

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こす病原体であり、HIV の治療において薬剤耐性変異株の出現が近年の主要な問題である。この問題に対処するため、抗 HIV 治療では多剤併用療法 (ART) が行われており、ART ではバックボーンドラッグの核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) 二剤と、キードラッグの非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI)、プロテアーゼ阻害薬 (PI) またはインテグラーゼ阻害薬 (INI) の中から一剤を組み合わせた治療が一般的に行われている。現在日本で承認されている NNRTI には第一世代のネビラピン (NVP)、エファビレンツ (EFV) と、第二世代のエトラビリン (ETR)、リルピビリン (RPV)、ドラビリン (DOR) の 5 種類があり、第二世代 NNRTI は構造の柔軟性によって多くの変異株に対して有効性を示している。しかし、これら NNRTI においても効果不十分な変異株が存在し、また副作用や薬物間相互作用の問題もある。そのため、安全性が高く、かつ広いスペクトルまたは新たな耐性プロファイルを有する新規 NNRTI の開発が必要とされる。

アルケニルジアリールメタン (ADAM) 類は、二つの芳香環とアルキル側鎖部位からなる柔軟な構造を有しており、逆転写酵素 (RT) の NNRTI 結合部位に結合することで逆転写酵素阻害活性を示す。近年では、ADAM-RT 複合体構造の X 線結晶構造を基にレセプターベースによる開発が進められており、フラグメント分子軌道 (FMO) 法などの計算化学的手法に基づく相互作用解析および分子設計が行われている。しかし、報告されている複合体構造には水分子の情報が含まれておらず、従来の解析では生体内で実際に分子運動している逆転写酵素や ADAM を想定していないことから、正確な相互作用が解析されていない可能性がある。従来の ADAM 誘導体は、野生株および変異株に対する抗 HIV-1 活性が不十分であり、これら問題を解決するためには、より精度の高い相互作用解析が必要である。また、化学的安定性が低く容易に加水分解されてしまう問題も残されている。そこで、本研究では、より有効な新規 ADAM 誘導体の開発を目的に、従来の FMO 法に加え、分子動力学 (MD) 法を組み合わせた相互作用解析を行い、新規誘導体のデザイン、合成、活性評価を行った。

第一章では、ADAM-RT 複合体構造に対して FMO 法および MD シミュレーションによる相互作用解析を行った。ADAM を芳香環部位とアルキル側鎖部位の三つのフラグメントに分割した FMO 解析により、ADAM の置換基ごとの相互作用をより明確にした。また、水分子を含んだ MD シミュレーションにより、ADAM および RT のコンフォメーション変化に伴う相互作用の変化を調査した。ADAM のベンゾオキサゾロン環部位では His221、Gln222 との水素結合が新たに観測され、ベンゾオキサゾロン環およびチオエステル部位では水分子との水素結合ネットワークの形成も新たに判明した。親水性領域の極性アミノ酸は運動性が高く、ADAM との水素結合は低頻度であったが、一方、疎水性領域の疎水性アミノ酸は運動性が低く、特に芳香族アミノ酸 (Trp229、Tyr181、Tyr188) は良好な相互作用を示した。このことから、これら芳香族アミノ酸は活性発現に重要なアミノ酸であると推測される。さらに、水溶性領域に存在する Leu228 は運動性が低いことが明らかとなり、新たな相互作用ターゲットになると考えられる。これら MD シミュレーションおよび FMO 解析の結果に基づき、第二章、第三章では新規 ADAM 誘導体の開発を行った。特に、運動性が低く安定した相互作用が形成可能なアミノ酸 (Trp229、Leu228、Tyr188) および水分子をターゲットとした。

第二章では、Trp229 との分散相互作用の増強を目的に ADAM のアルキル側鎖にイオウ原子を導入した

新規 ADAM 誘導体を 14 種類合成し、活性評価を行った。第一章の計算化学的解析によって Trp229 との良好な相互作用が示されており、また、Trp229 の薬剤耐性変異株は報告されていないことから、Trp229 は ADAM 誘導体の重要なターゲットであると考えられる。アルキル側鎖にイオウ原子を導入した誘導体は、中程度の活性 EC<sub>50</sub> (MT-4 cell) を示し、第一世代 NNRTI のネビラピンよりも幅広い変異株に対して有効であった。しかし、アルキル側鎖にイオウ原子を導入した誘導体は、全般的に従来の ADAM 誘導体と比較して活性は大きく低下し、MD シミュレーションおよび FMO 解析から、Trp229 に対する相互作用の低下がみられた。イオウ原子の導入による活性低下は Trp229 に対する相互作用低下に起因していると推測され、Trp229 との相互作用は活性に重要であることが示唆された。

第三章では、静電相互作用の増強を目的とした新規 ADAM 誘導体の検討を行った。まず、ADAM のチオエステル部位の水素結合について着目した。チオエステル部位は、MD シミュレーションにおいて水分子との安定した水素結合が観測されたことから、重要な置換基であると推測される。しかし、チオエステルは化学的に不安定であり、加水分解によって失活してしまう問題があった。そこで、加水分解抵抗性のスルホキンドを導入した新規誘導体を 24 種類デザインし、合成および活性評価を行った。スルホキンドはチオエステルよりも強い負の電荷をもつことから、周囲の水分子や極性アミノ酸との静電相互作用増強が期待できる。ラセミスルホキンド誘導体は、従来の ADAM 誘導体より低い活性 EC<sub>50</sub> (MT-4 cell) であったが、幅広い変異株に対する有効性を示した。また、エナンチオマー間の活性比較のため、キラルスルホキンドの不斉合成を検討し、Sharpless 不斉酸化反応によって非常に高い光学純度 (> 99% e.e.) でキラルスルホキンドを導入した ADAM 誘導体の合成に成功した。キラルスルホキンド誘導体の酵素レベルでの阻害活性 (IC<sub>50</sub>) は中程度であったが、S 体よりも R 体の方が強い活性を示した。計算化学的解析から、R 体の方が Trp229 および Tyr181 と良好な相互作用を示し、これら芳香族アミノ酸との相互作用がより活性の向上に寄与していると考えられる。しかし、活性低下を示したスルホキンド誘導体は、従来の ADAM 誘導体よりも Lys103 に対する相互作用が大きく向上しており、活性との相関性はみられなかった。そのため、スルホキンド置換基は NNRTI 結合部位への侵入過程に影響していると推測される。

次に、ADAM のベンゾオキサゾロン環部位の水素結合について着目した。MD シミュレーションによって、ADAM のベンゾオキサゾロン環部位と His221 および Gln222 との水素結合が観測されたが、運動性が非常に高いアミノ酸であることから不安定な相互作用であると推測される。一方で、ベンゾオキサゾロン環部位近傍に存在する Leu228 および Tyr188 は運動性が低く、安定した水素結合のターゲットとなりうると考えた。Leu228 は薬剤耐性変異株が報告されていないため、変異株への有効性も期待できる。そこで、新たに Leu228 の主鎖カルボニル基および Tyr188 のヒドロキシ基との水素結合の形成を目的として、ヒドロキシメチル基を導入した新規 ADAM 誘導体を 4 種類デザインし、合成および活性評価を行った。ヒドロキシメチル基を導入した新規 ADAM 誘導体は、酵素レベルで従来の誘導体よりも大幅な活性向上を示し、ADAM 誘導体の中で最も強い阻害活性 IC<sub>50</sub> であった。さらに MD シミュレーションにより、新規 ADAM 誘導体のヒドロキシメチル基と Leu228、Tyr188 および周囲の水分子との良好な水素結合が観測された。また、逆転写酵素のポリメラーゼ活性部位を構成するドメインの運動性低下が見られ、アミノ酸の運動性低下も抗 HIV-1 活性の向上に寄与している可能性が示唆された。このことから、ヒドロキシメチル基は ADAM 誘導体において非常に重要な置換基であると考えられる。

以上、FMO 解析に加え、生体内により近似した条件での MD シミュレーションを組み合わせることによって、構造活性相関をより明らかにし、今後の ADAM 誘導体の発展に有益な知見を得ることに成功した。

## Abstract

Takanori Takei

The human immunodeficiency virus (HIV) is an agent that caused acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), and the emergence of drug-resistant mutant strains has been a major problem in recent years in HIV therapy. To address this problem, antiretroviral therapy (ART) has been performed in anti-HIV treatment, which is generally used in combination with two nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and one of the non-nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), protease inhibitors (PIs) or integrase inhibitors (INIs). There are five types of NNRTIs currently approved in Japan: first-generation nevirapine (NVP) and efavirenz (EVZ), and second-generation etravirine (ETR), rilpivirine (RPV) and dravirine (DOR). Second-generation NNRTIs are shown to be effective to various mutant strains due to its structural flexibility. However, there are some insufficiently effective mutant strains even in these NNRTIs, and problem of side effect and drug-drug interaction. Therefore, it is necessary to develop a novel NNRTI that has high safety, wide spectrum, and new resistance profile.

Alkenyldiarylmethans (ADAMs) have flexible structure consisting of two aromatic ring and an alkyl side chain parts and are shown reverse transcriptase inhibitory activity by binding to the NNRTI binding site of reverse transcriptase (RT). In recent years, receptor-based development has been promoted based on the X-ray crystal structure of the ADAM-RT complex, and interaction analysis and molecular design based on computational chemistry methods such as fragment molecular orbital (FMO) method has been carried out. However, the interaction between ADAM and RT may not be exact because the reported complex structure does not contain information on water molecules, and conventional analysis does not assume dynamic behavior of the ADAM-RT complex in vivo. The traditional ADAMs have insufficient anti-HIV activity to wild and mutant strains, which requires more accurate interaction analysis to solve these problems. Also, the ADAMs have a serious problem such as low chemical stability to hydrolysis. Therefore, for the purpose of developing more effective ADAM derivatives, this study has been carried out using interaction analysis that combined molecular dynamics (MD) method in addition to conventional FMO method, and new derivatives were designed, synthesized, and evaluated the anti-HIV-1 activity.

In Chapter 1, the interaction between ADAM and RT complex was analyzed by FMO method and MD simulation. In FMO analysis, the interaction of each substituent of ADAM was more clarified by dividing ADAM into three fragments, an aromatic ring site and alkyl side chain site. MD simulation containing water molecules revealed the interaction changes associated with the conformation changes of ADAM and RT. In addition, new hydrogen bonds with His221 and Gln222 were observed at the benzoxazolone ring site of ADAM, and the formation of hydrogen bonds network with some water molecules was newly found at benzoxazolone ring and thioester sites. The polar amino acid in the hydrophilic area of the NNRTI binding site had high motility and infrequent the hydrogen bonds with ADAM, while the aromatic amino acids (Trp229, Tyr181, Tyr188) in the hydrophobic area of it had low motility and showed good interaction with ADAM. Thus, it is inferred that interaction with these aromatic amino acids is important for the expression of the activity. Based on these results of MD simulations and FMO analysis, new ADAM derivatives were developed in Chapter 2 and 3. In particular, amino acids (Trp229, Leu228, Tyr188) and water molecules with low motility were targeted in order to form more stable interactions.

In Chapter 2, new ADAMs with a sulfur atom in alkyl side chain were synthesized for the purpose of enhancing the

dispersion interaction with Trp229, and their activities were evaluated. Trp229 is suggested an important target for ADAMs, since computational chemistry analysis in Chapter 1 showed good interaction with Trp229 and no drug-resistant mutants of Trp229 have been reported. ADAMs with a sulfur atom in alkyl side chain showed moderately active  $EC_{50}$  (MT-4 cell) and were effective to a wider range of mutants than the first generation NNRTI nevirapine. However, those activities were generally significantly reduced as compared with the conventional derivatives, and MD simulation and FMO analysis showed decreasing in the interaction with Trp229. It was inferred that the decrease in their activity was caused by the decrease in interaction with Trp229, suggesting that the interaction with Trp229 is important for the activity of ADAM.

In Chapter 3, new ADAMs were examined for the purpose of enhancing electrostatic interaction, focusing on the hydrogen bond at their thioester site at first. The thioester was presumed to be an important substituent because stable hydrogen bond with water molecules were observed in MD simulation. However, the thioester doesn't have sufficiently chemical stability since it is hydrolyzed easily. Therefore, ADAMs with hydrolysis-resistant sulfoxide introduced instead of thioester were designed, synthesized and evaluated for the activity. ADAMs with racemic sulfoxide had lower activity about  $EC_{50}$  (MT-4 cell) than the conventional ADAMs but showed efficacy to a wide range of mutant strains. In addition, to compare the activities between their enantiomers, asymmetric synthesis of chiral sulfoxide was investigated, succeeding in synthesizing ADAMs introduced chiral sulfoxide with high optical purity (> 99% e.e.) by Sharpless asymmetric oxidation reaction. The HIV-1 RT inhibitory activity  $IC_{50}$  of ADAMs introduced chiral sulfoxide was moderate, which their *R*-form showed stronger activity than their *S*-form. The *R*-form showed better interaction with Trp229 and Tyr181 by computational chemistry analysis, suggesting that the interaction with these aromatic amino acids contributed to the improvement of activity. Although ADAMs with sulfoxide were low activity, they had enhanced interaction with Lys103 as compared with the conventional ADAMs with thioester, not obtaining correlation between the interaction and the activity. Thus, it was speculated that the sulfoxide substituent influenced the entry process into the NNRTI binding site.

Secondly, new ADAMs focused on hydrogen bond at their a benzoxazolone ring site were examined. Although hydrogen bonds between the benzoxazolone ring site and His221 or Gln222 were observed by MD simulation, it was inferred to be an unstable interaction because these amino acids were extremely high motility. On the other hand, Leu228 and Tyr188, which were present near the benzoxazolone ring site, had low motility, therefore these were potential targets for stable hydrogen bonds. New ADAMs introduced with a hydroxymethyl group at the benzoxazolone ring were designed for the purpose of forming hydrogen bonds with the carbonyl group of main chain of Leu228 and the hydroxy group of Tyr188 and synthesized and evaluated for the activity. The HIV-1 RT inhibitory activity  $IC_{50}$  of a new ADAM with the hydroxymethyl group were significant improved than that of known ADAMs. In addition, the new derivative showed the strongest activity among all ADAMs. MD simulation for the ADAM with the hydroxymethyl group observed stable hydrogen bonds to Leu228, Tyr188 and surrounding water molecules. Moreover, the domain constituting the polymerase active site of RT was showed decreasing in motility by MD simulation. This ADAM has possibility to decrease in protein motility and improve anti-HIV-1 activity. These results suggests that hydroxymethyl group is a very important substituent in the development of ADAMs.

This study succeeded in clarifying the structure-activity relationship and obtaining useful information for the development of ADAM derivatives by combining MD simulation and FMO analysis.

## 論文審査の結果の要旨

後天性免疫不全症候群の病原体であるヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、頻繁に変異を起こすことから、その治療では変異ウイルスに対処可能な抗 HIV 薬が必要とされている。現在、多剤併用の治療法が実施され、非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) がキードラッグの一つとして位置づけられている。NNRTI は、逆転写酵素 (RT) のポリメラーゼ活性部位近傍の疎水性ポケットに結合する阻害剤である。従来の NNRTI では、変異株によっては効果が見込めず、副作用等が指摘されている。最近、抗 HIV 活性をもつコサランを模倣したアルケニルジアリールメタン (ADAM) 類が新たな NNRTI として注目され、そのフレキシブルな構造特性から変異株に対する活性が期待されている。

ADAM-HIV-1 RT 複合体モデルのシミュレーションから阻害活性効果の高い ADAM 類の分子設計が可能である。複合体ではスタッキングなどの分散相互作用や、水素結合などの静電相互作用が発現していると推定され、これらの分子間相互作用を分子レベルで解明することができれば、構造活性相関モデルの構築が可能である。分子間相互作用解析には化学計算手法が有力で、ナノからミリ秒スケールでの微細な動的変化をとともう構造の安定性解析には分子動力学 (MD) 法が、タンパク質等の巨大分子の迅速解析には、分子を分割するフラグメント分子軌道 (FMO) 法がそれぞれ優れている。

本論文では変異株に対して高い抗 HIV 活性を有する NNRTI 創製を目指して、MD 法と FMO 法を用いた化学計算手法によって、水和条件下での ADAM 類-HIV-1 RT 複合体の三次元的な構造変化に伴う分子間相互作用を解析して、生体内に近似した構造活性相関モデルから新たな ADAM 類の分子設計を検討した。設計に基づき一連の化合物群を合成して、RT 阻害活性および野生型や変異型 HIV 感染細胞の生存率改善効果をもとにその有効性を評価し、シミュレーションによる構造上の特徴と関連付けた。

第 1 章では、先行研究で変異株に対して高い抗 HIV-1 活性をもつ ADAM 誘導体を指標化合物として、水和条件下、指標化合物-HIV-1 RT 複合体に発現する分子間相互作用を、FMO 法と MD 法を用いて計算解析して、構造活性相関モデルから新たな ADAM 類の分子設計を検討した。

この化学計算では、ADAM 骨格中のアルキル側鎖、2 つの芳香環にそれぞれ修飾しているベンゾオキサゾロン (oxaz) 環とチオエステル基が RT 結合サイトのアミノ酸と分子間相互作用をもつことが解析された。アルキル側鎖では Tyr188 や Trp229 との分散相互作用が確認された。oxaz 環では His221 および Val108 と、チオエステル基では Lys101 と水分子を介しての安定な水素結合が見られた。また、oxaz 環と Gln222、およびチオエステル基と Lys103 でも弱い水素結合の発現が見られ、Gln222 や Lys103 が存在するドメインの運動性は高いことが示唆された。アルキル側鎖末端のオキサジアゾール (oxa) 環では、アミノ酸との安定な分子間相互作用が見られないことから、ADAM のこの環構造部位はコンフォメーション変化が激しいことが示唆された。これらの水和条件下の解析結果は、実際の生体内での分子間相互作用が反映されている可能性が高く、X 線構造解析や真空中での化学計算解析からは得ることができていないものであった。

これらの解析から、特定のアミノ酸を標的にして分子間相互作用を強める、あるいは新たな分子間相互作用を生じさせる、という複合体モデルが考案された。すなわち、分散相互作用増強ではアルキル側鎖にイオウ原子を導入する、静電相互作用増強ではチオエステル基をスルホキシド基に変換する、また新たな水素結合形成を生じさせるために oxaz 環にヒドロキシメチル基を導入する、という 3 パターンの新規

ADAM 類分子が設計された。

第2章では、分散相互作用増強による ADAM 類の開発を検討した。アルキル側鎖にイオウ原子が導入された ADAM 類の合成では、1,3,4-oxa ユニットの新規合成法を確立して、oxa 環構造異性体や芳香環置換体を含めて、計 14 種類の化合物を得た。これらの抗 HIV-1 活性試験では、指標化合物と最も類似した化合物では、野生株のみならず特定の変異株に対して、第一世代 NNRTI であるネビラピンよりも良好な阻害活性を示したが、指標化合物よりは活性が低下していることがわかった。再化学計算では、イオウ原子と Trp229 との分散相互作用の向上は見られず、逆にこれらの反発相互作用が強まっていることが観測された。この要因はイオウ原子の原子半径が大きいためと推測された。

第3章では、静電相互作用増強による ADAM 類の開発を検討した。チオエステル基をスルホキシド基に変換した ADAM 類の合成では、oxa 環や芳香環の置換体を含めて、計 24 種類の化合物を得た。これらの活性試験では、指標化合物と最も類似した化合物では、野生株の他、7 種類の変異株全般で良好な阻害活性を示したが、指標化合物よりは活性が低いものであった。これらの化合物はラセミ体であることから、鏡像体による活性の違いも調べた。Sharpless 不斉酸化を鍵反応として、2 種類のラセミ体のそれぞれの両鏡像体を高い光学純度 (>99% ee) で得た。酵素活性試験では、いずれも S 体よりも R 体の方が強い活性を示したが、どちらも指標化合物よりは活性が低かった。再化学計算では、スルホキシドと Lys103 との強い静電相互作用が観測されたことにより、阻害活性低下の要因は、スルホキシド基の高い極性によって強い水合が起こり、結合サイトへの侵入が抑制されたものと推測された。また、鏡像体による活性の相違は、アミノ酸に対する水素結合の強度が鏡像体によって異なるためと推測された。

次に oxaz 環にヒドロキシメチル基を導入した ADAM 類の合成では、oxaz 環や oxa 環の置換体を含めて、計 4 種類の化合物を得た。酵素活性試験では、いずれも今までにない強力な阻害活性を示し、最高のものでは IC<sub>50</sub> 値が 0.022 $\mu$ M で、指標化合物やネビラピンとの対比ではそれぞれ 14 倍、55 倍高かった。再化学計算では、導入したヒドロキシメチル基が近傍の複数のアミノ酸と水素結合形成して、標的としていた Gln222 との水素結合強度も向上していることが観測された。これらのアミノ酸が存在するドメインでは運動性が低下して、より安定な複合体が形成されて強い阻害活性が達成されたものと結論された。

以上、本研究において化学計算による抗 HIV 薬を開発するという戦略を提示して、NNRTI として有望な化合物を見出すことに成功しており、本研究科において課程による博士(薬学)の学位を授与するに値するものと判断する。