

200908007A

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

HIV吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型HIV化学療法剤の開発
(H19-政策創薬-一般-007)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松岡 雅雄
(京都大学ウイルス研究所・教授)

平成22 (2010) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤の開発-----1 研究代表者・松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授）-----5 大石 真也（京都大学薬学研究科・助教）	5
2. 児玉 栄一（東北大学病院・助教）-----16	16
3. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）-----21	21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・刊行物・別刷

1. 松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）-----25	25
2. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授）-----38 大石 真也（京都大学薬学研究科・助教）	38
3. 児玉 栄一（東北大学病院・助教）-----77	77
4. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）-----95	95

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤の開発に関する研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡雅雄

研究要旨

耐性 HIV の出現は治療上大きな脅威であり、その克服には新たな標的に対する抗 HIV 剤の開発が必要である。本研究では、これまでに同定した侵入阻害活性を有する多数の小分子リード化合物、及び T-20 より強力な耐性ウイルスにも有効なペプチド製剤を基に、HIV 吸着・膜融合過程を標的とした強力かつ安全な新規抗 HIV 剤を開発し、多数の HIV 感染者が利用可能な多剤耐性克服型化学療法を確立する。

分担研究者氏名・所属機関名及び

所属分野における職名：

藤井信孝(京都大学大学院薬学研究科・教授)

大石真也(京都大学大学院薬学研究科・講師)

児玉栄一(東北大学医学部感染症科・助教)

村上努(国立感染症研究所・エイズ研究センター第三室長)

谷口 雅彦(富士写真フイルム株式会社 R&D 統括本部有機合成化学研究所・主任研究員)

A. 研究目的

近年、わが国における HIV 感染症に対する多剤併用療法（HAART）の有効性は顕著であるが、発展途上国をはじめとする新規薬剤が行き届かない各国での耐性ウイルスの出現は大きな脅威であり、グローバルな視点から安全かつ安価で有効な新規抗 HIV 剤の開発が急務となっている。我々は、HIV 吸着・膜融合の動的機構の解明を進め、これを基盤とする HIV 侵入阻害剤（第二受容体拮抗剤）や HIV 膜融合阻害剤の開発において先駆的研究を推進するとともに、多数の創薬リード化合物を創出してきた。本研究では、これまでに申請者らが取り組んで来た HIV 侵入・膜融合阻害剤の開発に関する基礎研究、および数種の開発候補化合物を基盤として多剤耐性 HIV 株を標的とする化学療法剤の開発を目指す。具体的には、（1）各種のペプチド性化合物・低分子リード化合物の構造最適化を図ると共に、作用メカニズム解析および既知薬剤の耐性株への評価を行い、（2）これまでに見出された化合物の実用化に向け in vivo 評価

へ向けた毒性評価・薬物動態試験を行う。また、（3）侵入プロセスを阻害する複数の薬剤の同時使用を指向した in vitro 系での予備的検討を行う。これらの研究のうち、特に融合阻害剤についてはすでに有用なペプチドを同定し、複数の特許出願を行っている。加えて、小分子リード化合物の発見、作用機序解明などで様々な成果をあげてきた。本申請ではこれまでに見出している一連のリード化合物の構造情報を基盤として、富士フイルム(株)と連携しながら強力な吸着・融合阻害活性を有する化合物を創製し、本年度までの有用な基礎研究成果をさらに発展させることを目的とする。

B. 研究方法

細胞

HeLa-CD4/CCR5LTR-b-galactosidase (MAGI) 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清(FCS)、0.2 mg/ml G418、0.1 mg/ml ハイグロマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養した。MT-2 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清(FCS)を含む RPMI1640 培地で培養した。

抗ウイルス剤とペプチド

ポルフィリンとその誘導体および V3 loop ペプチドは同志社大学薬学部より分与を受けた。

抗 HIV-1 活性の評価

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator assay を用いた。また固定化抗 CD3 抗体で刺激し、IL-2 存在下で増殖させた末梢血単核球

を標的細胞として HIV-1 を MOI=0.001 で感染させ、種々の濃度の薬剤存在下で 7 日から 10 日培養した。抗 HIV-1 活性は培養上清中の p24 抗原量を市販の ELISA を用いて測定後算出した。抗 HIV-1 活性は HIV-1 の複製を 50% 阻害する濃度 (EC₅₀) を算出し評価した。

ポルフィリンに対する耐性ウイルスの誘導

ウイルスは pNL4-3 を 293T 細胞にトランスフェクトし、作成する。ポルフィリン誘導体を 50% ウイルス複製阻止濃度から培養液に加え、その状態でウイルス複製を繰り返す。細胞変性効果が十分に見られるようになった場合、培養液に加える薬剤濃度を 2 倍に増加させ、さらに培養を続ける (dose escalating method)。ある一定濃度を超える濃度でもウイルスが複製してくるようになったら、感染細胞の一部を回収し、DNA を抽出、PCR 法でウイルスのエンベロープ領域を増幅し、その塩基配列を決定する。

KRH-3955 による抗 CXCR4 抗体 12G5 結合の持続的阻害活性の測定

Molt-4 細胞を on ice で薬剤処理した後細胞を洗浄し (または洗浄せず)、抗体反応後結合した CXCR4 抗体量を FACS にて定量した。また、薬剤処理した後細胞を洗浄したのち、37C で一定時間 (0, 3, 6 時間) 細胞を静置し、12G5 結合阻害活性を測定した。

事前内服による感染予防効果の検討

カニクイサルに SHIV-KS661_c を感染させる AIDS モデルにおいて KRH-3955 を 100 mg/kg で感染 24 時間前に投与 (対照薬剤: TDF/FTC は、30/20 mg/kg を感染 24 時間前と感染直前の 2 回投与) 後、10 AID50 の SHIV-KS661_c を経直腸感染させ、12 週にわたって観察する。主なモニター項目は、CBC、CD4/CD8 細胞数、ウイルス量、などである。

ペプチド合成法

化学合成により得られたモデルペプチドにより、Cys または Met を含む 2 残基のペプチド配列を付加した抗 HIV 活性配列の切り出し条件を精査した。次に、大腸菌による組換えタンパク質の発現系を確立し、融合タンパク質を用いて、組換えタンパク質の精製方法、融合タンパク質からの環化型ペプチドの切

り出し条件の精査、環化型ペプチドの精製方法等を検討した。

抗 HIV-1 活性を有する小分子化合物の合成法

東郷らにより報告されている酸化性的アミジン化反応を用いて、ベンズアルデヒドを 2-phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine (以下、2-PTHP) 誘導体に変換後、官能基化反応に付すことで、PD 404182 と同様の多環式複素環骨格が得られると考え、実験を進めた。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

新規ポルフィリン誘導体の効果

作成したポルフィリン誘導体は X4 と R5 ウイルスに対して同等の効果を発揮した。効果は低いものでも 5 mM 程度の EC₅₀ 値を示し、強いものでは 0.06 mM という低い濃度でも HIV-1 の複製を抑制していた。Fe をポルフィリン環に配位させたものはそうでないものと比べ効果が増強していた。HIV-1_{IIIB} と HIV-1_{Bal} に対する抗 HIV-1 効果から、これらのポルフィリン誘導体はコレセプターには影響されなかった。time of addition 実験を行いポルフィリン誘導体が侵入阻害剤として作用していることが示された。

ポルフィリン誘導体の標的分子の同定

ポルフィリン誘導体と細胞を培養した後に洗浄すると、抗 HIV-1 効果が失われたことから、作用点はウイルス側にあることが示された。ポルフィリン誘導体がウイルス外皮タンパク質 gp120 に結合し、阻害していると考えられたため外皮タンパク質の V3 loop 領域の合成ペプチドを合成し、ポルフィリン誘導体との結合能を解析した。ポルフィリン誘導体は X4, R5 ウイルス由来の V3 ペプチドに同等に結合することが示され、ポルフィリンの結合部位の候補の一つとして V3 loop が同定された。

KRH-3955 による抗 CXCR4 抗体 12G5 結合阻害活性の測定

Molt-4 細胞を on ice で薬剤処理した後、細胞を洗浄し、抗体反応後結合した CXCR4 抗体

量を FACS にて定量した。KRH-3955 (10 nM) では、薬剤処理した後細胞を洗浄し、遊離した薬剤を除去しても、12G5 結合を顕著に阻害した。対照的に、AMD3100 では細胞の洗浄によってその阻害活性をほぼ失っていた。KRH-3955 は持続的に抗 CXCR4 抗体の結合を阻害することが示された。

事前内服による感染予防効果の検討

KRH-3955 を 100 mg/kg で感染 24 時間前に投与した 3 頭の末梢血 CD4 数は、感染後 3 ヶ月経ってもウイルス感染時のレベルを維持していた。一方、対照薬剤の TDF/FTC では、感染後 3 ヶ月において 3 頭中 2 頭の末梢血 CD4 数はウイルス感染時のレベルを維持していたが、1 頭は感染後 1 ヶ月で急激な末梢血 CD4 数の減少を起こした。

ペプチド合成法の確立

抗 HIV 活性ペプチドの両側に Met-Gln 配列を付加した融合タンパク質をデザインし、融合タンパク質から臭化シアンによる切り出しと Gln の pGlu への環化を行い、N 末端に pGlu と C 末端に Hsl を有する抗 HIV 活性ペプチドの調製を試みた。この結果、70% ギ酸、0.1 N 塩酸、0.1 NTFA で溶出した His タグ融合 M-(Q-SC35EK-M)₃-Q から、それぞれ 1.7 mg (収率 7.9%)、2.8 mg (収率 12.4%)、2.0 mg (収率 8.9%) の pGlu-SC35EK-Hsl が得られた。組換えタンパク質から調製する抗 HIV 活性ペプチドは、血中での安定性向上を目的としたエンドキャップ構造が付与されるように設計されている。これらのペプチドの抗 HIV 活性を、化学合成により調製した標品を用いて MAGI アッセイで評価し、HIV-1(NL4-3)の感染を 50% 阻害する濃度 (50% effect concentration) として算出した。いずれも強力な抗 HIV 活性が認められ、両末端の構造が抗 HIV 活性に影響しないことが確認できた。

D. 考察

本研究では、HIV-1 の侵入・融合過程に焦点を当て新規の抗 HIV-1 薬を開発してきた。これまでの研究で T-20 耐性ウイルスに有

効で強い抗 HIV-1 活性を有するペプチドを開発してきた。ペプチド製剤の大きな問題点が高い製造コストにあるが、今年度の研究で新たな合成方法を確立した。アミノ酸原料の化学修飾を必要としない発現生産プロセスによりペプチド鎖を伸長後、化学的処理により抗 HIV 活性配列のみを獲得するという点で、ペプチド合成のためのステップを短くできる利点がある。

これまでの研究から、KRH-3955 が経口吸収性を有する強力な CXCR4 阻害剤であり、X4 HIV-1 複製阻害剤として有望であることが示唆されている。今年度の実験から CXCR4 に対して持続性の結合を示すことが明らかとなった。

ペプチド製剤は、従来、固相合成法と液相合成法を組み合わせた化学合成により生産が行われてきたため生産費用が高く、供給コストが高い原因の 1 つとなっている。今年度の研究で確立した方法は製造ステップを少なくすることにより製造コストを下げることが可能であるだけでなく、合成されたペプチドは、N 末端側と C 末端側の両方に環状構造からなる修飾基を有し、血中に存在するエキソペプチドダーゼによる分解を回避することが可能である。今後のペプチド製剤開発・製造に大きな貢献ができる研究成果であると期待される。

E. 結論

今年度の研究から、抗 HIV-1 活性を有するペプチド製剤の合成方法を新たに開発し、安価な薬剤開発を可能とした。新規 CXCR4 阻害剤の作用機序を解析すると共にサルを用いた実験で、その効果を明らかにでき、今後の開発に繋がる成果となった。

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
該当事項なし
3. その他
該当事項なし

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤の開発

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
研究分担者：京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝
大石 真也

研究要旨 ペプチド性膜融合阻害剤 SC34EK、SC35EK、T-20EK について、大腸菌による融合タンパク質発現とその後の化学処理により大量生産を行う方法を確立した。本法により得られるペプチドは、エキソペプチダーゼによる分解から保護する環状修飾基をその両末端に有しており、化学合成ペプチドと同等の活性を示した。また、非ペプチド性抗 HIV 剤の創製を目指した構造最適化研究のための新規複素環骨格の効率的合成法を確立した。



Fig. 1. Peptide preparation



Scheme 1. Preparation of anti-HIV peptide from fusion proteins

分担研究項目 1：ペプチド性膜融合阻害剤の発現生産プロセスの開発

A. 研究目的

ペプチドを化学合成する際には、側鎖や末端の化学修飾が可能である半面、大量の有機溶媒を必要とするために環境負荷が高く、高コストであるといった問題点がある。一方、遺伝子組換え技術を応用した場合には、有機溶媒等は必要とせず、培養スケールに応じて必要量の目的ペプチドを得ることが可能になる。しかしながら、異種ペプチドの多くは、融合タンパク質として発現させるために付加配列が残存し、この部分を除去するために高価な酵素を使用することが多い。また、培養により得られたペプチドを修飾することは容易ではなく、N 末端アミノ基・C 末端カルボキシル基となる一般的な非修飾型のペプチドは、*in vivo* においてペプチダーゼにより容易に分解されると考えられる (Fig. 1)。

研究グループでは、SC34EK、SC35EK、

T-20EK/S138A の 3 種類の抗 HIV 活性ペプチドについて、組換え技術により目的のペプチドを融合タンパク質として取得後、融合タンパク質から目的のペプチドを切り出すと同時に両末端を環化させることでキャッピング官能基を付与する手法の開発に取り組んだ。(Scheme 1) この方法の特徴は、目的のペプチドの前後にシステイン (Cys) 残基またはメチオニン (Met) 残基を含む 2 残基のペプチド配列を付加するだけで、高価な酵素を必要とせず、比較的マイルドな条件下で反応を行える点にある。さらに、取得後のペプチドには余分な配列が含まれず、両末端を環化させることで *in vivo* での安定性の向上が期待される。

B. 研究方法

まず、化学合成により得られたモデルペプチドにより、Cys または Met を含む 2 残基のペプチド配列を付加した抗 HIV 活性配列の切り出し条件を精査した。次に、大腸菌による組換えタンパク質の発現系を確

Table 1. Cleavage reaction of *S*-cyanocysteine-containing peptides **9** by aqueous NH₃^a

Ac-YEQQK-X-C(EYFKK)-NH₂ $\xrightarrow{\text{NH}_3}$ Ac-YEQQK-X-R **10a** R = NH₂
10b R = OH

CDAP $\left\{ \begin{array}{l} \text{8 R = H} \\ \text{9 R = CN} \end{array} \right.$

Ac-YEQQK-X- Δ Ala-EYFKK-NH₂ **11**
 (ΔAla: dehydroalanine)

Ac-YEQQK-X- Δ Ala-EYFKK-NH₂ **12**
 (ΔAla: dehydroalanine)

Ac-YEQQK-NH- **13** Ac-YEQQK-NH- **14**

X	Conversion (%) ^b	X	Conversion (%) ^b
Gly	50	Ser	68
Ala	62	Thr	71
Val	36	Asp	45
Leu	53	Glu	46
Ile	46	Asn	79 ^c
Pro	42	Gln	65
Met	66	Lys	82 ^d
Phe	63	Arg	71
Tyr	55	His	64
Trp	57		

^a All cleavage reactions were carried out in 3 M NH₃ for 20 min at 20 °C.

^b The conversion yields were calculated based on the combined peak areas of peptides **10a** and **11** by RP-HPLC analysis. ^c Including C-terminal aspartimide product **13** (**10a**:**13** = 53:47). ^d Including C-terminal ϵ -lactam product **14** (**10a**:**14** = 22:78).

立し、融合タンパク質を用いて、組換えタンパク質の精製方法、融合タンパク質からの環化型ペプチドの切り出し条件の精査、環化型ペプチドの精製方法等を検討した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

C-1. システインを介する化学的切断

① モデルペプチドを用いたシステインを介する化学的切断法の条件設定

融合タンパク質からのペプチドの切り出し方法として、Cys のチオール基をシアノ化後、塩基処理を行うことで、N 末端にイミノチアゾリジン構造を、C 末端にアミドを形成する反応が知られている。本プロジェクトでは、Cys の1 残基前の X 位を 19 種類のアミノ酸に置換したモデルペプチドを合成し、X 位のアミノ酸のアミド形成への影響を精査した。この結果、X をリジン (Lys) またはアスパラギン (Asn) とした時、C 末端にリジンラクタムまたはアスパルチミドを有するペプチドが収率よく得られることを見出した (Table 1)。また、*S*-シアノシステインからの切断とリジンラク

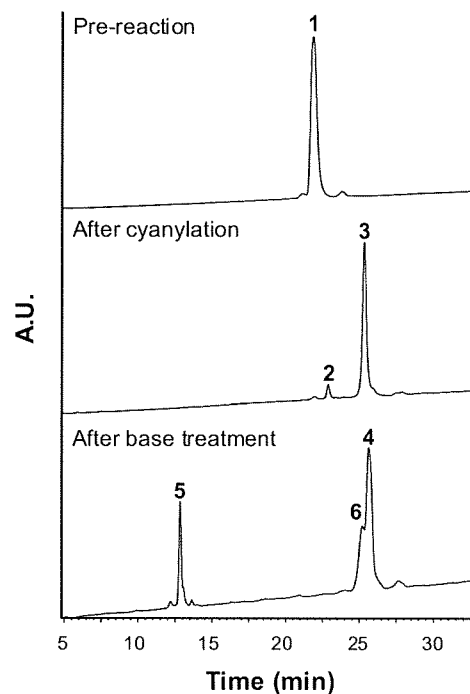


Fig. 2. Chromatogram of reaction products from TRX-fused protein

タム形成反応を効率的に進行させる塩基性条件について精査し、1 M K₂CO₃ 存在下、最も効率よく環化体が得られることを見出した。

この条件をもとに、抗 HIV 活性ペプチドの両側に Lys-Cys 配列または Asn-Cys 配列を付加した融合タンパク質をデザインし、融合タンパク質から CDAP によるシアノ化とこれにつづく塩基処理により、N 末端にイミノチアゾリジン構造と C 末端にラクタム環構造を有する抗 HIV 活性ペプチドの調製を試みた。

② チオレドキシン (TRX) 融合タンパク質からの SC34EK の切り出し

大腸菌で発現、精製した TRX-KKC-SC34EK-KCW および TRX-KNC-SC34EK-NCW を脱塩後、0.5 mM TCEP 存在下、0.1N 酢酸中で 10 mM CDAP と室温 30 分間反応させ、Cys のチオール基をシアノ化した。シアノ化後、脱塩、凍結乾燥し、0.3 M K₂CO₃ 水溶液中で 30 分間塩基処理を行い、融合タンパク質からの切り出しを行った。反応後、RP-HPLC による精製を行い、目的の両末端環化 SC34EK を得た。また、各ステップでの反応生成性を LC-MS

分析に供し、反応生成物を確認・同定した。

TRX 融合 KKC-SC34EK-KCW を用いてシアノ化、切り出しを行った際の LC-MS による解析結果を Fig. 2 に示す。TRX 融合 KKC-SC34EK-KCW (図中 1) は、シアノ化処理後には 4 つの Cys がすべてシアノ化されたタンパク質 (図中 2) と、2 つの Cys がシアノ化されたタンパク質 (図中 3) が得られた。これらのタンパクを塩基処理することによって、SC34EK の両末端が環化した cc-SC34EK(K) (図中 5) が得られた。

この結果、TRX-KKC-SC34EK-KCW 6.8 mg から 0.4 mg の cc-SC34EK(K) (収率 24%) を、TRX-KNC-SC34EK-NCW 6.8 mg から 0.3 mg の cc-SC34EK(N) (収率 21%) を得た。それぞれ 1 L の培養液から、4.8 mg および 3.3 mg の目的ペプチドが得られた。

③ TRX 融合タンパクからの SC35EK の化学処理による切り出し

TRX-KKC-SC35EK-KCW および TRX-K-(C-SC35EK-K)₃-C を 0.5 mM TCEP 存在下、0.1 N 酢酸中で 5 mM CDAP でシアノ化後、脱塩、凍結乾燥し、0.3 M K₂CO₃ 水溶液中での塩基処理により切り出しを行った。さらに、TRX-K-(C-SC35EK-K)₃-C については、シアノ化の際の条件を検討し、7 M 尿素 (変性剤) 存在下でも反応を行った。反応後、RP-HPLC による精製を行い、cc-SC35EK(K) を得た。この結果、TRX-KKC-SC35EK-KCW 6.4 mg から 0.2 mg の cc-SC35EK(K) (収率 15%) を得た。また、TRX-K-(C-SC35EK-K)₃-C 7.7 mg からは 0.4 mg の cc-SC35EK(K) (収率 10%) を得、尿素存在下で反応を行った場合には、5.1 mg から 0.3 mg の cc-SC35EK(K) (収率 14%) を得た。それぞれ 1 L の培養液から、2.8 mg、3.7 mg、5.1 mg の目的ペプチドが得られた。

④ TRX 融合タンパクからの T-20EK/S138A の化学処理による切り出し

cc-T-20EK/S138A(K) および cc-T-20EK/S138A(N) への切り出し条件を精査し、収率を算出した。精製・脱塩した TRX-FKC-T-20EK/S138A-KCY および TRX-FNC-T-20EK/S138A-NCY を、0.5 mM TCEP 存在下、0.1 N 酢酸中で 5 mM CDAP でシアノ化後、脱塩、凍結乾燥し、0.1 M K₂CO₃ 水溶液中で塩基処理を行い、融合タンパクからの切り出しを行った。反応後、RP-HPLC による精製を行い、目的の両末端

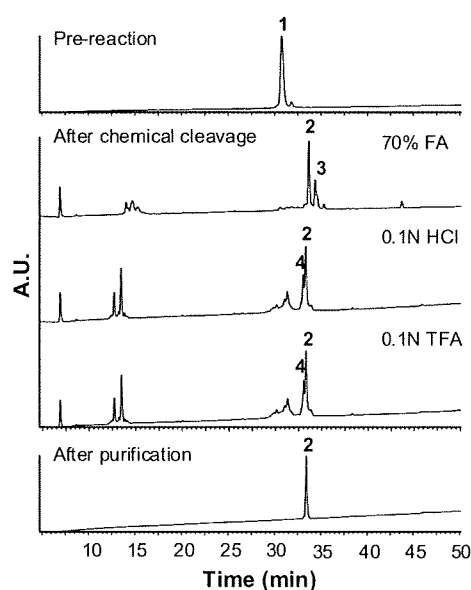


Fig. 3. Chromatogram of reaction products from His tag fused protein.

環化 T-20EK/S138A を得た。この結果、TRX-FKC-T-20EK/S138A-KCW 5.4 mg から 0.2 mg の cc-SC34EK(K) (収率 11%) を、TRX-FNC-T-20EK/S138A-NCY 11.3 mg から 0.6 mg の cc-T-20EK/S138A(N) (収率 32%) を得た。それぞれ 1 L の培養液から、1.3 mg および 6.7 mg の目的ペプチドが得られた。

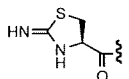
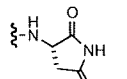
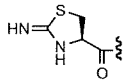
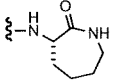
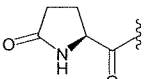
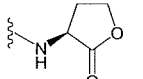
C-2. メチオニンを介する化学的切断

① モデルペプチドを用いたメチオニンを介する化学的切断法の条件設定

融合タンパクからのペプチドの切り出し方法として、Met 残基のチオエーテル基を 70% ギ酸中で臭化シアンと作用させ、メチオニン残基での切断と C 末端のホモセリンラクトン (Hsl) の形成を行う反応は、古くから知られていた。本プロジェクトでは、目的ペプチドの両末端が環化構造をとるように、Met 残基の前にグルタミン (Gln) を配置し、上記の反応と平行して、Gln がピログルタミン酸 (pGlu) へ環化する条件をモデルペプチド MQ-SC7EK-MQ を用いて精査した。反応溶媒についても検討した結果、還元剤である TCEP 存在を加えることで、これまで一般的に用いられてきた毒性の高いギ酸中だけでなく、0.1M 塩酸や 0.1M TFA などの強酸希薄溶液中においても、反応が進行する条件を見出した。

この条件をもとに、抗 HIV 活性ペプチドの両側に Met-Gln 配列を付加した融合タンパク質をデザインし、融合タンパク質から臭化シアンによる切り出しと Gln の pGlu

Table 2. Sequences and anti-HIV activity of N- and C-terminally capped SC34EK and SC35EK analogs.

peptide	R ¹	R ²	EC ₅₀ (nM) ^a	T _m (°C)
SC34EK	Ac	NH ₂	0.60 ± 0.10	71.2
SC34EK	H	OH	0.68 ± 0.11	-
SC34EK			0.48 ± 0.13	71.0
SC34EK			0.58 ± 0.24	71.0
SC35EK	Ac	NH ₂	0.50 ± 0.16	75.8
SC35EK	H	OH	2.43 ± 0.22	62.5
SC35EK			0.57 ± 0.24	73.6

^aEC₅₀ was determined as the concentration that blocked HIV-1 replication by 50% in a MAGI assay.

への環化を行い、N末端に pGlu と C末端に Hsl を有する抗 HIV 活性ペプチドの調製を試みた。

② Hisタグ融合タンパクからのSC35EKの化学処理による切り出し

Hisタグ融合MQ-SC35EK-MQを用いて、化学処理によるタンパク質からの抗HIV活性ペプチドの回収を試みた。大腸菌で発現・精製したHisタグ融合MQ-SC35EK-MQを、Met残基に対して100当量のBrCNと10当量のTCEP存在下、70%ギ酸、0.1 N塩酸、0.1 Nトリフルオロ酢酸 (TFA) 中でそれぞれ60°C、2時間反応させ、タグタンパク質からの切り出しと、N末端のGluのpGluへの環化を行った。反応後、RP-HPLCによる精製を行い、目的のpGlu-SC35EK-Hslを得た。また、各ステップでの反応生成性をLC-MS分析に供し、反応生成物を確認・同定した。

Hisタグ融合MQ-SC35EK-MQを用いて、各酸溶媒中で切り出しを行った際のLC-MSによる解析結果をFig. 3に示す。Hisタグ融合MQ-SC35EK-MQ (図中1) は、いずれの酸溶媒を用いた場合にも、目的のpGlu-SC35EK-Hsl (図中2) が主生成物として得られた。一方、70%ギ酸を用いた場合には、ホルミル化を受けたpGlu-SC35EK-Hsl (図中3) のピークが確認された。また、0.1N塩酸やTFAを用いた場合には、C末端のHslが開環してホモセリン

(Hse) になったpGlu-SC35EK-Hse (図中4) のピークが確認された。

この結果、70%ギ酸、0.1 N 塩酸、0.1 N TFAで溶出した His タグ融合 MQ-SC35EK-MQ から、それぞれ 10.4 mg (収率 16.6%)、7.8 mg (収率 15.2%)、8.7 mg (収率 14%) の pGlu-SC35EK-Hsl が得られた。

③ タンデム型Hisタグ融合タンパクからのSC35EKの化学処理による切り出し

Hisタグ融合M-(Q-SC35EK-M)₃-QからのpGlu-SC35EK-Hslの切り出し条件を精査し、収率を算出した。70%ギ酸、0.1 N塩酸、0.1 N TFAで溶出した His タグ融合 MQ-SC35EK-MQをMet残基に対して100当量のCNBrと10当量のTCEP存在下、それぞれ60°C、2時間反応させ切り出しを行った。反応後、RP-HPLCによる精製を行い、目的のpGlu-SC35EK-Hslを得た。また、各ステップでの反応生成物をLC-MSに供し確認・同定した。この結果、70%ギ酸、0.1 N塩酸、0.1 N TFAで溶出したHisタグ融合M-(Q-SC35EK-M)₃-Qから、それぞれ1.7 mg (収率7.9%)、2.8 mg (収率12.4%)、2.0 mg (収率8.9%) のpGlu-SC35EK-Hslが得られた。

C-3. 化学的切断法により得られる両末端環化型膜融合阻害剤の抗 HIV 活性評価

組換えタンパク質から調製する抗 HIV

活性ペプチドは、血中での安定性向上を目的としたエンドキャップ構造が付与されるように設計されている。これらのペプチドの抗 HIV 活性を、化学合成により調製した標品を用いて MAGI アッセイで評価し、HIV-1(NL4-3)の感染を 50%阻害する濃度 (50% effect concentration) として算出した (Table 2)。いずれも強力な抗 HIV 活性が認められ、両末端の構造が抗 HIV 活性に影響しないことが確認できた。

D. 考察

ペプチド性膜融合阻害剤は、従来、固相合成法と液相合成法を組み合わせた化学合成により生産が行われてきた。このため生産に関わる費用が著しく高く、治療薬供給コストが高い原因の1つとなっている。

本法では、アミノ酸原料の化学修飾を必要としない発現生産プロセスによりペプチド鎖を伸長後、化学的処理により抗 HIV 活性配列のみを獲得するという点で、ペプチド合成のためのステップを短くできる利点がある。また、得られたペプチドは、その N 末端側と C 末端側の両方に環状構造からなる修飾基を有し、血中に存在するエキソペプチダーゼによる分解を回避することが可能である。さらに、形質転換に用いるオリゴ DNA を変えることにより前年度までの研究において得られた薬剤耐性株のアミノ酸変異を導入したペプチドが簡便に合成可能であることから、次々に出現する薬剤耐性株の対する新規薬剤に共通のユニバーサルな合成法として利用することが可能である。

E. 結論

研究グループでは、ペプチド性 HIV 膜融合阻害剤の大腸菌による発現プロセスとその後の化学的処理を組み合わせた新しい生産プロセスを確立した。現状において大腸菌でのタンパク質発現量に改善の余地があるものの、分泌発現をはじめとするさらなる条件検討、および、アフィニティクロマトグラフィーに代わる新たな精製法との組み合わせにより、ペプチド性膜融合阻害剤原末を安価に供給可能になることが期待される。

分担研究項目 2 : 低分子抗 HIV 活性化合物の効率的合成法の開発研究

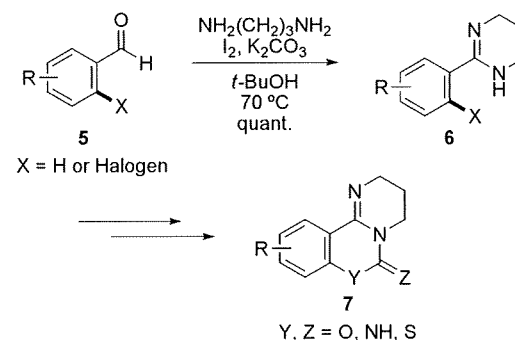
A. 研究目的

研究グループでは、新規抗 HIV 活性化合物の探索を目的としたランダムスクリーニングを行い、pyrimidobenzothiazin-6-imine 骨格を有する PD 404182 が抗 HIV 活性を示すことを見出した。本化合物は、グラム陰性菌のリポポリサッカライド (LPS) の主要物質である 2-ケト-3-デオキシオクトン酸 (KDO) の合成初期段階において、ホスホエノールピルビン酸とアラビノース 5 リン酸の縮合を触媒する KDO 8-P 合成酵素を阻害することにより抗菌活性を示し、多剤耐性菌に有効な新規化合物探索における有用なリード化合物であると報告されている。PD 404182 の合成は一例のみ報告例があるものの、各工程が低収率であることなどの問題点を有するため、抗 HIV 剤としての構造最適化に用いることができる効率的な合成法とは言い難い。そこで本研究では、構造活性相関研究を視野に入れた PD 404182 及びその類縁体の効率的合成法の開発を行った。

B-C. 研究方法・研究結果

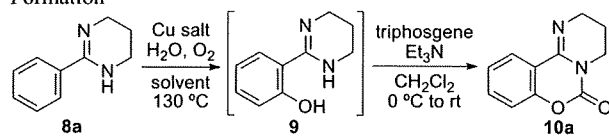
PD 404182 の合成計画を Scheme 1 に示す。東郷らにより報告されている酸化的アミジン化反応を用いて、ベンズアルデヒド **5** を 2-phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine (以下、2-PTHP) 誘導体 **6** に変換後、官能基化反応に付すことで、PD 404182 と同様の多環式複素環骨格 **7** が得られると考えた。

Scheme 1. Synthetic Plan for PD 404182 Derivatives



C-H 官能基化反応による PD 404182 誘導体合成法の開発

C-H 官能基化反応は、結合生成部位における官能基化段階を省き、短工程で目的の

Table 1. Optimization of Reaction Conditions for C-O Bond Formation^a


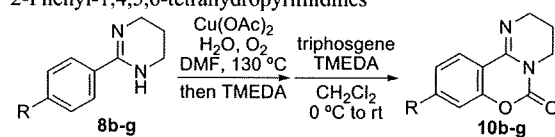
entry	Cu salt (equiv)	solvent	time (min)	yield (%) ^b
1	CuO (1.0)	DMF	20	N.r. ^e
2	Cu(OH) ₂ (1.0)	DMF	20	N.r. ^e
3	Cu(OTf) ₂ (1.0)	DMF	20	N.r. ^e
4	Cu(tfa) ₂ (1.0)	DMF	20	N.r. ^e
5	Cu(OAc) ₂ (1.0)	DMF	20	61
6	Cu(OAc) ₂ (1.0)	MeCN	60	11
7	Cu(OAc) ₂ (1.0)	dioxane	60	11
8	Cu(OAc) ₂ (0.2)	DMF	60	30
9	Cu(OAc) ₂ (2.0)	DMF	15	27
10 ^c	Cu(OAc) ₂ (1.0)	DMF	20	70
11 ^{c,d}	Cu(OAc) ₂ (1.0)	DMF	20	56

^a After completion of C-O bond formation (monitored by TLC), the reaction mixture was evaporated and treated with triphosgene (1.05 equiv) and Et₃N (4.0 equiv) in CH₂Cl₂ at 0 °C to rt for 1 h. ^b Isolated yields. ^c After completion of C-O bond formation (monitored by TLC), the reaction mixture was treated with TMEDA (4.0 equiv) at 130 °C for 1 min. In this case, TMEDA (additional 4.0 equiv) was used for the next step instead of Et₃N. ^d Reaction was carried out under air. ^e No reaction. Abbreviation: TMEDA = *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine.

構造を得るための有力な手法である。まず、2-PTHP **8a** の C-H 官能基化反応による誘導体合成法の開発を行った。

水 (1.0 当量) 存在下、CuO、Cu(OH)₂、Cu(OTf)₂、または Cu(tfa)₂ (1.0 当量) を用いて、DMF 中で 2-PTHP **8a** を酸素雰囲気下 130 °C で反応させたが、目的の反応は進行しなかった (Table 1, entries 1–4)。一方、Yu らの報告と同様に Cu(OAc)₂ を用いた場合、オルトヒドロキシ体 **9** の生成が確認できた。しかしながら、目的物である **9** は高い塩基性を有しており単離が困難であった。そこで、原料の消失を TLC で確認後、溶媒を減圧下留去し、ジクロロメタン中でトリホスゲン (1.05 当量) 及びトリエチルアミン (4.0 当量) で処理したところ、環化体 **10a** を 61% の収率で得た (entry 5)。次に銅塩を Cu(OAc)₂ に固定して、溶媒の検討を行った。DMF の代わりにアセトニトリルもしくはジオキサンをを用いた場合では、収率が大幅に低下した (entries 6 and 7)。Cu(OAc)₂ の量を 0.2 当量に減らしたところ、触媒効率が低く、収率は 30% に低下した (entry 8)。次に、2.0 当量の Cu(OAc)₂ を加えると、期待に反して収率はさらに低下した (entry 9)。この結果から、オルト置換体 **9** が銅触媒と複合体を形成したために収率が低下した可能性があると考え、反応条件のさらなる最適化を行った。

二座のリガンドである *N,N,N',N'*-テトラ

Table 2. Cu-catalyzed C-O Bond Formation of 4-Substituted 2-Phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidines^a


entry	substrate (R)	product	yield (%) ^b
1	8b (OMe)	10b	64 (53)
2	8c (Me)	10c	61 (54)
3	8d (Br)	10d	45 (37)
4	8e (CO ₂ Me)	10e	46 (43)
5	8f (CF ₃)	10f	43 (38)
6	8g (NO ₂)	10g	19 (16)

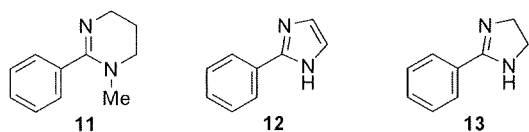
^a These reactions were carried out using the optimized procedure (Table 1, entry 10). ^b Isolated yields. Yields in parentheses indicate those of the reactions without TMEDA treatment (as shown in Table 1, entry 5).

メチルエチレンジアミン (TMEDA) を 1 当量添加して反応を行ったところ、目的の酸化的 C-H 活性化反応は完全に抑制された。次にカルボニル化反応の際に使用する塩基をトリエチルアミンから TMEDA に変更したが、収率は変化しなかった。一方で、1 当量の Cu(OAc)₂ を用いて C-O 結合形成反応を行った後、4 当量の TMEDA を加えて 130 °C で 1 分攪拌し、引き続き TMEDA を塩基としてカルボニル化反応を試みたところ、収率が 70% に向上した (entry 10)。空気雰囲気下での反応では、収率の低下が認められた (entry 11)。

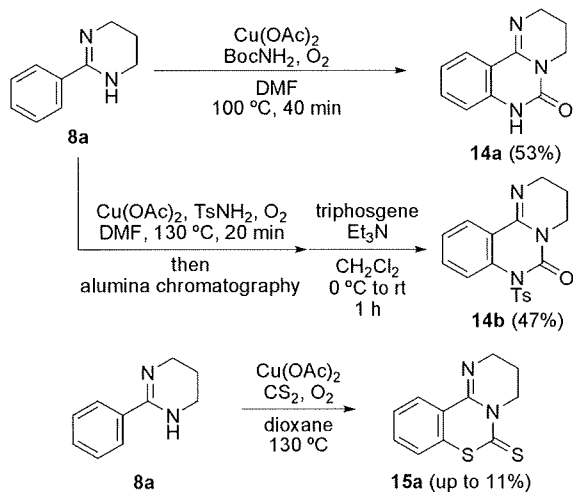
最適条件 (Table 1, entry 10) を用いて、フェニル基の 4 位にさまざまな置換基を有する基質に対する反応を検討した。Table 2 に示すように、メトキシ基 (entry 1)、メチル基 (entry 2) のような電子供与性基を持つ基質 **8b**, **8c** では、それぞれ 64%、61% の収率で対応する生成物が得られた。アリールブロミド部位を有する基質 **8d** においても 45% の収率で目的物が得られた (entry 3)。電子求引性基として、メトキシカルボニル基 (entry 4)、トリフルオロメチル基 (entry 5) を有する基質 **8e**, **8f** では中程度の収率で目的物を得ることができた。一方で、ニトロ基のような強い電子求引性基では大幅に収率が低下した (entry 6)。すべての反応において TMEDA による後処理を行わない条件 (Table 1, entry 5) においては、収率が低下した。

次に、配位性置換基として機能する環状アミジン部分の構造について検討した (Figure 1)。2-PTHP の窒素原子をメチル化した基質 **11** および 2-フェニルイミダゾール **12** で反応を行ったが、反応は進行しな

Figure 1. Various Amidine Analogues



Scheme 2. C-N or C-S Bond Formation with BocNH₂, TsNH₂ and CS₂



かった。また興味深いことに、五員環アミジンである2-フェニルイミダゾリン **13** でも反応は進行しなかった。

続いて、C-N 結合形成反応の検討を行った (Scheme 2)。検討の結果、アミジン **8a**、1.0 当量の Cu(OAc)₂、及び、3 当量の *tert*-ブチルカーバメートの DMF 溶液を 100 °C で 40 分間反応させると、*tert*-ブトキシドの脱離を伴う環化反応が進行し、保護アニリン誘導体 **14a** が 53% の収率で直接得られた。また、窒素源として *p*-トルエンスルホンアミドを用いた場合にも目的のアミド化が進行し、アルミナカラムにより副生成物を除去した後にトリホスゲン処理を行うと、保護体 **14b** を 47% の収率で得ることができた。続いて、様々な硫黄化合物 (チオール、ジスルフィド、金属スルフィド、二硫化炭素など) を用いて C-S 結合形成反応の検討を行ったところ、二硫化炭素を用いた場合にのみ C-S 結合形成反応が進行し、環化体 **15a** が得られた。しかしながら、本反応の最適化を試みたところ、11% と低収率であった。

芳香族求核置換 (S_NAr) 反応による PD 404182 誘導体合成法の開発

まず、オルト位にブromo基を有する 2-PHP を用いて、二硫化炭素とのカップリング反応の条件検討を行った。様々な金属触媒、塩基、溶媒などの反応条件の検討

Table 3. Optimization of Reaction Conditions Using CS₂^a

entry	X	base (equiv)	solvent	time (h)	yield (%) ^b
1	Br	NaH (5)	DMF	6	75
2	Br	NaH (5)	THF	4	trace
3	Br	NaH (5)	MeCN	4	trace
4	Br	NaH (2)	DMF	12	88
5	Br	none	DMF	12	12
6	Br	Et ₃ N (2)	DMF	12	trace
7	Br	KH (2)	DMF	6	trace
8	Br	NaOt-Bu (2)	DMF	6	27
9	F	NaH (2)	DMF	12	86

^a All reactions were carried out at 80 °C using 2 or 5 equiv of CS₂ (the equal equivalents to the base).
^b Isolated yields.

を行ったところ、反応は遷移金属触媒を用いなくても進行し、基質 **16aa** を DMF 中、水素化ナトリウム (5 当量) と二硫化炭素 (5 当量) により反応させた場合に、環化体 **15a** が良好な収率で得られた (Table 3, entry 1)。溶媒を THF やアセトニトリルに変更したところ、目的物 **15a** は痕跡量しか得られなかった (entries 2 and 3)。二硫化炭素と水素化ナトリウムの量を 2 当量に減らしても反応は効率よく進行し、12 時間の反応により目的物 **15a** が 88% の収率で得られた (entry 4)。一方、水素化ナトリウムを加えなかった場合は、収率が 12% に低下した (entry 5)。検討を行った範囲において、塩基としては水素化ナトリウムのみが有効であり、トリエチルアミン、水素化カリウム、ナトリウム *t*-ブトキシドはいずれも良い結果を与えなかった (entries 6-8)。フッ素体 **16ab** を用いて、最適条件下 (entry 4) で反応を行ったところ、86% の収率で **15a** が得られた (entry 9)。

次に、ベンゼン環に置換基を導入した基質に対する反応を検討した (Table 4)。4 位にメトキシ基、メチル基、及びフッ素基を有する基質 **16b-d** の反応は効率よく進行し、対応する環化生成物 **15b-d** を高収率で与えた (entries 1-3)。4 位にニトロ基を有する **16e** を用いて通常の条件下で反応を行うと複雑な混合物を与えたが、室温で反応を行うと 73% の収率で目的の **15e** が得られた (entry 4)。5 位のメトキシ基は収率を大きく低下させた (entry 5)、これはブromoベンゼン部位の電子密度が上昇することで反応性が低下したためと考えられる。5-ニトロ体 **16g** は、4 位置換体と同様に室

Table 4. Reaction of Substituted 2-(2-Halophenyl)-1,4,5,6-tetrahydropyrimidines^a

entry	substrate	product	yield (%) ^b	entry	substrate	product	yield (%) ^b
1			95	7			18
2	16c (R = Me, X = Br)	15c (R = Me)	88	8			71
3	16d (R = F, X = Br)	15d (R = F)	76	9			quant.
4	16e (R = NO ₂ , X = F)	15e (R = NO ₂)	– ^c (73) ^d				
5	16f (R = OMe)	15f (R = OMe)	17				
6	16g (R = NO ₂)	15g (R = NO ₂)	– ^c (57) ^d				

^a Unless otherwise stated, reactions were carried out with CS₂ (2.0 equiv) and NaH (2.0 equiv) in DMF at 80 °C for 12 h. ^b Isolated yields. ^c A complex mixture formed. ^d Yields in parentheses indicate those of the reactions at rt.

Table 5. Reaction with Isothiocyanates or Isocyanates^a

entry	substrate	R-NCX	product	yield (%) ^b	entry	substrate	R-NCX	product	yield (%) ^b
1				82	5 ^c	16ab	<i>t</i> -BuNCO		54
2	16ab (X = F)	BnNCS	23	97					18 ^e
3 ^c	16ab	<i>t</i> -BuNCS		62 ^{d,e}	6	16ab	PhNCO		quant.
4	16ab	BnNCO		quant.	7		<i>t</i> -BuNCS		49 ^e

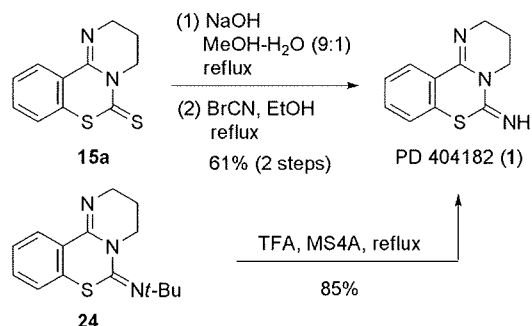
^a Unless otherwise stated, reactions were carried out with R-NCX (2.0 equiv) and NaH (2.0 equiv) in DMF at rt for 2-3 h. ^b Isolated yields. ^c These reactions were carried out at 80 °C. ^d A trace amount of regioisomeric *N*-arylation product was also formed. ^e Isolated as single isomer.

温下の反応により目的物を与えた (entry 6)。ピリジン誘導体 **17**, **19** では窒素原子の位置により反応性が大きく異なり、2-ブロモピリジン誘導体 **19** は 3-ブロモ体 **17** よりも反応性が高かった (entries 7 and 8)。ナフタレン骨格を持つ基質 **21** を用いたところ、反応は効率よく進行した (entry 9)。

次に、二硫化炭素の代わりにイソチオシアネートやイソシアネートを用いて検討した (Table 5)。まず、**16aa**, **16ab** を基質として用いて、ベンジルイソチオシアネートと反応させたところ、どちらも反応は室温で効率的に進行し、*N*-アリール化体 **23** がそれぞれ 82%と 97%の収率で得られた (entries 1 and 2)。一方、*tert*-ブチルイソチ

オシアネートを用いたところ、選択性が逆転し、*S*-アリール化体 **24** が単一の異性体として得られた (entry 3)。これらの結果は、イソチオシアネート窒素上の置換基を変えるだけで目的物を位置選択的に作り分けられることを示唆している。次にベンジルイソシアネートを用いたところ *N*-アリール化体 **25** が定量的に得られた (entry 4)。興味深いことに、*tert*-ブチルイソシアネートを用いたところ、より込み合った部位における反応により生成する *N*-アリール化体 **26** が *O*-アリール化体 **27** よりも優先して生成した (entry 5)。フェニルイソシアネートを用いた際にも、*N*-アリール化体 **28** のみが選択的に得られた (entry 6)。これらの

Scheme 3. Synthesis of PD 404182



結果は、窒素原子が酸素原子よりも高い求核性を有することに起因していると考えられる。五員環のアミジン構造を持つ2-フェニルイミダズリン誘導体 **29** を基質として用いると、やや収率は低下したものの目的の反応は効率よく進行した (entry 7)。

次に、PD 404182 (**1**) の合成を行った (Scheme 3)。化合物 **15a** を加水分解したのち、臭化シアンを作用させると **1** が61%の収率で容易に得られた。また **1** は、化合物 **24** をモレキュラーシーブス 4Å 存在下、トリフルオロ酢酸中で加熱還流することによっても得られた。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

D. 考察

C-H 官能基化反応の反応機構は未だに明確ではないが、一電子移動、もしくは求電子置換反応を伴う、二つの機構が考えられる。基質が電子求引性の置換基を有する場合に反応性が下がったことは、カチオン性中間体を経由するこれらの反応機構に矛盾しない。また、本反応のオルト位選択性は配位性置換基に結合した求核種の分子内移動が関与していることを示唆している。

一方、芳香族求核置換反応は、アミジン部位のヘテロクムレンへの求核付加、続く分子内での S_NAr 反応によって進行していると考えられる。本反応が強力な活性化基を有していない芳香環においても比較的温和な条件で進行していることから、二分子のヘテロクムレンがアミジン官能基に付加して中間体が生成し、アミジン官能基がより強い電子求引性基として機能して芳香族求核置換反応を促進している可能性も考えられる。また、本反応の求核種の位置選択性は官能基の求核性と立体的な嵩高さのバ

ランスにより制御されていると考えられる。

E. 結論

本研究では、2-phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine から2つの経路により PD 404182 誘導体を得る方法を確立した。前者は、ベンゼン環上にハロゲン置換基を有しない原料からの直接的な酸化反応により複素環構造を構築できるという点で、原料の化学構造における制限が小さい。一方、後者の方法では、芳香族求核置換反応により多様なヘテロ原子を導入可能であり、特徴的なヘテロ原子の配置による多様な複素環骨格が得られる。本法は、PD 404182 をリードとする抗 HIV 剤の構造活性相関研究に有用な反応であり、骨格上のヘテロ原子の配置および置換基の最適化の検討を効率的に行うことが可能となった。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watabe T., Terakawa Y., Watanabe K., Ohno H., Nakano H., Nakatsu T., Kato H., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Kitaura K., Oishi S., Fujii N. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. *J. Mol. Biol.* 392(3) 657–665 (2009)
2. Mizuhara T., Inuki S., Oishi S., Fujii N., Ohno H. Cu(II)-mediated oxidative intermolecular ortho C-H functionalisation using tetrahydropyrimidine as the directing group. *Chem. Commun.* (23) 3413–3415 (2009)
3. Oishi S., Koder Y., Nishikawa H., Kamitani H., Watabe T., Ohno H., Tochikura T., Shimane K., Kodama E., Matsuoka M., Mizukoshi F., Tsujimoto H., Fujii N. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. *Bioorg. Med. Chem.* 17(14) 4916–4920 (2009)
4. Oishi S., Kamitani H., Koder Y., Watanabe K., Kobayashi K., Narumi T., Tomita K., Ohno H., Naito T., Kodama E., Matsuoka M., Fujii N. Peptide bond mimicry by (E)-alkene and

- (Z)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. *Org. Biomol. Chem.* 7(14) 2872–2877 (2009)
- Evans B.J., Wang Z., Broach J.R., Oishi S., Fujii N., Peiper S.C. Expression of CXCR4, a G-protein-coupled receptor for CXCL12 in yeast identification of new-generation inverse agonists. *Methods Enzymol.* 460, 399–412 (2009)
 - Tanaka T., Nomura W., Narumi T., Esaka A., Oishi S., Ohashi N., Itotani K., Evans B.J., Wang Z.X., Peiper S.C., Fujii N., Tamamura H. Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids. *Org. Biomol. Chem.* 7(18) 3805–3809 (2009).
 - Tanaka M., Kajiwara K., Tokiwa R., Watanabe K., Ohno H., Tsutsumi H., Hata Y., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Oishi S., Fujii N. Bioorganic synthesis of end-capped anti-HIV peptides by simultaneous cyanocysteine-mediated cleavages of recombinant proteins. *Bioorg. Med. Chem.* 17(21) 7487–7492 (2009)
 - Kajiwara K., Watanabe K., Tokiwa R., Kurose T., Ohno H., Tsutsumi H., Hata Y., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Oishi S., Fujii N. Bioorganic synthesis of a recombinant HIV-1 fusion inhibitor, SC35EK, with an N-terminal pyroglutamate capping group from recombinant protein. *Bioorg. Med. Chem.* 17(23) 7964–7970 (2009)
 - Narumi T., Hayashi R., Tomita K., Kobayashi K., Tanahara N., Ohno H., Naito T., Kodama E., Matsuoka M., Oishi S., Fujii N. Synthesis and biological evaluation of selective CXCR4 antagonists containing alkene dipeptide isosteres. *Org. Biomol. Chem.* 8(3) 616–621 (2010)
 - Mizuhara T., Oishi S., Fujii N., Ohno H. Efficient synthesis of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles by S_NAr -type C–S, C–N, or C–O bond formation with heterocumulenes. *J. Org. Chem.* 75(1) 265–268 (2010)
 - Nishizawa K., Nishiyama H., Ohishi S., Tanahara N., Kotani H., Mikami Y., Toda Y., Evans B.J., Peiper S.C., Saito R., Watanabe J., Fujii N., Ogawa O. Fluorescent imaging of high grade bladder cancer using a specific antagonist for chemokine receptor CXCR4. *Int. J. Cancer.* in press.
 - Melchionna R., Di Carlo A., De Mori R., Cappuzzello C., Barberi L., Musarò A., Cencioni C., Fujii N., Tamamura H., Crescenzi M., Capogrossi M.C., Napolitano M., Germani A. Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. *Muscle Nerve.* in press.

2. 学会発表

- 林亮子、大石真也、富田健嗣、鳴海哲夫、大野浩章、内藤武志、児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 アルケン型ジペプチドイソスターの合成とケモカイン受容体 CXCR4 拮抗剤の構造活性相関研究への応用 日本ケミカルバイオロジー研究会第4回年会（神戸）平成21年5月18日
- Kajiwara, K., Tokiwa, R., Tanaka, M., Watanabe, K., Ohno, H., Izumi, K., Kodama, E., Matsuoka, M., Oishi, S., Fujii, N. 「Bioorganic Synthesis of End-capped HIV-1 Fusion Inhibitor SC35EK, 8th Australian Peptide Conference (Couran Cove Island) 平成21年8月12日
- 水原司、井貫晋輔、大石真也、藤井信孝、大野浩章 銅触媒によるテトラヒドロピリミジンを配位性置換基とした酸化的分子間オルト C-H 官能基化反応 第59回日本薬学会近畿支部大会（東大阪）平成21年10月24日
- 林亮子、大石真也、棚原憲子、富田健嗣、鳴海哲夫、大野浩章、内藤武志、児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 アルケン型ジペプチドイソスターの合成とケモカイン受容体 CXCR4 拮抗剤の構造活性相関研究への応用 第59回日本薬学会近畿支部大会（東大阪）平成21年10月24日
- 棚原憲子、大石真也、増田亮、児玉

- 栄一, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 平澤明, 辻本豪三, 大野浩章, 藤井信孝 ケモカイン受容体 CXCR4 選択的蛍光プローブを活用した化合物評価系の構築 第59回日本薬学会近畿支部大会(東大阪)平成21年10月24日
6. ○梶原一美、常盤礼、田中理紀、渡辺健太郎、大野浩章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大石真也、藤井信孝 抗 HIV 活性ペプチド SC35EK の生物有機化学的合成 第46回ペプチド討論会(北九州)平成21年11月5日
7. ○棚原憲子、大石真也、増田亮、児玉栄一、佐藤賢文、松岡雅雄、平澤明、辻本豪三、大野浩章、藤井信孝 ケモカイン受容体 CXCR4 選択的蛍光プローブを活用した新規化合物評価系の構築 第46回ペプチド討論会(北九州)平成21年11月4日
8. ○寺川幸宏、渡部毅、渡辺健太郎、大野浩章、泉和樹、大石真也、藤井信孝、北浦和夫 HIV-1 膜融合阻害ペプチドにおける gp41/S138A 置換効果の MM/PBSA 解析第37回構造活性相関シンポジウム(東京)平成21年11月12日
9. ○Kajiwara, K., Tokiwa, R., Tanaka, M., Watanabe, K., Ohno, H., Izumi, K., Kodama, E., Matsuoka, M., Oishi, S., Fujii, N. Bioorganic Synthesis of End-capped HIV-1 Fusion Inhibitors. The 11th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (京都)平成21年11月12日
10. ○水原司、井貫晋輔、大石真也、藤井信孝、大野浩章 銅触媒によるテトラヒドロピリミジンを配位性置換基とした酸化的分子間オルト C-H 官能基化反応 第35回反応と合成の進歩シンポジウム(金沢)平成21年11月17日
11. ○林亮子、大石真也、棚原憲子、富田健嗣、鳴海哲夫、大野浩章、内藤武志、児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 アルケン型ジペプチドイソスターの合成とケモカイン受容体 CXCR4 拮抗剤の構造活性相関研究への応用第28回メシナルケミストリーシンポジウム(東京)平成21年11月25日
12. 大石真也 ウイルスの変異に学ぶ抗 HIV 活性ペプチドのデザイン 第28回メシナルケミストリーシンポジウム(東京)平成21年11月26日
13. ○大石真也、梶原一美、田中理紀、大野浩章、藤井信孝 薬剤耐性株に有効な抗 HIV 活性ペプチドの創製と発現生産プロセスの開発 日本薬学会第130年会(岡山)平成22年3月28日
14. ○坂東弘樹、堤浩子、梶原一美、大石真也、松岡雅雄、藤井信孝、秦洋二 麴菌 *A. oryzae* による人工デザイン抗 HIV ペプチドの効率的分泌発現 日本農芸化学会2010年度大会(東京)平成22年3月28日
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 1. 特許取得**
1. 特願2002-283411: 抗 HIV 剤
日本: 特許証発行(特許第4332618号: 2009年7月3日)
2. PCT/JP2007/070807: 抗 HIV 剤
日本: 移行手続き完了(特願2008-541019: 2009年4月14日)
3. 特願2009-164647: 修飾ペプチド及びその製造方法
日本: 出願(2009年7月13日; 発明者: 藤井信孝、松岡雅雄、児玉栄一、大石真也、田中理紀、秦洋二、堤浩子、梶原一美、常盤礼; 出願者: 科学技術振興機構、京都大学、月桂冠株式会社)
4. 特願2010-030875: 麴菌を用いた抗 HIV ペプチドの生産方法
日本: 出願(2010年2月16日; 発明者: 坂東弘樹、堤浩子、秦洋二、梶原一美、藤井信孝、松岡雅雄、大石真也; 出願者: 月桂冠株式会社、科学技術振興機構)
5. 特願2010-046273: 酵母を用いた抗 HIV ペプチドの生産方法
日本: 出願(2010年3月3日; 発明者: 梶原一美、田中智子、秦洋二、堤浩子、藤井信孝、松岡雅雄、大石真也; 出願者: 科学技術振興機構、月桂冠株式会社)
- 2. 実用新案登録**
該当事項なし
- 3. その他**
該当事項なし

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤の開発に関する研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

研究分担者：東北大学病院 内科・感染症科 児玉 栄一

研究要旨

多剤耐性 HIV 感染症を克服するために HIV の細胞侵入過程を標的とした薬剤の開発を行った。最終年度である本年度は、ポルフィリン誘導体が R5 およびに X4 ウイルスの V3 loop に結合し、そのレセプター結合を阻害することによって抗 HIV 効果を示すことを明らかにした。一部の化合物は経口吸収性もあることから今後誘導体のさらなる合成・検討が望まれる。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のエンベロープタンパクである gp120 と gp41 はウイルスの宿主細胞への吸着・侵入において重要な役割を果たしている。gp120 は細胞表面上の CD4 レセプター、続いて CXCR4 や CCR5 等のコレセプターと結合することにより構造変化を起こし、それによって gp41 が活性化され N 末端の疎水性アミノ酸部位が細胞膜に貫通する。融合の過程で、gp41 の N 末端側ヘリックス(HR1)と C 末端側ヘリックス(HR2)が相互作用し六量体を形成することでウイルスと細胞膜を接近させ、膜融合を起こすと考えられている。

本研究ではこの HIV の細胞内侵入を阻害する薬剤を網羅的に探索・開発し、現在臨床で問題となっている逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性 HIV を効率よく抑制することを目的としている。そのため初年度においてスクリーニング効率の向上と作用機序の解明のために新たなスクリーニング系を確立した。この方法によって CCR5 を利用して感染する実験室株や臨床分離株などを効率よく簡便にスクリーニングできることを示した。また一方で、我々がこれまでに開発してきた有望な融合阻害剤 SC34EK を小分子化した。またこれらのペプチドを現在臨床で問題となりつつある T-20 耐性ウイルスに対して検討し、さらに血中での安定性を in

vitro で検討した。昨年度は T-20 耐性を克服するために T-20 耐性関連変異 S138A を導入した T-20 (T-20_{S138A}) を作製・検討したところ、T-20 耐性 HIV の複製を抑えることが可能であった。本年度は HIV のレセプター結合を阻害する薬剤の開発を行った。

B. 研究方法

細胞

HeLa-CD4/CCR5LTR-β-galactosidase(MAGI)細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清(FCS)、0.2 mg/ml G418、0.1 mg/ml ハイグロマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養した。MT-2 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清(FCS)を含む RPMI1640 培地で培養した。

抗ウイルス剤とペプチド

ポルフィリンとその誘導体およびに V3 loop ペプチドは同志社大学薬学部より分与を受けた(図 1)。

抗 HIV-1 活性の評価

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator assay を用いた。10⁴ cells/well の HeLa-CD4/CCR5LTR-β-galactosidase (MAGI) 細胞を 96 well flat microtiter culture plate で培養し、翌日に HIV-1 クローンと抗ウイルス剤を加える。ウイルスを加えてから 48 時間培養後 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) によって感染細胞を染色した。呈色した細胞数

を数えコントロールとの比較によってその濃度における HIV-1 の細胞への感染阻害率を求めた。抗 HIV-1 活性は HIV-1 の複製を 50% 阻害する濃度 (EC₅₀) を算出し評価した。

ポルフィリンに対する耐性ウイルスの誘導

ウイルスは pNL4-3 を 293T 細胞にトランスフェクトし、作成する。ポルフィリン誘導体を 50% ウイルス複製阻止濃度から培養液に加え、その状態でウイルス複製を繰り返す。細胞変性効果が十分に見られるようになった場合、培養液に加える薬剤濃度を 2 倍に増加させ、さらに培養を続ける (dose escalating method)。ある一定濃度を超える濃度でもウイルスが複製してくるようになったら、感染細胞の一部を回収し、DNA を抽出、PCR 法でウイルスのエンベロープ領域を増幅し、その塩基配列を決定する。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

新規ポルフィリン誘導体の効果

図 1 に新規ポルフィリン誘導体の化学構造を示すが、今回の誘導体はポルフィリン環からの側鎖を変更して作成した。基本的には側鎖にベンゼン環とカルボキシル基を配位して HIV のエンベロープタンパク質に強く結合するように設計を行った。本実験では CXCR4 をレセプターの一つとして用いる HIV-1_{IIIIB} と CCR5 を用いる HIV-1_{BaL} に対しての効果を MAGI 細胞での single round replication 阻害効果を検討した。

今回作成したポルフィリン誘導体はすべて HIV-1_{IIIIB} と HIV-1_{BaL} に対して同等の効果を示した (Table 1)。効果は低いものでも 5 μM 程度の EC₅₀ 値を示し、強いものでは 0.06 μM という低い濃度でも HIV-1 の複製を抑制していた。Fe をポルフィリン環に配位させたものはそうでないものと比べ効果が増強していた。興味深いことに Fe を配位させると細胞毒性が逆に低下することが明らかとなった。そのため、選択性が著しく向上する結果となった。HIV-1_{IIIIB} と HIV-1_{BaL} に対する効果より、

これらのポルフィリン誘導体はケモカインレセプターの利用には影響を受けないことが明らかとなった。

Time of addition

ポルフィリン誘導体の作用機序を明らかにするために、time of addition 実験を行った。侵入阻害剤としては DS5000、主に CD4 と gp120 との吸着を阻害、AMD3100、吸着後の CXCR4 との結合を阻害、逆転写酵素阻害剤の AZT といった作用機序が明らかな薬剤と誘導体である FeP1 を比較した。ウイルスは HIV-1_{IIIIB} を用いて検討した。図 3A に結果を示すが、FeP1 の活性 profile は DS5000 と AMD3100 とほとんど同様であり、entry 阻害剤として作用していることが明らかとなった。

ポルフィリン誘導体の標的分子の同定

ポルフィリン誘導体がウイルス側または宿主側のどちらに作用して HIV entry を阻害しているかを検討するために、誘導体をウイルス前に細胞に加え、2 時間後に PBS でよく洗浄したのちにウイルスを加えて抗 HIV 効果を MAGI 法で検討した (図 3B)。その結果細胞側に作用する AMD3100 のみが強い効果を示したがポルフィリン誘導体は効果を示さなかった。一方逆転写酵素阻害剤 AZT は細胞に取り込まれたのち、宿主リン酸化酵素によってリン酸化を受けるため、一度細胞内に取り込まれリン酸化されたものは細胞内にとどまることから、弱い効果が見られた。このことから、ポルフィリン誘導体はウイルス側に作用していると考えられた。

ポルフィリン誘導体の gp120 V3 loop への結合

ポルフィリン誘導体がウイルス gp120 に結合し、Entry を阻害していると予想されたため、ウイルスの細胞レセプター結合に重要な働きをする V3 loop 領域の合成ペプチドを合成し、ポルフィリン誘導体との結合能を UV/Vis 法で解析した。ポルフィリン誘導体は HIV-1_{IIIIB} と HIV-1_{BaL} 由来の V3 ペプチドに同等に結合することが示され、ポルフィリンの結合部位の候補の一つとして V3 loop が挙げられることを明らかとした。

D. 考察

分担研究者はこれまでに gp41 由来のペプチドを用いた fusion 阻害剤を用いて T-20 耐性ウイルス複製を阻害することができる C34 誘導体である SC34EK、そしてその小分子化ペプチド SC29EK の開発に携わる一方で、それらに対する耐性 HIV の解析を行ってきた。その結果、昨年報告したように、T-20 耐性 HIV に導入される耐性 2 次変異 S138A を T-20 アミノ酸配列に導入することで T-20 耐性を克服しうることを明らかとした。しかし、小分子化合物では nM レベルで効果を示す融合阻害ペプチドのような強力な活性をもつものを同定するには至っていない。

そのため今年度は、融合阻害剤にこだわらず、広くウイルスの細胞進入を阻害する薬剤のスクリーニングを行い、ポルフィリン誘導体にその効果があることを明らかとした。これまでもポルフィリン誘導体が抗 HIV 効果を示すことは知られていたが (*J Med Chem* 37:1099-108, 1994)、主に gp120 との in vitro 結合性で議論されており、その作用機序は明確にはなっていない。後の研究 (*Antimicrob Agents Chemother*, 46:3917-25 2002)においても、ウイルス粒子の不活化や融合阻害剤とも考えられていた。メチレンブルー等でも知られている UV による photodamage が、ポルフィリン誘導体でも起こることが示されているが (*Antiviral Res*, 61:37-47, 2004)、実験は gp120 由来ペプチドとそれに対する抗体の結合性を指標に検討しており、直接ウイルスを用いていないため、実際のウイルス感染において主たる機序であるとは結論できないと考えられる。

このようなことを踏まえ、分担研究者は感染性 HIV を用いてウイルス学的にその作用機序を検討した結果、ポルフィリン誘導体は gp120 の V3 loop に結合し、R5 指向性、X4 指向性を問わず HIV の entry を阻害、この際、UV 照射はなくとも効果を示すことを明らかとした。また time of addition の結果より、CD4 分子との結合からコレセプター結合に関与するステップで効果を示すことから確認し、これまで融合阻害剤とも考えられてきたポルフィリン誘導体が、融合ではなく、V3 とレセプター結合の阻害が主な作用点であることを明らかとした。

E. 結論

本研究ではポルフィリン誘導体が R5 および X4 ウイルスの V3 loop に結合し、そのレセプター結合を阻害することによって抗 HIV 効果を示すことを明らかにした。一部の化合物は経口吸収性もあることから今後誘導体のさらなる合成・検討が望まれる。

F. 健康危険情報

基礎的研究であり該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroki Nishikawa, Shota Nakamura, Eiichi Kodama, Saori Ito, Keiko Kajiwara, Kazuki Izumi, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Akira Otaka, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Electrostatically constrained α -helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41: 891-899, 2009
- 2) Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Kentaro Watanabe, Saori Ito, Tsuyoshi Watabe, Yukihiro Terakawa, Hiroki Nishikawa, Stefan G. Sarafianos, Kazuo Kitaura, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. *Journal of Biological Chemistry* 284: 4914-4920, 2009
- 3) Takeshi Naito, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Yasuko Sakagami, Keiko Kajiwara, Hiroki Nishikawa, Kentaro Watanabe, Stefan G. Sarafianos, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced α -helicity, inhibits replication of