

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム(AMED・A-STEP)

平成 27 年度成果報告書(公開)

プロジェクトリーダー (企業責任者)	エーザイ株式会社 シニアサイエンティフィカドバイザー 吉松 賢太郎
研究責任者	国立大学法人筑波大学 医学医療系 助教 川口 敦史
参加機関	エーザイ株式会社 国立大学法人筑波大学
研究開発課題	耐性株が産生されにくい抗インフルエンザ薬の開発

1. 研究開発の目的

本研究開発課題では、季節性インフルエンザだけでなく、高病原性鳥インフルエンザにも効果があり耐性株が出現しにくい抗インフルエンザ薬の開発を最終目標としている。このため、本課題ではウイルス株間で高度に保存され、アミノ酸変異を許容することができないウイルスピリメラーゼのサブユニット複合体形成部位を標的とした低分子化合物を探索し、耐性株が出現しにくく、新型インフルエンザにも対応可能な抗インフルエンザ薬として製品化を目指す。

2. 研究開発の概要

インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼのサブユニット PB1 と PA の結合部位の X 線結晶構造解析結果をもとに、in silico スクリーニングを行うことで得られていた化合物をシード化合物として誘導体を合成することで、PA と PB1 の結合阻害ならびに in vitro 抗インフルエンザ活性の構造活性相関を把握する。水溶性が向上した誘導体を用いて PA との共結晶の作製を試み、共結晶が得られた場合には、X 線結晶構造解析および分子動力学的シミュレーションにより、PA と化合物の相互作用様式を明確にし、活性向上のための誘導体のデザインを行う。In vitro 抗インフルエンザ活性として IC50 値が 100nM 以下を当面の目標として、in vivo 抗インフルエンザ活性の評価に進める化合物を選択し、平均生存期間を有意に延長させる化合物を目指す。

3. 研究開発の成果(平成 27 年度)

(1)誘導体展開とその構造活性相関・物性検討【エーザイ株式会社】

平成 26 年度までに得られた結果をもとに、抗インフルエンザ活性がより高く、また、水溶性が改善された新規化合物のデザインを目指した。2種のシード化合物から合成委託 CRO を利用して、123 化合物を合成した。そのうち 78 化合物について筑波大学において各種評価を実施した。合成と評価は年度内に 3 度に分けて行い、構造活性相関を取得しながら効率よく合成展開した。系統 Aについては、平成 26 年度に獲得した化合物を基点にし、構造許容性の広い環状アミン部位の変換と活性向上が期待できる母核芳香環への置換基導入を中心に展開した。環状アミン部位の変換からは活性を保持し物理化学的性質の異なる多様な構造を見出した。芳香環への置換基導入では、期待通りアルキル基の導入により PA と PB1 結合阻害活性の向上が認められた。一方、

系統Bでは、結晶構造とのドッキングシュミレーションによる構造デザインを行い、主に溶解性向上に挑戦した。特に、結合に重要なPAとの水素結合部位を維持し、その先に存在する水溶性ポケットへの極性置換基の導入を行った。その結果、水溶性の低い系統Bの化合物においても弱いながらPAとPB1の結合阻害活性を評価できた。

活性を有する化合物について溶解性を評価した。系統Aの上記に挙げた化合物で中性付近の溶解性に3倍ほど改善が見られたもの(中性領域PBS中溶解度は60μM)や中性領域PBS中溶解度が18μMの化合物も得られた。創薬シード化合物としては十分な溶解性と考えられ、また各種評価で白濁する等の課題は大きく改善できた。

(2) 抗インフルエンザ活性、PAとPB1結合阻害活性【筑波大学】

平成27年度は78化合物の評価を、プラークアッセイ法(培養細胞を用いた抗インフルエンザ活性評価法)およびアルファスクリーン法(生化学的なPAとPB1の結合阻害活性評価法)によって行った。その結果、プラークアッセイ法で12個、アルファスクリーン法で13個の活性を有する化合物を得た。しかし、系統Aでは、プラークアッセイ法およびアルファスクリーン法の両方で良好な結果を示す化合物は得られなかった。一方、系統Bでは、1化合物が高濃度ではあるが抗ウイルス活性を有し、PAとPB1の結合阻害活性も観察され、また、溶解性の改善が観察された。

抗ウイルス活性評価の項で同定された化合物のうち、10化合物についてITC法(等温滴定型カロリメトリー)によって化合物のPAとの結合親和性を物理化学的に評価し、X線結晶構造解析のための共結晶作製に耐えうる化合物か否かを検討した。そのうち、2化合物は良好な結合親和性を示し、現在、結晶化条件を検討中である。

標的であるRNAポリメラーゼの活性を阻害することを確認するため、また、アルファスクリーン法(生化学的なPAとPB1の結合阻害活性評価法)での阻害活性との相関性を検討するために、12化合物について無細胞系のRNAポリメラーゼ活性に対する作用を検討したところ、アルファスクリーン法で結合阻害活性の強い化合物は、RNAポリメラーゼ活性の阻害作用が強いことが確認された。

以上