

HIV 侵入の第二受容体に対する特異的拮抗剤の発見と応用に関する研究

玉村 啓和

京都大学大学院薬学研究科, 〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29

Development of Selective Antagonists against an HIV Second Receptor

Hirokazu TAMAMURA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received August 20, 2001)

The authors have discovered a highly selective CXCR4 antagonist, T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II), and its shortened potent analogs, T140 and TC14012, which strongly inhibit the T-cell line-tropic HIV-1 (X4-HIV-1) infection through their specific binding to a chemokine receptor, CXCR4. CXCR4 is a major coreceptor (second receptor) for the entry of X4-HIV-1 into T-cells. These peptides have been found through the structure-activity relationship (SAR) study on tachyplesins and polyphemusins, which function as self-defense peptides of horseshoe crabs with immature immune systems. T140 and TC14012 showed the highest level of anti-HIV activity and antagonism of target cell entry by X4-HIV-1 among all the CXCR4 antagonists that have been reported to date. Additionally, bifunctional anti-HIV agents based on the specific CXCR4 antagonists (T140 analogs)-3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) conjugation have been synthesized and evaluated, since T140 analogs can possibly work as a carrier of AZT targeting T-cells due to their specific affinity for CXCR4 on T-cells. T22 have two disulfide bonds and a Trp residue in the molecule. In connection with this study, novel facile and side-reaction-free methodologies for disulfide bond formation have been established for the increase of the efficiency of SAR studies. Furthermore, the completely stereocontrolled synthetic process for a couple of (*E*)-alkene dipeptide isosteres starting from L-amino acid has been established in order to facilitate nonpeptidylation studies on peptide-lead candidates. In this review, the authors wish to summarize our recent research on the development of specific antagonists against the HIV second receptor CXCR4, involving studies on the establishment of efficient methodologies for the facile synthesis of peptides and peptide mimetics.

Key words—HIV; coreceptor; CXCR4 antagonist; bifunctional agent; T140

1. はじめに

5年前、エイズの原因ウイルス (HIV) に関する研究が、治療薬の開発研究を含めて、大きく進展した。学術雑誌 *Science* に Breakthrough of the Year (1996年)¹⁾として紹介されたように、その後現在までの HIV, AIDS 研究に強く影響を及ぼした2つの重要な発見があった。1つめは、HIV プロテアーゼ阻害剤1剤と逆転写酵素阻害剤2剤の組み合わせによる3剤併用療法が、エイズの治療に極めて有効であり、HIV 感染者の血中ウイルス濃度を検出限度以下に減少させることに成功したことである。このような併用療法は、highly active anti-retroviral therapy (HAART) 療法と呼ばれ、現在でも最も効果的な治療法であり、種々の HIV プロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤が組み合わされて使用されて

いる。²⁾ 2つめは、HIV が T 細胞やマクロファージへ侵入するとき使用する coreceptor (第二受容体) がついに発見されたことである。HIV が細胞への感染において利用する最初の受容体は細胞表面タンパクの CD4 であることは、15年以上も前からわかっていたが、coreceptor はその存在が示唆されながら長年不明であった。実は、この coreceptor は、本来、炎症、免疫反応時の白血球の走化性等に関与するケモカインの受容体であることが明らかにされたのである。そして、HIV が感染できる細胞の種類によって、HIV のタイプをマクロファージ指向性 (M-tropic)、T 細胞指向性 (T-tropic) と二重細胞指向性 (dual tropic) に大きく分類された (Fig. 1).³⁾ この指向性はマクロファージ、T 細胞株、活性化 T 細胞のそれぞれによって発現しているケモ

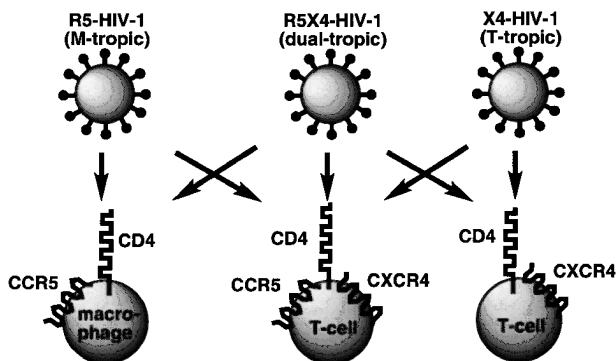


Fig. 1. HIV-Tropism and Receptors for HIV-1 Entry

カイン受容体の種類の違いによる。M-tropic, T-tropic HIV は、それぞれ、異なるケモカイン受容体 CCR5,⁴⁾ CXCR4 (fusin)⁵⁾ を coreceptor として利用する。最近では、HIV が侵入の際に使用する coreceptor の違いによって、HIV のタイプを R5-HIV, X4-HIV と R5X4-HIV に分類している。また、HIV 感染を受けた後 10 年以上も未発症の感染者がいることは長年の謎であったが、これは先天的に CCR5 を作る遺伝子の一部が欠損していることが原因であった。⁴⁾ これらの報告をもとに、世界の製薬企業がこの coreceptor を標的とした熾烈な拮抗剤の開発競争を展開し始めた。⁶⁾

現在のエイズの治療薬としては、上述のように逆転写酵素阻害剤と HIV プロテアーゼ阻害剤が使用されており、その HAART 療法は非常に有用性が高い。しかし、HAART により血中 virus 量を長期間検出限度以下に保っていても、体内には必ず HIV が存在し、複製を繰り返していることが明らかになり、HAART は HIV の増殖を 99% 抑制できるが、完全に体内から HIV を駆逐することは不可能であるというのが、現段階での見解である。また、副作用の発現や耐性ウイルスの出現等の問題が完全に解決されたわけではなく、多剤併用療法での治療薬使用の選択肢を増やすために、HIV の複製の各段階を抑制する薬剤の登場が期待されている。このような状況から、HIV coreceptors CCR5, CXCR4 に対する HIV の結合を阻害する薬剤が有望視された。その阻害剤の候補としては天然のリガンドであるケモカインそのもの及びそのアゴニストとアンタゴニストが考えられる。まず、このケモカイン受容体 CCR5 の本来のリガンドであるケモカ

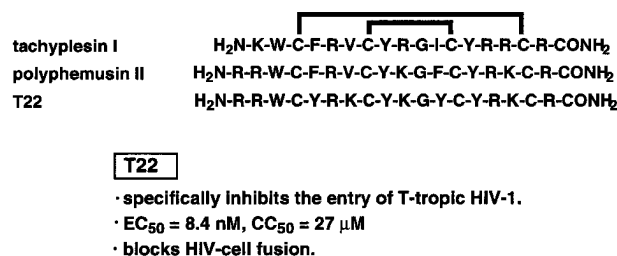


Fig. 2. Self Defense Peptides of Horseshoe Crabs and Their Analog T22

イン regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , CXCR4 のリガンドであるケモカイン stromal cell-derived factor (SDF)-1 が薬剤になり得るかどうかである。これらケモカインは、顕著な抗 HIV 活性を有するものの、^{7,8)} 分子量も大きく (70 アミノ酸残基程度)、細胞内にシグナルが伝わることによる副作用、すなわち、本来のケモカインの作用である白血球の遊走及び活性化により、逆に HIV の複製を促進してしまう可能性がある。以上のような状況から、HIV coreceptors CCR5, CXCR4 を標的とした低分子の阻害剤 (アンタゴニスト) の開発が待ち望まれている。

著者らは、カブトガニの血中に存在し、生体防御を司っている抗菌抗ウイルス活性ペプチドである tachyplestin, polyphemusin⁹⁾ から誘導して、アジドチミジン (AZT, 最初に臨床で使われた抗エイズ薬)¹⁰⁾ に匹敵する抗 HIV 活性を有する化合物 T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II) (18 残基ペプチド) を見出した (Fig. 2).¹¹⁾ また、T22 が上述の HIV の第二受容体 CXCR4 の低分子拮抗剤であることを明らかにし、¹²⁾ T22 を基盤構造として、新しいタイプの抗 HIV 剤の開発研究を展開している。なお、T22 は分子内に 2 本のジスルフィド結合を有するトリプトファン (Trp) 含有ペプチドであり、本研究に関連し、従来の合成法の欠点を改良した新規のジスルフィド結合形成反応を開発し、シスチン含有ペプチドの合成の効率化及び構造活性相関研究の効率化に有用な手段を提供した。本総説では、最初にシスチン含有ペプチドの合成法の開発について説明し、次に、T22 の構造活性相関と作用機序解明及び T22 を基盤構造とする新しいタイプの抗 HIV 剤の合成について述べることにする。

2. 簡便なシスチン含有ペプチドの合成法の開発

分子内に複数のジスルフィド結合を有するペプチドを合成する場合、空気酸化法によるジスルフィド形成反応のみでは、目的の位置に S-S 架橋されていないジスルフィド異性体が生成することが報告されている。また、天然のペプチドのアミノ酸置換誘導体、又は、非天然型アミノ酸や非ペプチド性ユニットを導入したペプチドあるいはペプチドミメティクスを合成する場合は、目的の位置に S-S 架橋される保証はない。したがって、それぞれのジスルフィド結合を段階的に、かつ、位置選択的に形成する方法が望まれる。この方法を遂行するには、S-保護システインを直接シスチンに変換できるジスルフィド形成反応が必要になる。これには、ヨード、タリウム、スルホキシドを用いる反応が報告されているが、これらの酸化反応条件に鋭敏な Trp, メチオニン (Met) が修飾を受けることが知られており、使用には制限がある。^{13,14)} そこで著者らは、従来の合成法の欠点を改良した、S-保護システインの脱保護法 [トリフルオロメタンスルホン酸銀 (AgOTf) を用いる方法]¹⁵⁾ と塩酸水溶液中のジメチルスルホキシド (DMSO) 酸化法¹⁶⁾ の組み合わせによるジスルフィド形成反応を見出した (Fig. 3).¹⁷⁾ 本法を用いると分子中に共存する他のジスルフィド結合に影響を与えることなく、ペプチド中の S-acetamidomethyl (Acm) 保護システイン残基を数時間で定量的にシスチンに変換できる。しかも、この反応中酸化反応条件に鋭敏なアミノ酸 (Trp, Met 等) は安定であり、本反応は適用範囲の広い有用な反応であると考えられる。さらに、空気酸化法と組み合わせることにより、分子内に 2 本のジスルフィド結合を含むペプチドの位置選択的ジスルフィド結合形成に応用可能であることを示した (Fig. 4).¹⁸⁾ 実際、本法を用いて 100 種類以上の T22 誘導体の合成を行っており、T22 (18 残基, S-S 2 本, Trp 1 個, Figs. 2 & 4) の構造活性相関研究を効率的に行った。¹⁹⁾ また、本法を用いて前述のケモカイン SDF-1 (67 残基, S-S 2 本, Trp 1 個, Fig. 5) の合成にも成功し、本法が長鎖のペプチドの合成にも有用であることを示した。²⁰⁾

著者らは上記の T22 の構造活性相関研究により、さらに有用な低分子の高活性低毒性誘導体 T131, T140 (14 残基, S-S 1 本, Trp を含まない)

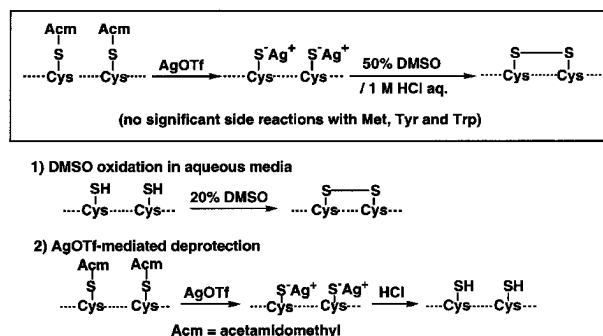


Fig. 3. Disulfide Bond Formation in Cys (Acm)-Peptides Using AgOTf and DMSO/HCl aq.

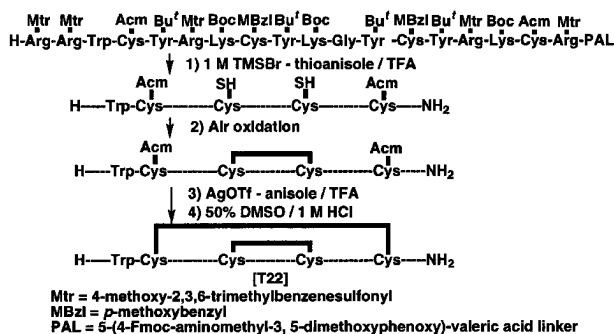


Fig. 4. Regioselective Disulfide Bond Formation for the Synthesis of T22 Analogs

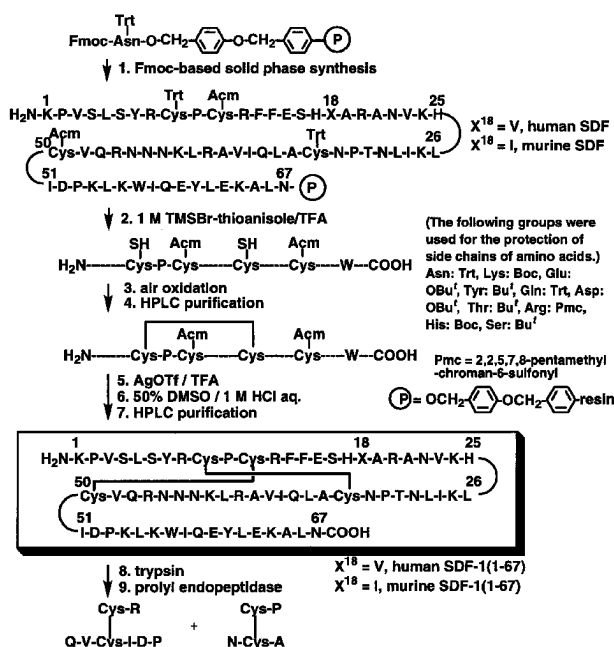


Fig. 5. Synthetic Scheme for SDF-1

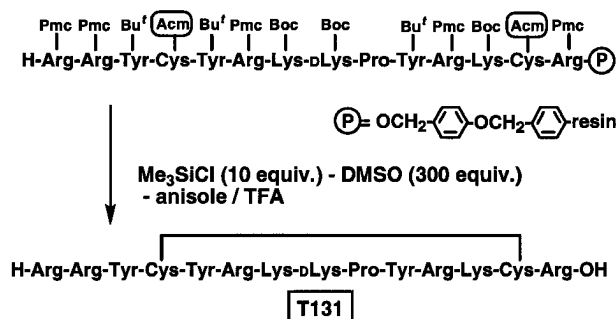


Fig. 6. One-Pot Synthesis of T131

を見出した (後述, Figs. 9 & 11).^{21,22)} これに関連してジスルフィド結合 1 本のみを含むペプチドの簡便な合成法を開発した. すなわち, トリメチルシリルクロリド (TMSCl)-DMSO/トリフルオロ酢酸 (TFA) 系²³⁾ を用い, 最終脱保護 (全保護基の除去と固相リンカーからの切断) とジスルフィド結合形成を one-pot で行う方法を開発した (Fig. 6).²⁴⁾ 本法により, Trp を含まないシスチン含有ペプチドの合成の効率化が達成され, 合成時間の短縮と多品目同時合成が可能になった. また, 本法は, 核酸誘導体 AZT と T140 の付加体 (後述, Fig. 18) のような通常の空気酸化法では合成困難な複雑な化合物の合成にも有用であることを示した.²⁵⁾

3. 抗 HIV ペプチド T22 の構造活性相関と作用機序解明

9 年前, 著者らは, tachypleisin と polyphemusin を基盤化合物として, 強い抗 HIV 作用を有する化合物 T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II) を見出した.¹¹⁾ 本 T22 は, 天然の polyphemusin II の構成アミノ酸をわずかに 3 個置換しただけの 18 アミノ酸残基の合成ペプチドであるが, 抗 HIV 活性は polyphemusin II の 100 倍以上で, 50% 有効濃度 (EC₅₀) が 8.4 nM, 50% 細胞毒性濃度 (CC₅₀) が 27 μM である (Fig. 2). その後, NMR,²⁶⁾ CD による立体構造解析を基にした構造活性相関研究を通じて T22 の活性発現に必要なユニットを同定し, T22 の 2 本のジスルフィド結合のうち主に外側のジスルフィド結合により保持された β-ターンを含む折り返し β-シート構造が重要であることを明らかにした (Fig. 7).¹⁹⁾ この結果を参考にしたさらなる構造活性相関により, 低分子かつ低毒性誘導体 T140 を見出すに至った (後述, Fig. 11).²²⁾

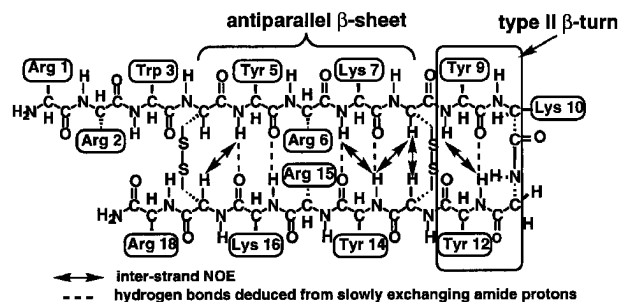


Fig. 7. Schematic Representation of the Secondary Structure of T22 Based on the NMR Analysis

T22 発見当時の作用機序解明研究により, HIV が T 細胞に侵入するときの吸着直後, すなわち, 膜融合の段階で T22 は作用することがわかっていった. また, T22 は T-tropic HIV の感染のみを特異的に阻害し, M-tropic HIV の感染に対してはその効力を示さないこともわかっていった. さらに, 数年後, T22 は細胞融合に関与する HIV 表面タンパク gp120 と T 細胞表面タンパク CD4 の両方に対して結合親和性を持つことが明らかになった. しかし, T22 関連誘導体における gp120, CD4 に対する結合親和性と抗 HIV 活性とは必ずしも相関しないことがわかり, 高活性発現のためのメインの作用機序を探索していた. このような状況の中, HIV の coreceptor が発見され, M-tropic, T-tropic HIV はそれぞれ CCR5, CXCR4 を利用することが報告された. T22 が吸着直後の細胞融合の段階で作用することや T-tropic HIV (X4-HIV) の侵入のみを特異的に阻害することから, CXCR4 を介する X4-HIV の侵入に T22 が影響を与える可能性が示唆された. 実際, 種々の実験により, T22 は CXCR4 を介する X4-HIV の侵入及び細胞融合を特異的に阻害するが, CCR5 を介する R5-HIV の侵入及び細胞融合には影響しないことがわかった (Fig. 8).¹²⁾ さらに, SDF-1 が持っている CXCR4 を介する細胞内カルシウム濃度上昇作用を T22 は阻害し, また, 抗 CXCR4 モノクローナル抗体 12G5²⁷⁾ の CXCR4 への結合を T22 は阻害した. このことから, T22 は CXCR4 の特異的なアンタゴニストであることが証明された.

4. T22 を基盤構造とする新しいタイプの抗 HIV 剤の合成

上述の T22 の構造活性相関を参考にして, 抗

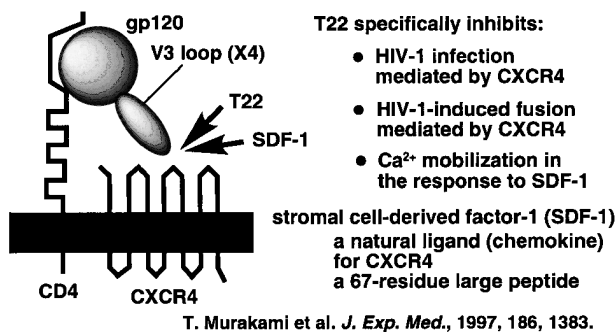


Fig. 8. T22 Is a Small Molecule CXCR4 Inhibitor that Blocks X4-HIV-1 Infection

T22: high-cationic (5 Arg, 3 Lys, 1 N^α → total charges = + 9)
Natural tachyplesin I: also amphiphilic (total charges = + 7)
 electrostatic and/or hydrophobic interaction with lipid bilayers → antimicrobial action
 the membrane permeability of T22 ↔ cytotoxicity

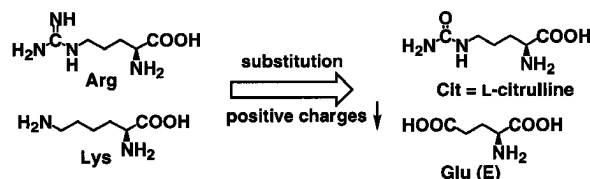


Fig. 10. Design of Low-Cytotoxic Analogs

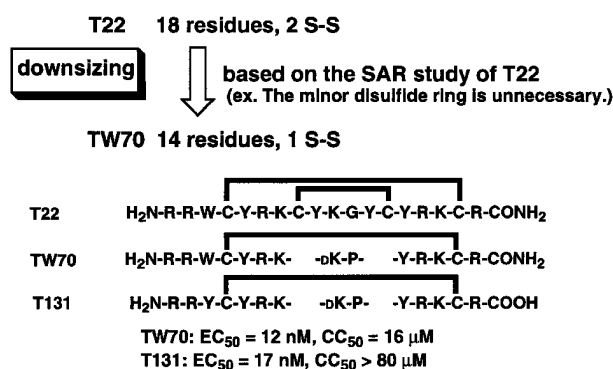


Fig. 9. Downsizing of T22

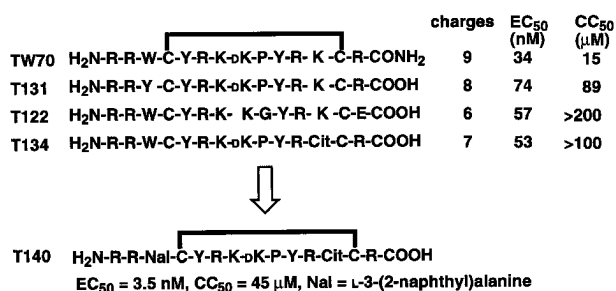


Fig. 11. Development of a Novel Lead Compound T140

HIV 活性発現に必須ではない内側のジスルフィド結合を含む 4 残基を削除した短鎖誘導体 TW70 を合成した (Fig. 9).²⁸⁾ TW70 はターン部分 (i+1, i+2 位) をもとの Lys-Gly から D-Lys-Pro へ変換しターンの固定化をはかっており、全体の 2 次構造としては、T22 と同様の折り返し β-シート構造をとっている。²⁹⁾ このように T22 の低分子化 (18 残基 → 14 残基) には成功したが、T22 誘導体にはまだ、顕著な細胞毒性を有しているという問題点が残されている。T22, TW70 は分子内に Arg 5 個, Lys 3 個を含み、分子全体で +9 のチャージを有する high-cationic な塩基性ペプチドである。天然型の tachyplesin I も同様に +7 のチャージを有する両親媒性のペプチドであり、脂質膜に対する静電的相互作用や疎水性相互作用によって、抗菌作用を示すと考えられている。³⁰⁾ T22 の場合、この膜相互作用が細胞毒性に関与していると考えられる³¹⁾ ので、分子内の Arg, Lys を同様な骨格を有する中性残基 L-citrulline (Cit) や酸性残基 Glu に置換して、分子全体の +チャージを減らし、細胞毒性の軽減した誘

導体の創製を目指した (Fig. 10).²¹⁾ さらに、C 末端をアミドタイプからカルボン酸タイプへ変換し、結果として、種々の低毒性化合物を得ることができ、また、新たなリード化合物 T140 を見出すことができた (Fig. 11).²²⁾ この T140 は NMR と CHARMm を用いる分子動力学計算により、II' 型 β-ターン/β-シート構造をとっていることが明らかになった (Fig. 12).³²⁾ さらに、T140 を含めて上記の構造活性相関から得られた数種の低分子低毒性誘導体も CXCR4 阻害剤であることを証明した。そして、T22, T140 関連誘導体間で、抗 HIV 活性と「CXCR4 を介する HIV の侵入を阻害する活性」及び「抗 CXCR4 モノクローナル抗体 12G5 の CXCR4 への結合を阻害する活性 (CXCR4 に対する結合親和性)」が相関することを見出し、T22 及び T140 の活性発現のメインのターゲットは coreceptor CXCR4 であることを決定付けた (Table 1).³³⁾

次に、新規 CXCR4 阻害剤 T140 に関して Ala-scanning を行った結果、Arg², L-3-(2-naphthyl)alanine (Nal)³, Tyr⁵, Arg¹⁴ の 4 個が必須残基である

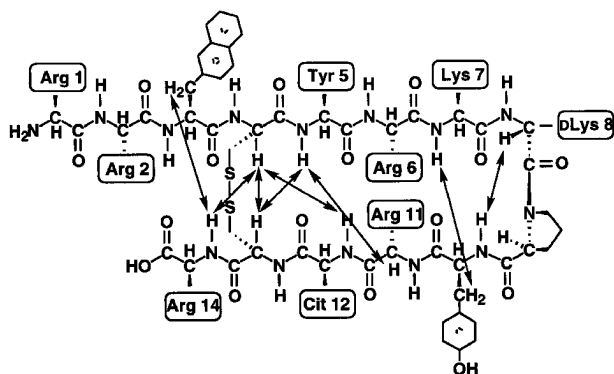


Fig. 12. Schematic Representation of the Secondary Structure of T140 Based on the NMR Analysis and Molecular Dynamic Calculations

Table 1. Comparison of Inhibitory Activities of T22-related Analogs in 3 Different Assays

Analog	IC ₅₀ (nM)		
	Anti-HIV	Inhibition of HIV-entry through CXCR4	Inhibition of binding of 12G5*
tachyplesin I	>20,000	1,000	N.T.
polyphemusin II	420	520	780
T22	80	5.1	48
all-D-T22	370	1,400	2,800
[Nal ³]-T22	110	0.32	N.T.
Scr [#]	no activity	no activity	no activity
TW70	34	15	N.T.
T131	74	31	N.T.
T134	53	2.7	4.1
T140	3.5	0.43	2.5

* 12G5=an anti-CXCR4 monoclonal antibody, # Scr=a scrambled 4Ala-tachyplesin I, in which 4 Cys of tachyplesin I were substituted with Ala and the sequence of the constituent amino acids was scrambled. N.T.=not tested

ことが明らかになった (Fig. 13).³⁴⁾ T140 の立体構造 (Fig. 12) から判断して、これらの 4 残基は空間的に近い位置に存在しており、抗 HIV 活性 pharmacophore を形成していると考えられた。この pharmacophore を保持したまま、Cit-scanning を行い、高い選択係数 {selectivity indexes (SIs) = CC₅₀/EC₅₀} を有する誘導体 TC14003, TC14005 を得た。しかし、その後の実験により、これら T140 誘導体 (C 末端カルボン酸フリー型) は、マウスあるいはネコの血清で処理すると必須残基のひとつである C 末端の Arg¹⁴ が切断されることがわかった (Fig. 14).³⁵⁾ 一方、C 末端をアミド型に変換した誘導体 TZ14004 は、抗 HIV 活性が低下するものの、

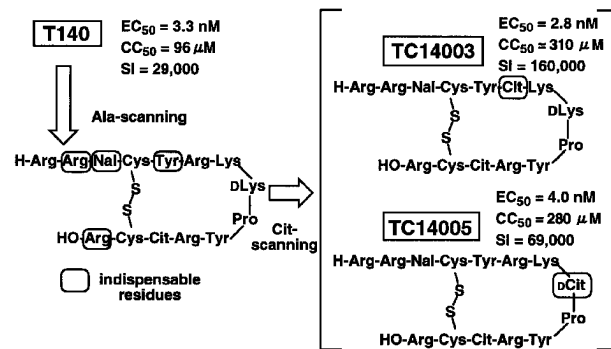


Fig. 13. T140 Leads to Effective Anti-HIV Peptides with High Selectivity Indexes

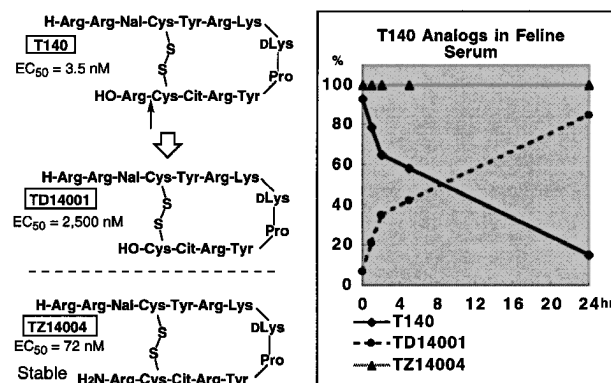


Fig. 14. Biodegradation of T140 in Feline Serum

血清処理においては全く安定であった。そこで、C 末端をアミド型に固定し、このことにより生じるネットチャージの+1 上昇を考慮して、さらに double Cit-scanning を行った (Table 2)。この結果、血清中で安定で、高い SI を有する誘導体 TN14003 (EC₅₀ = 0.6 nM, CC₅₀ = 410 μM, SI = 680,000) と TC14012 (EC₅₀ = 0.4 nM, CC₅₀ > 800 μM, SI > 2,000,000) を見出した。

著者ら (Murakami T., *et al.*) が T22 の CXCR4 阻害活性を発表した時,¹²⁾ 同時に別の 2 種の低分子 CXCR4 阻害剤が報告された。1 つめは、De Clercq らにより報告された、bicyclam と呼んでいる複素環化合物 (化合物名 AMD3100, 以前は JM3100 という名称)³⁶⁾ (Fig. 15) であり、2 つめは、Doranz らにより報告された、9 個の D-Arg からなるペプチド ALX40-4C (Ac-(D-Arg)₉-NH₂) (Fig. 15) である。³⁷⁾ これら 2 化合物はいずれも、CXCR4 を介する X4-HIV の侵入を阻害し、また、SDF-1 の細胞内カルシウム濃度上昇作用や抗体 12G5 の結合を阻

Table 2. Anti-HIV Activity of Analogs with the C-Terminal Amide

Analog	Sequence	EC ₅₀ (nM)	Charge
T140	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH	3.3	+7
TZ14004	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	72	+8
TC14003	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH	2.8	+6
TN14003	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	0.6	+7
TC14005	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-OH	4	+6
TN14005	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	4.6	+7
TC14012	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	0.4	+6
TC14014	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH ₂	6.8	+6
TC14016	H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	6.6	+6
TC14018	H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH ₂	1.2	+6
TC14020	H-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DCit-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH ₂	2.7	+6
TC14022	H-Cit-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Cit-Cit-Cys-Arg-NH ₂	40	+6

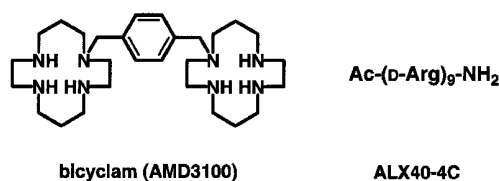


Fig. 15. Other Small Molecule CXCR4 Inhibitors

害した。T22 を含め、これら 3 個の CXCR4 阻害剤は、いずれも中性水溶液中での全体の荷電数が +8 あるいは +9 の強カチオン性化合物である (T22 は前述の通り +9, AMD3100 は +8, ALX40-4C は D-Arg 9 個で +9)。また、これら 3 化合物とも CXCR4 に対する結合において抗体 12G5 と拮抗作用を示す。12G5 は CXCR4 の第一及び第二細胞外ループに結合するので、この部分に多く存在している酸性アミノ酸残基³⁸⁾がこれら 3 化合物との結合に関与している可能性がある。これら 3 化合物は強カチオン性という性質は非常によく似ているが、個々の化合物におけるチャージの位置、及び全体の構造もかなり異なるように見える。SDF-1 との比較では、T22 と SDF-1 が β-シート構造を有していることが共通点としてあげられる。最近、HIV 侵入に必要とされる CXCR4 の領域や、HIV の指向性を決定する CXCR4 の配列の解明研究が急速に進んでおり、³⁹⁾ 現在までに preliminary に得られた結果としては、T22 (T140), AMD3100, SDF-1, HIV がそれぞれ CXCR4 に結合する領域は、第二細胞外ループを中心に非常に近く、一部オーバーラップするが同じではないことがわかっている。また、ちなみ

Table 3. Comparison of Activities of 4 CXCR4 Inhibitors in 4 Different Assays

Analog	IC ₅₀ (nM)			
	Anti-HIV		Inhibition of HIV-entry through CXCR4	Inhibition of binding of 12G5
	MTT	IF		
T22	290	0.20	2.9	71
T140	12	0.023	0.18	2.3
AMD3100	280	25	1.1	13,000
ALX40-4C	1,300	220	400	3,200

IC₅₀ values on the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay are the concentrations for 50% protection of HIV-induced cytopathogenicity in MT-4 cells. IC₅₀ values on the indirect immunofluorescence (IF) assay are based on the inhibition of the viral antigen p24 expression.

に、著者らの assay 系において T22, T140, AMD3100, ALX40-4C を比較したところ、抗 HIV 活性と「CXCR4 を介する HIV の侵入を阻害する活性」及び「抗 CXCR4 モノクローナル抗体 12G5 の CXCR4 への結合を阻害する活性 (CXCR4 に対する結合親和性)」のすべてにおいて、T140 が最強の値を示した (Table 3).²²⁾ 今後これらの化合物が CXCR4 に相互作用する様式を明らかにすること、化合物の高次構造を、受容体結合状態の構造を含め、詳細に解析すること、さらに、その化合物の共通点、類似性、相違点を見出すことなどにより、より有用な CXCR4 阻害剤がデザインできる可能性がある。また、SDF 欠損マウスでは骨髄球系造血及び心形成の異常が見られたことから、⁴⁰⁾ CXCR4 阻害剤使用時にも同様の副作用が生じる可能性を懸念しなければならない。しかし、前述の結果 (SDF

-1, HIV がそれぞれ CXCR4 に結合する領域は、一部オーバーラップするが同じではないこと) から、SDF の結合を阻害せず HIV の侵入のみを阻害する CXCR4 阻害剤の創製も理論的には可能であり、今後の進展に期待している。

5. 2価官能性抗 HIV 剤の合成

また、T140 誘導体の CXCR4 に対する親和性を利用し、これをベクターとして、他の抗エイズ薬 (逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤) を T 細胞へターゲティングすることを考えた (Fig. 16)。まず、著者らは T140 誘導体に適当なリンカー (スクシニルリンカー) を介して逆転写酵素阻害剤 AZT を共有結合させた付加化合物を合成し (Figs. 17 & 18)、標的細胞に本来親和性のない薬剤 (AZT) に親和性を与えることに成功し、本付加化合物の *in vitro* での有用性を確認した (Table 4)。^{25,41)} T22 及び T140 のような標的細胞に親和性を有する化合物を、他の抗エイズ薬のターゲティングのためのベクターとして用いることができれば、抗エイズ薬の使用量を減らすことができ、重篤な毒性や副作用

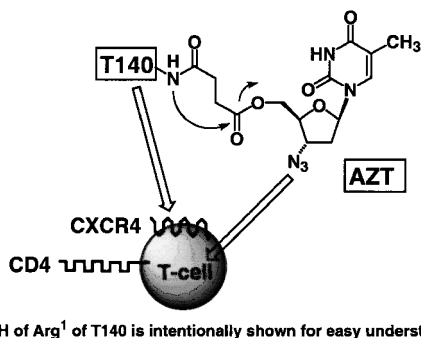


Fig. 16. Bifunctional Anti-HIV Agents Based on the Specific CXCR4 Antagonists-AZT Conjugation

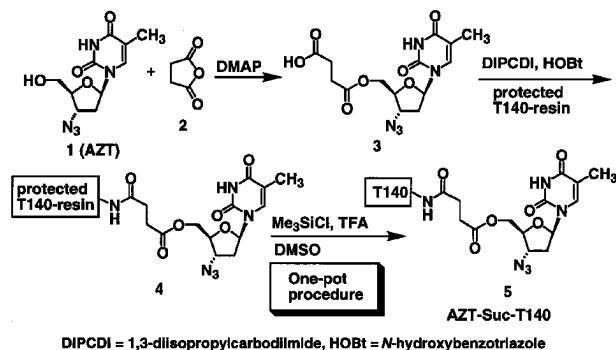


Fig. 17. Synthetic Route for the AZT-T140-Conjugate

発現などの問題を解決するための 1 つの有用な手段になりうると思われる。なお、本付加化合物は、AZT の 5' 位のアルコールと T140 の N 末端をスクシニルリンカー (succinyl linker) で架橋させており、生理的 pH でスクシニド環を形成して AZT をリリースするようにデザインされている (Fig. 19, 半減期約 2.5 時間)。したがって、本付加化合物の合成途上ペプチド部分のジスルフィド形成時には、生理的 pH で行う空気酸化法を用いることはできない。そこで、前述 (Section 2, Fig. 6) のように酸性条件で反応できる TMSCl-DMSO/TFA 系による one-pot 合成法 (Fig. 18) が、このような複雑な化合物の合成に効率良く適用できることを明らか

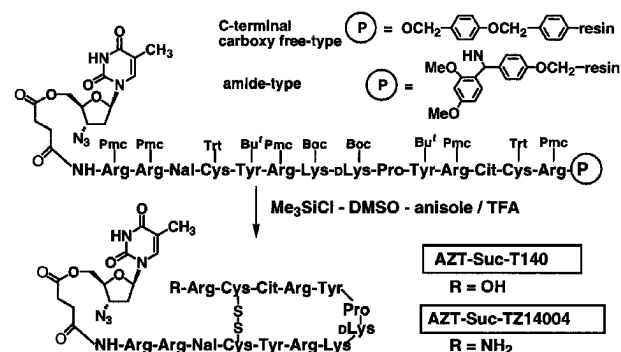


Fig. 18. One-Pot Synthesis of the AZT-T140 (or TZ14004)-Conjugate

Table 4. Anti-HIV Activity of AZT-T140-Conjugates

	EC ₅₀ (nM)	CC ₅₀ (μM)	S.I.
T140	3.3	>20	>6,100
N ^α -hemisuccinate-T140	310	>20	>65
N ^α -succinimide-T140	330	>20	>61
AZT-Suc-T140	4.6	>20	>4,300
AZT	20	150	7,500
AZT : T140 (1 : 1)	1.2	>20	>17,000
AZT : N ^α -hemisuccinate-T140 (1 : 1)	13	>20	>1,600
AZT : N ^α -succinimide-T140 (1 : 1)	3.2	>20	>6,300
TZ14004 (T140-NH ₂)	68	8	120
N ^α -hemisuccinate-TZ14004	730	>20	>27
N ^α -succinimide-TZ14004	390	>20	>51
AZT-Suc-TZ14004	6.1	13	2,200
AZT : TZ14004 (1 : 1)	11	7	610
AZT : N ^α -hemisuccinate-TZ14004 (1 : 1)	7.9	11	1,400
AZT : N ^α -succinimide-TZ14004 (1 : 1)	4	9	2,300

にした。

6. 部分的非ペプチド化研究

現在著者らは、T140 誘導体のようなペプチド性化合物の高活性非ペプチド化の研究にも取り組んでいる。多数あるジペプチドイソスターの中で、(E)-アルケンジペプチドイソスターに着目し、アミノ酸をキラルプールとして完全に立体制御された化学合成プロセスの確立を行った (Fig. 20)。まず、L-アミノ酸から数行程で4種類の isomer の混合物として得られるアジリジン- α,β -不飽和エステル (aziridine- α,β -enoate) を基質として、故井深教授により開発された Pd(0) 触媒を用いる異性化反応⁴²⁾により、 γ, δ -cis- γ, δ -epimino (E)- α, β -enoate (cis-E) を効率良く得た。著者らは、このアジリジン- α, β -不飽和エステルのブレンステッド酸 (MeSO₃H) による位置及び立体選択的開環反応を見出し、⁴³⁾ 有機銅試薬による立体選択的 anti-S_N2' 反応⁴⁴⁾ と組み合わせることにより、光学活性な2種類の (E)-アルケンジペプチドイソスターを完全に立体制御して化学合成するプロセスを確立し

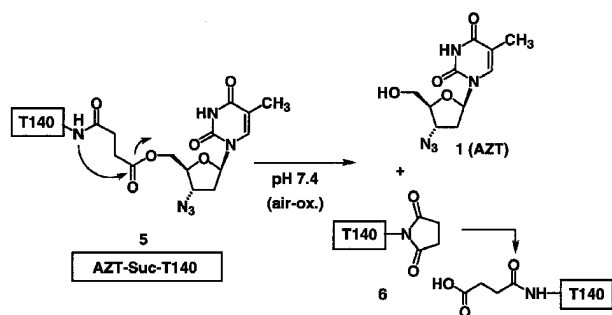


Fig. 19. Release of AZT by Formation of a Succinimide Derivative of T140 at a Physiological pH

た。⁴⁵⁾ 本法は、T140 等のペプチドリード医薬品を指向した非ペプチド化研究において有用な合成法になると期待している。実際、T140 のターン部分に (E)-アルケンジペプチドイソスターを導入した誘導体を合成し、T140 と同等の活性を有していることを確認した。

7. おわりに

以上、著者らは、現在最もホットなエイズ治療薬のターゲットの1つである HIV 第二受容体を標的とする化合物 T22, 及びより有用な T140, TC14012 を創製し、HIV 感染メカニズムの生化学的研究及び抗 HIV 剤開発研究に有益な基礎的知見を提供した (Fig. 21)。これらは、まだまだ実験段階を過ぎないが、ここで述べた coreceptor をターゲットとした抗 HIV 剤の開発研究は、治療薬使用の選択肢を増やすためにもより一層重要性を増してくると思われる。現在、T140 誘導体を基にさらなる低分子化及び非ペプチド化の研究を進めている。また、本研究を遂行するに際し、シスチン含有ペプチドの新

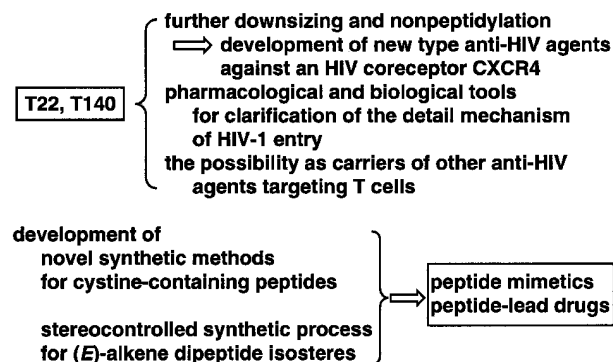


Fig. 21. Conclusion and Future Works

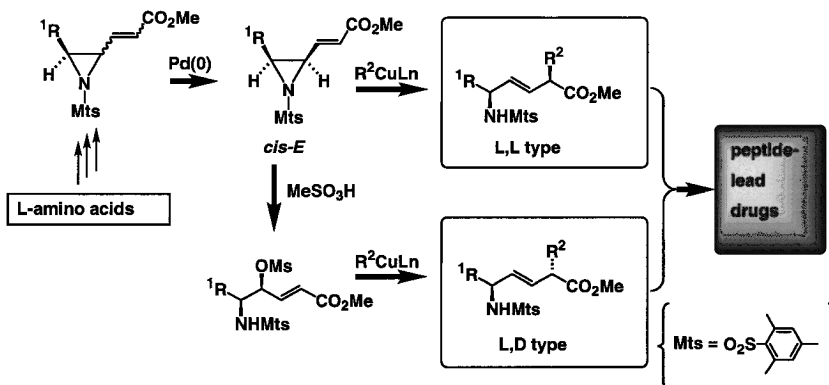


Fig. 20. Stereocontrolled Synthesis of (E)-Alkene-Pseudopeptides

規な合成法, 及び光学活性な2種の (*E*)-アルケンジペプチドイソスターの簡便な立体選択的合成法を開発し, これらは広く一般のペプチド及びペプチドミメティックスの化学合成において応用可能であることを示した. このように, 著者らは, 有機化学と生化学の学際領域にまたがる幅広い研究を展開することを心掛けており, 今後も医薬品化学の基礎研究に貢献していきたいと願っている.

謝辞 本研究を遂行するにあたり, 終始御指導御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科藤井信孝教授に深謝致します. また, 温かく見守り, 激励を賜りました恩師矢島治明名誉教授に深謝致します. また, T22, T140 誘導体に関する研究は, 当初から9年間, 東京医科歯科大学医学部山本直樹教授, 村上努博士 (現 琉球大学沖縄・アジア医学研究センター), 聖マリアンナ医科大学中島秀喜教授, 生化学工業株式会社協道典博士 (現 九州大学大学院工学研究科), 松本章義氏との共同研究によって行われたもので, 以上の先生方に深謝致します. さらに, 天然型の tachyplexin I の立体構造を解析して頂きました北海道大学大学院薬学研究科稲垣冬彦教授, T140 の立体構造を解析して頂きました小野薬品工業株式会社浜中信行博士に深謝いたします. また, 最近の T140 誘導体の CXCR4 阻害活性に関する研究では, 京都大学ウイルス研究所服部俊夫教授 (現 東北大学大学院医学研究科), 松岡雅雄教授に深謝致します. さらに, 終始ご助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科大高章助教授, 故井深俊郎教授に御礼申し上げます. また, 本研究に御協力頂きました北海道大学大学院理学研究科野水基義助教授, 京都大学大学院生命科学科松崎勝己助教授, 薬学研究科小出隆規博士 (現 徳島大学工学部), 増田正雄博士 (現 東京都老人総合研究所), 黒田正孝博士 (現 田辺製薬), 巾下広博士 (現 小野薬品), 寺川良司博修士 (現 田辺製薬), 石原常仁修士 (現 田辺製薬), 大曲垂香音修士 (現 日本新薬) をはじめ薬品有機製造学分野の皆様は厚く御礼申し上げます.

REFERENCES

- 1) Bloom F. E., *Science*, **274**, 1987–1989 (1996).
- 2) Mitsuya H., Erickson J., “Textbook of AIDS

Medicine,” ed. by Merigan T. C., Bartlett J. G., Bolognesi D., Williams & Wilkins, Baltimore, 1999, pp. 751–780.

- 3) Murakami T., Yamamoto N., *Protein Nucleic Acid and Enzyme*, **42**, 1427–1434 (1997), and references therein.
- 4) a) Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Marzio P. D., Marmon S., Sutton R. E., Hill C. M., Davis C. B., Peiper S. C., Schall T. J., Littman D. R., Landau N. R., *Nature*, **381**, 661–666 (1996); b) Dragic T., Litwin V., Allaway G. P., Martin S. R., Huang Y., Nagashima K. A., Cayan C., Maddon P. J., Koup R. A., Moore J. P., Paxton W. A., *ibid.*, **381**, 667–673 (1996); c) Alkhatib G., Combadiere C., Broder C. C., Feng Y., Kennedy P. E., Murphy P. M., Berger E. A., *Science*, **272**, 1955–1958 (1996); d) Choe H., Farzan M., Sun Y., Sullivan N., Rollins B., Ponath P. D., Wu L., Mackay C. R., LaRosa G., Newman W., Gerard N., Gerard, C., Sodroski J., *Cell*, **85**, 1135–1148 (1996); e) Doranz B. J., Rucker J., Yi Y., Smyth R. J., Samson M., Peiper S. C., Parmentier M., Collman R. G., Doms R. W., *ibid.*, **85**, 1149–1158 (1996); f) Samson M., Libert F., Doranz B. J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.-M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Muyldermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R. J., Collman R. G., Doms R. W., Vassart G., Parmentier M., *Nature*, **382**, 722–725 (1996).
- 5) Feng Y., Broder C. C., Kennedy P. E., Berger E. A., *Science*, **272**, 872–877 (1996).
- 6) a) Tamamura H., *Saishin Igaku*, **53**, 2040–2046 (1998); b) Tamamura H., Fujii N., *Bio-Medical Engineering*, **12**, 44–51 (1998).
- 7) Cocchi F., DeVico A. L., Garzino-Demo A., Arya S. K., Gallo R. C., Lusso P., *Science*, **270**, 1811–1815 (1995).
- 8) a) Nagasawa T., Kikutani H., Kishimoto T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 2305–2309 (1994); b) Bleul C. C., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark-Lewis I., Sodroski J., Springer T. A., *Nature*, **382**, 829–833 (1996); c) Oberlin E., Amara A., Bachelier F., Bessia C., Virelizier J.-L., Arenzana-Seisdedos F., Schwartz O., Heard J.-M., Clark-Lewis I., Le-

- gler D. F., Loetscher M., Baggiolini M., Moser B., *ibid.*, **382**, 833–835 (1996); d) Tashiro K., Tada H., Heilker R., Shirozu M., Nakano T., Honjo T., *Science*, **261**, 600–603 (1993).
- 9) a) Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y., *J. Biol. Chem.*, **263**, 16709–16713 (1988); b) Miyata T., Tokunaga F., Yoneya T., Yoshikawa K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y., *J. Biochem.*, **106**, 663–668 (1989); c) Muta T., Fujimoto T., Nakajima H., Iwanaga S., *ibid.*, **108**, 261–266 (1990).
- 10) Mitsuya H., Weinhold K. J., Furman F. A., St. Clair M. H., Lehrman S. N., Gallo R. C., Bolognesi D., Barry D. W., Broder, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 7076–7100 (1985).
- 11) a) Masuda M., Nakashima H., Ueda T., Naba H., Ikoma R., Otaka A., Terakawa Y., Tamamura H., Ibuka T., Murakami T., Koyanagi Y., Waki M., Matsumoto A., Yamamoto N., Funakoshi S., Fujii N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 845–850 (1992); b) Nakashima H., Masuda M., Murakami T., Koyanagi Y., Matsumoto A., Fujii N., Yamamoto N., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 1249–1255 (1992).
- 12) a) Murakami T., Nakajima T., Koyanagi Y., Tachibana K., Fujii N., Tamamura H., Yoshida N., Waki M., Matsumoto A., Yoshie O., Kishimoto T., Yamamoto N., Nagasawa T., *J. Exp. Med.*, **186**, 1389–1393 (1997); b) Murakami T., Yamamoto N., *Protein Nucleic Acid and Enzyme*, **43**, 677–685 (1998).
- 13) Otaka A., Fujii N., *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, **48**, 658–671 (1990).
- 14) Otaka A., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 54–67 (2000).
- 15) Fujii N., Otaka A., Watanabe T., Okamachi A., Tamamura H., Yajima H., Inagaki Y., Nomizu M., Asano K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 283–284 (1989).
- 16) a) Fujii N., Otaka A., Okamachi A., Watanabe T., Arai H., Tamamura H., Funakoshi S., Yajima H., “Peptides 1988: Proceedings of the 20th European Peptide Symposium, 1988,” ed. by Jung G., Bayer E., Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1989, pp. 58–60; b) Tam J. P., Wu C.-R., Liu W., Zhang J.-W., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6657–6662 (1991).
- 17) Tamamura H., Otaka A., Nakamura J., Okubo K., Koide T., Ikeda K., Fujii N., *Tetrahedron Lett.*, **34**, 4931–4934 (1993).
- 18) Tamamura H., Otaka A., Nakamura J., Okubo K., Koide T., Ikeda K., Ibuka T., Fujii N., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **45**, 312–319 (1995).
- 19) Tamamura H., Murakami T., Masuda M., Otaka A., Takada W., Ibuka T., Nakashima H., Waki M., Matsumoto A., Yamamoto N., Fujii N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1729–1735 (1994).
- 20) Tamamura H., Matsumoto F., Sakano K., Otaka A., Ibuka T., Fujii N., *Chem. Commun.*, **1998**, 151–152 (1998).
- 21) Tamamura H., Arakaki R., Funakoshi H., Imai M., Otaka A., Ibuka T., Nakashima H., Murakami T., Waki M., Matsumoto A., Yamamoto N., Fujii N., *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 231–238 (1998).
- 22) Tamamura H., Xu Y., Hattori T., Zhang X., Arakaki R., Kanbara K., Omagari A., Otaka A., Ibuka T., Yamamoto N., Nakashima H., Fujii N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 877–882 (1998).
- 23) Koide T., Otaka A., Suzuki H., Fujii N., *Synlett*, **1991**, 345–346 (1991).
- 24) Tamamura H., Ishihara T., Otaka A., Koide T., Miyoshi T., Ibuka T., Fujii N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 1911–1912 (1996).
- 25) Tamamura H., Ishihara T., Oyake H., Imai M., Otaka A., Ibuka T., Arakaki R., Nakashima H., Murakami T., Waki M., Matsumoto A., Yamamoto N., Fujii N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 495–500 (1998).
- 26) Tamamura H., Kuroda M., Masuda M., Otaka A., Funakoshi S., Nakashima H., Yamamoto N., Waki M., Matsumoto A., Lancelin J. M., Kohda D., Tate S., Inagaki F., Fujii N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1163**, 209–216 (1993).
- 27) Endres M. J., Clapham P. R., Marsh M., Ahuja M., Turner J. D., McKnight A., Thomas J. F., Stoebenau H. B., Choe S., Vance P.

- J., Wells T. N., Power C. A., Sutterwala S. S., Doms R. W., Landau N. R., Hoxie J. A., *Cell*, **87**, 745–756 (1996).
- 28) Waki M., Waki K., Miyamoto K., Matsumoto A., Tamamura H., Fujii N., Murakami T., Nakashima H., Yamamoto N., *Chem. Lett.*, **1996**, 571–572 (1996).
- 29) Tamamura H., Waki M., Imai M., Otaka A., Ibuka T., Waki K., Miyamoto K., Matsumoto A., Murakami T., Nakashima H., Yamamoto N., Fujii N., *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 473–479 (1998).
- 30) Matsuzaki K., Fukui M., Fujii N., Miyajima K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 259–264 (1991).
- 31) Otaka A., Tamamura H., Terakawa Y., Masuda M., Koide T., Murakami T., Nakashima H., Matsuzaki K., Miyajima K., Ibuka T., Waki M., Matsumoto A., Yamamoto N., Fujii N., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1669–1672 (1994).
- 32) Tamamura H., Sugioka M., Odagaki Y., Omagari A., Kan Y., Oishi S., Nakashima H., Yamamoto N., Peiper S. C., Hamanaka N., Otaka A., Fujii N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 359–362 (2001); *idem, ibid.*, **11**, 2409 (2001).
- 33) Xu Y., Tamamura H., Arakaki R., Nakashima H., Zhang X., Fujii N., Uchiyama T., Hattori T., *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, **15**, 419–427 (1999).
- 34) Tamamura H., Omagari A., Oishi S., Kanamoto T., Yamamoto N., Peiper S. C., Nakashima H., Otaka A., Fujii N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2633–2637 (2000).
- 35) Tamamura H., Omagari A., Hiramatsu K., Gotoh K., Kanamoto T., Xu Y., Kodama E., Matsuoka M., Hattori T., Yamamoto N., Nakashima H., Otaka A., Fujii N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 1897–1902 (2001).
- 36) Schols D., Struyf S., Van Damme J., Este J. A., Henson G., De Clercq E., *J. Exp. Med.*, **186**, 1383–1388 (1997).
- 37) Doranz B. J., Grovit-Ferbas K., Sharron M. P., Mao S.-H., Goetz M. B., Daar E. S., Doms R. W., O'Brien W. A., *J. Exp. Med.*, **186**, 1395–1400 (1997).
- 38) Nagasawa T., Nakajima T., Tachibana K., Iizasa H., Bleul C. C., Yoshie O., Matsushima K., Yoshida N., Springer T. A., Kishimoto T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 14726–14729 (1996).
- 39) Wang Z., Berson J. F., Zhang T., Cen Y.-H., Sun Y., Sharron M., Lu Z., Peiper S. C., *J. Biol. Chem.*, **273**, 15007–15015 (1998).
- 40) Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N., Nishikawa S.-I., Kitamura Y., Yoshida N., Kikutani H., Kishimoto T., *Nature*, **382**, 635–638 (1996).
- 41) Tamamura H., Omagari A., Hiramatsu K., Kanamoto T., Gotoh K., Kanbara K., Yamamoto N., Nakashima H., Otaka A., Fujii N., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2179–2187 (2001).
- 42) a) Ibuka T., Mimura N., Aoyama H., Akaji M., Ohno H., Miwa Y., Taga T., Nakai K., Tamamura H., Fujii N., Yamamoto Y., *J. Org. Chem.*, **62**, 999–1015 (1997); b) Ibuka T., Mimura N., Ohno H., Nakai K., Akaji M., Habashita H., Tamamura H., Miwa Y., Taga T., Fujii N., Yamamoto Y., *ibid.*, **62**, 2982–2991 (1997).
- 43) Tamamura H., Yamashita M., Muramatsu H., Ohno H., Ibuka T., Otaka A., Fujii N., *Chem. Commun.*, **1997**, 2327–2328 (1997).
- 44) a) Ibuka T., Habashita H., Otaka A., Fujii N., Oguchi Y., Uyehara T., Yamamoto Y., *J. Org. Chem.*, **56**, 4370–4382 (1991); b) Fujii N., Nakai K., Tamamura H., Otaka A., Mimura N., Miwa Y., Taga T., Yamamoto Y., Ibuka T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1995**, 1359–1371 (1995).
- 45) Tamamura H., Yamashita M., Nakajima Y., Sakano K., Otaka A., Ohno H., Ibuka T., Fujii N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 2983–2996 (1999).