

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：「標的酵素による活性化」のコンセプトに基づく抗 HIV 共有結合医薬
Anti-HIV covalent drugs based on target enzyme-mediated activation

研究開発実施期間：令和元年 12 月 19 日～令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：木村 康明
Yasuaki Kimura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻・講師
Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, Lecturer

II 研究開発の概要

共有結合医薬は、標的酵素と共有結合を形成してその機能を阻害する医薬分子で、高い阻害活性を有する。また阻害効果が不可逆的であり、持続性の高い阻害が期待できる。これらの優れた特性から、近年様々な酵素を標的とした共有結合阻害薬が開発されており、実際上市にまで至っている例も多い。しかし、共有結合医薬は標的以外のタンパク質と共有結合を形成する 경우가多く、それに由来する副作用が、共有結合医薬開発における大きな課題となっている。このような問題点を踏まえ、本研究では「標的酵素によって活性化される共有結合医薬」の戦略を提案し、それを抗 HIV 薬開発で実践する。本分子戦略では、阻害剤は標的酵素が行う酵素反応によって活性化されて初めて反応性を獲得するため標的外タンパク質との共有結合形成は起こらず、共有結合医薬の標的選択性の問題を解決する有力なアプローチとなる。

具体的には、レトロウイルスに対する抗ウイルス活性が期待される逆転写酵素阻害剤として、2'-修飾核酸アナログ（化合物 A）を考案した。これはポリメラーゼによりオリゴ核酸に組み込まれると、2'位に導入した求核性官能基により求電子性活性種を形成する。これがポリメラーゼ活性中心のアミノ酸残基と共有結合を形成し、その酵素活性を不可逆的に阻害すると考えられる。実際化合物 A のトリリン酸体を用いてウイルス性逆転写酵素を用いて 2 段階のプライマー伸長反応を行ったところ、不可逆阻害性を確認している。本研究では化合物 A の詳細な阻害メカニズムの解析と、各種誘導体の構造活性相関研究に取り組んだ。

メカニズム解析については、化合物 A をコア構造とする pull down 用分子プローブを開発し、それをを用いて標的タンパク質の回収、続く LC/MS/MS 解析により共有結合形成の有無・及びその形成位置の解析に取り組んだ。プローブの分子設計は以下の通り行った。化合物 A に導入した求核性官能基部位は標的酵素内での活性種放出

の土台となる。その部位から種々の長さのリンカーを導入し末端にアルキンを導入した。これが活性種生成に伴い求電子的なアルキン含有ユニットを放出し、これが標的酵素と共有結合を形成するメカニズムを推定した。本想定メカニズムに基づき上記の種々のプローブ合成を行った。プローブの合成は化合物 A の合成ルートに基づき、途中の求電子性鍵中間体に対しアルキントグユニットを含む求核性ユニットを導入した。保護基の変換・除去、活性体であるトリリン酸化を経て目的のプローブ分子を合成した。またトリリン酸型のプローブに加えて、あらかじめ基質となる DNA 鎖に対しプローブ相当分子を組み込んだオリゴ核酸を、ホスホロアミダイト逆合成法により合成した。続いて合成した種々のプローブについて *in vitro* での機能評価を行った。前者のトリリン酸型のプローブでは、ウイルス逆転写酵素による取り込みを評価したところ、アルキンまでのリンカー長が短いプローブについては、阻害剤と同等レベルの取り込みが確認され、プローブとしての有用性が示された。一方、DNA 組み込み型のプローブについては、種々プライマー伸長反応の条件を行ったが、続く塩基の取り込みは観測されなかった。この結果に関しては、逆合成法でプローブの組み込みに制限があり、組み込み可能なリンカー長のプローブでは想定する活性化体の形成が不可能であったためと推定される。*in vitro* でトリリン酸型プローブの妥当性を検証した後、実際のプルダウン実験を行った。*in vitro* 系では取り込み効率が低かったため、濃度や反応時間、添加物の最適化を行った。その最適化条件において、pull down 実験を行った。標的酵素とのプローブ処理後、アジドタグ含有デスチオビオチンとのクリック反応処理、ストレプトアビジンビーズによる回収によりクロスリンクしたタンパク質の回収を行った。LC/MS/MS 解析により分析を進めているが、これまでに想定する形での目的タンパク質の回収には至っていない。引き続き反応条件・プローブ分子構造の最適化等を通じて、解明研究を行う。

一方、化合物 A の誘導体の合成・及びそれらの活性評価により、構造活性相関研究を行った。化合物 A は核酸塩基としてアデニンを有する構造であったが、チミンおよびグアニン誘導体について開発を行った。前者では、反応性求核性ユニットを導入するための鍵中間体の不安定性のために、チミン塩基への保護基の導入が必要であった。種々の保護基の検討の結果、特殊な保護基であるニトロ基が有効であることを見出した。続く各種官能基・保護基変換等を経て、目的のチミン誘導体及びその Pro Tide 型プロドラッグを合成した。一方、グアニン誘導体については、修飾グアニンを含む合計 3 種類の合成を行った。こちらの誘導体では、核酸塩基の保護基は必要とせず合成を進めることが可能であり、ヌクレオシド体とプロドラッグ体それぞれについて合成した。

合成した各種誘導体の抗 HIV 評価を行ったところ、各塩基に応じた活性を示した。すなわちチミン誘導体では、化合物 A とは異なり抗 HIV 活性を示す前に、宿主細胞に対する毒性を示すことが明らかとなった。一方グアニン誘導体では、化合物 A と比べて抗 HIV 活性は劣るものであったが、本核酸アナログに特徴的な各種耐性 HIV 株に対する活性抵抗性を観測できた。

また核酸アナログに導入可能な新規リン酸プロドラッグの開発をも進めた。モデルの核酸アナログとしてジェムシタピンを用いて、リン酸部位に導入するアミノ基の置換基構造の検討を行ったところ、ニトロベンジル型の置換基が特に有効性が高いことを見出したため、当該官能基を化合物 A に搭載したプロドラッグ体の合成を行った。本新規プロドラッグ体については濃度依存的に抗 HIV 活性を示したものの、その活性は ProTide 型プロドラッグに劣るものであった。標的細胞に応じた構造最適化による活性向上の余地は大きく、現在はその構造最適化を進めている。

Covalent drugs are pharmaceutical molecules that form covalent bonds with target enzymes to inhibit their functions and have high inhibitory activity. In addition, the inhibitory effect is irreversible, and highly sustained inhibition can be expected. Because of these excellent characteristics, covalent bond inhibitors targeting various enzymes have been developed in recent years, and some of them have actually reached the market. However, covalent drugs often form covalent bonds with proteins other than the target, and the side effects resulting from this are a major issue in the development of covalent drugs. Based on these issues, we propose a strategy of "covalent drugs activated by the target enzyme. In this strategy, the inhibitor acquires reactivity only when it is activated by the enzymatic reaction carried out by the target enzyme.

Specifically, a 2'-modified nucleoside analog (compound A) was devised as a reverse transcriptase inhibitor that is expected to have antiviral activity against retroviruses. When incorporated into oligonucleotide by polymerase, it forms an electrophilic active species by introducing a nucleophilic functional group at the 2' position. This covalent bond is thought to form with the amino acid residue of the polymerase active center and irreversibly inhibit its enzymatic activity. In fact, the two-step primer elongation reaction using viral reverse transcriptase with the triphosphate form of compound A has confirmed the irreversible inhibitory activity. In this study, we worked on detailed analysis of the inhibition mechanism of compound A and structure-activity relationship studies of various derivatives.

For mechanistic analysis, we developed a molecular probe for pull-down using compound A as the core structure, and used it to recover covalently bond-forming proteins. The molecular design of the probe was as follows. The nucleophilic functional group introduced into compound A is the basis for the release of active species in the target enzyme. A linker of various lengths was introduced from the site, and an alkyne was introduced at the end. We hypothesized a mechanism by which the alkyne-containing unit, which is electrophilic, is released upon generation of the active species and forms a covalent bond with the target enzyme. Based on this postulated mechanism, we synthesized the various probes described above. The synthesis of the probes was based on the synthetic route of compound A. Nucleophilic units including alkyne tag units were introduced to the electrophilic key intermediate on the way. The target probe molecule was synthesized through conversion/removal of the protecting group and triphosphorylation as the active form. In addition to the triphosphate-type probes, oligonucleotides containing the probe equivalent molecules were synthesized by the reverse synthesis of the phosphoramidite method. Various probes were then evaluated *in vitro*. The former triphosphate-type probes were evaluated for uptake by viral reverse transcriptase, and those with short linker lengths to the alkyne showed uptake at the same level as that of the inhibitor, indicating their usefulness as probes. On the other hand, for DNA-embedded probes, no subsequent base incorporation was observed under various primer elongation conditions. After verifying the validity of the triphosphate-type probe *in vitro*, we performed actual pull-down experiments. Because of the low uptake efficiency in the *in vitro* system, we optimized the concentration, reaction time, and additives. The pull down experiment was performed under the optimized conditions. After probing with the target enzyme, the cross-linked proteins were recovered by click reaction treatment with azide tag-containing desthiobiotin and recovery with streptavidin beads. However, we have not been able to recover the target protein in the expected form. We will continue our research for clarification through optimization of conditions, etc.

On the other hand, structure-activity relationship studies were conducted by synthesizing derivatives of compound A and evaluating their activities. Compound A has a structure with adenine as the nucleobase, and we developed thymine and guanine derivatives. In the former, the introduction of a protecting group on the thymine base was necessary due to the instability of the key intermediate for introducing the reactive nucleophilic unit. After examining various protective groups, we found that a special protective group, nitro group, was effective. After conversion of various functional and protecting groups, the desired thymine derivatives and their prodrugs in the ProTide type were synthesized. On the other hand, a total of three guanine

derivatives, including a modified guanine, were synthesized. These derivatives do not require any protecting group of nucleobase, and were synthesized as nucleoside and prodrug forms, respectively. Anti-HIV activity evaluation of the various synthesized derivatives showed activity according to each base. The thymine derivative, unlike compound A, showed toxicity to host cells before exhibiting anti-HIV activity. On the other hand, the guanine derivative showed inferior anti-HIV activity compared to compound A, but showed resistance to various resistant HIV strains, which is characteristic of this nucleoside analog.

We also developed a novel phosphate prodrug that can be introduced into the nucleoside analog. Using Gemcitabine as a model nucleoside analog, we investigated the substituent structure of the amino group to be introduced into the phosphoric acid moiety, and found that a nitrobenzyl substituent was particularly effective. Although the new prodrug showed concentration-dependent anti-HIV activity, the activity was inferior to that of the ProTide-type prodrug. Since there is a high possibility of improving the activity by optimizing the structure suitable for the target cell, we are currently working on the structural optimization of the prodrug.