

【要約】

COVID-19 治療薬としてのフラレン誘導体の開発

82054034 片岸 大紀

指導教員 熊谷 直哉 教授

担当教員 大江 知之 准教授

【背景】

新型コロナウイルス感染症 (Coronavirus disease 2019: COVID-19) は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) を原因ウイルスとする急性呼吸器疾患である。2019 年 12 月に中華人民共和国湖北省武漢市で最初の発生が報告されて以来、世界中に感染が拡大しており、2023 年 1 月現在でもパンデミックは終息していない。

COVID-19 治療薬として、SARS-CoV-2 の生活環のさまざまな点を標的とした抗ウイルス薬の開発が進められているが、抗ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 薬や抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 薬の転用例の報告も多い。中でも SARS-CoV-2 のメインプロテアーゼ (M^{pro}) は、Cys145 と His41 からなる触媒 2 残基を持つシステインプロテアーゼである。この 2 つのアミノ酸は、ウイルスのポリタンパク質から機能性タンパク質への変換過程において、His41 のイミダゾール基が Cys145 のチオール基を活性化することで加水分解反応を促進する重要な役割を担っており、抗ウイルス薬の標的として有望であると考えられている。実際に日本でも M^{pro} を標的とした治療薬が既に承認されている。

一方、フラレンは、Kroto らにより発見されたサッカーボール型の C_{60} に代表される第 3 の炭素同素体である。その球状の縮合芳香環構造に由来した物理化学的性質は非常にユニークであり、さまざまな分野で応用研究が行われている。創薬分野においても、既存の医薬品にはない新奇の骨格であるフラレンの医薬品応用を目指し、その水溶性の低さを化学的誘導体化により改善した多くの水溶性誘導体が合成され、その生物活性が調べられてきた。慶應義塾大学薬学部医薬品化学講座でもこれまでに、さまざまな C_{60} 誘導体が、HIV や HCV に対する抗ウイルス活性を有することを明らかにしてきた。

【目的】

抗 HIV 薬や抗 HCV 薬が COVID-19 治療に転用できることが報告されていることから、HIV や HCV に対する抗ウイルス活性を有する C_{60} 誘導体も、COVID-19 の治療薬候補となる可能性があると考えた。

本研究では、新規に合成した誘導体を含むさまざまなタイプの置換基を有する C_{60} 誘導体の COVID-19 治療薬としての応用の可能性を、SARS-CoV-2 M^{pro} に対する阻害作用を指標として検討した。

【新規 C₆₀ 誘導体の合成】

最初にさまざまなタイプの置換基を有する C₆₀ 誘導体の SARS-CoV-2 M^{Pro} 阻害作用を評価した結果、いくつかの誘導体が阻害作用を示すことが明らかとなった。そこで、さらなる構造展開によりその構造活性相関の探索を行うこととし、新規 C₆₀ 誘導体を合成した。

複素環を有する C₆₀ 誘導体の合成

SARS-CoV-2 M^{Pro} 阻害作用を示した C₆₀ 誘導体の中でも Fig. 1 に示す *cis*-7 (Fig. 1) は、これまで医薬品化学講座において HIV の複製に関わるさまざまな酵素を阻害することが示され、細胞系でも抗 HIV 活性を示したことから、抗ウイルス薬として有望であると考えられている。そこで、周辺の構造活性相関を探ることを目的とし、他の複素環を導入した **9-11** を新たにデザイン・合成した (Scheme 1, 2)。

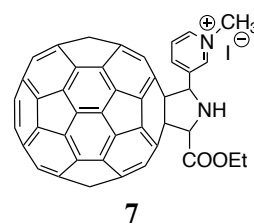
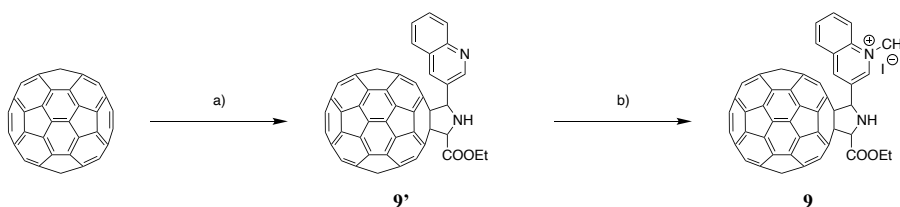
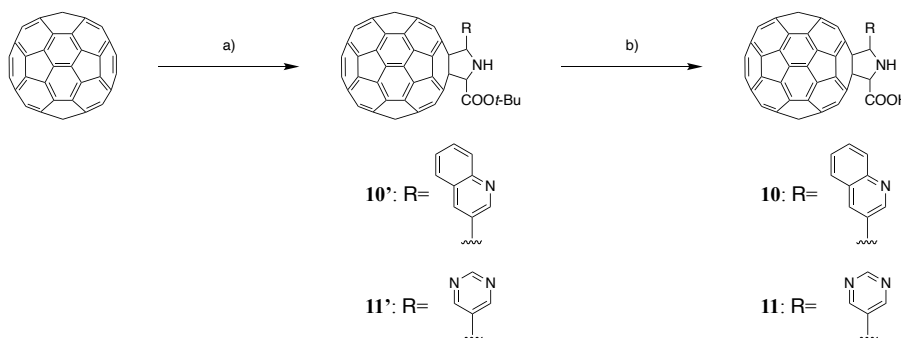


Fig 1 C₆₀ 誘導体 7

1,3-双極子付加環化反応 (Prato 反応) により C₆₀ 上にピロリジン環を構築した後、**9** は iodomethane によるキノリン環窒素のメチル化、**10, 11** は trifluoromethanesulfonic acid による *tert*-ブチルエステルの脱保護により目的物を得た。



Scheme 1 **9** の合成 a) Quinoline-3-carboxaldehyde, glycine ethyl ester hydrochloride, diisopropylethylamine, toluene, reflux
b) Iodomethane, r.t., dark

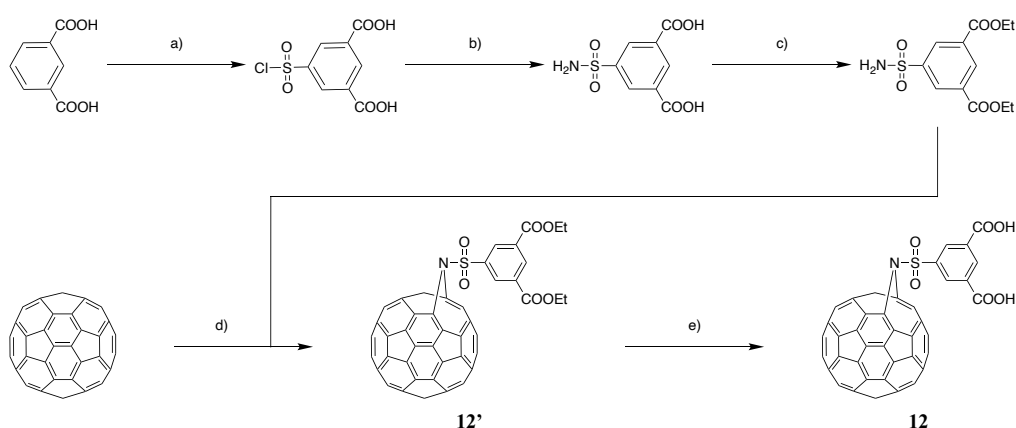


Scheme 2 **10, 11** の合成 a) Corresponding aldehyde, glycine *tert*-butyl ester hydrochloride, diisopropylethylamine, toluene, reflux
b) Trifluoromethanesulfonic acid, dry toluene, r.t.

アザフレロイド誘導体の合成

C₆₀ の 5 員環と 6 員環の接合部 ([5,6]-結合) の炭素-炭素結合が開裂し窒素で架橋されたアザフレロイドと呼ばれる化合物群は C₆₀ 本来の 60 π 電子共役系を維持しており、生物活性の点でも興味深い誘導体群であると言える。そこで、スルホンアミド構造を有し水溶性向上のためにカルボキシ基を 2 つ導入したアザフレロイド **12** を合成した (Scheme 3)。

置換基部分の合成を行った後に、*N*-iodosuccinimide を用いたラジカル反応により C₆₀ 上に付加、エチルエステルの脱保護により目的物を得た。



Scheme 3 **12** の合成 a) Chlorosulfuric acid, reflux b) 2 mol/L ammonia methanol solution, r.t. c) Thionyl chloride, dry ethanol, 60 °C
d) *N*-iodosuccinimide, *o*-dichlorobenzene, 80 °C e) 1. Sodium hydride, 2. methanol, 3. 2 M HCl, dry toluene, r.t.

【SARS-CoV-2 M^{Pro} 阻害作用の評価】

市販の SARS-CoV-2 M^{Pro} 活性測定キットは、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理を利用するものである。C₆₀ 誘導体が蛍光を消光する可能性を考慮し、プロテアーゼ反応により生成したペプチド断片を LC-MS を用いて定量する評価系を新たに確立して、Fig. 2 に示す種々の C₆₀ 誘導体の M^{Pro} 阻害作用を評価した。

SARS-CoV-2 M^{Pro} 阻害試験

SARS-CoV-2 M^{Pro} (100 ng/mL) を含む反応液に NSP4-NSP5 接合部を模した基質ペプチド (50 μ g/mL) を加えてペプチドを切断した。1 時間後、生成したペプチド断片を LC-MS の SIM モードで得られるクロマトグラムにおけるピーク面積から定量することで M^{Pro} 阻害作用を測定した。ポジティブコントロールには HCV プロテアーゼ阻害薬であり、SARS-CoV-2 M^{Pro} 阻害作用を示すことが報告されている boceprevir を用いた。

各化合物 1.0 μ M 添加時の酵素残存活性を Fig. 3 に示す。

19 種の誘導体の中でマロン酸型 (**1, 2**) が特に強い阻害作用を示した。

他の数種の誘導体も阻害作用を示し、カルボキシ基の数がその強さに関係している可能性が示唆された。

本研究で新規に合成した複素環導入型 (*trans*-**9**, *trans*-**10**, *cis*-**11**) はそれほど強い阻害作用を示さなかった。一方、アザフレロイド **12** は比較的強い阻害作用を示した。C₆₀ の 60π 電子共役系を維持しているアザフレロイドの生物活性の報告はほとんどないため、本結果は重要な知見と言える。

以上の結果により、さまざまな C₆₀ 誘導体が SARS-CoV-2 M^{PRO} 阻害作用を示し、その強さは誘導体により異なることが示された。

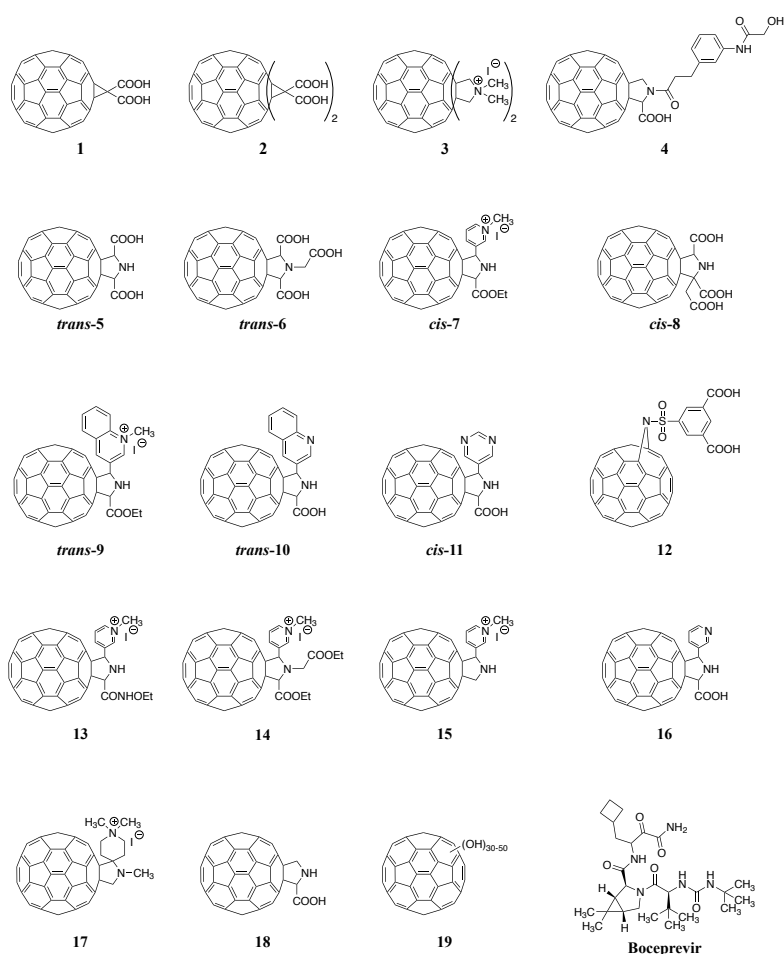


Fig. 2 被験化合物

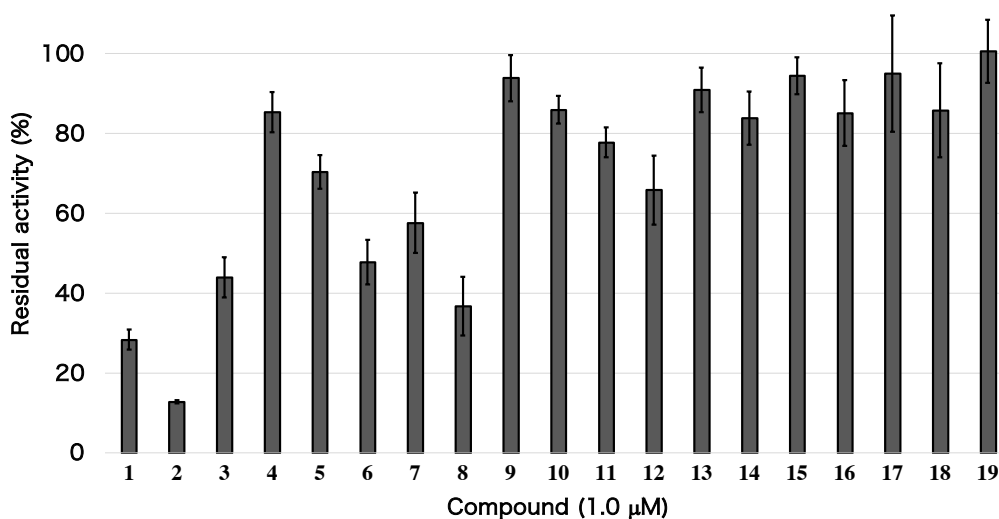


Fig. 3 各化合物 1.0 μM 添加時の SARS-CoV-2 M^{PRO} 残存活性

1.0 μM 添加で阻害作用を示した誘導体に関しては、 IC_{50} 値の算出も行った。

強力な阻害作用を示すマロン酸型誘導体 **1** および **2**、カルボン酸型誘導体 *trans*-**6**、複素環型誘導体 *cis*-**7**、アザフレロイド **12** の IC_{50} 値は、それぞれ 0.53、0.20、0.98、1.2、1.6 μM であった。boceprevir の IC_{50} 値は 28 μM であり、評価した C_{60} 誘導体は boceprevir に比べて強い阻害作用を有することが示された。特にマロン酸型誘導体 **2** は、 IC_{50} 値が boceprevir より 2 オーダー低い極めて強い阻害作用を示した。

【細胞毒性の評価】

正常細胞モデル細胞として汎用されているマウス胎児線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて、強い SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を示した **1**、**2**、*trans*-**6**、*cis*-**7**、**12** に関して、細胞毒性を評価した結果、いずれも 30 μM までは細胞毒性を示さないことが確認された。

【立体異性体間における活性の比較】

筆者の修士課程研究において、 C_{60} 誘導体の HIV プロテアーゼや HCV RNA ポリメラーゼに対する阻害作用に立体異性体間で差がある可能性が示された。そこで、SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用に関しても、阻害作用が比較的強い **7** を用いて立体異性体間で差があるかを検討することとした。まずは不斉触媒を用いて **7** の立体選択的合成を行ったが、良好な鏡像体過剰率で目的物を得ることができなかつたため、キラル固定相を有する HPLC を用いて光学分割を行い、得られた 4 種の立体異性体に関して、鏡像体過剰率を算出した。

また、それぞれに関して円偏光二色性 (CD) 分析を行い、指紋領域である 430 nm 付近に観測されたコットン効果の正負から、Martín らにより提唱されたセクタールールに従い絶対立体配置を決定した (Table 1)。

Table 1 分取した各立体異性体の鏡像体過剰率と絶対立体配置

<i>cis/trans</i>	溶出順	鏡像体過剰率 (%)	絶対立体配置
<i>cis</i>	1	>99	2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>
<i>cis</i>	2	94.0	2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>
<i>trans</i>	1	>99	2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>
<i>trans</i>	2	95.6	2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>

分取した各立体異性体の DMSO 溶液の濃度を、別途ラセミ体を用いて濃度既知の DMSO 溶液を調製して作成した検量線をもとに算出し、希釈を行い、SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を評価した。その結果、**7** の立体異性体間で強さの差はほぼ見られなかつた。

【結論】

C₆₀ 誘導体の COVID-19 治療薬としての応用の可能性を、SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を指標として検討するため、評価系を新たに確立し、既存の誘導体に加え、7 の構造をもとに他の複素環を導入した 9-11 および C₆₀ 本来の 60 π 電子共役系を維持するアザフレロイド 12 をデザイン・合成し、1-19 の SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を評価した。

マロン酸型 (1, 2) が 19 種の誘導体の中で特に強い阻害作用を示した。他の数種の誘導体も阻害作用を示し、カルボキシ基の数がその強さに関係している可能性が示唆された。本研究で新規に合成した複素環導入型 (9-11) はそれほど強い阻害作用を示さなかった。一方、アザフレロイド 12 は比較的強い阻害作用を示した。60 π 電子共役系を維持するアザフレロイドの生物活性の報告はほぼないため、本結果は重要な知見と言える。

以上のことから、2 は細胞毒性を示さず、SARS-CoV-2 M^{pro} に対して強い阻害作用を示し、COVID-19 の治療薬候補となる可能性がある。しかし、この化合物は複数の位置異性体の混合物であり、それぞれの異性体を単離し、個別の阻害作用を評価する必要がある。また、C₆₀ 誘導体によって阻害作用の強さに顕著な差があることも明らかとなり、より詳細な構造活性相関を明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

また、阻害作用が比較的強い 7 に関して、キラル固定相を有する HPLC による光学分割を行い、M^{pro} 阻害作用を評価したが、立体異性体間で強さの差はほぼ見られなかった。

【謝辞】

本研究の一部は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2123 および 2022 年度慶應義塾博士課程学生研究支援プログラムの助成を受けたものです。この場をお借りして、御礼申し上げます。

【主論文に関する原著論文】

Daiki Katagishi, Daisuke Yasuda, Kyoko Takahashi, Shigeo Nakamura, Tadahiko Mashino, Tomoyuki Ohe, Fullerene derivatives as inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2023**, *80*, 129121.

【参考論文】

Daisuke Yasuda, Ipei Yoshida, Riyo Imamura, Daiki Katagishi, Kyoko Takahashi, Hirotsu Kojima, Takayoshi Okabe, Yoshinobu Ichimura, Masaaki Komatsu, Tadahiko Mashino, Tomoyuki Ohe, Development of p62-Keap1 protein-protein interaction inhibitors as doxorubicin-sensitizers against non-small cell lung cancer, *Results in Chemistry*, **2022**, *4*, 100609.