたSC34EKはSC34耐性HIVに対して5倍程度しか感受性が低下せず非常に類似したペプチドが交差耐性を示さないことが明らかとなった。これらのことから、EK置換の部位を変えることによって交叉耐性を抑えることが可能であることが示唆された。

## 2) SC34誘導体のT-20耐性HIVに対する効果

SC34誘導体を臨床治療に応用するためにT-20耐性HIVに対して効果を示すのかどうかを検討した。T-20耐性に寄与する変異、V38A, N43D, N43Kを有するpNL4-3由来のHIV感染性クローンを使用し、作成した。SC34およびSC34EKはこれらのウイルスに対して、低い交差耐性を示すものの、T-20で見られるような高度耐性化は引き起こさなかった(Table 1)。

Table 1. MAGI法による抗HIV活性

	ddC	EC <sub>50</sub> (nM)				
		N36	T-20	C34	SC34	SC34EK
WT <sup>a)</sup>	404	180	35	3.2	1.4	0.7
L33S	289	3.9	>1000	2.9	1.3	0.9
N43K	220	382	278	180	2.7	2.3
ΔFNSTW/L33S/N43K						
	115	115	191	51	1.8	4.4
ΔFNSTW <sup>b)</sup>						
	653	211	208	5.3	1.1	0.5
ΔFNSTW/D36G/I37K/N126K/L204I <sup>c)</sup>						
	246	547	754	67	4.6	2.9
V38A	714	407	402	96	2.0	1.1
D36S/V38M <sup>d)</sup>						
	296	178	42	7.2	1.9	0.8
N43D	430	461	>1000	>100	29	1.0

b). HIV-1<sub>NL4-3</sub>を野生株として用いた。c). ΔFNSTWはgp120 V4領域364-368の5アミノ酸の欠失を示す。d). このウイルスはC34耐性ウイルスとして報告した。e). in vitroにおけるT-20耐性HIVとして報告された。

このことからSC34誘導体はC34耐性HIVに対すると同様にT-20耐性HIVにも効果を示すことを確認した。

## 3) FCSによる活性の変化

SC34誘導体の血清蛋白との相互作用を検討した。通常の実験に用いる牛胎児血清(FCS)の濃度10%を基準として、5、25、50%存在下で抗HIV活性を測定した。臨床で用いられ、血清蛋白の影響を受けにくい逆転写酵素阻



害剤 ddC と融合阻害剤 T-20、その影響を比較的受けやすいと報告されている逆転写酵素阻害剤 MKC-442 をコントロールとした。過去の報告どおり、ddC や T-20 は血清蛋白の影響を受けにくく、血清蛋白の濃度が上昇してもその抗 HIV 活性は比較的保たれたが、MKC-442 は 50% FCS で活性が半分以下になったが、SC34 誘導体はその活性を維持していた (Figure 2)。

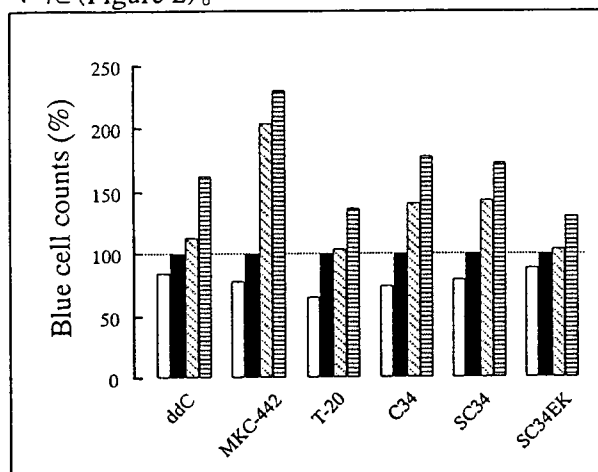


Figure 2. FCS 濃度の抗 HIV 活性に対する影響  
MAGI アッセイにおいて 10% FCS で EC<sub>50</sub> を示す薬剤濃度での HIV の感染性を 100% とした。FCS 濃度を 5 (白)、10 (黒)、25 (斜)、50 % (横) としてその感染性への変化を棒グラフで表した。

#### 4) 多剤耐性臨床分離株への効果

日本で分離された多剤臨床分離株 3 株と感受性株 1 株に対する抗 HIV 効果を p24 法で検討した。日本では融合阻害剤が使用されていないこともあり、ウイルス株間での感受性にばらつきはあるもののすべてのウイルス株において T-20 と SC34 誘導体は感受性であった。また、臨床分離株の gp41 領域のアミノ酸配列を決定したところ、SC34 誘導体が結合する N-helix 領域のアミノ酸配列は高度に保存されていたが、C-helix 領域はアミノ酸配列に置換が見られた (Figure 1)。

#### 5) T-20 のアミノ酸置換

現在、米国を中心に使用されている T-20 のアミノ酸を置換し、その活性の変化を検討した。今年度は T-20 に SC34EK で用いた EK 置換を導入し、活性が上昇するかを検討した。水溶性に乏しい C34 は EK 置換によって水溶性になり、高濃度での調整が可能となっただけでなく、その抗 HIV 活性も約 10 倍上昇している。また、抗 HIV 活性を残したまま 29 アミノ酸まで低分子化可能であった。活性自体は低下するものの 22 アミノ酸まで低分子化した SC22EK も抗 HIV 活性を有していた。この EK 置換を今年度は T-20 に応用した (Figure 1)。

EK 置換を受けた T-20 はその効果が約 5 倍上昇し、C34 を EK 置換した場合とほぼ同様の結果が得られた。

#### 6) ELISA によるスクリーニング

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 法とほぼ同レベルで測定が可能であった。他の融合阻害ペプチドも同様に測定可能であったが、臨床応用されている T-20 はこの方法では 100 μM 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 を C 末側に延ばした MBP-N36-89 を作成して検討したところ弱いながら T-20 の活性測定が可能となった。この方法を用いて小分子化合物をスクリーニングした今年度は有効な分子を同定するにはいたらなかったが、スクリーニングに使用する融合ペプチドの長さを変更することによってペプチドおよび今までに同定した小分子化合物の主な結合部位を大まかに予想することが可能となった。このことによって今までは耐性 HIV を誘導することによって推定していた作用機序の解明や、結合部位の同定を比較的容易にすすめることが可能になった。

#### D. 考察

昨年度 HIV-細胞融合阻害活性を有する C34 耐性ウイルスの誘導・解析から耐性に直接関与する 1 次変異 (C34 の結合力低下と競合力増加) と低下したウイルス複製能を補正する 2 次変異 (gp41 変異によって変化した RRE 構造の安定化) の役割を明らかにした。今年度はこの C34 の誘導体である SC34 の耐性 HIV を誘導した。SC34 耐性 HIV は C34 耐性 HIV よりも耐性変異の導入を必要とし、そのアミノ酸変異数は 10 以上である。このことは生体内でも SC34 に対する耐性を獲得しにくいことを示す。さらに明らかな primary mutation が存在しないことは同時に複数のアミノ酸変異を導入しなければいけないことを示し、このことから耐性化が困難であると考えられた。

SC34 耐性ウイルスにおいても C34 耐性 HIV で見られたようにアミノ酸をコードするだけでなく RNA 機能分子としても働く RRE の機能を回復する変異が導入されていた。このこともこの部位に変異を導入して耐性を獲得することがウイルスにとって容易ではないことを示

しており耐性化しにくい抗 HIV 剤としての有利な点である。HIV は RT やプロテアーゼ阻害剤に対して耐性化しにくい多剤耐性化するには多数の変異を導入しなければならないが、このことは複数の融合阻害剤に対する耐性を獲得することは容易ではないと考えられる。我々は現在米国、ヨーロッパで使用されている T-20 を上回る薬剤の同定を目指しており、現時点で SC34 および SC34EK などのペプチドが候補として目標を満たしている。また SC34 耐性ウイルスの誘導実験からアミノ酸配列が非常に類似したペプチド SC34EK が交差耐性を示さないことは興味深い結果である。すなわちアミノ酸の配列を入れ替えることで交差耐性化を防ぐペプチドデザインが可能であることを示している。

今年度はこの EK 置換を T-20 にも応用し、その効果を検討したところ C34 で見られたものと同様、活性が上昇した。しかし、T-20 耐性 HIV に対してはその高感受性を維持することはできないという結果であった。この C34 と T-20 での効果の違いは今後さらなる検討を加えて耐性 HIV にも効果を示すようなアミノ酸置換を行う予定である。

本研究の遂行によって新たな融合阻害剤を開発し、耐性ウイルスにも有効でかつ耐性が出現しない治療法の確立を目指す。

## E. 結論

今年度は EK 置換を導入したペプチドの耐性機序の解明と耐性 HIV に対する効果の判定を行ってきた。SC34 は C34 や T-20 耐性 HIV に対しても効果を示した。一方 T-20 に EK 置換を導入した T-20EK においても抗 HIV 活性が上昇していた。SC34 耐性 HIV の解析から耐性化には少なくとも 10 以上の変異が必要であり、さらに RRE 構造の維持に必要な変異も導入されており、耐性化は容易ではないと考えられ、さらに primary mutation が認められないことから耐性化は非常に困難であると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, Kawakami H, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Ikeda

S, Kodama E, Matsuoka M, and Shinkai H. Novel HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from Quinolone Antibiotics. *J. Med. Chem.* 49(5): 1506-1508, 2006.

2. Fan J, Kodama E, Koh Y, Nakao M, Matsuoka M. Halogenated thymidine analogues restore the expression of silenced genes without demethylation. *Cancer Res.* 65:6927-33, 2005.

3. 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

4. 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.

## 2. 学会発表

1. 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. Feb. 22-25

2. Kodama E, Mabuchi N, Otaka A, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Kobe, Japan 2005 July 1-5

3. 上野真理子、梶原慶子、志村和也、児玉栄一、松岡雅雄:融合阻害剤 T-20 (Fuzeon) に対する耐性 HIV の解析:第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日

4. 梶原慶子、児玉栄一、松岡雅雄: MTT 法を用いた CXCR4 および CCR5 トロピック HIV-1 に対する薬剤感受性試験法: 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日

5. 児玉栄一、梶原慶子、大高章、藤井信孝、松岡雅雄: 水溶性 C34 誘導体の抗 HIV 効果: 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日

6. 川本敦司、児玉栄一、大類洋、満屋裕明、松岡雅雄: 核酸系逆転写酵素阻害剤 4'-ethynyl-2-halo-deoxyadenosine 誘導体の耐性 HIV 複製阻害活性の検討: 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特願 2004-007 発明の名称: 4'-C-置換-2-ハロアデノシン誘導体

##### 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：京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝

**研究要旨** 新規低分子 HIV-1 膜融合阻害剤の探索のための AlphaScreen™ システムを用いた新規ハイスループットスクリーニングシステムを構築した。また、これまでに見いだされた SC35EK の非ペプチド化を目的としたフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立した。

**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**

**A. 研究目的**

HIV-1 感染におけるウイルスと標的細胞間の膜融合過程において、HIV-1 エンベロープ蛋白質 gp41 の N 末端側 (HR1) および C 末端側 (HR2) の  $\alpha$ -ヘリックス領域は逆平行型に相互作用し、6-helical bundle を形成する。近年、HIV-1 膜融合剤阻害剤として臨床応用されている enfuvirtide (DP-178, T20, 商品名：Fuzeon) は、この過程を阻害する 36 残基からなるペプチドであり、多剤耐性克服型抗 HIV 剤になりうる薬剤として注目を集めている。

当該研究グループでは、これまでに enfuvirtide の約 20 倍の活性を有する 35 アミノ酸残基からなるペプチド SC35EK を見だし、低分子化研究により 29 残基の SC29EK でも同等の活性が保持されることを明らかにしている。平成 18 年度は、低分子膜融合阻害剤の開発を目的として、HR1 と HR2 の結合を阻害する低分子化合物をスクリーニングするための評価系の確立に取り組んだ。

**B. 研究方法**

HR1 と HR2 の結合において、HR2 は 3-helical bundle をとった HR1 の外側に結合する。HR1 の 3-helical bundle には、N 末端領域と C 末端領域に、2ヶ所の HR2 のトリプトファンに富んだ配列を認識するポケットが存在し、enfuvirtide は N 末端側の、C34 や SC35EK は C 末端側のポケットを含む配列を認識して 3-helical bundle とそれぞれ結合すると考えられている。

研究グループでは、スループットの高い化合物の展開を可能にするために、洗浄操作を必要としない連続的な試薬の分注による均一

系での反応でアッセイを行うことが可能な AlphaScreen™ システムを活用することとした。AlphaScreen™ システムは、2つのビーズに結合した分子が近傍に位置する際に、単波長光照射によって発生する一重項酸素の作用により得られる蛍光を検出するシステムで、さまざまなタグ化タンパク質等を利用して均一系でのアッセイ系が可能である。研究グループでは、HR1 および HR2 の化学合成ペプチドを利用したアッセイ系を構築するべく、これに適用可能なヒスチジンタグ検出システムを用いることとした。アッセイ系に用いる HR1 および HR2 に相当するペプチドは、N 末端ビオチン標識体および N 末端 His6 標識体として、それぞれ化学合成した。この際、enfuvirtide の結合領域と SC35EK の結合領域それぞれについてスクリーニング可能になるよう、下表のペプチドを調製し、アッセイ系への利用について以下検討を行った。

表 1：アッセイ系に用いた化学合成ペプチド

HR1 領域 (N 末端ビオチン標識ペプチド)
Biotin-HR1(536-571)
Biotin-HR1(536-581)
Biotin-N36 (HR1(546-581))
HR2 領域 (N 末端 His6 標識ペプチド)
His6-C34 (HR2(628-661))
His6-SC35EK
His6-T20 (HR2(638-673))
His6-T20EK

**(倫理面への配慮)**

該当事項なし

**C. 研究結果**

(1) アッセイ系の構築

まず、C34 や SC35EK のように、HR1 の C 末

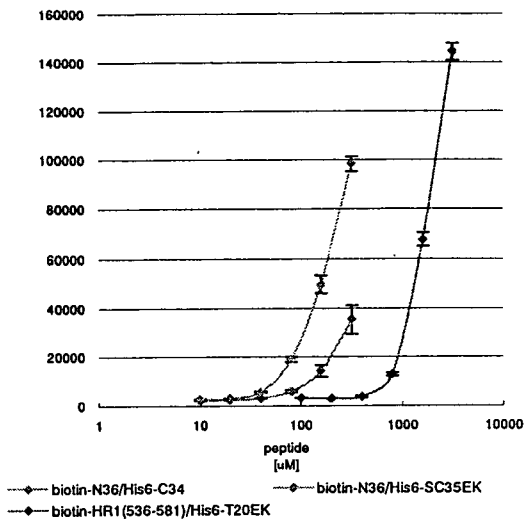


図1:HR1 ペプチドとHR2 ペプチドの結合

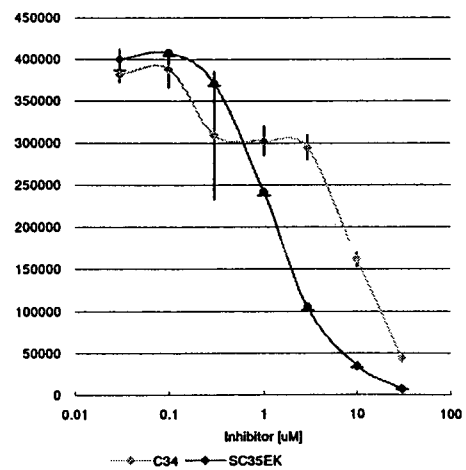


図3:biotin-N36/His6-C34 相互作用の阻害活性

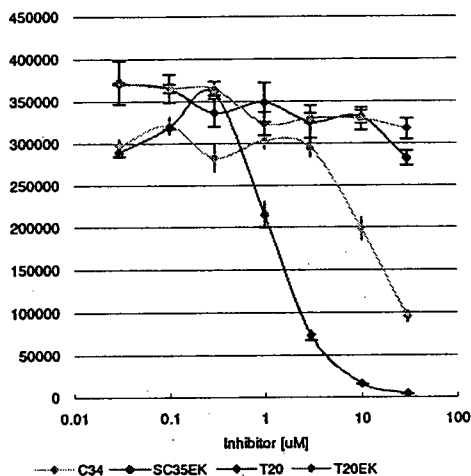


図2:biotin-N36/His6-SC35EK 相互作用の阻害活性

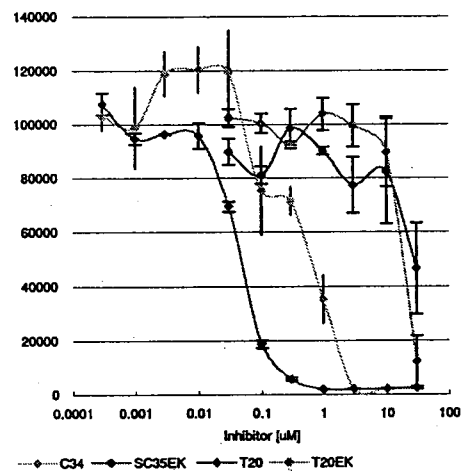


図4:biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK 相互作用の阻害活性

端側のポケットに結合して阻害活性を示す低分子化合物を探索するための評価系として、biotin-N36とHis6-C34もしくはHis6-SC35EKの等モル濃度の組み合わせについて検討した(図1)。その結果、His6-C34を用いた際には80nM以上、His6-SC35EKを用いた際には40nM以上のペプチド濃度の時に、HR1ペプチドとHR2ペプチドの結合に基づくシグナルが検出された。

続いて、T20のようにHR1のN末端側のポケットに結合して阻害活性を示す化合物探索のための評価系として、biotin-HR1(536-571)とHis6-T20もしくはHis6-T20EKの等モル濃度の組み合わせについて検討を行った。しかしながら、いずれの系においてもペプチド濃度が30μMであってもシグナルが検出されなかった。研究グループでは、この原因が、ペプチドHR1(536-571)が安定な3-helical bun-

dle構造をとらず、T20およびT20EKが結合できないためであると考え、biotin-HR1(536-571)に代えて、C末端側のポケットの領域も含むbiotin-HR1(536-581)を用いた系について検討を行った。その結果、His6-T20を用いた系では、シグナルの検出が見られなかったものの、His6-T20EKを用いた系では、800nM以上の濃度でシグナルの検出が見られた。

(2) ポジティブコントロールを用いた阻害実験  
上記の実験をもとに、biotin-N36/His6-SC35EK、biotin-N36/His6-C34およびbiotin-HR1(536-581)/His6-T20EK相互作用について、それぞれ150nM、300nM、1.5μMのタグ化ペプチドを用いて、ポジティブコントロールとなる阻害剤による阻害実験を行った。阻害剤と

して、C34、SC35EK、T20 および T20EK を用いた。

まず、biotin-N36/His6-SC35EK を用いた系では、C34 および SC35EK が、それぞれ  $IC_{50} = 10\text{-}30$ 、 $1\text{-}3 \mu\text{M}$  程度の阻害効果を示した(図2)。一方、T20 および T20EK は  $30\mu\text{M}$  でも阻害効果を示さなかった。

同様に、biotin-N36/His6-C34 を用いた系についても阻害実験を行ったところ、C34 および SC35EK が、それぞれ  $IC_{50} = 10$ 、 $1\text{-}3 \mu\text{M}$  程度で阻害効果を示した(図3)。

続いて、biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK を用いた系で阻害実験を行ったところ、T20 および T20EK により、それぞれ  $IC_{50} = 30$ 、 $10\text{-}30 \mu\text{M}$  程度の阻害活性が得られた(図4)。しかしながら、 $10 \mu\text{M}$  以上の濃度ではこれらの阻害剤が可溶化しているかは不明であり、非特異的相互作用による阻害効果の可能性も否定できない。興味深いことに、この系では、C34 および SC35EK もまた、それぞれ  $IC_{50} = 30\text{-}100 \text{ nM}$ 、 $0.3\text{-}1 \mu\text{M}$  程度の強力な阻害活性を示した。HR1 領域のビオチンタグペプチドとして C34 および SC35EK を認識する領域を含む biotin-HR1(536-581)を用いたため、この結合に伴う阻害活性が見られたものと考えられる。

#### D. 考察

AlphaScreen システムを用いたスクリーニング系を構築するにあたり、3種類の合成ペプチドの組み合わせからなる系において、アッセイに用いることが可能なシグナルが検出された。シグナル検出に必要なとされたペプチド濃度をもとに、HR1 領域と HR2 領域のペプチド間の親和性は、 $\text{N36/SC35EK} > \text{N36/C34} >> \text{HR1(536-581)/T20EK}$  と推測される。

ポジティブコントロールを用いた阻害実験からは、T20 や T20EK といった HR1 の N 末端領域を認識するペプチドの評価には、biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK の系のみが有効であることが明らかとなった。

一方、C34 や SC35EK といった HR1 の C 末端領域を認識するペプチドの評価にはすべてのペプチドの組み合わせが利用可能である。しかしながら、biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK の系において C34 や SC35EK が高感度で阻害活性を検出できたのは、C34 や SC35EK が HR1 に対して高親和性であり、かつ T20EK と重複した認識部位を有しているためであることから、HR1 の C 末端側のポケット

のみに結合親和性を有する低分子化合物の活性評価には適していないと判断された。Biotin-N36/His6-SC35EK および biotin-N36/His6-C34 の系の間では、結合親和性を補うために異なるペプチド濃度を使用しているため、感度に大きな違いはなく、相互作用の阻害活性を評価するためにはいずれの系を使うことも可能であると考えられる。

#### E. 結論

本年度の研究により、AlphaScreen™ システムを用いた2ヶ所の結合部位に対する HIV-1 膜融合阻害剤探索に用いることが可能な新規スクリーニング系を確立した。今後、このスクリーニング系を用いることにより、研究グループが保有する化合物ライブラリーのスクリーニングを実施し、新規低分子膜融合阻害剤の探索を行う。

### 分担研究項目 2 : 融合阻害剤の設計・合成

#### A. 研究目的

高活性 HIV-1 膜融合阻害剤として見いだされた SC35EK、SC29EK および SC22EK の非ペプチド誘導体への構造変換を目的として、共通の Glu-Glu、Lys-Lys ジペプチド構造に対するアルケン型ジペプチドイソスターの導入について検討を行った。昨年度の研究において、Lys-Lys 間のペプチド結合の (E)-CH=CH 型アルケンへの変換により、抗 HIV 活性が低下することを明らかにした。研究グループでは、この活性の低下が、 $\alpha$ ヘリックス構造形成のための水素結合に必要なアミド水素およびカルボニル酸素が失われ、活性発現に必要な二次構造をとることができなくなったことに起因するものと考え、カルボニル酸素に相当するフッ素原子を有する新規 (Z)-CF=CH 型アルケン(フルオロアルケン)を含有するペプチドイソスターの立体選択的合成法の開発に取り組んだ(図5)。

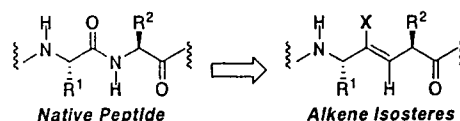


図5:アルケン型ジペプチドイソスターの化学構造

#### B. 研究方法

フルオロアルケン型ジペプチドイソスターを合成するには、二つの不斉点に挟まれたフル

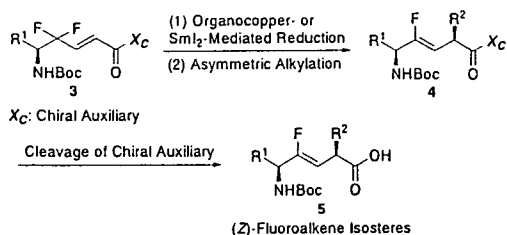


図6: (Z)-CF=CH 型ジペプチドイソスターの合成経路

オロアルケン骨格を構築しなければならない。これまでに研究グループでは、有機銅試薬、及びヨウ化サマリウムを用いた一電子還元によるフルオロアルケン骨格の合成法を見いだしている。本研究では、有機銅試薬を用いた一電子還元によるフルオロアルケン骨格の合成法を基盤として、アミノ酸の側鎖に相当する官能基の位置、及び立体選択的導入法について検討を行った(図6)。

### (倫理面への配慮)

該当事項なし

## C. 研究結果

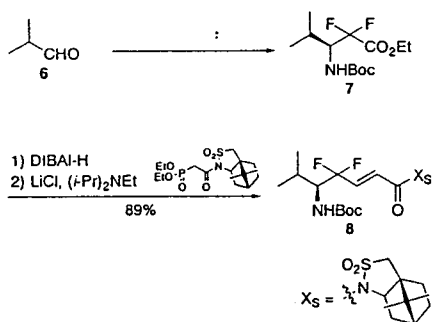


図7: (Z)-CF=CH 型ジペプチドイソスターの鍵中間体の合成

鍵中間体となるキラル補助基を分子内に有する  $\delta$ -amino- $\gamma,\gamma$ -difluoro- $\alpha,\beta$ -unsaturated sulfonamides **6** は以前報告した合成法を応用して合成した(図7)。

得られた鍵中間体に対し、一電子還元剤として有機銅試薬を作用させたところ Gilman 型の場合に定量的に反応が進行することがわかった(図8)。そこでより簡便な合成法を目指し、有機銅試薬による一電子還元と不斉アルキル化反応を One-Pot 反応で行うこととした。しかしながら、銅エノラートは反応性が低いため求電子剤との反応が遅く非効率的であることから、反応性の良いスズエノラートに変換し、求電子剤と反応させることにした。その結果、種

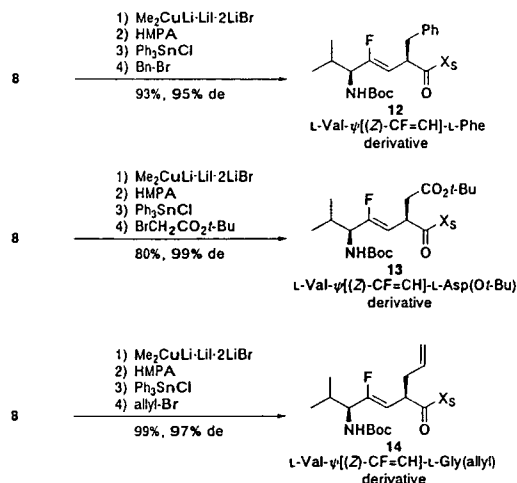
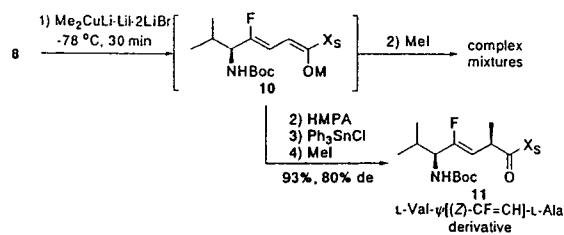


図8: L-Xaa<sup>1</sup>- $\psi$ [(Z)-CF=CH]-L-Xaa<sup>2</sup> 型ジペプチドイソスターの合成

々のアルキルハライドと効率よく反応し、高立体選択的に L-Xaa<sup>1</sup>- $\psi$ [(Z)-CF=CH]-L-Xaa<sup>2</sup> 型ジペプチドイソスターの合成が可能であることを見いだした。また、本法を応用することにより、フェニルアラニン(Phe)側鎖となるベンジル基、アスパラギン酸(Asp)やアスパラギン(Asn)側鎖へ展開可能なオキシカルボニルメチル基、アルギニン(Arg)、グルタミン酸(Glu)およびグルタミン(Gln)側鎖に展開可能なアリル基といった官能基を含む Xaa<sup>2</sup> 側鎖が導入され、高官能性フルオロアルケンジペプチドイソスターの合成が可能となった。

同様の合成経路において、不斉補助基として *R*-sultam を用いることにより、ジアステレオマーに相当する L-Xaa<sup>1</sup>- $\psi$ [(Z)-CF=CH]-D-Xaa<sup>2</sup> 型ジペプチドイソスターが、いくぶん低収率ながら高立体選択的合成が可能であることを明らかにした(図9)。

## D. 考察

本研究により、ジペプチドの2つの立体中心について、N 端側を原料アミノ酸により、C 端側をキラル補助基の作用によって導入することが可能であり、同時にフルオロアルケンを Z 選択的に構築することが可能であることを明

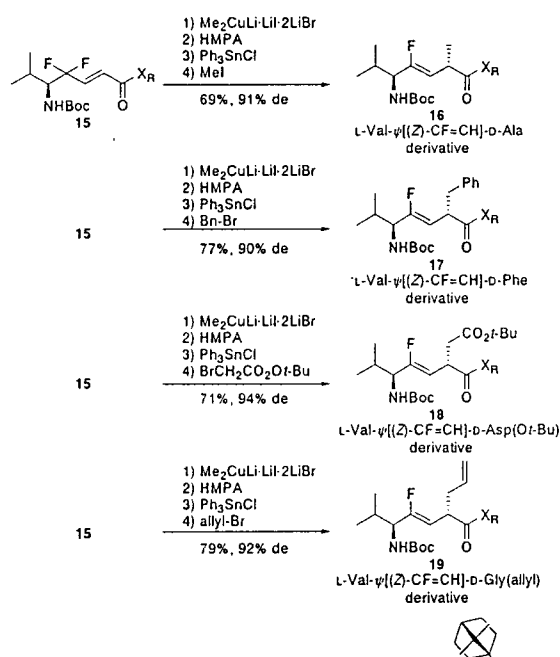


図9: L-Xaa<sup>1</sup>-ψ[(Z)-CF=CH]-D-Xaa<sup>2</sup> 型ジペプチドイソスターの合成

らかにした。本知見をもとに、現在研究グループでは、Glu-Glu および Lys-Lys ジペプチドに相当するフルオロアルケン型ジペプチドの合成に取り組んでいる。今後、HIV-1 膜融合阻害剤 SC35EK の Glu-Glu および Lys-Lys 部位にこれらのアルケンイソスターを組み入れ、構造活性相関を行う予定である。高活性化に必須なユニットとされるこれら2つのジペプチド部位を、αヘリックス性を保持しながら非ペプチド化することにより、生体内安定性や薬物動態特性の向上が期待される。

## E. 結論

以上のように、本研究では、HIV-1膜融合阻害剤 SC35EK の非ペプチド化を指向した分子設計において、重要な構造ユニットとなるフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立した。従来法では解決できなかった2つの不斉中心を持つイソスターの合成法が確立したことにより、今後の SC35EK の構造活性相関研究への展開が期待される。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ohno H, Kadoh Y, Fujii N, Tanaka T. Potassium carbonate-promoted stereospecific 5-endo-trig cyclization of unactivated allenes in the absence of any transition metals. *Org Lett.* **2006**, *8*, 947-50.
- Niida A, Tomita K, Mizumoto M, Tanigaki H, Terada T, Oishi S, Otaka A, Inui, K, Fujii N. Unequivocal synthesis of (Z)-alkene and (E)-fluoroalkene dipeptide isosteres to probe structural requirements of the peptide transporter PEPT1. *Org Lett.* **2006**, *8*(4), 613-6.
- Ohta Y, Itoh S, Shigenaga A, Shintaku S, Fujii N, Otaka A. Cysteine-derived s-protected oxazolidinones: potential chemical devices for the preparation of peptide thioesters. *Org Lett.* **2006**, *8*(3), 467-70.
- Avniel S, Arik Z, Maly A, Sagie A, Basst HB, Yahana MD, Weiss ID, Pal B, Wald O, Ad-El D, Fujii N, Arenzana-Seisdedos F, Jung S, Galun E, Gur E, Peled A. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns. *J Invest Dermatol.* **2006**, *126*(2), 468-76.
- Oishi, S.; Miyamoto, K.; Niida, A.; Yamamoto, M.; Ajito, K.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Kuroda, Y.; Asai, A.; Fujii, N. Application of tri- and tetrasubstituted alkene dipeptide mimetics to conformational studies of cyclic RGD peptides. *Tetrahedron* **2006**, *62*(7), 1416-1424.
- Tamamura H, Esaka A, Ogawa T, Araki T, Ueda S, Wang Z, Trent JO, Tsutsumi H, Masuno H, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Otaka A, Fujii N. Structure-activity relationship studies on CXCR4 antagonists having cyclic pentapeptide scaffolds. *Org Biomol Chem.* **2005**, *3*(24), 4392-4.
- Tamamura H, Fujii N. The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets.* **2005**, *9*(6), 1267-82.
- Navenot JM, Wang Z, Chopin M, Fujii N, Peiper SC. Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor



- activity of kisspeptins. *Cancer Res.* **2005**, 65(22), 10450-6.
9. Tamamura H, Otaka A, Fujii N. Development of anti-HIV agents targeting dynamic supramolecular mechanism: entry and fusion inhibitors based on CXCR4/CCR5 antagonists and gp41-C34-remodeling peptides. *Curr HIV Res.* **2005**, 3(4), 289-301.
  10. Niida, A.; Oishi, S.; Sasaki, Y.; Mizumoto, M.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Otaka, A. Facile access to (Z)-alkene-containing diketopiperazine mimetics utilizing organo copper-mediated anti-SN2' reactions. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46(24), 4183-4186.
  11. Bhonsle, J. B.; Wang, Z.-x.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Peiper, S. C.; Trent, J. O. A simple, automated quasi-4D-QSAR, quasi-multi way PLS approach to develop highly predictive QSAR models for highly flexible CXCR4 inhibitor cyclic pentapeptide ligands using scripted common molecular modeling tools. *QSAR & Comb. Sci.* **2005**, 24 (5), 620-630.
  12. Niida A, Wang Z, Tomita K, Oishi S, Tamamura H, Otaka A, Navenot JM, Broach JR, Peiper SC, Fujii N. Design and synthesis of downsized metastatin (45-54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. *Bioorg Med Chem Lett.* **2006**, 16(1), 134-7.
  13. Ueda S, Fujita M, Tamamura H, Fujii N, Otaka A. Photolabile protection for one-pot sequential native chemical ligation. *Chembiochem.* **2005**, 6(11), 1983-6.
  14. Retz M, Sidhu SS, Lehmann J, Tamamura H, Fujii N, Basbaum C. New HIV-drug inhibits in vitro bladder cancer migration and invasion. *Eur Urol.* **2005**, 48(6), 1025-30.
  15. Zhong Y, Yoshinaka Y, Takeda T, Shimizu N, Yoshizaki S, Inagaki Y, Matsuda S, Honda G, Fujii N, Yamamoto N. Highly potent anti-HIV-1 activity isolated from fermented *Polygonum tinctorium* Aiton. *Antiviral Res.* **2005**, 66(2-3), 119-28.
  16. Tamamura H, Araki T, Ueda S, Wang Z, Oishi S, Esaka A, Trent JO, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Otaka A, Fujii N. Identification of novel low molecular weight CXCR4 antagonists by structural tuning of cyclic tetrapeptide scaffolds. *J Med Chem.* **2005**, 48(9), 3280-9.
  17. Tamamura H, Hiramatsu K, Ueda S, Wang Z, Kusano S, Terakubo S, Trent JO, Peiper SC, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Stereoselective synthesis of [L-Arg-L/D-3-(2-naphthyl)alanine]-type (E)-alkene dipeptide isosteres and its application to the synthesis and biological evaluation of pseudopeptide analogues of the CXCR4 antagonist FC131. *J Med Chem.* **2005**, 48(2), 380-91.
  18. Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M, Heveker N. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem.* **2005**, 280(11), 9895-903.
  19. Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev-responsive element functions. *J Virol.* **2005**, 79(2), 764-70.

## 2. 学会発表

1. ○ Satoshi Ueda, Akira Otaka, Hirokazu Tamamura and Nobutaka Fujii. Development of New Photoremovable Protecting Group and its Application toward Chemical Synthesis of 7TM-GPCR. 19<sup>th</sup> American Peptide Symposium (2005.6, San Diego, U.S.A.)
2. ○ Ayumu Niida, Shinya Oishi, Makiko Mizumoto, Yoshikazu Sasaki, Kenji Tomita, Hirokazu Tamamura, Akira Otaka, Tomohiro Terada, Ken-ichi Inui and Nobutaka Fujii. UNEQUIVOCAL SYNTHESIS OF (Z)-ALKENE OR (E)-FLUOROALKENE DIPEPTIDE ISOSTERES VIA DKP MIMETICS TO PROBE STRUCTURAL REQUIREMENTS OF PEPTIDE TRANSPORTER. 19<sup>th</sup> American Peptide Symposium (2005.6, San Diego, U.S.A.)
3. ○ 太田悠介、伊藤紗織、藤井信孝、大高章 システイン由来アシルオキサゾリジノンを利用したチオエステルの合成とペプチド

- 合成への展開研究. 第42回ペプチド討論会(大阪)平成17年10月27日
4. ○新居田歩、富田健嗣、谷垣浩晃、寺田智祐、水本真紀子、大野浩章、玉村啓和、大高章、乾賢一、藤井信孝 アルケン型ペプチドイソスターの合成とペプチドトランスポーター(PEPT1)の構造的な要求解明への応用 第42回ペプチド討論会(大阪)平成17年10月27日
  5. ○玉村啓和、平松健一、荒木威亙、上田聡、大石真也、江坂藍、Zixuan Wang、Stephen C. Peiper、John O. Trent、中島秀喜、山本直樹、大高章、藤井信孝 CXCR4 アナログの合成と活性評価 第42回ペプチド討論会(大阪)平成17年10月28日
  6. ○富田健嗣、新居田歩、大石真也、大野浩章、大高章、藤井信孝 RWアミドを有する hOT7T175 アゴニストの構造活性相関研究 第42回ペプチド討論会(大阪)平成17年10月28日
  7. ○鳴海哲夫、新居田歩、富田健嗣、大石真也、大高章、大野浩章、藤井信孝 多価官能基を有するフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの高立体選択的合成法の開発を目指して 第42回ペプチド討論会(大阪)平成17年10月29日
  8. ○佐々木義一、新居田歩、辻貴志、藤井信孝、大高章 有機銅試薬を利用した *cis*-アルケン型 Ala-Pro ペプチドミメティックの合成研究 第42回ペプチド討論会(大阪)平成17年10月29日
  9. ○上田聡、富田健嗣、野村麻以、大高章、藤井信孝 7回膜貫通型 GPCR の化学合成を指向した新規光感受性アミノ保護基の開発 第31回反応と合成の進歩シンポジウム(神戸)平成17年11月7日
  10. ○新居田歩、富田健嗣、谷垣浩晃、藤井信孝、玉村啓和、大高章、寺田智祐、乾賢一 アルケン型ジペプチドイソスターを利用したペプチドトランスポーター(PEPT1)の基質認識機構解明の試み 第31回反応と合成の進歩シンポジウム(神戸)平成17年11月7日
  11. ○玉村啓和、平松健一、上田聡、藤井信孝、Zixuan Wang、Stephen C. Peiper、John O. Trent、山本直樹、中島秀喜、大高章 [L-Arg, L/D-3-(2-naphthyl)alanine]-タイプ (*E*)-アルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成とケモカイン受容体 CXCR4 アンタゴニスト FC131 のペプチドミメティック誘導体の創製への応用 第31回反応と合成の進歩シンポジウム(神戸)平成17年11月7日
  12. ○太田悠介、伊藤紗織、藤井信孝、大高章 システイン由来アシルオキサゾリジノンを利用したチオエステルの合成とペプチド合成への展開研究 第31回反応と合成の進歩シンポジウム(神戸)平成17年11月7日
  13. ○富田健嗣、新居田歩、大石真也、大野浩章、大高章、藤井信孝 低分子 GPR54 作動剤の構造活性相関研究 第24回メディシナルケミストリーシンポジウム(大阪)平成17年11月28日
  14. ○鳴海哲夫、新居田歩、富田健嗣、大石真也、大野浩章、大高章、藤井信孝 多価官能基を有するフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの高立体選択的合成法の開発 第24回メディシナルケミストリーシンポジウム(大阪)平成17年11月28日
  15. ○新居田歩、富田健嗣、谷垣浩晃、寺田智祐、水本真紀子、大野浩章、玉村啓和、大高章、乾賢一、藤井信孝 シス形アミド等価体としてのアルケン型ジペプチドイソスターの合成とペプチドトランスポーター(PEPT1)の機能解析への応用 第24回メディシナルケミストリーシンポジウム(大阪)平成17年11月29日
  16. ○佐々木義一、辻貴志、新居田歩、藤井信孝、大高章 有機金属試薬を利用した位置及び立体選択的 *cis*-アミノ酸-プロリン型 (2)アルケンジペプチドイソスター合成 日本薬学会第126年会(仙台)平成18年3月30日
  17. 鳴海哲夫、○宮谷敏次郎、新居田歩、富田健嗣、大石真也、大高章、大野浩章、藤井信孝 フルオロアルケンイソスターの高立体選択的合成法の開発と生理活性ペプチドへの応用 日本薬学会第126年会(仙台)平成18年3月30日
  18. ○鳴海哲夫、新居田歩、富田健嗣、大石真也、大高章、大野浩章、藤井信孝 パラジウム触媒による炭素-フッ素結合活性化を伴うフルオロアルケンイソスターの新規合成法の開発 日本薬学会第126年会(仙台)平成18年3月30日
  19. ○上田聡、野村麻以、小川哲平、大高章、藤井信孝 新規光感受性保護基の開発と応用(1): 4-(dimethylamino)phenacyl基を基盤とした光感受性カルボキシル及びアミノ保護基の開発 日本薬学会第126年会(仙台)

平成18年3月30日

20. ○小川哲平、上田聡、富田健嗣、大高章、藤井信孝 新規光感受性保護基の開発と応用(2):膜蛋白質の化学合成を指向したペプチドフラグメントのone-pot連続縮合反応 日本薬学会第126年会(仙台)平成18年3月30日
21. ○玉村啓和、溝上智子、平松健一、小川哲平、上田聡、堤浩、増野弘志、山本直樹、藤井信孝 低分子非ペプチド性CXCR4アンタゴニストの創製研究 日本薬学会第126年会(仙台)平成18年3月30日
22. ○渡部敏明、江坂藍、小川哲平、上田聡、玉村啓和、大石真也、John O. Trent、Zixuan Wang、Stephan C. Peiper、藤井信孝 新規環状母核構造を有するCXCR4アンタゴニストの合成および構造活性相関研究 日本薬学会第126年会(仙台)平成18年3月30日
23. ○富田健嗣、新居田歩、原田俊幸、大石真也、大野浩章、赤松美紀、藤井信孝 ペンタペプチド性GPR54アゴニストのN末端領域における構造活性相関研究および定量的構造活性相関研究 日本薬学会第126年会(仙台)平成18年3月30日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

1. Fujii, N.; Otaka, A.; Yamamoto, N.; Yamamoto, N. Anti-sars virus agent. PCT Int. Appl. (2006) WO 2006025536.
2. Fujii, N.; Yamamoto, N. (Benzoyl-amino)isoquinolinecarboxamide derivatives as anti-coronavirus drugs. PCT Int. Appl. (2005) WO 2005004868.

##### 2. 実用新案登録

該当事項なし

##### 3. その他

該当事項なし

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）  
分担研究報告書

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

分担研究者：秋田工業高等専門学校 千葉卓男

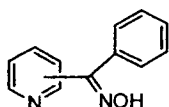
**研究要旨** 抗菌活性を示すベンゾイルピリジン誘導体を合成した後、オキシムに誘導した化合物3種類：抗RSウイルス活性を示すベンズイミダゾール環を有するフェニルケトン誘導体とそのオキシムの2種類：DNAなどにインターカレーションしやすい三環性芳香族化合物キサンテノール、キサントン及びキサンテンカルボン酸の3種類：N-ミリスチル（C14）フェニルグリシン：N-保護トリプトファン3種類：スルファニリルイソロイシンとアセトアセチルトリプトファンから合成したヒドラジノ誘導体：ジフェニルイミダゾールチオ酢酸およびジフェニルオキサゾールチオ酢酸の2種類：麻疹ウイルスに活性のあるイサチンチオセミカルバジドからのベンズイミダゾールメチルチオエーテル誘導体：アダマンタン誘導体2種類：アミノメチレンベンズイミダゾールアセトニトリル2種類の計20種類を合成し、スクリーニングしたが、大部分が細胞毒性を示すのみで、活性のある化合物を見出すことはできなかった。

**A 研究目的**

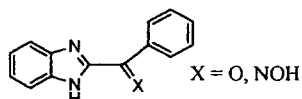
種々の生理活性物質を応用し、化学修飾により、HIV-細胞融合阻害活性を有する小分子化合物を合成・同定し、その作用機序を明らかにする。

**B 研究方法**

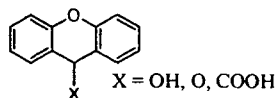
- 1) 2位、3位、4位の3種類のシアノピリジンから Grignard 反応でケトン体へ誘導した後、ヒドロキシルアミンを反応させてそれぞれ対応するオキシム誘導体を3種類合成した。



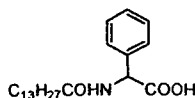
- 2) O-フェニレンジアミンとマンデル酸とから合成したヒドロキシベンズイミダゾールを酸化してケトン体に誘導し、さらにケトン体とヒドロキシルアミンとの反応でオキシム誘導体を合成した。



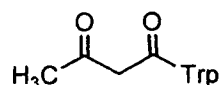
- 3) ベンズヒドリル誘導体から、3種類の3環性化合物キサンテン誘導体を合成した。



- 4) フェニルグリシンと塩化ミリスチルから、N-ミリスチルフェニルグリシンを合成した。



- 5) トリプトファンとジケテンから、アセトアセチルトリプトファンを合成した。



- 6) トリプトファンと別途に合成したメトキシメチレンメルドラム酸から、N-ジケト・1,3-ジオキシノメチレントリプトファンを合成した。

