

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) ウイルスゲノム複製酵素を標的とした耐性株が産生されにくい
抗インフルエンザ薬の開発
(英 語) Development of anti-influenza drug inhibiting viral replicase

研究開発実施期間：2016 年 10 月 19 日～2018 年 3 月 31 日(予定)

研究開発代表者 氏名：(日本語) 川口 敦史
(英 語) Atsushi Kawaguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 筑波大学・医学医療系・准教授
(英 語) University of Tsukuba・Faculty of Medicine・Associate Professor

II 研究開発の概要

川口 敦史 准教授(筑波大学医学医療系)、小池 智 プロジェクトリーダー(東京都医学総合研究所)、および吉松 賢太郎 シニアサイエンティフィックアドバイザー(エーザイ株式会社)らの協働により、インフルエンザウイルスポリメラーゼ機能を阻害する抗ウイルス薬の開発を進め、リード化合物(ETIP-0293)の作用機序解析とリード化合物の誘導体展開を行った。

平成 28 年度では化合物デザインを終えたものが 62 種類、そのうち、年度内に合成が終了し、抗ウイルス活性を評価できたのは、ETIP-0294～ETIP-0325 の 32 化合物である。平成 28 年度では、リード化合物である ETIP-0293 の X 環と Y 環の合成展開を行った。X 環に置換基を導入したもの、もしくは X 環を Z 基に置換したものが ETIP-0294～ETIP-0317、Y 環に置換基を導入したものが ETIP-0318～ETIP-0325 である。抗ウイルス活性はプラークアッセイにより評価し、PA との結合性はゲル濾過クロマトグラフィーと質量分析器を組み合わせた ASMS 法を用いて評価した。その結果、X 環を置換した誘導体では、抗ウイルス活性がある化合物のほとんどが、ASMS で PA との結合も観察された。一方、X 環に置換基を導入した化合物の一部は PA との結合が失われ、X 環が PA との結合に必要であることが示唆された。また、X 環の置換基次第では強い毒性を示すことも明らかになった。X 環を Z 基に置換した ETIP-0295 では、水溶性が改善されており(PBS に対して 14 μ M 前後)、PA との相互作用解析に有用なツール化合物となる可能性が示唆され、現在、NMR 法を用いて ETIP-0295 と PA との結合評価を進めている。一方、Y 環に置換基を導入した化合物では、毒性が抗ウイルス活性と乖離せず、また、活性の向上も観察されなかった。続いて、平成 29 年度では、*in silico* ドッキングシミュレーションによる PA と ETIP-0293 の複合体構造モデルの解析を行った。その結果、PA の芳香族アミノ酸に ETIP-0293 の X 環がスタッキング相互作用することが示唆された。一方、母核部位と X 環をつなぐリンカー部位が短い方がスタッキング相互作用は改善されることが推測された。そこで、リンカー部位が短く、X 環を置換した 46 種類の化合物をデザイン・合成し、その抗ウイルス活性の評価を進めた。その結果、脂溶性が原因と思わ

れる毒性との乖離がなお課題であるが、ベンゾフラン環 (ETIP-0382) や、極性の高いベンズイミダゾールでも基本的結合活性を保持し、特にリンカーを1炭素短くした ETIP-0383 では、毒性と乖離したプラーク活性を確認でき、ドッキングシミュレーション結果を支持した。一方、ベンゾフラン環の三環性誘導体では、毒性と抗ウイルス活性の乖離が観察され、今後の誘導体展開のヒントを得ることができた。

さらに、ETIP-0293 の作用機序の解析について、平成 28 年度では、*in silico* のドッキングシミュレーションの結果より、ETIP-0293 は、PB1 の A 残基、B 残基、C 残基、D 残基と PA の E 残基、F 残基、G 残基との結合を阻害すると予測された。しかし、PB1 の A～D 残基は構造をとらないリンカー領域であり、ウイルスポリメラーゼ活性への影響は不明である。そこで、PB1 のリンカー領域の変異体を構築し、そのウイルスポリメラーゼ活性を評価した。その結果、B、C、D 残基の変異により、ウイルスポリメラーゼ活性は完全に消失した。よって、ETIP-0293 が標的とする PB1 の A～D 残基のリンカー領域は抗ウイルス薬の標的部位として非常に有望であることが示唆された。続いて、平成 29 年度では、ETIP-0293 に対する耐性変異株の出現頻度を評価した。その結果、耐性変異株が単離される頻度はタミフルと比べて顕著に低く、耐性変異株の出現を抑えた創薬設計が可能であることが示唆された。一方、著しく耐性能は弱いものの、NP のループ領域の点変異により、ETIP-0293 に対して、若干の薬剤耐性能を獲得することが明らかになった。NP の点変異は PA と接する領域で同定されており、ETIP-0293 がウイルス特異的に作用することを示唆する研究成果であると考えられる。

In collaboration with Dr. A. Kawaguchi (University of Tsukuba), Dr. S. Koike (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Research), and Dr. K. Yoshimatsu (Eisai Co., Ltd.) and others, we aim to develop anti-influenza drugs through chemical syntheses of lead compound (ETIP-0293) derivatives and analyses of the mechanism of action of ETIP-0293.

In FY2016, we designed 62 kinds of derivative and obtained 32 derivatives (ETIP-0294~ETIP-0325) among them. In FY2008, we introduced substituents in the X ring and the Y ring of ETIP-0293, respectively. The derivatives in which the substituent is introduced to the X ring or those in which the X ring is substituted with the Z group designated ETIP-0294 to ETIP-0317. The derivatives in which the substituent is introduced into the Y ring are ETIP-0318 to ETIP-0325. The antiviral activity was evaluated by plaque assay and the binding activity was examined by ASMS method using gel filtration chromatography and mass spectrometer. The X ring substituents showed the antiviral activity in good correlation with PA binding activity. And, a part of the X ring substituents did not interact with PA, suggesting that X ring is required for the PA binding. Further, by introducing substituent to the X ring, a part of derivatives shows strong cell toxicity. We found that the water solubility of ETIP-0295, in which the X ring is substituted with a Z group, was significantly improved, indicating that ETIP-0295 may be a useful tool compound for the structural analysis with PA using NMR. In contrast, the cell toxicity of derivatives, in which the substituent was introduced to the Y ring, was observed and there is no improvement of antiviral activity. Thus, we plan to design derivatives of the X ring without any substitutions in the Y ring. In FY2017, we performed *in silico* docking simulation to construct the binding model of ETIP-0293 with PA protein. We found that an aromatic amino acid residue of PA interacts with the X ring of ETIP-0293 through stacking interaction. Based on this binding model, it is also suggested that the stacking interaction is improved by shortening the linker region connecting X ring to main structure. Thus, we designed and synthesized 46 kinds of derivative which have short linker regions, and examined the antiviral activity. Then, we found that the benzofuran ring (ETIP-0382) and the highly polar benzimidazole interacted with PA although these derivatives possessed very high cell toxicity due to the high hydrophobicity. Further, ETIP-0383 showed the antiviral activity with low cell toxicity by removing one carbon from the linker region as the docking simulation suggested. On

the other hand, the tricyclic derivative of benzofuran ring has the antiviral activity without cell toxicity. These results provided clues to design further derivatives.

Based on the results obtained from *in silico* docking simulation, it is speculated that ETIP-0293 inhibits the interaction between A, B, C, and D residues of PB1 and E, F, and G residues of PA. However, amino acid region of PB1 from residues A to D is an unstructured linker region, and the function of the linker region in the viral polymerase activity is unknown. Thus, we constructed point mutants of the linker region and examined the viral polymerase activity in FY2016. The viral polymerase activity was not observed by introducing point mutations in B, C, and D residues of PB1, suggesting that the linker region of PB1 is thought to be a promising target site for antiviral drugs. Subsequently, in FY2017, we evaluated the appearance of resistant mutants against ETIP-0293. It was shown that the frequency of emergence of resistant mutants was remarkably lower than that of Tamiflu, suggesting that our drug design is capable to reduce the emergence of drug resistant mutant. Further, although it was remarkably weak in tolerance, point mutations in the loop region of NP were involved in the drug resistance against ETIP-0293. This finding suggest that ETIP-0293 inhibits the virus replication through the direct action.