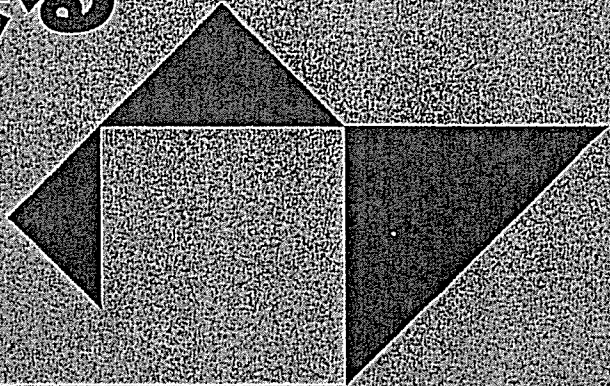




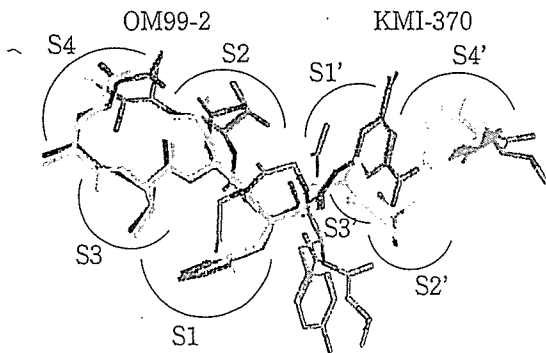
2005 第19回「大学と科学」公開シンポジウム講演収録集

アルツハイマー病：治療の可能性を探る



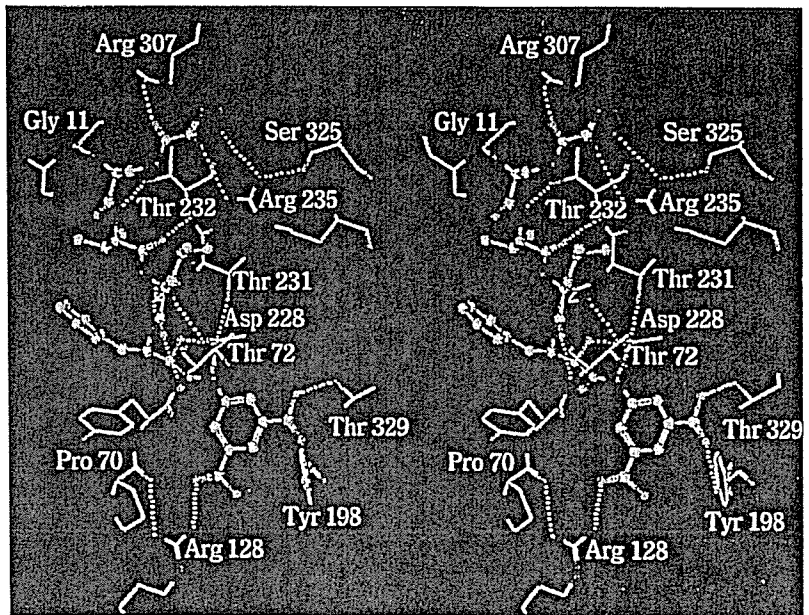
アミロイド生成阻害薬開発の展望

京都薬科大学創薬科学
フロンティア研究センター教授
木曾 良明



BACE1：緑 / 茶 (flap)
OM99-2：黄、KMI-370：青

OM99-2 vs KMI-370 (p. 171、図 14 参照)



BACE1 と結合した KMI-429 の分子モデル (p. 172、図 17 参照)

主 催：平成17年度文部科学省科学研究費補助金

研究成果公開促進費「研究成果公开发表 (A)」補助事業

東京大学大学院医学系研究科教授 井原 康夫

後 援：福岡市教育委員会 / NPO法人脳の世紀推進会議 / 福岡痴呆を考える会 / 筑紫痴呆セミナー

北九州高次脳機能研究会 / 七隈アルツハイマー病研究会 / ニューロサイエンス

大牟田臨床痴呆研究会 / 大牟田神経イベント / エーザイ株式会社 / ファイザー株式会社

9170

アミロイド生成阻害薬 開発の展望



木曾 良明

京都薬科大学創薬科学フロンティア研究センター教授

私は、先月、プラハでチャールズ大学附属病院に3日間入院しました。日本に帰ってすぐ、MRIなどの検査をうけて、患者さんの立場がよくわかるようになりました。検査の結果、異常がなかったのでお医者さんは薬はいらないというのですが、症状は完全に治まっていないので、薬が欲しくなります。

私は現在、日本ペプチド学会の会長も務めさせていただいており、本日の1時から国際会議場で開催されている日本ペプチド学会主催の市民フォーラム「生命を守り、健康をつくるアミノ酸・ペプチド」で講演してきました。



図1 地球誕生

た。今晚からは、アジア太平洋国際ペプチドシンポジウムも始まります。そのためにも何か薬が欲しいのです。名医といわれている先生方は、薬はできるだけ使わないようにしています。お医者さんは健康な方が多く、患者さんの立場が少しわからないのかもしれませんが。

生物分子の誕生

そこで、最初に薬の話をしたと思います。アミロイド β タンパク質 ($A\beta$) がアルツハイマー病発症の主原因であることから、その生成を阻害すればよいと単純に推察され、現在、 β -セクレターゼを阻害する物質と、 γ -セクレターゼを阻害する物質が検討されています。また、 $A\beta$ の凝集を阻害する物質、ワクチンも考えられます。私は現在、 β -セクレターゼに焦点をあてていますが、その原理的に優れている理由をお話しします。

地球が誕生したのは46億年前といわれています(図1)。太古の大陸は現在とはまったく違います。その時代にはアミノ酸もタンパク質も存在しません。地球誕生から数億年で、現在のウイルスや動物、植物、人が使っている生体分子が誕生しました。分子の進化からみると、タンパク質・核酸のような高度な生

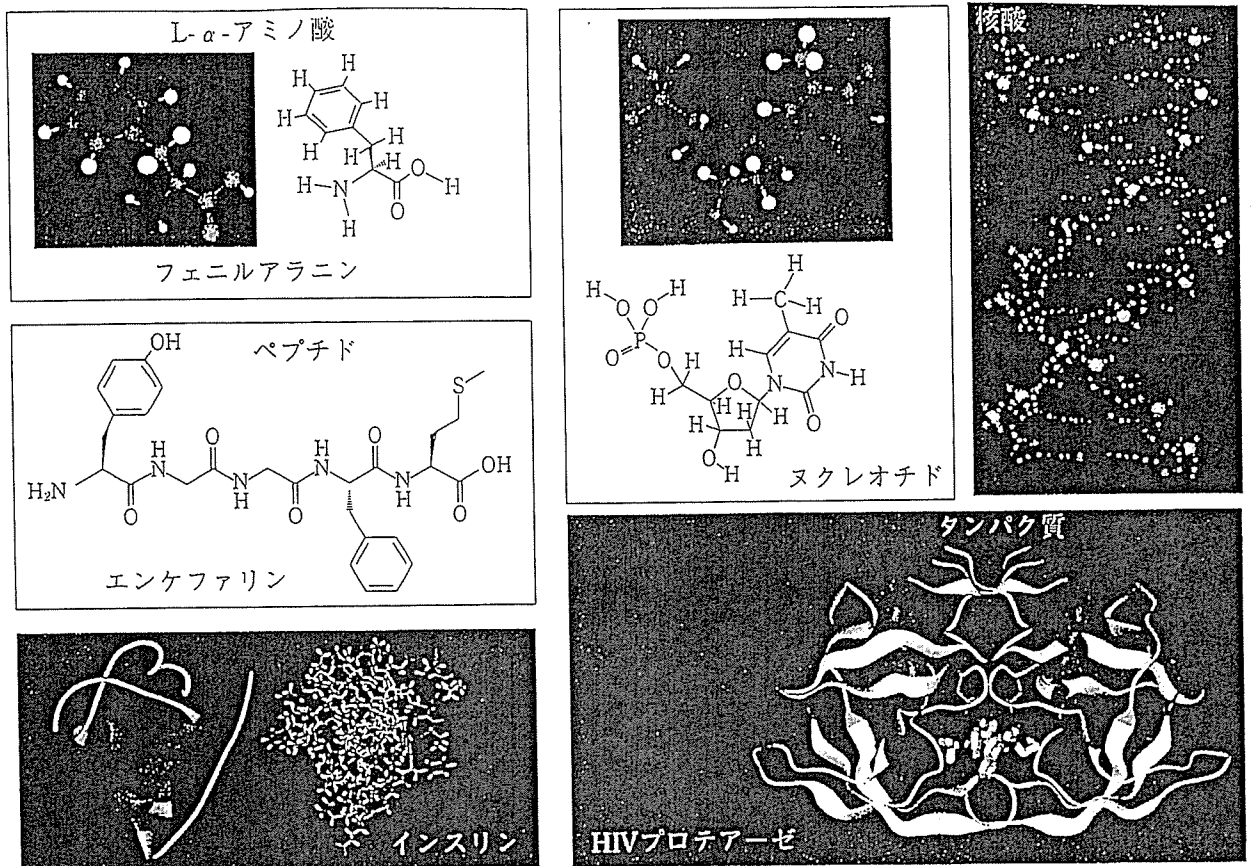


図2 生物分子の誕生

物分子が非常に早くにできたと思われています。

図2にL- α -アミノ酸のひとつであるフェニルアラニン構造を示しますが、それら20種類のアミノ酸は4種類ほどの塩基を用いている核酸からなる遺伝子にコードされています。また、脳神経系に重要なドーパミンやアドレナリンなどの原料になるアミノ酸がペプチド結合して、エンケファリンやエンドルフィンという脳内にある麻薬物質が生成されます。マラソン選手などはジョギングすると気持ちよくなるようですが、エンドルフィンが分泌されるため、非常に気分がよくなるわけです。また、心頭滅却して脳内麻薬物質が産生されると痛みも止まりますし、火のなかでも熱くなく、疲れもないといわれています。

血糖値に関係するインスリンは、アミノ酸がさらに多く結合したものです。また、複雑なタンパク質の代表例として、エイズウイルス(HIV)が産生するタンパク質分解酵素であ

るHIVプロテアーゼがあり、これは2量体です。今日の話の中心は、HIVプロテアーゼと親戚の物質です。

世界の伝承薬物とドラッグの発見・開発

このようなアミノ酸の情報を保持しているDNAやRNAという核酸が、地球誕生から数億年で誕生したことは非常に驚くべきことです。その物質が現在も使われているのには意味があります。私は、タンパク質が進化の最終物質ではないかと考えています。というのは、アミノ酸をつないでいるペプチド結合は非常に安定で、水素結合をつくることもできます。それによってさまざまな構造をとることができ、また側鎖の官能基によって機能を発揮できるようになります。ウイルスもこのように複雑な酵素を使っています(図3)。

サルも同じです。ウイルスが高度な酵素を使うように、サルも高度な植物(薬草)を使っているといわれています。霊長類は病気の状

態では、通常とは異なる植物(薬草)を食べます。人はもちろんのことです。人のあるところ文明があり、文明のあるところには薬が存在します(図4)。

ちなみに、この6月、文部科学省 21世紀 COE プログラムのヒヤリングで、私の哲学を

お話しする機会をいただき、そのとき使ったのが図4です。

現在は、ポストゲノム時代です。ゲノム塩基配列を決定することによって遺伝子の塩基配列を推測し、タンパク質のアミノ酸配列の推測、それからさらに、機能タンパク質や酵

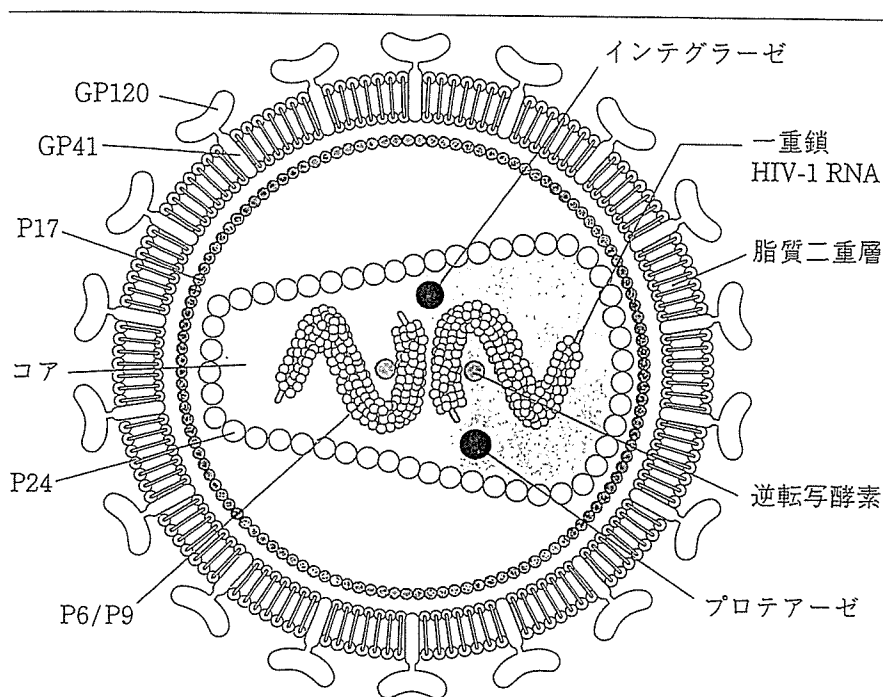


図3 エイズウイルス (HIV) の構造

四大文明	古代エジプト文明(ファラオ天然薬物).....エーベルス・パピルス
	メソポタミア文明.....ハムラビ法典(医療の報酬、罰則)
	インダス文明.....アーユル(生命、長寿)・ヴェーダ(知識)
	中国文明.....黄帝内经、傷寒論 漢方医学(日本)

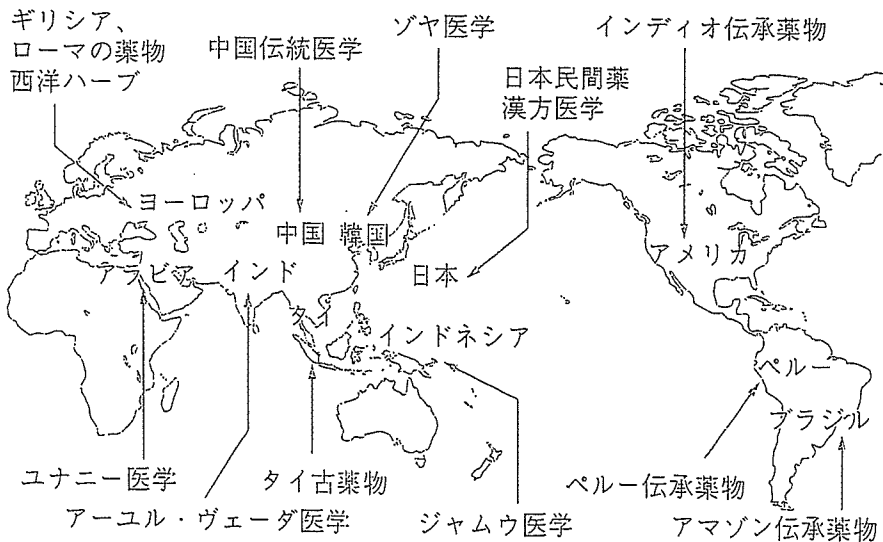


図4 世界の伝統薬物と伝承薬物

素の発見、受容体・トランスポートの発見などを経て、最後に薬剤の発見・開発につながっていきます(図5)。アセチルコリンエステラーゼという酵素は、活性部位にセリンがあり、この酵素を阻害する物質を見つけたことが、塩酸ドネペジルという薬剤の発見・開発につながったわけです。

タンパク質分解酵素

アセチルコリンエステラーゼは、プロテアーゼと似ています。プロテアーゼもペプチド結合を切断するだけでなくエステル結合を切断します。プロテアーゼは、日本語では「タンパク質分解酵素」といわれていますが、これには4種類あります。

第1は、アスパラギン酸プロテアーゼです(表1)。ペプシンはもっとも基本的な胃の消化酵素で、酸性で働きます。第2は、トリプシンに代表されるセリ

ンプロテアーゼで、アセチルコリンエステラーゼとよく似ています。第3はシステインプロテアーゼ、第4は金属プロテアーゼです。

アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるHIVプロテアーゼ阻害剤は、エイズ研究において歴史に残る薬になりました。ちなみに、HIVプロテアーゼ阻害剤の研究は、酵素反応機構から論理的にドラッグデザインを行うと

いうストーリーが非常にきれいであったためほんとうですかという話は多かったのですが、理詰めの研究が重要であるという一例です。

マラリアにもアスパラギン酸プロテアーゼであるプラスメプシンの阻害が有望です。アルツハイマー病の β -セクレターゼが、同じ仲間であることが1999年に発見されました。それは、研究者にとって魅力でもあるし、治療にも使える可能性があることから研究がさかんになりました。

γ -セクレターゼは、非常に難しい複合体タンパク質です。表1で、?マークをつけているのは、まったく新規なもので、少し難しい話になるためです。

アミロイド前駆体タンパク質のプロセッシング

アルツハイマー病は、脳内に、 $A\beta$ からなるアミロイド線維が沈着してできる老人斑が広範に認められる神経変性疾患で、進行性の痴呆を特徴としています。 $A\beta$ は、アミノ酸残基700個からなる1回膜貫通型のアミロイド前駆体タンパク質 (APP) が、2種類のプロテアー

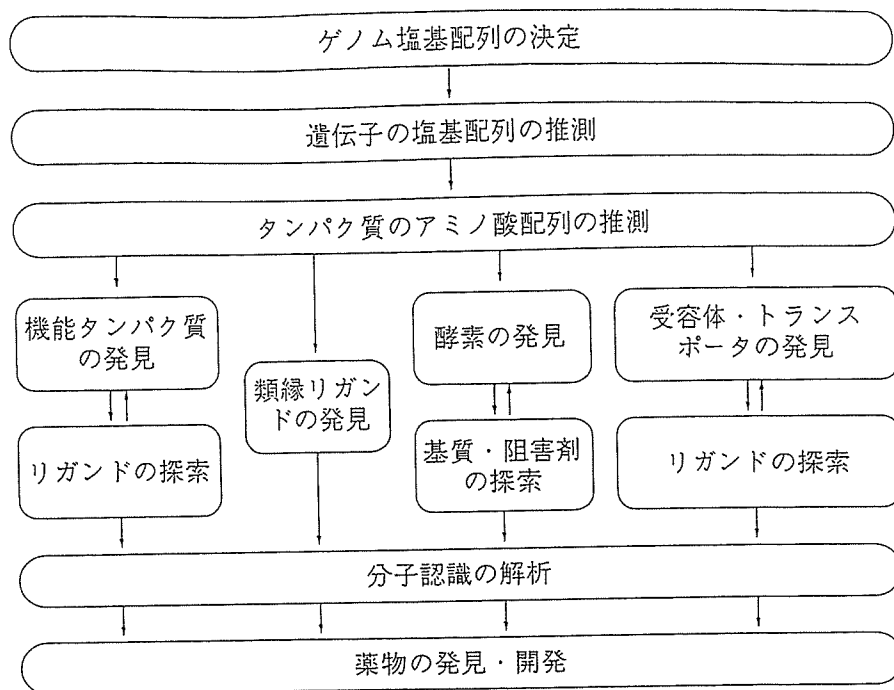


図5 薬物の開発の流れ

表1 アスパラギン酸プロテアーゼ

① レニン
② HIVプロテアーゼ (エイズ)
③ プラスメプシン (マラリア)
④ β -セクレターゼ (アルツハイマー病)
⑤ γ -セクレターゼ? (アルツハイマー病)

ゼで切断されることにより産生されます。 $A\beta$ はAPPの細胞外領域から膜貫通領域にかけて含まれ、まず β -セクレターゼにより $A\beta$ のアミノ末端 (N末端) 部分が切断され、次に γ -セクレターゼによって $A\beta$ のカルボキシル末端 (C末端) 部分が切断されます (図6)。

$A\beta$ は40番目のアミノ酸残基 Val で終わる $A\beta$ 40と、さらに2個のアミノ酸残基 (Ile-Ala) が伸びた $A\beta$ 42があり、 $A\beta$ 42は $A\beta$ 40より凝集性が高くなっています。凝集した $A\beta$ 42は $A\beta$ 40を巻き込んでアミロイド線維を形成することから、 $A\beta$ 42の蓄積がアルツハイマー病の発症に強くかかわっている可能性があります。

また、 β -セクレターゼと異なる部位でAPPを切断し、 $A\beta$ の産生を抑制する酵素として

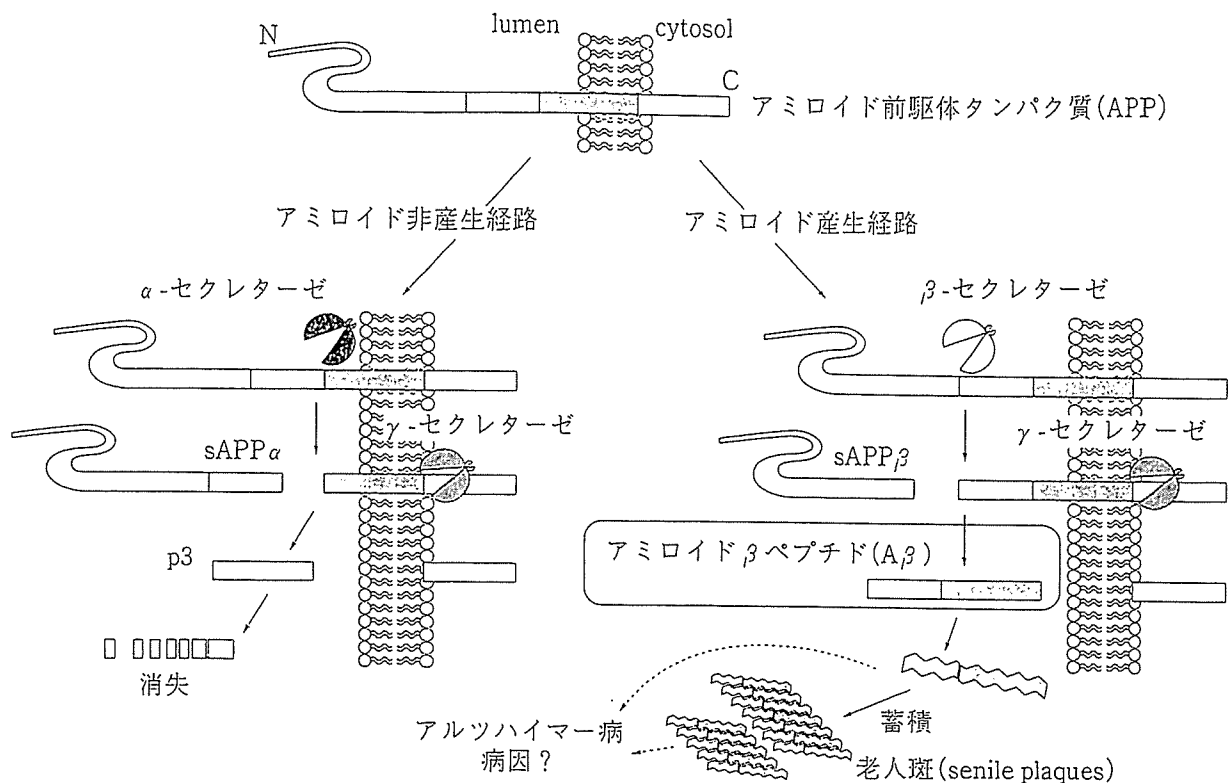


図6 アミロイド前駆体タンパク質 (APP) のプロセッシング

α -セクレターゼがあります (図6)。

ちなみに、今年のノーベル賞もタンパク質分解に関する研究が受賞しました。タンパク質の切断は、簡単にいうと加水分解です。有機化学の研究者や学生さんからみると簡単すぎて、そんな古いことには興味を示しません。タンパク質分解は生命にとって基本的なことです。

A β 42は β シート構造をとって凝集しますが、 β シートの構造が変化することで起こる病気が多くあります。たとえば、プリオンタンパク質もそうであり、HIVプロテアーゼも β シートで2量体になります。そのため、これを阻害することは、当然チャレンジングですが、メカニズム的には非常に困難です。私どもの研究室でも2量体化阻害剤について、外国人ポスドクが面白いためすぐやっ論文をだしましたが、あまり活性も強くないし実用性もなさそうです。 β シートの凝集を止めるものにトレハロースなどがありますが、選択性的問題や活性の問題で、現在のレ

ベルでは道が遠いと私は理解しています。

APP 切断部位のアミノ酸配列

APPが切断される部位のアミノ酸配列を図7に示します。 β サイトは、普通の人ではメチオニンとアスパラギン酸の間で切断されます。私どもの長い研究からみると、これは非常に珍しい例です。切断部位は専門用語でP1-P1'と表示されていますが、P1'にアスパラギン酸が位置してその前で切断されることは非常に珍しいことです。

スウェーデンの家族性アルツハイマー病の発症家系の人、このP1がロイシン、その前がアスパラギンになっているため、約100倍、切断されやすくなります。このため、A β が産生しやすくなり発病しやすくなります。非常に論理的でわかりやすいので、私どもはすぐに研究を進めました。シンプルであることは科学の原点です。

そこで、スウェーデン型のアスパラギン、ロイシンの部分に注目しています。また、私

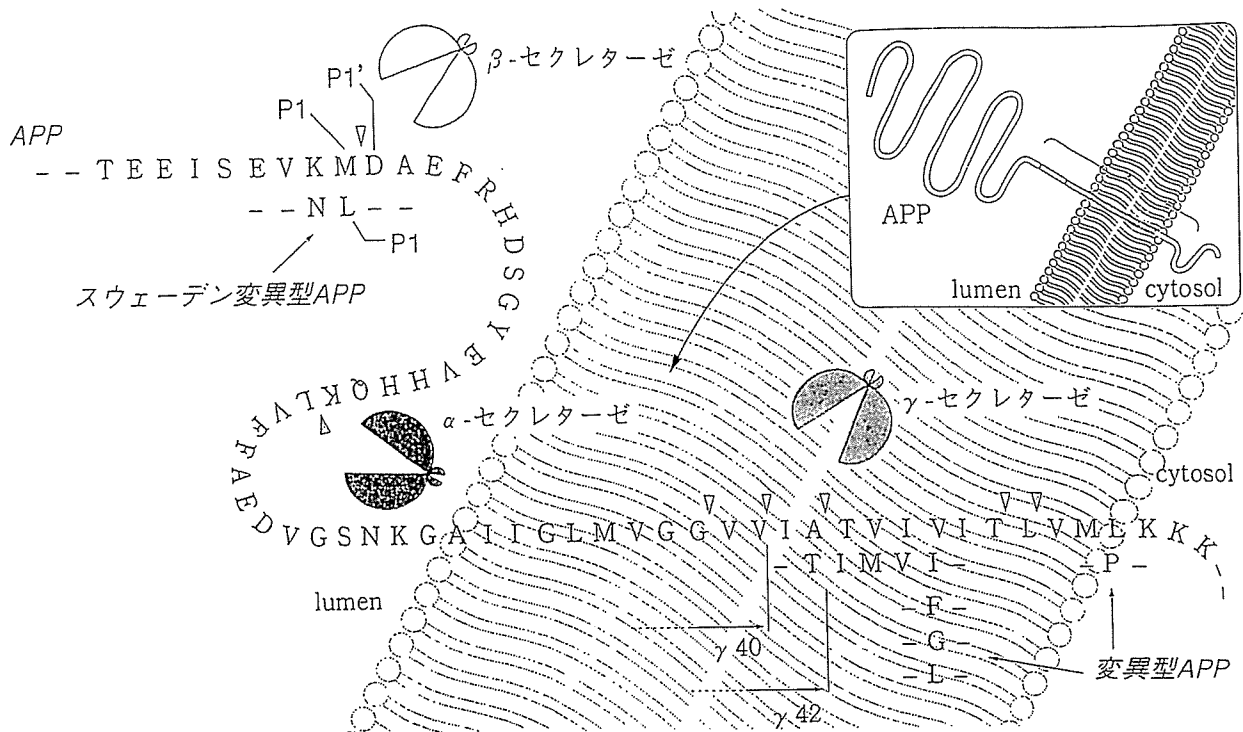


図7 APP切断部位のアミノ酸配列

表2 BACE1のアミノ酸配列 (Vassar R *et al.*, *Science* 286, 735-741, 1999)

	シグナルペプチド	プロペプチド
1	MAQALPWL	LLWMGAGVLP
51	PEEPCRRGSF	VEMVDNLRGK
101	VGAAPHPFLH	RYYQRQLSST
151	GPNVTVRANI	AAITESDKFF
201	LVKQTHVPLN	FSLQLCGAGF
251	YTPIRREWYY	EVIIVRVEIN
301	VFEAAVKS	IKAASSTEKFPD
351	EVTNQSF	RITILPQQYLRPV
401	GFYVVFDRAR	KRIGFAVSAC
451	DESTLMTIAY	<u>VMAAICALFM</u>
501	K	<u>LPLCLMVCQW</u>

膜貫通領域

どもは、このような研究を長く続けているため、図7をみてすぐわかるのですが、ロイシンの後で切断するのは、アスパギン酸に特徴的です。表2の灰色で示した部分すなわち活性部位にアスパラギン酸があるのは、HIVプロテアーゼと同じです。今、ヨーロッパペプチド学会会長のマルチネス教授が来日していますが、マルチネス教授も「木曾の研究室は山ほど経験があるから、BACE1 (β位 APP切断酵素) の研究もうまくいっているだろう」とい

っていました。

β-セクレターゼ阻害剤の開発

さて、β-セクレターゼのエポックメイキングな出来事は1999年の冬に起こりました。その年、β-セクレターゼ活性を有するBACE1がクローニングされ、膜結合型のアスパラギン酸プロテアーゼであることが明らかにされ、阻害剤の研究が一気に加速しました。Aβの蓄積がアルツハイマー病の発症の引き金である

というAβ仮説も、Aβの産生を阻害する薬物を開発できれば真相を明らかにすることができ、アルツハイマー病の治療薬の開発にもつながる可能性があります。

ところで、表2に示すアミノ酸配列から、なぜ、BACE1がアスパラギン酸プロテアーゼであることがすぐにわかるかということ、そこにDTGS (Asp-Thr-Gly-Ser)の配列と、DSGT (Asp-Ser-Gly-Thr)というアミノ酸配列があるためです。Asp-ThrやAsp-Serがこれくらいあればアスパラギン酸プロテアーゼであることはすぐわかります。

これは重要な活性部位です。われわれの体に発現していますが、特に脳で発現が高くなっています。レニンやペプシンはこんなに複雑ではありません。BACE1は膜に結合もしていますし、システインがあり、糖が付加している難しい酵素です。そのため、阻害剤開発はチャレンジングな問題であることは間違いありません。

アスパラギン酸プロテアーゼにはこれまでの長い歴史があることから、研究者はすぐチャレンジし、オクラホマ・シカゴグループとイーラングループがいっせいに論文を発表しました。世界中が研究をしており、遷移状態をまねる水酸基をもった阻害剤を発表しまし

た(図8)。

APPのアミノ酸配列に基づいた BACE1 阻害剤のデザイン

アスパラギン酸プロテアーゼの反応メカニズムを図9に示します。BACE1の活性部位にアスパラギン酸があり、そこにSer-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Alaというアミノ酸配列をもった基質がくると、Leu-Aspのペプチド結合を切断します。そのときの反応機序は、大学の2年生レベルのやさしい有機化学で、活性部位のアスパラギン酸が攻撃して、電子の流れで、非常にスムーズに反応が進みます。そうすると、P1-P1'のペプチド結合が基質遷移状態を通して切断されます(図9)。日本語で「模倣の」という言葉を、英語では「ミミックまたはミメティック」といいます。アミド結合(CO-NH)のままでは生体内で酵素により切断されてしまうため、C(OH)を挿入しC(OH)-CO-NHとしました(図9)。すなわち、ヒドロキシメチルカルボニル(HMC)イソスター(等価体)です。

私どもは、レニン阻害剤、HIVプロテアーゼ阻害剤、プラスメプシン阻害剤の研究にこのHMCを使って良好な阻害剤を得ているので、β-セクレターゼをターゲットとして阻害

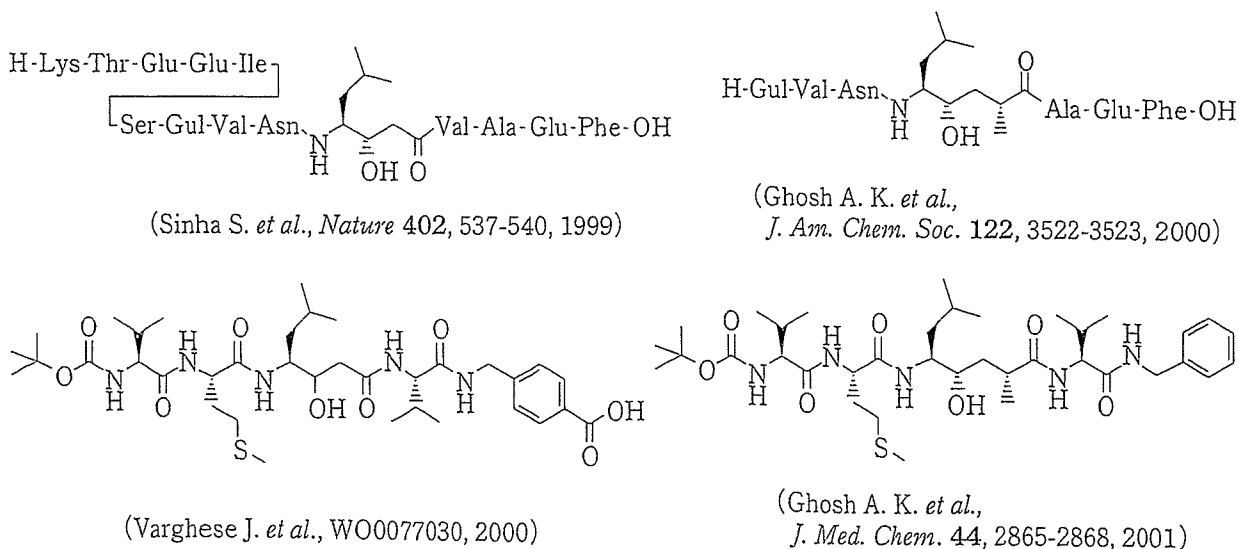


図8 β-セクレターゼ阻害剤

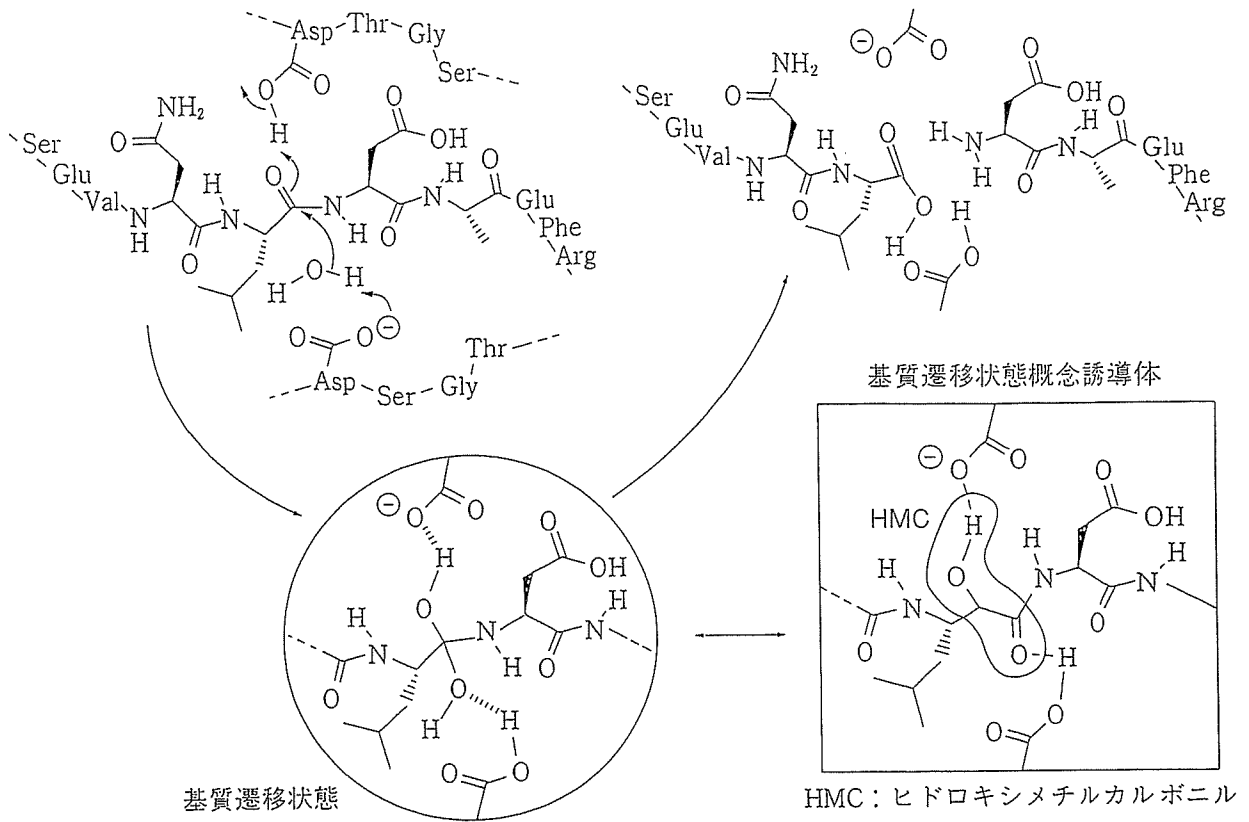


図9 アスパラギン酸プロテアーゼの反応メカニズム

剤の研究を行いました。

HMCのヒドロキシ基(-OH)は、アスパラギン酸のCOO⁻と水素結合をします。また、そのCOは別のアスパラギン酸のカルボキシル基(-COOH)と水素結合して、酵素反応をこの阻害剤が止めてしまいます。図9左は基質の遷移状態ですから切断されますが、右の遷移状態誘導体は反応が進行しません。非常に簡単な考え方です(図9)。ただし、簡単とはいってもいろいろなやり方があります。人によっては、図10のようなものを使います。梅澤濱夫先生が初めて発見して命名したスタチンは、γ-アミノ酸です。

ちなみに、現在、スタチン系という名前は

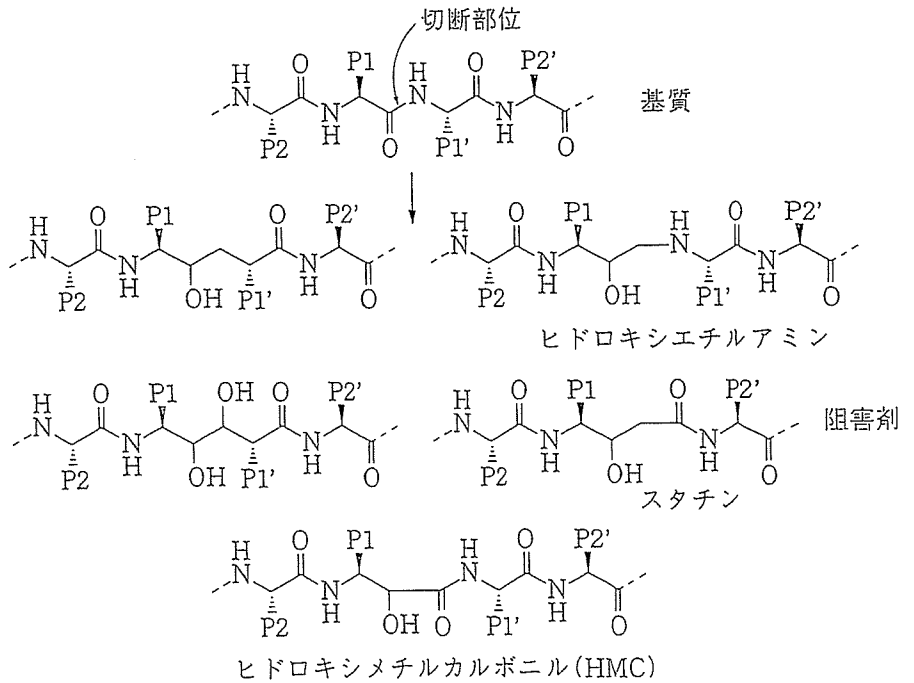


図10 基質遷移状態ミメティック

違う意味に使われています。あまりにも有名な薬のプラバスタチンやシンバスタチンが開発されたためです。「止める」という意味の“スタット”というラテン語に由来して梅澤先生が最初に命名したのが、ペプシンの阻害剤とい

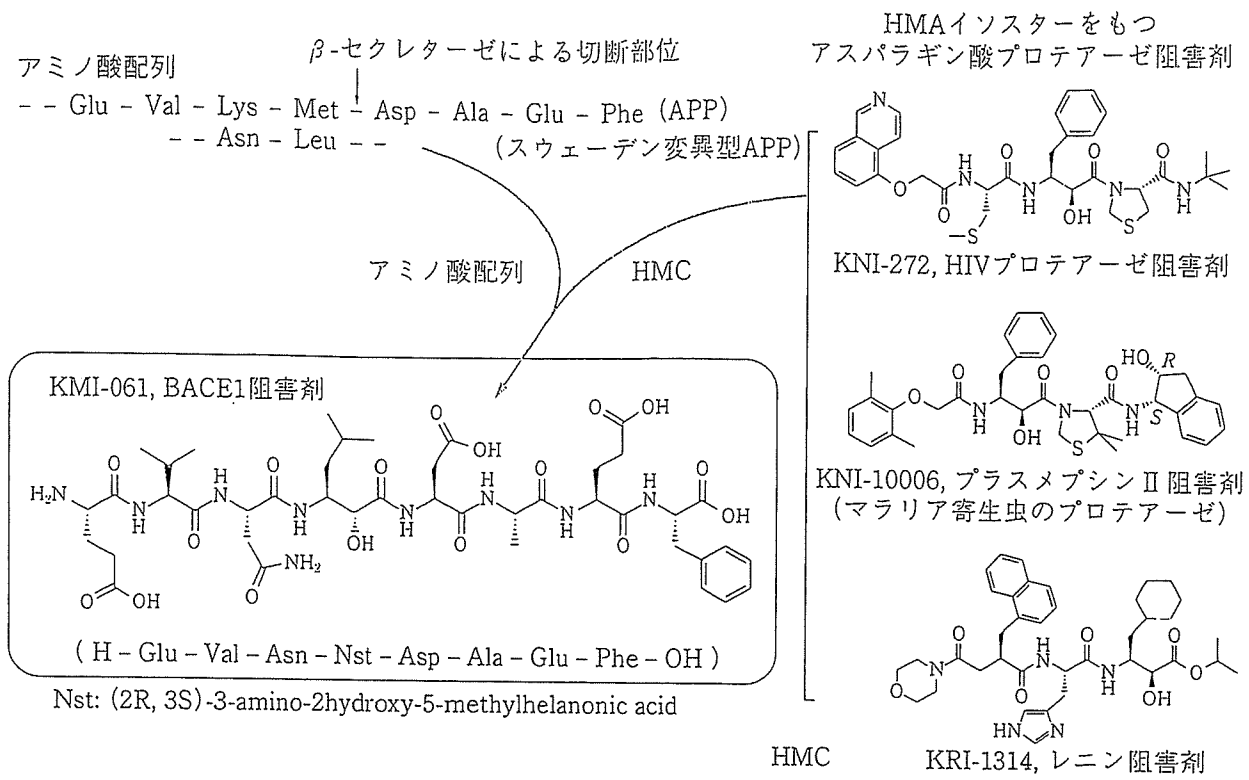


図 11 APP のアミノ酸配列に基づいた BACE1 阻害剤のデザイン

表 3 オクタペプチド型 BACE1 阻害剤

compound no.	P4 P3 P2 P1 P1' P2' P3' P4'	BACE1 阻害 (%) (at 2μM)
1 (KMI-061)	H-Glu-Val-Asn-Nst-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
2 (KMI-062)	H-Glu-Val-Asn-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	24
3	H-Glu-Val-Asp-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	25
4	H-Glu-Val-Gln-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	36
5	H-Glu-Val-Glu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	30
6	H-Glu-Val-Met-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	42
7 (KMI-008)	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	> 90*
8	H-Glu-Val-Lys-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
9	H-Glu-Leu-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
10	H-Glu-Ile-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	26
11	H-Glu-Phe-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
12	H-Glu-Met-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
13	H-Glu-Val-Leu-Pns-Ala-Val-Glu-Phe-OH	30
14	H-Glu-Val-Leu-Pns-Ala-Leu-Glu-Phe-OH	41
15	H-Glu-Val-Leu-Pns-Ala-Phe-Glu-Phe-OH	60
16	H-Glu-Val-Leu-Pns-Ala-Glu-Glu-Phe-OH	78
17	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Gln-Phe-OH	56
18	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Val-Phe-OH	57
19	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Leu-Phe-OH	57
20	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Phe-Phe-OH	67

* (IC₅₀ = 413nM)

うことから「ペプスタチン」で、それに含まれていたγ-アミノ酸が「スタチン」と名づけられました。その命名以来、化学の世界では抑制因子を「○○○スタチン」と命名するようになり、たとえば脳内の成長ホルモン放出抑制ホルモンにソマトスタチン、それから開発された薬にサンドスタチンといった命名です。

**フェニルノル
スタチンを含む
BACE 阻害剤**

APP の家族性アルツハイマー病変異のひとつであるスウェーデン変異型は、β-セクレタ

ーゼに対する親和性が高くA β を産生しやすいことから、私どもはスウェーデン変異型APP配列をもとに、そのP1部位に基質遷移状態誘導体を組み込んだ阻害剤をデザインしました(図11)。残念ながら、KMI-061には活性がほとんど認められませんでした。少し大きめのものにする、少し活性が上がりました。

このような研究は、ポストドクもいますが、大学院生を指導してやっています。大学院生にテーマを与えるとき学生の希望を聞きます。チャレンジングだからうまくいくかどうかわかりませんよといったのですが、院生S君は先の化合物をもとにアミノ酸置換による最適化を行っていったところ、遷移状態誘導体のフェニルノルスタチン(Pns)を含むオクタペプチド型阻害剤KMI化合物を合成しました(表3)。これらのうちKMI-008と名づけた化合物に強い酵素阻害活性が見い出されました。S君には安全なテーマも与えていたのですが、もうこちらにのめりこんでいきました。ポストドクなんかに教えるぐらいのレベルで、どんどん研究をしてくれました。

細胞ではどうかということ、東京大学の石浦章一先生にCOS-7細胞を用いてAPP β が切れたものを解析してもらいました(図12)。その結果、KMI-008を添加すると、弱いものの確かに阻害しました。細胞でも β -セクレターゼ阻害活性をもっていたわけです。

低分子型BACE阻害剤

KMI-008は、アミノ酸は8個ですから、こ

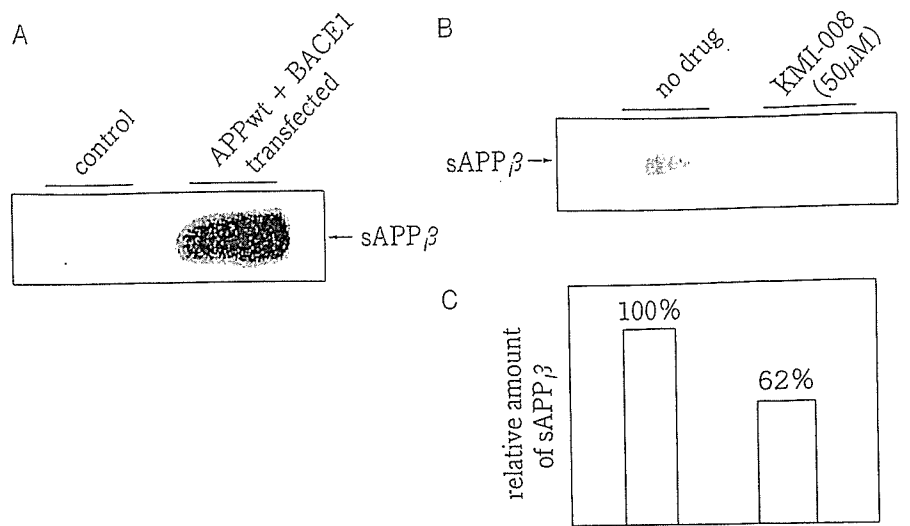


図12 KMI-008の β -セクレターゼに及ぼす影響 A: APPとBACE1を導入したCOS-7細胞からのsAPP β の分泌(電気泳動のパターン) B: KMI-008添加によるsAPP β の減少(電気泳動のパターン)。APPとBACE1を導入したCOS-7細胞にKMI-008を加えると(右)、加えない場合(左)に比べてsAPP β の有利が減少していることがわかる。Cの図はこれを定量的に表したもので、加えない場合を100%とするとKMI-008を加えるとsAPP β の遊離が62%に減少している

れでは薬にはなりません。小さくする必要があります。そこで、活性発現に必要な最小構造を求めるために、KMI-008からアミノ酸を切除して低分子化を行いました(表4)。

KMI-008のような化合物ができると、みんなが研究をやりたがったため、あっという間に研究が進み、P4からP1'までのリガンドを有するペプチド誘導体でも、確かな活性を有していることがわかりました。

この結果は、同じアスパラギン酸プロテアーゼであるレニンの阻害剤の構造活性相関とも共通する点があり、非常に興味深くなっています。

ただし、このペプチドだけでは生体での安定性が悪いことから、さらに構造の最適化を進めていきました。そして、グルタミン酸(Glu)のかわりにオキザリルで置換したジアミノプロピオン酸を導入しました(図13)。C末端もカルボン酸を普通のアミノ酸にしたのでは活性が上がらないため、アミノ安息香酸にしたところ、非常に強い、チャンピオンデータレベルまで活性が上がりました。3.4nMという非常に強い活性があります。

細かい話をすると、オクラホマグループの化合物 OM99-2 と私どもの化合物では、C 末端がだいぶ違います (図 14)。ですから、選択性などがかなり違っていています。石浦先生に HEK293 細胞を使って、この化合物 (KMI-358 および KMI-370) の β -セクレターゼ活性を調べていただいたところ、濃度依存的に β -セクレターゼを阻害していました (図 15)。

一方、KMI-358 と KMI-370 のオキザリル基は転移しやすいため、カルボン酸とよく似たものを導入しました。カルボン酸イソスターとして、武田薬品の血圧降下剤アンジオテンシン受容体の遮断薬で仲健彦先生が使われ、世界中の人が使っているテトラゾールを導入してみました。

その結果、得られた KMI-420 は予想どおり、

非常に活性がよくなっています。しかも、化学的な安定性も上がって、非常によいことがわかりました。

さらに、カルボン酸 2 つとテトラゾールをもつ KMI-429 も非常に優れています (図 16)。先日、京都でアルツハイマー病協会の国際会議があり、米国の研究者や会議の副委員長などたくさんの方が KMI-429 に注目され、米国では 2 次情報にかなり詳しくでるという話です。

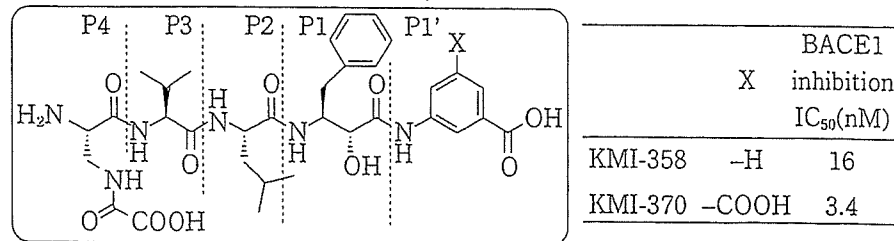
日本生化学会では石浦章一先生が発表されたので、そちらからの問い合わせも多くなっています。現在、ライセンスして欲しいという要請が結構きています。

相互作用をみると、このテトラゾールがうまくいっている (図 17) ことから、この考え方は間違っていないことがわかりました。これ

表 4 最小活性構造の探索

compound no.	P4 P3 P2 P1 P1' P2' P3' P4'	BACE1 阻害 (%) (at 2 μ M)
7 (KMI-008)	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	> 90
32	H-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
33	H-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
34	H-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
35	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-OH	60
36	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-OH	46
37	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-OH	61
38	H-Glu-Val-Leu-Pns-OH	34
39	H-Gly-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
40	H-Glu-Gly-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
41	H-Glu-Val-Gly-Pns-Asp-Ala-Glu-Phe-OH	< 20
42	H-Glu-Val-Leu-Pns-Gly-Ala-Glu-Phe-OH	54
43	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Gly-Glu-Phe-OH	73
44	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Gly-Phe-OH	56
45	H-Glu-Val-Leu-Pns-Asp-Ala-Glu-Gly-OH	65

Structures and Activities of KMI-358/-370



Synthetic Route to KMI-370

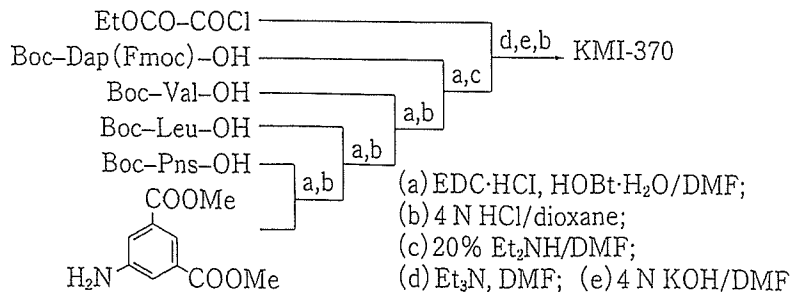


図 13 小分子型 BACE1 阻害剤、KMI-358/-370

は薬としては途中段階であると思いますが、可能性はあるという状況です。

γ-セクレターゼ阻害剤の開発

γ-セクレターゼについては簡単に触れます。γ-セクレターゼにはアスパラギン酸プロテアーゼ活性も認められ、その阻害剤も活発に開発されていますが、タンパク質複合体と考えられていて、いまだ正体は不明です。また、γ-セクレターゼは、発生・分化に深く関与している1回膜貫通型タンパク質のいくつかを基質にすることが知られています。実際、γ-セクレターゼの主なタンパク質部分と考えられているプレセニリンのノックアウトマウスは体節異常をきたし、胎生致死です。以上のことから、γ-セクレターゼを安易に阻害することは好ましくないとの考え方もあります。

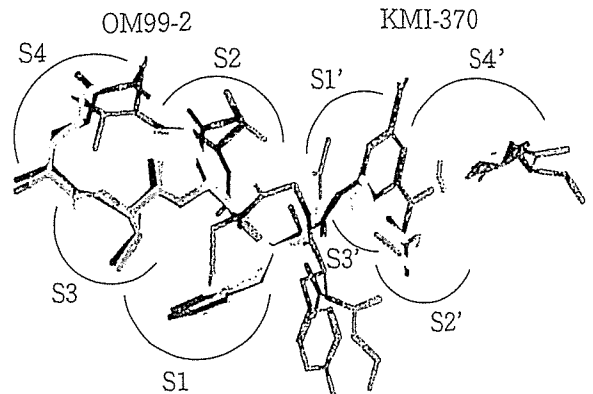
APPには、γ-セクレターゼによる切断部位がたくさん存在しています。そのため、β-セクレターゼ阻害研究に比べたら論理性が少し難しくなります。

ただし、γ-セクレターゼ阻害剤として非ステロイド抗炎症薬 (NSAID) ようなものもあります。活性部位ではなく、ほかの領域に結合してγ-セクレターゼ阻害を示す可能性があることから、このような化合物の研究も進める必要があります。γ-セ

クレターゼ阻害剤の研究も、結合部位を見つけるためにますますさかんになっています。

今後の課題と展望

基質遷移状態概念に基づいてβ-セクレターゼ阻害剤を設計し、強い活性をもつ化合物を見出しました。しかし、β-セクレターゼの作用部位を考えると、



BACE1: 緑/茶 (flap)
OM99-2: 黄、KMI-370: 青

図14 OM99-2 vs KMI-370 (口絵カラー参照)

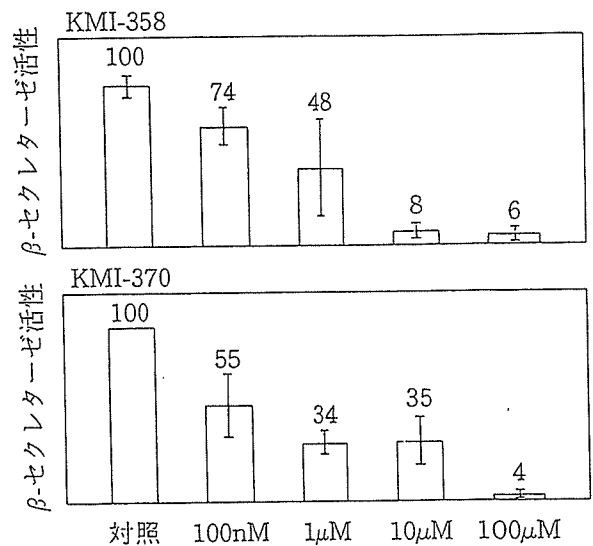
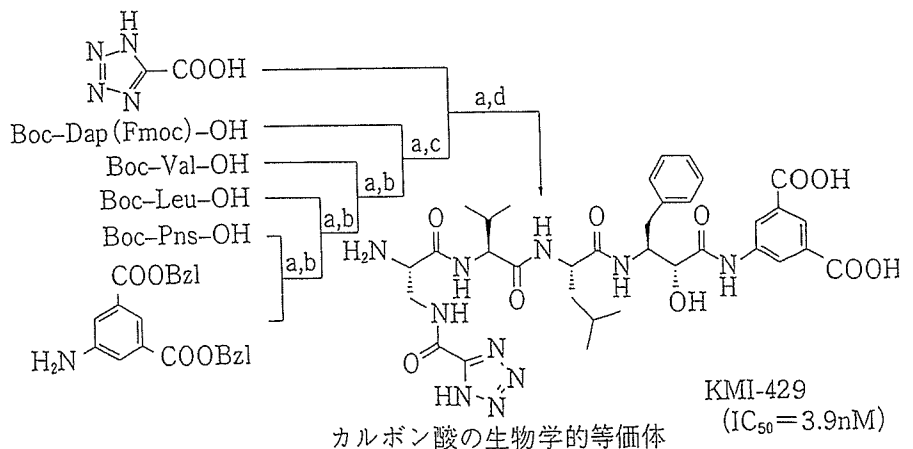


図15 β-セクレターゼ活性に及ぼす KMI-358/370 の効果 (in BACE1-HEK293 cells, n = 3)



Abbrev.: Dap; L-α, β-diaminopropionic acid,
Reagents: (a) EDC·HCl, HOBt/DMF; (b) 4N HCl/dioxane;
(c) 20% Et₂NH/DMF; (d) TMS-Br, thioanisole, *m*-cresol/TFA

図16 KMI-429 の合成

薬剤は血液脳関門を通過する必要があり、分子サイズや親和性疎水性バランスなど、考慮すべき点が多くなっています。また、従来のアスパラギン酸プロテアーゼと基質特異性が異なり、阻害剤設計も新しいアイデアが必要になると思われます。

HIV プロテアーゼ阻害のときもそうでしたが、1991年に、読売新聞の科学部のデスクがわざわざ京都までこられて、「非常によくわ

かりました。希望をもたせることは非常に大事ですね」といわれました。そのころ、ほかの先生方が「先生、カウンセラーになれますよ」といっていました。いつも「希望をもってください」といっていたためです。論理性がある薬は、開発に時間がかかるかもしれませんが、希望はあると思いますので、ぜひ、希望をもっていただきたいと思います。阻害剤の開発は、アルツハイマー病発症機構の解明や治療に役立つ可能性があり、今後の発展に期待したいと思います。

石浦先生、理研の橋本先生、西道先生をはじめたくさんの研究者に感謝します。私どもの研究は、文部科学省学術フロンティア推進事業、文部科学省21世紀COEの支援をいただいています。この先端脳では井原康夫先生にお世話になりました。この場を借りてお礼申し上げます。

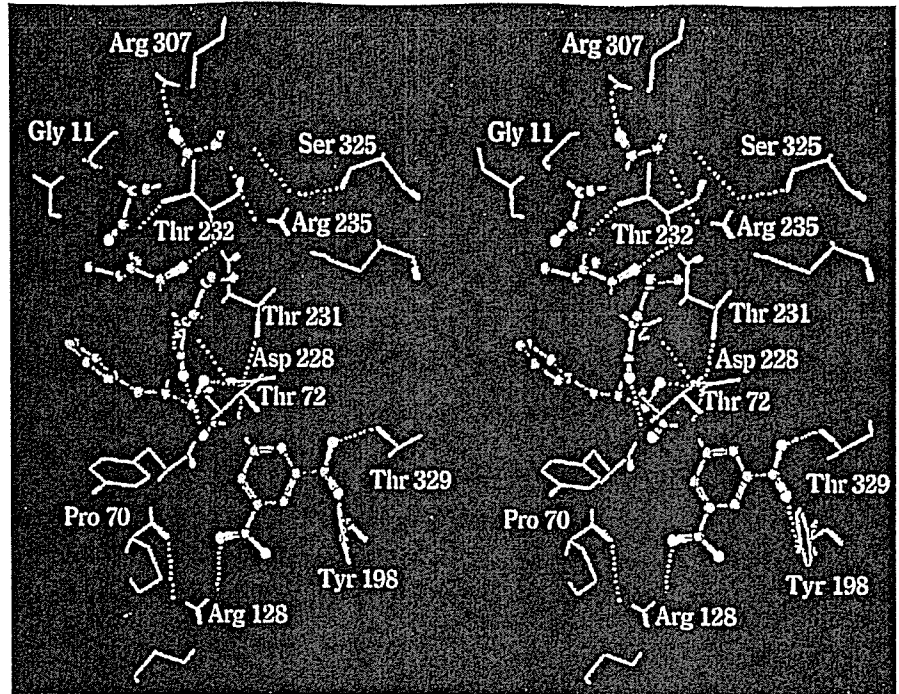


図17 BACE1と結合したKMI-429の分子モデル(ステレオ対)(口絵カラー参照)

参考文献

- 1) Tooru Kimura, Daisuke Shuto, Yoshio Hamada, Naoto Igawa, Soko Kasai, Ping Liu, Koushi Hidaka, Takashi Hamada, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Design and synthesis of highly active Alzheimer's β -secretase (BACE1) inhibitors, KMI-420 and KMI-429, with enhanced chemical stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (1), 211-215, 2005
- 2) Youhei Sohma, Masato Sasaki, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: Design and synthesis of a novel water-soluble $A\beta$ 1-42 isopeptide: an efficient strategy for the preparation of Alzheimer's disease-related peptide, $A\beta$ 1-42, via O-N intramolecular acyl migration reaction. *Tetrahedron Letters* 45 (31), 5965-5968, 2004
- 3) Tooru Kimura, Daisuke Shuto, Soko Kasai, Ping Liu, Koushi Hidaka, Takashi Hamada, Yoshio Hayashi, Chinatsu Hattori, Masashi Asai, Shinobu Kitazume, Takaomi C. Saido, Shoichi Ishiura, Yoshiaki Kiso.: KMI-358 and KMI-370, highly potent and small-sized BACE1 inhibitors containing phenylnorstatine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (6), 1527-1531, 2004
- 4) 濱田芳男、木曾良明：プロテアーゼインヒビターの設計と新機能。新規治療薬創製のアプローチ、化学と生物 41 (12)、796-803、2003
- 5) 林良雄、木曾良明：プロテアーゼインヒビター、ファルマシア 39 (1)、33-37、2003

Evaluation of Peptidomimetic HTLV-I Protease Inhibitors Containing Hydroxymethylcarbonyl as a Transition-State Isostere

Ayako Itami, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Koushi Hidaka, Yasuhiro Arii, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, and Yoshiaki Kiso

Department of Medicinal Chemistry, Center for Frontier Research in Medicinal Science, 21st Century COE Program, Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan

e-mail: ky00027@poppy.kyoto-phu.ac.jp

We have synthesized a series of HTLV-I protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere as a transition-state mimic. From SAR study of the hexapeptide-type inhibitor, we found that phenylglycine (Phg) and tert-leucine (Tle) fitted the S3 and S2 pockets, respectively. Moreover, we found out pentapeptide-type inhibitors, KNI-10247 and -10252 as new lead compounds that show comparative inhibitory activities with hexapeptide-type inhibitors.

Keywords: HTLV-I, aspartic protease inhibitor, hydroxymethylcarbonyl, allophenylnorstatine, transition-state mimic

Introduction

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) is a retrovirus that has been associated with adult T-cell leukemia (ATL) [1], tropical spastic paraparesis / HTLV-I associated myelopathy (TSP / HAM) [2, 3] and numerous chronic diseases. Estimations in 1997 revealed that between one and two million people were infected with HTLV-I in Japan where the virus is most prevalent in the world [4]. However, HTLV-I specific chemotherapeutic agents have not been developed. Without a doubt, the discovery of such drugs is urgently needed. HTLV-I encodes a virus-specific aspartic protease responsible for processing the *gag* and *gag-pro-pol* polyproteins, leading to the proliferation of the retrovirus [5]. Since this process is essential for retroviral replication, this protease is one of the major therapeutic targets for developing specific anti-HTLV-I agents.

In our previous study of HIV protease inhibitor, we developed a series of substrate-based peptidomimetic inhibitors containing Apns [allophenylnorstatine; (2*S*,3*S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid] with a hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere as an ideal transition state mimic (Fig. 1) [6]. We performed HTLV-I protease assays on our tripeptide-type HIV-1 protease inhibitors because the sequences of HTLV-I protease shares 28% homology with HIV-1 protease, with a more conserved substrate binding region (45%). Some of the inhibitors containing Apns-Dmt [Dmt; (*R*)-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidinecarboxylic acid] at the P1-P1'

positions exhibited inhibitory activities against HTLV-I protease (Fig. 2) [7], which suggests that the Apns-Dmt scaffold is effective for the development of new drugs. Consequently, we synthesized Apns-Dmt containing HTLV-I protease inhibitors based on the amino acid sequence of p19 / p24, and observed that the substrate-mimetic octapeptide **1** possesses high inhibitory activity for HTLV-I protease ($K_i = 3.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$) (Fig. 3) [8]. Moreover, from the study of size reduction, we found out hexapeptide-type inhibitor **2** showed enough activity (Fig. 3). Herein, we report further SAR of inhibitors using **2** as a lead compound.

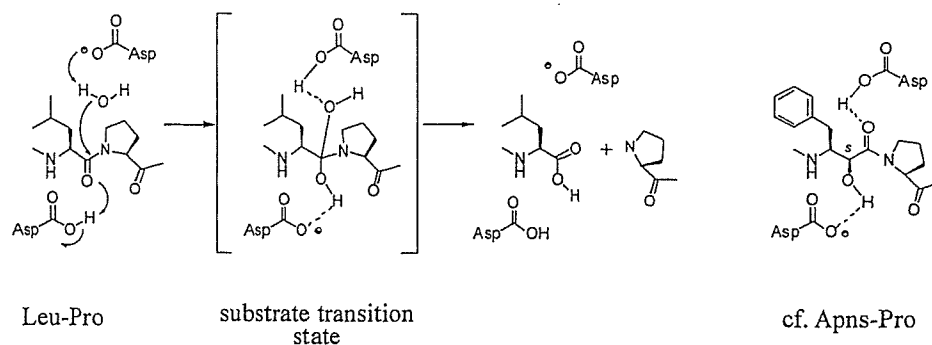


Fig. 1. Hydrolysis by aspartic protease and transition-state analogue containing allophenylnorstatine (Apns) with a hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere.

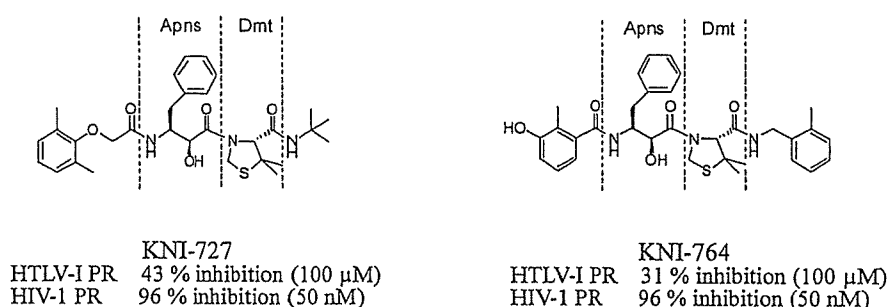


Fig. 2. Structures and inhibitory activities of KNI-727 and KNI-764.

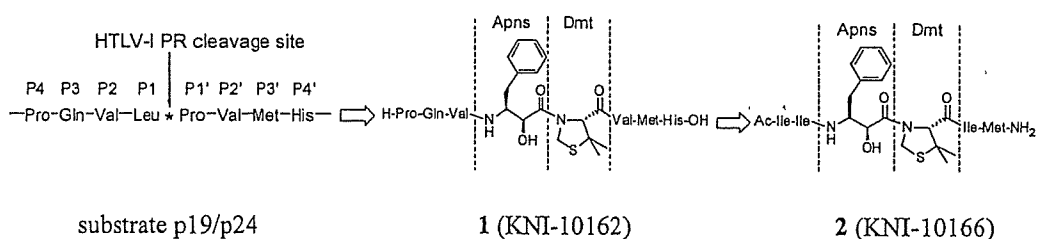


Fig. 3. Structures of substrate-based HTLV-I protease inhibitors.

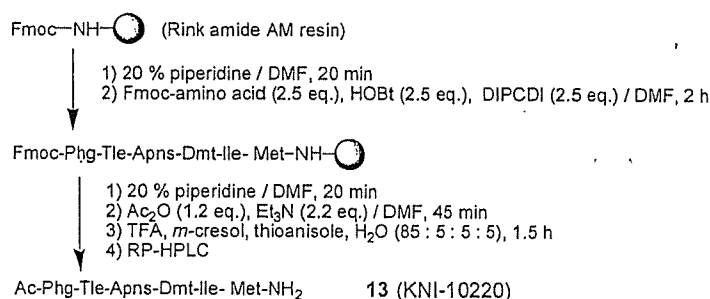
Results and Discussion

We already prepared a series of hexapeptide-type inhibitors by substitution of each position for natural amino acid residues. As the result, compound **2** was the most potent inhibitor. Now we substituted each residue of **2** for unnatural amino acid, Phg (L- α -phenylglycine) or Tle (L- α -*tert*-butylglycine) (Table 1). Under consideration for enzymatic stability, the P3 position of Phg was preferred rather than Ile, however, these modifications at P2' position decreased its activity. The P3' position of **2** was substituted for natural amino acids and we found out that Gln was suitable for this position. Based on these results, we synthesized compound **13** and **14**. These inhibitors showed 99% and 100% inhibitory activities, respectively, and with a IC_{50} value of 0.46 μ M for **13**. The synthetic route to **13** is shown in Scheme 1 as a representative example.

In order to obtain smaller-size inhibitor, we synthesized a pentapeptide-type inhibitor **15** (Table 2) by eliminating the P3' moiety of **13**. Since compound **15** maintained relatively high inhibitory activity, we modified P2' position with some benzylamine derivatives as shown in Table 2. Among these compounds, compound **19**, which has a 2-methylbenzylamine moiety, exhibited comparable inhibitory activity with that of compound **15**.

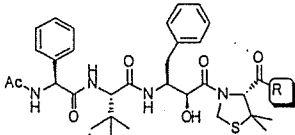
Table 1. SAR of hexapeptide-type inhibitors.

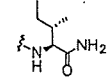
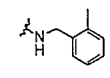
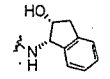
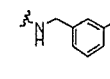
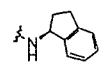
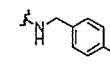
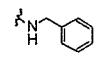
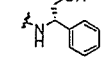
Compound	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	Inhibition %	
							HTLV-I (100 μ M)	HIV-1 (50 nM)
2 (KNI-10166)	Ac-Ile-Ile-Apns-Dmt-Ile-Met-NH ₂						94	98
3	Ac-Tle-Ile-Apns-Dmt-Ile-Met-NH ₂						63	98
4	Ac-Phg-Ile-Apns-Dmt-Ile-Met-NH ₂						96	98
5	Ac-Ile-Tle-Apns-Dmt-Ile-Met-NH ₂						94	97
6	Ac-Ile-Phg-Apns-Dmt-Ile-Met-NH ₂						37	88
7	Ac-Ile-Ile-Apns-Dmt-Tle-Met-NH ₂						62	79
8	Ac-Ile-Ile-Apns-Dmt-Phg-Met-NH ₂						87	86
9	Ac-Ile-Ile-Apns-Dmt-Ile-Gln-NH ₂						97	93
10	Ac-Ile-Ile-Apns-Dmt-Ile-Phe-NH ₂						90	98
11	Ac-Ile-Ile-Apns-Dmt-Ile-Ala-NH ₂						91	82
12	Ac-Ile-Ile-Apns-Dmt-Ile-Phg-NH ₂						83	99
	↓							
13 (KNI-10220)	Ac-Phg-Tle-Apns-Dmt-Ile-Met-NH ₂						99	99
14 (KNI-10221)	Ac-Phg-Tle-Apns-Dmt-Ile-Gln-NH ₂						100	98



Scheme 1. Synthetic scheme for HTLV-I protease inhibitor **13** using Rink amide AM resin.

Table 2. Modification at P2' position of pentapeptide-type inhibitors.



Compound	R	Inhibition %		Compound	R	Inhibition %	
		HTLV-I (100 μM)	HIV-1 (50 nM)			HTLV-I (100 μM)	HIV-1 (50 nM)
15 (KNI-10247)		84	93	19 (KNI-10252)		82	99
16		63	98	20		39	99
17		75	100	21		63	99
18		46	99	22		74	79

In conclusion, we synthesized a series of HTLV-I protease inhibitors containing Apns-Dmt scaffold as transition-state mimic and obtained pentapeptide-type inhibitors KNI-10247 (**15**) and -10252 (**19**) that are small in size and possessed the high inhibitory activities. These results would greatly contribute to the development of small-sized inhibitors with potent inhibitory activity and high cell-permeability.

Acknowledgement

This research was supported in part by the "Academic Frontier" Project for Private Universities: matching fund subsidy from MEXT (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology) of the Japanese Government, and the 21st Century COE Program from MEXT.

References

- Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S., Miyoshi, I. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 6476-6480.
- Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., Tara, M. (1986) *Lancet*, **1**, 1031-1032.
- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J. C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., De Thé, G. (1985) *Lancet*, **2**, 407-410.
- Uchiyama, T. (1997) *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 15-37.
- Oroszlan, S., Luftig, R. B. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **157**, 153.
- Mimoto, T., Kato, R., Takaku, H., Nojima, S., Terashima, K., Misawa, S., Fukazawa, T., Ueno, T., Sato, H., Shintani, M., Kiso, Y., Hayashi, H. (1999) *J. Med. Chem.*, **42**, 1789-1802.
- Tözsér, J., Zahuczky, G., Bagossi, P., Louis, J. M., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Harrison, R. W., Weber, I. T. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6287-6295.
- Maegawa, H., Kimura, T., Aii, Y., Matsui, Y., Kasai, S., Hayashi, Y., Kiso, Y. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 5925-2929.

**From Peptidic Substrate to Small Inhibitor Possessing Non-Natural Amino Acids:
A Summary on HTLV-I Protease Inhibitor Optimization Studies**

J-T. Nguyen, A. Itami, H. Maegawa, K. Nishiyama, T. Kimura and Y. Kiso
Department of Medicinal Chemistry, Center for Frontier Research in Medicinal Science and
21st Century COE Program, Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan
kiso@mb.kyoto-phu.ac.jp

The human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) infects human white blood cells causing malignant proliferation of adult T-cell leukemia / lymphoma that infiltrates skin and brain, as well as myelopathy / tropical spastic paraparesis in which patients present with a gradual onset of symmetrical weakness, upper motor neuronal signs, mainly affecting lower limbs. Infection with the oncogenic retrovirus is endemic in south-western Japan, the Caribbean basin, South America, Central and West Africa, the Middle East and the Pacific region. The HTLV-I protease (PR) plays a key role in the replication of the HTLV-I virus; thus inhibiting the protease would essentially stop viral propagation.

From a matrix-capsid cleavage substrate that is only recognized by HTLV-I PR, we roughed out a series of peptide inhibitors and ended with octapeptide KNI-10161, exhibiting 94% HTLV-I PR inhibition at 100 μ M of the compound. Realizing the difficulty for large peptides to penetrate intact cells, we then chipped octapeptide KNI-10161 down to hexapeptide KNI-10127 with some loss of inhibitory activity (66%). On the premise that other substrates are also cleaved by the HTLV-I PR, we carved out small libraries at each residue of KNI-10127 to recover equipotency in inhibitor KNI-10166 (94%). In the midst of our woes on how frail peptides are against proteolytic cleavage, we slowly changed the natural amino acid foundation of the inhibitor, and sculpted hexapeptide KNI-10220 exhibiting 99% activity. Filing away an excess residue, we rejoiced as we uncovered pentapeptide KNI-10247 with minimal loss of activity (84%). Finally, after much polishing, we unveiled small tetrapeptide KNI-10455 (94%) that is completely devoid of any natural amino acid residue.

Compounds	Structure											HTLV-I PR Inhibition at 100 μ M	
	P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '	P ₅ '			
Peptide Substrate	H	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Pro	Val	Met	His	Pro	OH	Not Applicable
KNI-10161		H	Pro	Gln	Val	Apns	Pro	Val	Met	His	OH		94%
KNI-10127			Ac	Gln	Val	Apns	Dmt	Val	Met	NH ₂			66%
KNI-10166			Ac	Ile	Ile	Apns	Dmt	Ile	Met	NH ₂			94%
KNI-10220			Ac	Phg	Tle	Apns	Dmt	Ile	Met	NH ₂			99%
KNI-10247			Ac	Phg	Tle	Apns	Dmt	Ile	NH ₂				84%
KNI-10455			Ac	Phg	Tle	Apns	Dmt	Bma					94%

Apns, (2*S*,3*S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid, allophenylnorstatine
Dmt, (*R*)-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid
Phg, L-(+)- α -phenylglycine
Tle, L-*tert*-leucine
Bma, β -methallyl

1. シクロフィリンと HIV-1

足立 昭夫, 鎌田 和弥, 藤田 美歌子

はじめに

エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV: human immunodeficiency virus) が発見されたのは 1983 年のことである。その後まもなく, 新種のウイルスが見出され HIV2 型 (HIV-2: HIV type 2) と名付けられた。HIV-2 はほぼ西アフリカ地方に限局して存在し伝播性や病原性が弱いとされているのに対し, 1983 年のウイルス HIV-1 は全世界に蔓延し人類の脅威となっている¹⁾。感染爆発が凄まじいアジア・アフリカ地域では, HIV-1 の制圧が最も緊急の医学的課題である。

1993 年に HIV-1 粒子にシクロフィリンが結合することが著名な科学雑誌 Cell に掲載された²⁾。HIV-1 タンパク質と細胞タンパク質の相互作用を分子生物学的に証明した画期的論文である。この論文を契機としてシクロスポリンは抗 HIV-1 薬としても一躍脚光を浴び, 作用機構などが詳細に解析された。その後, シクロフィリン A が HIV-1 の複製や宿主域 (トロピズム) に密接にかかわっていることも明らかにされ, 現在も精力的に研究が行われている。ここでは, HIV-1 複製とシクロフィリン / シクロスポリンとの関係をまとめるが, さらに, ウイルストロピズムに関する筆者らの最新の成果についても概説する。

1. HIV-1 の基本的性状

1) ゲノムおよびタンパク質

図 1 に示したように, HIV-1 ゲノムには 9 種類の遺伝子がある。これらの遺伝子は構造遺伝