

1, 2, 5-チアジアゾール誘導体の合成とその抗HIV活性

花	崎	保	彰
藤	原	将	寿
井	出	輝	彦
渡	邊	博	幸
勝	浦	公	男

Synthesis and Anti-HIV Activity of 1,2,5-Thiadiazole Derivatives

Yasuaki HANASAKI
 Masatoshi FUJIWARA
 Teruhiko IDE
 Hiroyuki WATANABE
 Kimio KATSUURA

A series of new 1,2,5-thiadiazole derivatives, which exhibit inhibitory activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) specific reverse transcriptase, have been synthesized. Some of these compounds were found to inhibit HIV-1 replication by 50% at nanomolar concentration; 4-(2,6-dichloro-3-aminophenyl)-1,2,5-thiadiazol-3-yl N-methyl-N-propylcarbamate was most effective, its EC_{50} being 0.006 μ M.

1. はじめに

HIV (Human Immunodeficiency Virus: ヒト免疫不全ウイルス) はAIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome: 後天性免疫不全症候群) の原因ウイルスであり、HIV-1 とHIV-2 が知られている。HIV-1 は主に欧米、日本、東南アジアで、HIV-2 は西アフリカ、インドで流行している。HIV-1 はHIV-2 に比べて潜伏期間が短く、感染力や病原性が強いことから、特に問題視されている。WHO (世界保健機関、1995年12月) によると、AIDS感染者は世界で1,400万人、AIDS発症者は450万人 (内400万人死亡)、特にサハラ以南のアフリカ、東南アジア、南アジアに感染者が多く、中でも東南アジアでの感染者が急速に増加

していると報告している。また、日本でもエイズサーベイランス委員会 (1996年2月) は国内のAIDS患者・感染者は累計で4,175人 (死亡者累計730人) と報告している。

このような状況下、抗HIV剤の研究開発も精力的に行われており、現在までに9剤が米国において承認されている。それら9剤は核酸系逆転写酵素阻害剤であるAZT (Retrovir)、ddI (Videx)、ddC (Hivid)、d4T (Zerit)、3TC (Epivir)、非核酸系逆転写酵素阻害剤であるnevirapine (Viramune)、プロテアーゼ阻害剤であるsaquinavir (Invirase)、indinavir (Crixivan)、ritonavir (Norvir) である。日本では3剤が承認され、現在4剤が拡大臨床試験中である。

我々は以前より生理活性物質探索を目的に、1, 2, 5

ーチアジアゾール誘導体の合成と反応について検討してきた¹⁾。その過程で抗ウイルス剤の探索をターゲットに抗ウイルス評価を実施したところ、1,2,5-チアジアゾール誘導体に弱いながら抗HIV活性のあることを見いだした。その後、種々合成展開を実施することにより、高活性化化合物へと導くことができた²⁾。また、本化合物群は非核酸系逆転写酵素阻害剤に属することを確認している。今回は1,2,5-チアジアゾール誘導体の合成とその抗HIV活性における構造活性相関について報告する。

2. 1,2,5-チアジアゾール誘導体の合成

1,2,5-チアジアゾール誘導体は、以下のような方法により合成した。チアジアゾール環の構築に関しては、以前に報告した方法により行った¹⁾。

[1] 3-ヒドロキシ-4-置換-1,2,5-チアジアゾールの合成

(1) 3-ヒドロキシ-4-アリアル (アルキル)-1,2,5-チアジアゾール 2 の合成 (Scheme 1)

1) アミノアセトアミド類 1 をDMF中、一塩化硫

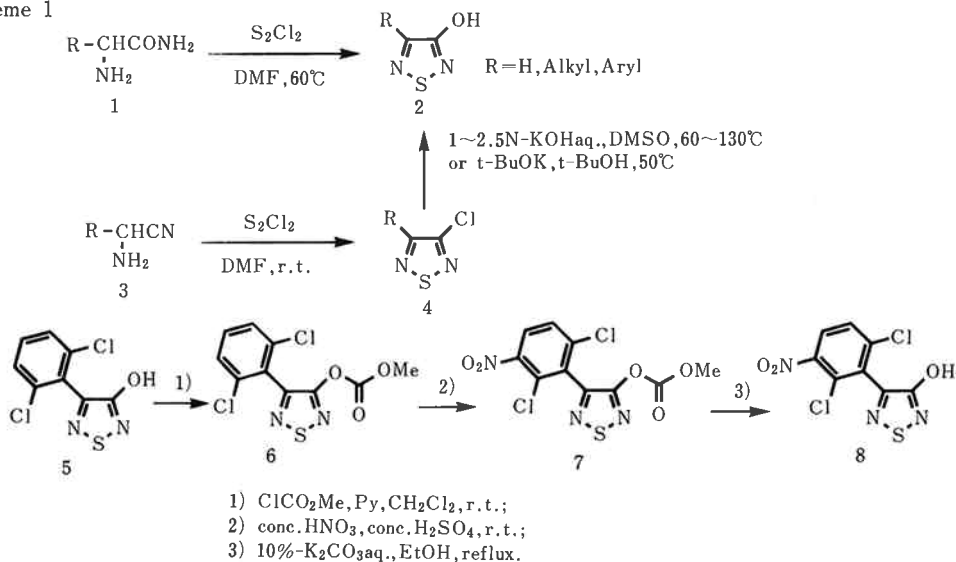
黄と反応させることにより、化合物 2 を得た。

2) アミノアセトニトリル類 3 をDMF中、一塩化硫黄と反応させることにより、3-クロロ-4-アリアル (アルキル)-1,2,5-チアジアゾール 4 を得た。このものは、DMSO中、1~2.5Nの水酸化カリウム水溶液と処理することにより、目的の化合物 2 を得た。また、t-BuOH中、カリウムt-ブトキシドによっても得ることができる。

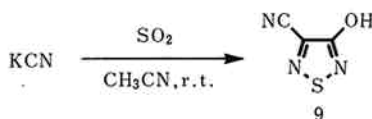
3) 4-(2,6-ジクロロフェニル)-3-ヒドロキシ-1,2,5-チアジアゾール 5 を塩化メチレン中、ピリジンの存在下、クロロ炭酸メチルと反応させることにより4-(2,6-ジクロロフェニル)-1,2,5-チアジアゾール-3-イル メチルカーボネート 6 を得た。このものは混酸で処理することにより選択的にフェニル基の3位ニトロ体 7 とした後、希水酸化ナトリウム水溶液で加水分解し、4-(2,6-ジクロロ-3-ニトロフェニル)-3-ヒドロキシ-1,2,5-チアジアゾール 8 を得た。

(2) 3-シアノ-4-ヒドロキシ-1,2,5-チアジアゾール 9 の合成 (Scheme 2)

Scheme 1



Scheme 2



化合物9はRossたちの方法³⁾に準じて、シアン化カリウムをアセトニトリル中、二酸化硫黄と反応させることにより得た。

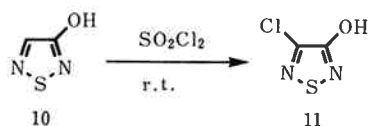
(3) 3-クロロ-4-ヒドロキシ-1,2,5-チアジアゾール11の合成 (Scheme 3)

化合物11は上記方法により得た3-ヒドロキシ-1,2,5-チアジアゾール10を無溶媒下、塩化スルフルと反応させることにより得た。

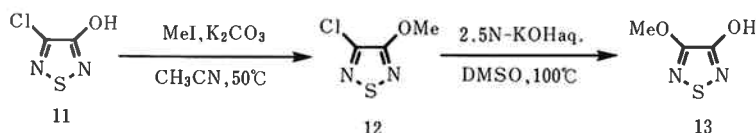
(4) 3-メトキシ-4-ヒドロキシ-1,2,5-チアジアゾール13の合成 (Scheme 4)

化合物13は上記方法により得た3-クロロ-4-ヒドロキシ-1,2,5-チアジアゾール11をアセトニトリル中、炭酸カリウム存在下、ヨウ化メチルと反応させることにより3-クロロ-4-メトキシ-1,2,5-チアジアゾール12とした後、DMSO中、2.5N-KOHで処理することにより得た。

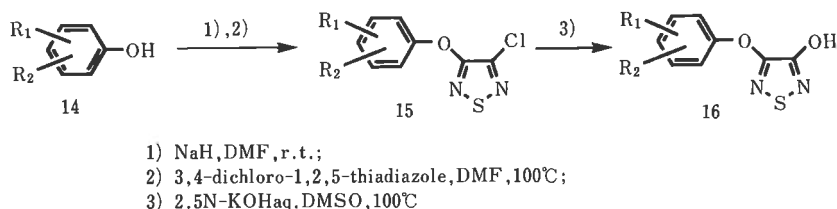
Scheme 3



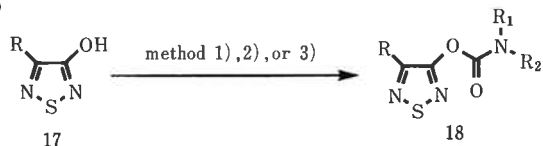
Scheme 4



Scheme 5

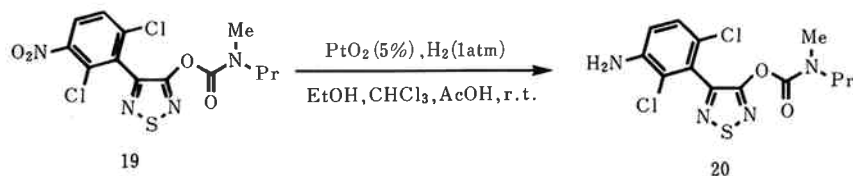


Scheme 6



Method 1): $\text{ClC}(=\text{O})\text{NR}_1\text{R}_2$, K_2CO_3 , CH_3CN , reflux
 2): triphosgene, Py, CH_2Cl_2 , r.t., and then HNR_1R_2 , r.t.
 3): ($\text{R}_1=\text{H}$) $\text{R}_2\text{-NCO}$, Py, r.t.

Scheme 7



(5) 3-アリアルオキシ-4-ヒドロキシ-1,2,5-チアジアゾール 16 の合成 (Scheme 5)

フェノール類 14 をDMF中、水素化ナトリウムで処理しフェノキッドとした後、3,4-ジクロロ-1,2,5-チアジアゾールと反応させることにより3-アリアルオキシ-4-クロロ-1,2,5-チアジアゾール 15 を得た。このものはDMSO中、2.5N-水酸化カリウムで処理することにより化合物 16 へと導いた。

(2) 4-置換-1,2,5-チアジアゾール-3-イル N,N-ジアルキルカーバメート 18 の合成²⁾

(1) カルバモイル基の導入 (Scheme 6)

カルバモイル基の導入には以下の3種類の方法により合成した。

1) 3-ヒドロキシ-4-置換-1,2,5-チアジアゾール 17 をアセトニトリル中、炭酸カリウムの存在下、カルバモイルクロリドと反応させることによりカーバメート体 18 を得た。

2) 化合物 17 を塩化メチレン中、ピリジンの存在下、トリフォスゲンと反応させ、次いで対応するアミン類と反応させることによりカーバメート体 18 を得た。

3) 化合物 17 をピリジン中、イソシアナート類と反応させることによりカーバメート体 18 を得た。

(2) 4-(2,6-ジクロロ-3-アミノフェニル)-1,2,5-チアジアゾール-3-イル N-メチル-N-プロピルカーバメート 20 の合成 (Scheme 7)

4-(2,6-ジクロロ-3-ニトロフェニル)-1,2,5-チアジアゾール-3-イル N-メチル-N-プロピルカーバメート 19 を少量の酢酸含有エタノール、クロロホルム混合溶媒中、触媒として酸化白金の存在下、水素(常圧)で還元することにより、化合物 20 を得た。

3. 抗HIV活性試験

抗HIV活性は細胞にウイルスを感染させ、種々の濃度で供試化合物を処理し一定時間培養後、MTT法にて評価した。効果判定は50%有効濃度 (EC_{50}) を算出することで評価した。細胞毒性は非感染細胞に供試化合物を処理し一定時間培養後、MTT法で50%細胞毒性濃度 (CC_{50}) を算出した。細胞としてはMT-4細胞を用い、ウイルスとしてはHIV-1のIII B株(実験標準株)を用いた^{2),4),5)}。

4. 構造活性相関(抗HIV活性評価結果)

東ソー化合物ライブラリーからいくつかの化合物に

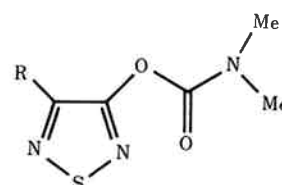
ついて抗ウイルス活性試験を実施したところ、4-フェニル-1,2,5-チアジアゾール-3-イル N,N-ジメチルカーバメート (RD3-2105, $EC_{50}=23\mu M$) に弱いながら抗HIV活性を見いだした。そこで、抗HIV活性の向上を目的に、この化合物について種々構造変換を実施し、以下のような結果を得た。

(1) 構造活性相関1(4位置換基の影響、Table 1)

3位をN,N-ジメチルカーバメートに固定し、4位置換基を種々変換した。活性のあったフェニル基を取り除き、無置換とすると活性は完全に消失した (RD3-2362)。電子供与性置換基 (RD3-2357)、特に立体的に嵩高いt-ブチル基 (RD5-2035) に変換しても活性はなく、また電子吸引性置換基 (RD3-2376, RD3-2359) への変換も効果なく活性はなかった。アルコキシ基 (RD3-2225) は活性はなかったが、フェノキシ基 (RD3-2230) はフェニル基 (RD3-2105) と同程度の活性値を示した。

チアジアゾール (TDA) 環にフェノキシ基が置換した化合物ではTDA環とフェノキシ基との間の回転

Table 1 Structure-Activity Relationship for inhibition of HIV-1 replication in MT-4 cells by TDA derivatives (1)



Compound	R	$EC_{50}^a, \mu M$	$CC_{50}^b, \mu M$	SI ^c
RD3-2362	H	>560	>560	—
RD3-2376	Cl	>176	176	—
RD3-2359	CN	>92	92	—
RD3-2357	Me	>535	>535	—
RD3-2225	MeO	>28	28	—
RD5-2035	t-Bu	>349	349	—
RD3-2105	Ph	23	183	8
RD3-2230	PhO	56	169	3

a) Effective concentration of compound required to achieve 50% replication of MT-4 cells against the cytopathic effect of HIV-1.

b) Cytotoxic concentration of compound required to reduce the viability of mock-infected MT-4 cells by 50%.

c) Selectivity index: ratio of CC_{50} to EC_{50} .

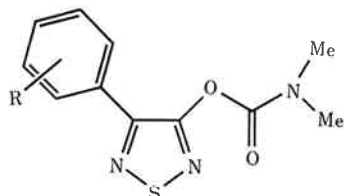
All data represent mean values of at least three separate experiments.

が比較的自由であるが、フェニル基が置換したTDA化合物ではTDA環とフェニル基との間に回転障害があるという点でコンフォメーション的な違いがある。しかしながら、 EC_{50} 値はほぼ同程度であることから、少なくともTDA環4位近傍に芳香環が存在することが活性に必要であることが示唆される。

〔2〕 構造活性相関 2 (4位フェニル基の置換基の影響、Table 2)

塩素原子で置換位置の検討を実施し、フェニル基の2位に塩素原子を導入 (RD 3-2356) することにより無置換体 (RD 3-2105) に比べて約70倍活性が向上することを見いだした。また、フェニル基の3位への導入 (RD 3-2361) でも約3倍の活性向上が認められたが、フェニル基の4位への導入 (RD 3-2107) は活性の完全消失を招いた。更に電子効果を考慮し、フェニル基の4位にメチル基 (RD 3-2109) あるいはメトキシ基 (RD 3-2112) を導入したが活性はなく、立体効果を考慮し、水素原子の次に小さなフッ素原子 (RD 5-2116) を導入しても活性はなかった。

Table 2 Structure-Activity Relationship for inhibition of HIV-1 replication in MT-4 cells by TDA derivatives (2)



Compound	R	$EC_{50}^a, \mu M$	$CC_{50}^b, \mu M$	SI ^c
RD 3-2105	H	23	183	8
RD 3-2356	2-Cl	0.32	161	503
RD 3-2361	3-Cl	7.5	42	6
RD 3-2107	4-Cl	>352	352	—
RD 5-2116	4-F	>175	175	—
RD 3-2109	4-Me	>139	139	—
RD 3-2112	4-MeO	>140	140	—

a) Effective concentration of compound required to achieve 50% replication of MT-4 cells against the cytopathic effect of HIV-1.

b) Cytotoxic concentration of compound required to reduce the viability of mock-infected MT-4 cells by 50%.

c) Selectivity index : ratio of CC_{50} to EC_{50} .

All data represent mean values of at least three separate experiments.

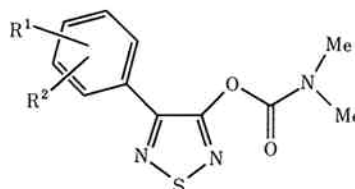
これらのことから、少なくともフェニル基の4位への置換基の導入は活性の消失をもたらす、フェニル基の2位置換基の導入は活性向上に大きく影響することが判明した。

〔3〕 構造活性相関 3 (4位フェニル基の二置換体の影響、Table 3)

フェニル基2位への塩素原子の導入 (RD 3-2356) が著しい活性向上をもたらしたので、二置換体について検討した。2位に塩素原子を固定し、二置換目の位置としてそれぞれ3、4、5、6位へ塩素原子を導入した結果、一置換の場合と同様4位での置換基の存在 (RD 3-2219、RD 3-2218) が活性消失を招いた。それ以外の置換位置 (RD 3-2236、RD 3-2233、RD 3-2220) では活性は保持された。

これらのことから、4位以外の置換位置への置換基の導入は可能であることが判明し、物性改良及び活性向上にはそれらの位置に適切な官能基を導入することにより達成できる可能性を示した。

Table 3 Structure-Activity Relationship for inhibition of HIV-1 replication in MT-4 cells by TDA derivatives (3)



Compound	R ¹	R ²	$EC_{50}^a, \mu M$	$CC_{50}^b, \mu M$	SI ^c
RD 3-2105	H	H	23	183	8
RD 3-2356	2-Cl	H	0.32	161	503
RD 3-2336	2-Cl	3-Cl	0.19	109	574
RD 3-2219	2-Cl	4-Cl	>54	54	—
RD 3-2233	2-Cl	5-Cl	0.075	32	427
RD 3-2220	2-Cl	6-Cl	0.24	145	604
RD 3-2218	3-Cl	4-Cl	>215	>215	—

a) Effective concentration of compound required to achieve 50% replication of MT-4 cells against the cytopathic effect of HIV-1.

b) Cytotoxic concentration of compound required to reduce the viability of mock-infected MT-4 cells by 50%.

c) Selectivity index : ratio of CC_{50} to EC_{50} .

All data represent mean values of at least three separate experiments.

〔4〕 構造活性相関 4 (3位カーバメート部のN上の置換基の影響、Table 4)

3位を2,6-ジクロロフェニル基に固定し、更にN上の置換基R₁をメチル基に固定し、R₂のアルキル基の長さについて検討したところ、R₂がプロピル基(RD4-2024)の時に最も高活性を示した。すなわち、プロピル基の長さが活性に最も適しており、それより長くても短くても活性は低下することが判明した。また、R₁を無置換すなわち水素原子(RD3-2380)にすると活性は消失し、少し長くしてエチル基(RD3-2102, RD4-2023)にすると活性は減弱した。R₁が水素原子の時活性が消失したのは、化合物の不安定性に起因するのか、あるいはコンフォメーション変化に起因するのか、あるいは両方が影響しているのかもしれない。いずれにしても、アルキル基の長さは活性向上に重要な影響を及ぼしていることは明らかである。ここで見いだした4-(2,6-ジクロロフェニル)-1,2,5-チアジアゾール-3-イル N-メチル-N-プロピルカーバメート(RD4-2024)は非核酸

系逆転写酵素阻害剤の中でもトップクラスの活性を示し、最近承認されたnevirapine (EC₅₀=0.073 μM)⁶⁾を凌ぐ活性を示した。

〔5〕 構造活性相関 5 (最適化、Fig. 1)

以上の構造活性相関から、4-(2,6-ジクロロフェニル)-1,2,5-チアジアゾール-3-イル N-メチル-N-プロピルカーバメート(RD4-2024)が最も高活性を示すことが判明した。

しかしながら、この化合物はlogP(水-オクタノール分配係数)値が3.77と高く、分布容積(生体内分布指標)が必要以上に大きくなる可能性が示され、毒性が危惧される。また、ヒト血漿を用いた化合物の血漿タンパクへの結合率を測定したところ、タンパク結合率は非常に高いことが判明した。一般に、抗HIV剤は分布容積が小さくとも薬効が期待でき、血漿蛋白質に対する非結合体が多いほど活性発現が向上するとされているので、分布容積及び血漿タンパク結合性の適正化を図るため、化合物への親水性基の導入による物性改良を行った。

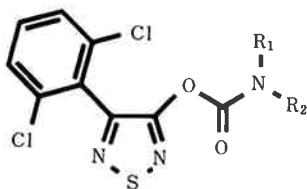
親水性基の導入には、上記の構造活性相関の結果考察から2,6-ジクロロフェニル基の更に3位への導入を試みた。その結果、フェニル基の3位にアミノ基を導入(RD4-2217)することにより、親水性を向上させることができた。すなわち、logPは3.12へ低下し、また血漿タンパク結合率も低下させることができた。またこのものは、活性値もさらに向上(EC₅₀=0.006 μM)することが判明した。

5. まとめ

抗ウイルス活性物質の探索研究の過程で見いだした抗HIV活性チアジアゾール誘導体について、種々合成展開を実施した結果、in vitroにおいて高活性かつ感染症薬として適当な物性を持つ化合物へ導くことができた(Fig. 2)。現在、化合物についてはスキッドマウスを用いた動物試験を実施中である。

一般に抗HIV剤の一つの欠点として薬剤耐性ウイルスの出現を挙げることができる。事実、臨床で使用中の核酸系逆転写酵素阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤には耐性ウイルスが出現し、これら薬剤が効かなくなることが確認されている。しかしながら、同種の作用機作を有する薬剤同士、あるいは異種の作用機作を有する薬剤同士を併用することで、耐性ウイルスの出現を回避する試みがなされており効果を上げている。このような状況下、既存の作用機作を有する化合物でも構

Table 4 Structure-Activity Relationship for inhibition of HIV-1 replication in MT-4 cells by TDA derivatives (4)



Compound	R ¹	R ²	EC ₅₀ ^a , μM	CC ₅₀ ^b , μM	SI ^c
RD 3-2220	Me	Me	0.24	145	604
RD 4-2025	Me	Et	0.039	136	3487
RD 4-2024	Me	Pr	0.013	131	10077
RD 3-2102	Me	Bu	0.039	29	744
RD 4-2031	Me	Hex	0.10	16	160
RD 3-2380	H	Bu	>139	139	—
RD 3-2102	Et	Et	0.25	314	1256
RD 4-2023	Et	Bu	0.33	44	133

a) Effective concentration of compound required to achieve 50% replication of MT-4 cells against the cytopathic effect of HIV-1.

b) Cytotoxic concentration of compound required to reduce the viability of mock-infected MT-4 cells by 50%.

c) Selectivity index: ratio of CC₅₀ to EC₅₀.

All data represent mean values of at least three separate experiments.

Fig. 1

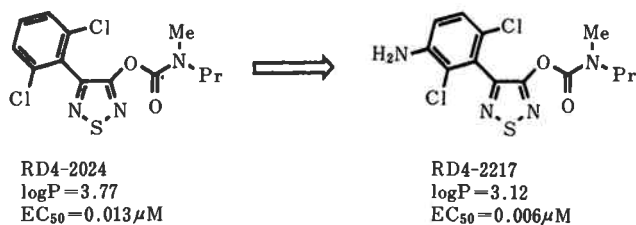
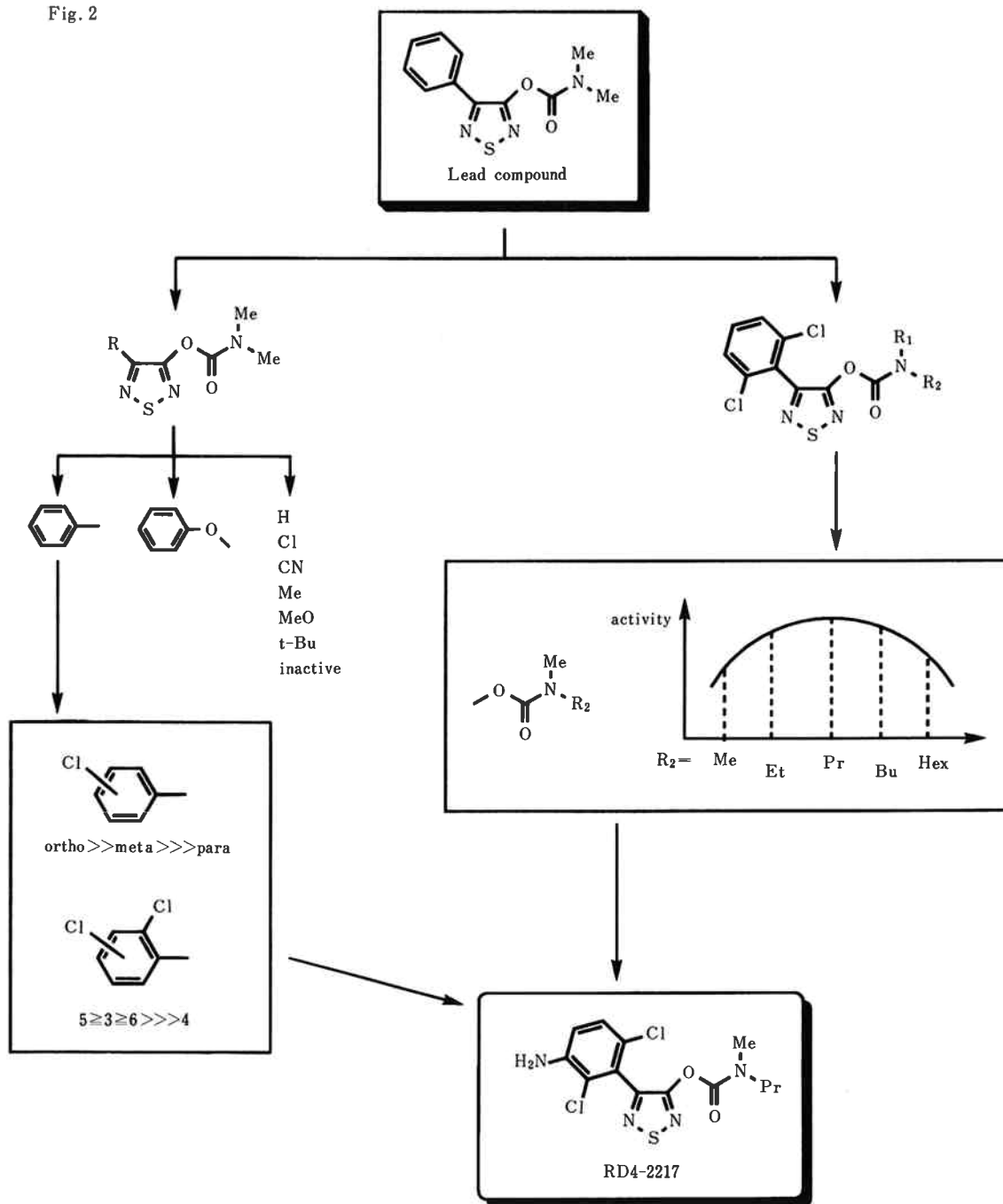


Fig. 2



造の異なる化合物、さらに好ましくは既存の作用機作以外を有する化合物の創製が強く望まれている。最近、第3の作用機作である非核酸系逆転写酵素阻害剤の nevirapine が承認され、loviride (Janssen)、BHAP (Upjohn)、L-743726 (Merck)、MKC-442 (三菱化学) が臨床試験中であるとの情報を得ている。

本チアジアゾール誘導体は非核酸系逆転写酵素阻害剤に属するが、興味あることに一連の非核酸系逆転写酵素阻害剤で誘導された耐性ウイルス⁷⁾にも効果を示す化合物を見いだしており、現在さらにこの点について検討中である。また、今回は省略したが、カーバメート部を他の官能基へ、チアジアゾール環を他のヘテロ環へ変換した化合物等⁸⁾についても種々検討し、興味ある知見を得ており別の機会に報告したい。

本研究は創薬技術研究所の伊地知功史研究員、紺野謙治部長、横田智之所長、千葉大学薬学部の高山廣光助教授、白川誠一郎修士、坂井進一郎教授、相見則郎教授、福島医科大学の茂田士郎教授、鹿児島大学医学部の馬場昌範教授との共同研究により行った。

文 献

- 1) Y. Hanasaki, K. Tokuhisa, H. Watanabe, and K. Tsuzuki; 東ソー研究報告, **35**, 69 (1991)
- 2) a) Y. Hanasaki, H. Watanabe, K. Katsuura, H. Takayama, S. Shirakawa, K. Yamaguchi, S-I. Sakai, K. Ijichi, M. Fujiwara, K. Konno, T. Yokota, S. Shigeta, and M. Baba; *J. Med. Chem.*, **38**, 2038 (1995).
b) K. Ijichi, M. Fujiwara, Y. Hanasaki, H. Watanabe, K. Katsuura, H. Takayama, S. Shirakawa, S-I. Sakai, S. Shigeta, K. Konno, T. Yokota, and M. Baba; *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2337 (1995).
- c) K. Ijichi, M. Fujiwara, H. Nagano, Y. Matsumoto, Y. Hanasaki, T. Ide, K. Katsuura, H. Takayama, S. Shirakawa, N. Aimi, S. Shigeta, K. Konno, M. Matsushima, T. Yokota, and M. Baba; *Antiviral Res.*, **87** (1996).
- 3) J. M. Ross and W. C. Smith; *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2861 (1964).
- 4) M. Baba, E. De Clercq, H. Tanaka, M. Ubasawa, H. Takashima, K. Sekiya, I. Nitta, K. Umezu, H. Nakashima, S. Mori, S. Shigeta, R. T. Walker, and T. Miyasaka; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 2356 (1991).
- 5) R. Pauwels, J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, and E. De Clercq; *J. Virol. Methods*, **20**, 309 (1988).
- 6) V. J. Merluzzi, K. D. Hargrave, M. Labadia, K. Grozinger, M. Skoog, J. C. Wu, C.-K. Shin, K. Eckner, S. Hattox, J. Adams, A. S. Rosethal, R. Faanes, R. J. Eckner, R. A. Koup, and J. L. Sullivan; *Science*, **250**, 1411 (1990).
- 7) E. De. Clercq; *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 155 (1994).
- 8) H. Takayama, S. Shirakawa, M. Kitajima, N. Aimi, K. Yamaguchi, Y. Hanasaki, T. Ide, K. Katsuura, M. Fujiwara, K. Ijichi, K. Konno, S. Shigeta, T. Yokota, and M. Baba; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 1993 (1996).



著 者
氏名 花 崎 保 彰
Yasuaki HANASAKI
入社 昭和61年4月1日
所属 東京研究所
副主任研究員



著 者
氏名 藤 原 将 寿
Masatoshi FUJIWARA
入社 昭和62年4月1日
所属 創薬技術研究所出向
副主任研究員



著 者
氏名 井 出 輝 彦
Teruhiko IDE
入社 平成元年4月1日
所属 東京研究所
副主任研究員



著 者
氏名 渡 邊 博 幸
Hiroyuki WATANABE
入社 昭和54年4月2日
所属 東ソー・アクト株式会社
開発部研究課
課長



著 者
氏名 勝 浦 公 男
Kimio KATSUURA
入社 昭和61年1月16日
所属 東京研究所
主席研究員