

## 論文の内容の要旨

論文題目 HIV-1インテグラーゼ阻害剤JTK-303 (elvitegravir) の創薬研究

氏名 佐藤 元秀

### 序論

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) はプラス鎖の一本鎖 RNA を持ち、レトロウイルス科レンチウイルスに属する。HIV には HIV-1 と HIV-2 の 2 種類のタイプがあり、世界的に拡散しているのは HIV-1 である。HIV は、ヒトの CD4 陽性 T リンパ球などの免疫担当細胞に感染し、増殖しながら感染細胞を徐々に破壊していく。その結果、免疫力が低下し、種々の日和見感染症を併発する後天性免疫不全症候群 (AIDS) を発症する。

HIV の生活環において、ウイルスの逆転写酵素、プロテアーゼおよびインテグラーゼが重要な役割を果たしており、これらを標的とした抗 HIV 薬の研究開発が進められてきた。逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤および逆転写酵素アロステリック阻害剤の上市に伴い、抗 HIV 療法は単剤療法から多剤併用療法 (cART) へと進歩した。cART により、HIV 感染者の生命予後は劇的に改善し、致命的疾患であった AIDS は、現在では慢性疾患と位置付けられるようになった。しかしその一方で、抗 HIV 薬を長期間服薬することにより、耐性ウイルスが出現するという新たな問題が生じた。このような背景のもと、まだ医薬品が創製されていなかったインテグラーゼ阻害剤に大きな注目が集まった。

インテグラーゼは、ウイルス DNA の両 3'-末端 2 残基を切断する 3'-processing 反応と、3'-processing 反応により生成した 3'-末端をヒト DNA に挿入する strand transfer 反応を触媒する酵素である。この酵素反応には、酵素の活性中心において、DDE モチーフと呼ばれる 3 つの酸性アミノ酸残基 (Asp<sup>64</sup>、Asp<sup>116</sup> および Glu<sup>152</sup>) と 2 つの Mg<sup>2+</sup> イオンが関与している。2000 年に、化合物 **1**、**2** がインテグラーゼの strand transfer 反応を阻害し、抗 HIV 活性を示すことを米国 Merck 社のグループが報告した (図 1)。これらの化合物は酵素の活性中心に作用し、 $\alpha,\gamma$ -ジケト ( $\alpha$ -エノール- $\gamma$ -ケト) カルボン酸部分が、2 つの Mg<sup>2+</sup> イオンに配位することで阻害活性を示すと考えられている (図 2)。

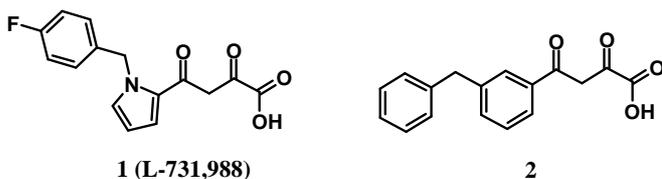


図 1 HIV-1 integrase strand transfer 阻害剤

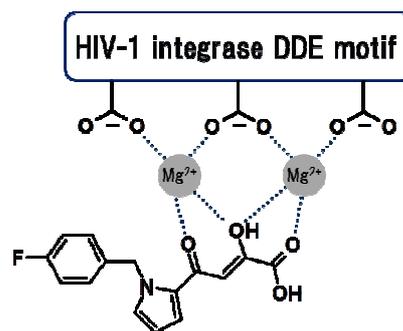


図 2 化合物 1 の推定阻害様式

この報告を端緒として、インテグラーゼ阻害剤の探索が欧米の大手製薬企業を中心に活発に行われ、2007年に raltegravir が first-in-class として FDA から承認された。しかしながら、承認薬に辿り着くまでにはいくつもの化合物が毒性により開発の中止を余儀なくされている。

インテグラーゼが創薬標的として注目が高まる中、2002年に著者も、医薬品としての HIV-1 インテグラーゼ阻害剤を創製することを目的として創薬研究を開始した。

### リード化合物の創出

まずオリジナリティーのある良質なリード化合物の探索を行った。1、2 が有する特徴的な  $\alpha, \gamma$ -ジケトカルボン酸構造のバイオイソスターとして、4-キノロン-3-グリオキシル酸体 3 を合成したが、酵素阻害活性は認められなかった。しかしその一方で、3 の類縁体として合成した 4-キノロン-3-カルボン酸体 4 に酵素阻害活性 ( $IC_{50} = 1630 \text{ nM}$ ) が認められた (表 1)。

ただし 4 の活性は、2 ( $IC_{50} = 50 \text{ nM}$ ) と比較して約 1/30 の強度であった。この活性の差は、化合物の配位力の差に起因しているのではないかと考察した。2 の scaffold は、2つの  $Mg^{2+}$  イオンと 5 員環と 6 員環を形成して配位すると考えられている。同様に考えると、4 の scaffold は 4 員環と 6 員環を形成して配位すると推測される。4 は不利なジオメトリーで配位するため、その配位力は 2 と比較して弱いであろうと考えられる (図 3)。

表 1 化合物 2-4 の酵素阻害活性と抗 HIV 活性

compound	Inhibition of Strand Transfer	Antiviral Activity	Cytotoxicity
	$IC_{50}$ (nM)	$EC_{50}$ (nM)	$CC_{50}$ (nM)
2	50	440	> 30000
3	> 100000	> 30000	> 30000
4	1630	> 30000	> 30000

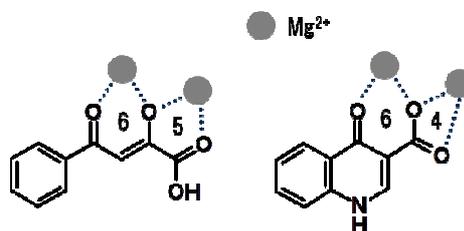


図 3  $Mg^{2+}$  イオンとの推定配位様式

配位力が弱いという特徴は活性面では不利であるが、金属イオンとの非特異的な強い配位は毒性に繋がる懸念があることから、安全性面では有利ではないかと考えた。さらに 4 の scaffold

は、抗菌薬として承認されているキノロンカルボン酸骨格であることから、医薬品として好ましいプロファイルの scaffold であるとも考えた。ジケトカルボン酸型化合物の多くが安全性の問題で開発を中止していたことから、前例のないモノケトカルボン酸型化合物 **4** をリード化合物として、以下の方針で構造活性相関研究を進め、目的とする阻害剤を創製することとした。

- 1) まず酵素阻害活性を指標に、インテグラーゼのポケットの大きさや性質（疎水性または極性）を推測しながら各部位の構造変換を行う。
- 2) その後、高活性を示した各部位の構造を組み合わせで最適化を行う。

### リード化合物 **4** から JTK-303 (elvitegravir) の創製

まず **4** のベンジル基について、ベンゼン環の置換基の検討を実施した。その結果、パラ位にクロロ基を導入すると酵素阻害活性が消失した。このことから、パラ位の方角には空間がほとんどないと考えられた。一方、オルト位ではクロロ基やフルオロ基の導入により、またメタ位ではクロロ基の導入により酵素阻害活性の向上が認められ、さらにそれらを組み合わせた **5** において、大幅に酵素阻害活性が向上するとともに、抗 HIV 活性が認められた。

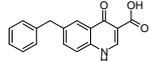
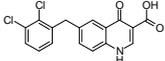
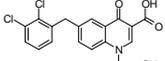
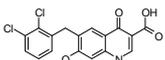
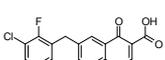
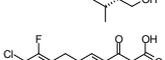
次に **5** を基に、キノロン環 1 位に置換基の導入を実施した。低級アルキル基を導入した一連の化合物で **5** と同等以上の酵素阻害活性が認められ、また抗 HIV 活性は向上したことから、この部位はある程度の空間があると考えられた。さらに極性基について種々検討したところ、ヒドロキシエチル基が活性の向上に大きく寄与することがわかり、**6** に強力な酵素阻害活性、抗 HIV 活性が認められた。

続いて **6** を基に、キノロン骨格のベンゼン環に置換基の導入を実施した。まず **5**、**7** および **8** 位にそれぞれフルオロ基を導入したところ、**7** 位にフルオロ基を導入した化合物のみ活性が保持された。そこで **7** 位についてさらに検討したところ、**7**-メトキシ体 **7** で酵素阻害活性、抗 HIV 活性が約 2 倍向上した。

また、**7** のベンジル基のベンゼン環の置換基については、オルト位のクロロ基をフルオロ基で置換した化合物において、**7** と同等以上の活性が認められた。

**1** 位については、前述の通り、低級アルキル基の導入により抗 HIV 活性が向上したことから、ヒドロキシエチル基との組み合わせを検討した。その結果、窒素原子の  $\alpha$  位に (*S*)-アルキル基を導入した一連の化合物で活性が

表 2 化合物 **4-9** の酵素阻害活性と抗 HIV 活性

compound	Inhibition of Strand Transfer IC <sub>50</sub> (nM)	Antiviral Activity EC <sub>50</sub> (nM)	Cytotoxicity CC <sub>50</sub> (nM)	
<b>4</b>		1630	440	> 30000
<b>5</b>		70	3400	12600
<b>6</b>		21	100	> 6000
<b>7</b>		12	60	4200
<b>8</b>		8.2	7.5	14000
<b>9</b> (JTK-303)		7.2	0.9	4000

向上した。特に抗 HIV 活性は、アルキル基が嵩高くなるにつれて向上し、**8** は  $10^9$  レベルの  $EC_{50}$  値を示した。

最後に、高活性を示した各部位の構造を組み合わせて最適化を実施した。その結果、さらに抗 HIV 活性が向上した開発化合物 **9** (JTK-303) を見いだすに至った。なお **9** の抗 HIV 活性と細胞毒性 ( $CC_{50}$  値) との間には、4000 倍以上の乖離が認められた (表 2)。

JTK-303 について、さらに詳細な薬理、薬物動態および毒性試験が実施された。

その結果を以下に示す。

- *In vitro* において、インテグラーゼの strand transfer 反応を選択的に阻害し、野生株のみならず各種サブタイプの臨床分離株、薬剤耐性の臨床分離株に対しても、幅広く強力な抗 HIV 活性を示した。
- バイオアベイラビリティはラットで 34%、イヌで 30%であった。
- ラット、イヌの慢性毒性試験をはじめ、各種毒性試験において問題となる毒性所見は認められなかった。

## 結論

本研究において以下の成果を得た。

- 1) 医薬品としての HIV-1 インテグラーゼ阻害剤を創製する目的で、まずはリード化合物の創出を行い、従来のジケトカルボン酸型化合物とは異なる scaffold を持つモノケトカルボン酸型化合物 **4** を見出した。
- 2) リード化合物 **4** について、構造活性相関研究を進めた結果、強力な酵素阻害活性と抗 HIV 活性を示す JTK-303 ( $IC_{50} = 7.2$  nM,  $EC_{50} = 0.9$  nM) の創製に成功した。
- 3) JTK-303 は、*in vitro* においてインテグラーゼの strand transfer 反応を選択的に阻害し、各種サブタイプの臨床分離株、薬剤耐性の臨床分離株に対しても、幅広く強力な抗 HIV 活性を示した。また JTK-303 は、良好な薬物動態プロファイルを示すとともに各種毒性試験において問題となる毒性所見が認められなかった。

## おわりに

JTK-303 (一般名 elvitegravir) は、導出先の Gilead 社が海外で実施した HIV 陽性者対象の 10 日間反復投与試験において、血中ウイルス量を最大約 1/100 に低下させること、および CYP3A 阻害剤との併用により、1 日 1 回の服薬が可能となることが示された。序論にも述べた通り、抗 HIV 療法は多剤併用療法が基本であり、これに服薬利便性を考慮して JTK-303、CYP3A 阻害剤および 2 種類の逆転写酵素阻害剤を合剤化し、1 日 1 回 1 錠の服薬で済む配合錠の開発が進められた。Gilead 社が海外で実施した第 3 相試験の結果、この配合錠は対照薬と同等の有効性、安全性を示し、2012 年に米国で承認され、STRIBILD®として製品化された。