

学位論文要旨

学 位 申 請 者 氏 名 星 絢子

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染は、免疫細胞を破壊し、日和見感染や悪性腫瘍などの重篤な病態を示す後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こす。WHO による感染予防対策により新規感染者数は減少傾向にあるものの、2013 年の AIDS による死亡者数は 150 万人に及んでいる。HIV 感染の治療としては、5 つのカテゴリーに分類された 28 種類の薬剤から数種類を適宜組合せた多剤併用療法が行われているが、HIV を完全に駆逐するまでには 60 年以上の長期服用が必要であり、多剤併用療法の恩恵を受けることは容易ではない。治療開始から厳格な服薬が求められ、深刻な副作用を示すことも多い。また、治療薬剤に対して耐性を獲得したウイルスが出現することもあり、患者が保有する耐性ウイルスの種類が治療薬の選択に影響を与えることも少なくない。

非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) は、逆転写酵素のポリメラーゼ部位近傍に位置する Palm ドメイン内の疎水性アロステリック部位で分子間相互作用を形成し、RNA から DNA への逆転写を阻害する薬剤である。代表的な NNRTI であるエファビレンツは、HIV 治療の主薬として長年使用され、高い実績と治療効果が証明されているが、薬剤耐性を獲得しやすいことと精神系の副作用があることから第一選択薬から外れている。NNRTI に対する耐性は、複数の NNRTI が共通して相互作用を示すアミノ酸残基の変異により引き起こされ (交叉耐性)、特に逆転写酵素における K103N と Y181C の二重変異を有する HIV-1 株に対して有効な薬剤は少ない。NNRTI に属するアルケニルジアリールメタン (ADAM) は、アルケンを中心に 2 つの芳香環ユニットと 1 つアルキル側鎖ユニットが結合した構造をしており、NRTI 耐性変異 HIV が感受性を示すことが報告されている。研究当初は ADAM 誘導体に含まれるメチルエステルの加水分解性の改善と抗 HIV 活性の向上を目的に、生物学的等価体への変換による構造最適化が行われていたが、2 種類の ADAM 誘導体を有する逆転写酵素複合体の立体構造が 2009 年に明らかとなり、耐性変異による ADAM 類の活性低下を克服する薬剤をレセプターベースのファーマコフォアに基づいて見出すことが可能となった。そこで、本論文では、NNRTI 耐性変異に有効な ADAM 誘導体の創製を目指し、ファーマコフォア情報から新規誘導体の設計と合成、並びに生物活性の評価を行うこととした。

まず、ADAM に含まれる 3 つのメチルエステルを種々変換した 33 種類の誘導体を合成し、抗 HIV 活性の向上と ADAM 類におけるメチルエステル等価体の一般性を評価した。新規誘導体はこれまで良好な活性を示した部分構造の組合せによりデザインし、2 種類の芳香環ユニットと 1 種類のアルキル側鎖ユニットを Pd 触媒反応を用いるクロスカップリング法で連結した。シス配置の芳香環にチオエステル、もしくはイミドイルフルオライドを有する化合物はいずれも良好な生物活性を示し、ADAM 類における良好な等価体であることが明らかとなった。しかし、K103N と Y181C の二重耐性変異をもつ逆転写酵素に対しては、いずれの誘導体も阻害活性を示さなかった。ADAM 誘導体も他の NNRTI と同様 Lys103 と Tyr181 との相互作用が強い傾向にあり、二重耐性変異に有効な ADAM 類の探索には、耐性変異アミノ酸以外のアミノ酸残基に対する相互作用の増強が必要であると思われる¹。

そこで、K103N と Y181C の二重耐性変異に対して抗 HIV 活性を維持し、かつ交叉耐性を回避できる可能性がある ADAM 誘導体を設計するために、フラグメント分子軌道 (FMO) 法によって算出された各種 NNRTI の相互作用エネルギーからファーマコフォアを抽出し、相互作用増強の標的とするアミノ酸残基

を決定した。FMO 法とは、系全体を小さなフラグメントに分割し、フラグメントモノマーとフラグメントペアの分子軌道計算から、全体のエネルギーを精度よく算出するように工夫された量子化学計算である。この手法によりフラグメント間の相互作用エネルギーが算出されるため、タンパク質に応用すればリガンドと特定のアミノ酸残基間の相互作用の強さを明らかにすることができる。さらにこの相互作用エネルギーは、エネルギー分割により、静電相互作用、分散相互作用、交換反発相互作用、電荷移動相互作用など物理的に分かりやすい相互作用成分として解析することが可能である。相互作用解析には、既存の NNRTI 3 種類と ADAM 2 種類を含む逆転写酵素複合体構造を用いて検討した。FMO 計算の結果から、既存の NNRTI と比較して ADAM 類が強い相互作用を示したアミノ酸残基のうち、Glu138 と Lys223 に対する静電相互作用の増強あるいは Phe227 と Trp229 に対する分散相互作用の増強が交叉耐性に有効性を持つ ADAM 誘導体を設計する上で重要であると考え、4 種類の標的アミノ酸残基との相互作用を増強するような構造ユニットをデザインした。Glu138 はオキサジアゾールの近くに位置するため、オキサジアゾールのメチル基を低毒性の電子求引性基として汎用されているトリフルオロメチル基に変換し、トリフルオロメチル基が結合する炭素と Glu138 のカルボニル酸素における静電相互作用の増強を目的とした。Lys223 はオキサゾロンのカルボニル酸素と水素結合を形成する可能性があるため、カルボニル酸素の水素結合性を増強したベンズイミダゾロンユニットをデザインした。さらに、Phe227 と Trp229 との分散相互作用を増強させるために、各々のアミノ酸残基が対応する誘導体の位置にイオウ原子を導入したベンズチアゾロンもしくはイオウ原子を導入したアルキル側鎖ユニットをデザインした。新規構造ユニット 6 種類は 2 工程から 6 工程かけて合成し、イオウ原子を導入したアルキル側鎖を有する誘導体は、基本骨格を構築した後に側鎖を修飾する方法で合成した。最終的に、各種構造ユニットの組合せにより 38 種類の新規誘導体を合成した。

新規誘導体 38 種類の抗 HIV-1 活性を評価したところ、トリフルオロメチル基置換オキサジアゾールを導入した誘導体は、細胞毒性の大幅な軽減をもたらしたが、二重耐性変異に対して有効性は示さなかった。FMO 計算による相互作用解析により、トリフルオロメチル基は Glu138 との相互作用ではなく、変異アミノ酸である Lys103 との静電相互作用と Tyr181 との分散相互作用が増強されたことが示唆された。ベンズイミダゾロンを有する誘導体は、K103N と Y181C の二重耐性変異を有する HIV 株に対しても阻害活性を示すことが明らかとなった。二重耐性変異を有する逆転写酵素を再現した仮想的なモデルを用いて、ベンズイミダゾロンを有する誘導体の逆転写酵素に対する相互作用解析を行ったところ、イミダゾロンのカルボニル酸素は Lys223 のアンモニウム水素と水素結合を形成していることが推測され、Lys223 は耐性変異における ADAM 類の活性低下を回避するアミノ酸残基であることが示唆された。FMO 法は、アロステリック部位の解析においても有益な相互作用情報を与えたが、酵素の動的変化を解析できる分子動力学法との併用によって、アロステリック効果を考慮した精度の高い情報が得られるものと思われる。ベンズチアゾロンを有する誘導体もしくは側鎖にイオウ原子を導入した誘導体のほとんどは、大幅な活性向上を達成することができなかったが、本論文で合成した誘導体の中で、最も良好な EC₅₀ 値 (CEM-SS 細胞) を示す化合物が見出された。

以上、FMO 計算に基づいたファーマコフォアからデザインをすることによって、二重耐性変異 HIV-1 株に有効な化合物を見出すことに成功した。

学位論文要旨

学 位 申 請 者 氏 名 星 絢子

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals have an increased risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) with opportunistic infection and cardiovascular disease. Although the number of people living with HIV-1 decreased by the HIV-1 infection prevention, AIDS-related deaths have come to 1.5 million people in 2013. HIV-infected individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART), combination therapies of twenty-eight anti-HIV-1 agents classified in five categories, have achieved an undetectable plasma HIV-RNA level. However, it is not easy to receive a benefit of the HAART to require more than 60 years until HIV-1 is completely expelled. Also, the individuals often have serious adverse effects and resistant viruses, and the individuals infected with resistant viruses often affect the choice of anti HIV-1 agents.¹

Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) suppress reverse transcription by binding noncompetitively to a lipophilic allosteric site in the palm domain near the reverse transcriptase polymerase active site. Typical NNRTI Efavirenz had become a cornerstone of the therapy, however it has psychotropic adverse effects and drug resistance. NNRTI-resistance is caused by the mutation of common amino acid residues K103N, V106A, Y181C, or Y188L in the binding site, and few agents effective against the K103N and Y181C double resistant HIV-1 mutation have been reported.²

Alkenyldiarylmethane (ADAM) derivatives are a kind of NNRTI and their structures are composed of two aromatic rings and an alkyl side chain attached to a single alkene carbon, and have synergistic anti-HIV-1 activity with azidothymidine (AZT) against nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NRTI)-resistant mutation. Although the initial ADAMs have three methyl esters hydrolyzed to biologically inactive carboxylic acids by non-specific esterase in blood plasma, the metabolically stable ADAMs with potent activity have been reported as part of optimal methyl ester bioisosteres.³ In 2009, two co-crystal structures of RT-ADAM complex were also constructed,⁴ and they made it possible to find novel ADAMs effective against NNRTI-resistant mutations on the basis of the pharmacophore analyses. Therefore, ADAMs were newly designed, synthesized, and evaluated antiviral activity in this study.

At first, the thirty-three derivatives in which three kinds of methyl esters were converted to bioisosteres were synthesized to improve anti-HIV-1 activity and evaluated generality of methyl ester bioisosteres. The selected methyl ester bioisosteres have previously been successfully employed in ADAM series. Two aryl iodides and one alkyne synthon containing various substituents were connected using the Pd-catalyzed reactions (Sonogashira coupling, Hydrostannation, and Stille coupling). ADAMs having *N*-methoxyimidoyl fluoride and *S*-methyl thioester on the benzene ring *cis* to the side chain displayed potent bioactivities, these functional groups also revealed better bioisosteres in ADAM series. However, the thirty-three ADAMs all did not have bioactivities against K103N and Y181C double resistant mutation because the known ADAMs tend to have interactions to Lys103 and Tyr181 as well as other NNRTIs.⁵ Therefore, the effective ADAMs against double mutation will be found by supplying strong interaction with amino acid residues except for Lys103 and Tyr181.

The pharmacophore was extracted on the basis of interaction energies between reverse transcriptase (RT) and

each NNRTIs calculated by Fragment Molecular Orbital (FMO) method, and amino acid residues increasing RT-ADAMs interactions were selected to design ADAM derivatives that maintain antiviral activities against K103N and Y181C double resistant mutation and evade cross-resistance. The FMO method is a fragmentation approach that can perform quantum-mechanical calculations on large molecular systems. The molecular systems were divided using 1 residue per fragment, the total FMO energy was computed neglecting all dimer contributions within protein as $E = \sum_I^N E_I + \sum_{\substack{I \in A \\ J \in B}} \Delta E_{IJ}$, where E_I is the internal energy of fragment I, A and B denote the ligand ADAM derivatives, and HIV-1 RT, respectively; and $\Delta E_{IJ}^{\text{int}}$ is the pair interaction energy (PIE) between fragments I and J. PIE is decomposed as $\Delta E_{IJ}^{\text{int}} = \Delta E_{IJ}^{\text{ES}} + \Delta E_{IJ}^{\text{DISP}} + \Delta E_{IJ}^{\text{EX}} + \Delta E_{IJ}^{\text{CT+mix}}$, where $\Delta E_{IJ}^{\text{ES}}$, $\Delta E_{IJ}^{\text{DISP}}$, $\Delta E_{IJ}^{\text{EX}}$, and $\Delta E_{IJ}^{\text{CT+MIX}}$ are the electrostatic, dispersion, exchange-repulsion, and charge transfer and higher order term respectively. The interactions were analyzed using co-crystal structures containing three clinical NNRTIs and two ADAMs. FMO calculation found out that it was necessary to increase dispersion interactions for Phe227 and Trp229 and electrostatic interactions for Lys223 and Glu138 having no report about NNRTI-resistance mutations. The building blocks were designed to increase interactions for four targeting amino acid residues; benzimidazolone or benzthiazolone trans to the side chain, trifluoromethyl substituted oxadiazoles at the end of side chain, and sulfur atom at the alkyl of side chain. The six new building blocks were synthesized 2-6 processes, and ADAMs containing a sulfur atom on side chain were modified in the final stage. Thirty-eight novel derivatives finally were synthesized by combining various building blocks.

The novel ADAMs incorporating trifluoromethyl-substituted oxadiazoles displayed lower cytotoxicities, but non-activities against double resistant mutation. The molecular interaction analyses suggested that the trifluoromethyl group increased interactions for the amino acid residues of Lys103 and Tyr181 (not Glu138). The ADAMs incorporating benzimidazolone displayed antiviral activity against double resistant mutant strains. The interaction analyses using hypothetical binding models of RT and ADAMs having benzimidazolone complexes suggested that the carbonyl oxygen of the imidazolone and the ammonium group of Lys223 formed hydrogen bonding, and Lys223 is an amino acid residue escaping the effects of NNRTI-resistant mutations. The FMO method gave useful information in the allosteric area, however the combination with molecular dynamics will give the highly accurate information taking account of allosteric effects. Almost ADAM incorporating benzthiazolone and a sulfur atom in the side chain were not able to improve bioactivities. However, an ADAM displayed the best EC₅₀ value in CEM-SS.

This study succeeded in finding the compound effective against HIV-1 double NNRTI-resistant mutation by designing it from pharmacophore analyses based on FMO calculations.

1) Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents; Department of Health and Human Services: 2015. 2) Cortez, K. J. *et al.*, *Viruses*, **2011**, 3, 347-378. 3) Sakamoto, T. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3314-3321. 4) Cullen, M. D. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6467-6473. 5) Hoshi, A. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 3006-3022.

論文審査の結果の要旨

後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因となる病原体であるヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、逆転写酵素とインテグラーゼによりその遺伝情報を宿主染色体に挿入し潜伏するが、増殖すると免疫細胞を破壊して重篤な病態へと進行させる。現在、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI)、非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI)、プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、CCR5 阻害剤の 5 つのカテゴリーに分類された薬剤から数種類を適宜組み合わせた多剤併用療法が、感染者体内のウイルス量を低く抑えるのに成果をあげている。NNRTI は、ヌクレオシドを模倣した NRTI と異なり、逆転写酵素の活性中心の近傍に結合してアロステリックに酵素活性を阻害し、その効果から抗 HIV 療法の主薬として長年用いられてきた。しかしながらこれまでの NNRTI は薬剤耐性を獲得しやすく、また副作用の問題があり、新規 NNRTI の開発が非常に重要な課題となっている。

アルケニルジアリールメタン (ADAM) は抗ウイルス活性を有する実験用色素アウリントリカルボン酸の誘導体であるコラサンの部分構造から見いだされた NNRTI であり、逆転写酵素との共結晶構造に基づいて構造最適化が進められ、多数の誘導体が合成されている。本研究では、柔軟性の高い構造を有する ADAM を用い、二重変異 (逆転写酵素において Lys¹⁰³ から Asn への置換 (K108N) と Tyr¹⁸¹ から Cys への置換 (Y181C) の両方がおこっている) を有する逆転写酵素に対しても阻害活性を示す ADAM 誘導体の創製を目指した。フラグメント分子軌道 (FMO) 法を用いて得られた ADAM 誘導体のファーマコフォア、および、逆転写酵素に対する ADAM 誘導体の相互作用部位の情報に基づき新規化合物のデザインと合成、並びに抗 HIV 活性の評価を行っている。

第 1 章では、ADAM 誘導体の抗 HIV 活性と代謝安定性に必要なメチルエステル等価体の系統的評価をするため、ADAM2 がもつ 3 種類のメチルエステルを様々に変換した 33 種類の ADAM 誘導体 (ADAM10-42) を合成して解析し、既存の NNRTI や NRTI との比較も行っている。これらの誘導体を構成する芳香環ユニット 2 つとアルキル側鎖ユニット 1 つは Pd 触媒を用いるクロスカップリング法で連結した。また、ADAM 誘導体の活性評価には、試験管内における HIV-1 逆転写酵素活性の阻害、および、HIV-1 感染細胞の細胞変性の抑制や細胞生存率の変化などを用いている。ADAM 上の *S*-メチルチオエステル、オキサゾロン、オキサジアゾール類が良好な置換基であることが明らかとなったが、二重変異をもつ逆転写酵素に対しては活性を示さなかった。そのため、このような逆転写酵素に対しても ADAM 誘導体が有効であるためには、変異した Lys¹⁰³ と Tyr¹⁸¹ 以外の残基に対して相互作用を増強させることが必要であると結論づけている。

第 2 章では、二重変異を有する逆転写酵素に対して有効な ADAM 誘導体を見出すために、既存の NNRTI であるエファビレンツ、デラビルジン、リルピビリンの 3 種類、または 2 種類の ADAM (ADAM5 と ADAM6) と逆転写酵素との複合体の構造情報をもとに、FMO 法によりこれらの NNRTI と強く相互作用する逆転写酵素上のアミノ酸残基を検討した。着目したのは、ADAM との分散相互作用が活性発現に重要な Phe²²⁷ と Trp²²⁹、さらには、二重変異による活性低下を回避するために静電相互作用の増強が重要な Glu¹³⁸ と Lys²²³ である。ADAM6 を基本骨格とし、これらの 4 つのアミノ酸残基の側鎖部分との相互作用を増強する可能性のある構造ユニットをデザインした。ADAM6 のオキサジアゾールのメチル基をトリフルオロメチル基 (CF₃) に変換することで Glu¹³⁸ のカルボニル酸素との静電相互作用が増

強できると期待された。また、ADAM6 のオキサゾロンのカルボニル酸素の Lys²³³ に対する水素結合性を増強するため、酸素を窒素に変換したベンズイミダゾロンとした。さらに、Phe²²⁷ と Trp²²⁹ との分散相互作用を増強させるために、各々のアミノ酸残基が対応する位置にイオウ原子を導入することにした。続く第 3 章でこれらの化合物を合成し、抗 HIV 活性を測定している。

第 3 章では、第 2 章で見出した逆転写酵素上の 4 つのアミノ酸残基 Glu¹³⁸、Lys²²³、Phe²²⁷、Trp²²⁹ との相互作用に着目した新規 ADAM 誘導体を合成し活性評価を行った。

第 1 節と第 2 節においては、Glu¹³⁸ もしくは Lys²²³ との静電的相互作用の増強を目的とした新規 ADAM 誘導体 85-99 について合成（第 1 節）し、抗 HIV 活性の評価（第 2 節）を行っている。CF₃ をもつ誘導体は、当初の目的とした二重変異を有する逆転写酵素に対する阻害活性をもたなかったものの、細胞毒性が大幅に改善され、ADAM 誘導体の問題点である細胞毒性の強さの改善に向けた重要な知見が得られた。一方イミダゾロン環を有する誘導体は、極めて良好な活性を持つだけでなく、二重変異を有する逆転写酵素に対しても中程度の阻害活性を示し、イミダゾロンが Lys²²³ と水素結合を形成していることが推測された。

第 3 節と第 4 節では、逆転写酵素の Phe²²⁷ もしくは Trp²²⁹ との分散相互作用の増強を目的とした新規 ADAM 誘導体 124-146 について合成（第 3 節）と抗 HIV 活性の評価（第 4 節）を行っている。

最後の第 4 章では、イミダゾロン環を有する化合物が、二重変異をもつ逆転写酵素に対して中程度の抗 HIV 活性を示すこと、その一方で、側鎖に CF₃ 基を有する場合やイミダゾロンがオキサゾロンとなった場合には二重変異に対して大幅な活性低下が起こる原因について FMO 計算を用いた分子間相互作用の解析により考察している。その結果、イミダゾロン環は Lys²²³ と水素結合を形成することで、二重変異をもつ逆転写酵素に対しても阻害活性を維持したと考察している。一方、側鎖に CF₃ を有すると、Y181C の変異により Lys²²³ との相互作用が低下すると予想している。

以上のように、FMO 法を利用して ADAM 誘導体のファーマコフォアを同定するとともに、ターゲットである逆転写酵素の対応するアミノ酸残基を特定し、それを元に新たなリガンドをデザインしていくことで、二重変異をもつ HIV の逆転写酵素に対しても阻害活性を示す ADAM 誘導体を合成することができた。薬物設計が困難な、アロステリック部位への結合リガンドを、FMO 法も利用したデザインを行って合成し、活性評価の後、さらにその活性の変化の原因を再度 FMO 法により解析して考察することが、新たな NNRTI 創製に向けた新規な戦略として有効であることを示しており、非常に興味深い。よって本論文は本研究科課程による博士（薬学）論文として十分な価値を有するものと判断した。