

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：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)

Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer

ACceleration Transformative research for Medical innovation (ACT-MS)

研究開発課題名： 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

Development of anti-influenza drug inhibiting viral replicase

研究開発担当者 国立大学法人筑波大学 助教 川口 敦史

所属 役職 氏名： University of Tsukuba, Assistant Professor, Atsushi Kawaguchi

実施期間： 平成 28年 10月 19日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 リード化合物の誘導体の抗ウイルス活性の評価

開発課題名： Evaluation of anti-influenza activity of compound derivatives

研究開発分担者 東京都医学総合研究所 プロジェクトリーダー 小池 智

所属 役職 氏名： Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Project Leader, Satoshi Koike

II. 成果の概要 (総括研究報告)

川口 敦史 助教 (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。今後は、置換基効果の観察されなかった Y 環は固定して、X 環の誘導体展開を集中的に進めていく予定である。

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ている。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。

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 FY2016, 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.

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. 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.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
 - 1. 構造生物学的解析とそれに基づく創薬、口頭、川口敦史、TIA かけはしワークショップ、2017/3/22、国内
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし
- (4) 特許出願
なし

I. 基本情報

事業名：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)

Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
Acceleration Transformative research for Medical innovation(ACT-MS)

研究開発課題名： 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

Development of anti-influenza drug inhibiting viral replicas

実施期間：平成28年10月19日～平成29年3月31日

分担研究 リード化合物の誘導体の抗ウイルス活性の評価

開発課題名： Evaluation of anti-influenza activity of compound derivatives

研究開発分担者 公益財団法人東京都医学総合研究所 プロジェクトリーダー 小池 智

所属 役職 氏名： Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Project Leader, Satoshi Koike

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立大学法人筑波大学 助教 川口 敦史 総括研究報告を参照。

川口 敦史 助教（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 環に置換基を導入した化合物の抗ウイルス評価を実施した。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。これら 32 化合物の抗ウイルス活性をプラークアッセイにより評価した。その結果、X 環を置換した誘導体 25 化合物中、11 化合物が 30 μ M で抗ウイルス活性を示し、そのうち 2 化合物が 10 μ M で抗ウイルス活性を示した。また X 環に置換基を導入した化合物では置換基次第では強い毒性を示すことも明らかになった。一方、Y 環に置換基を導入した化合物では、4 化合物が 30 μ M で抗ウイルス活性を示したが細胞毒性との乖離が見られず、また、活性の向上も観察されなかった。従って Y 環よりも X 環への置換基導入が抗ウイルス活性改善に繋がることが期待された。今後は、置換基効果の観察されなかった Y 環は固定して、X 環を中心に誘導体展開された化合物の抗ウイルス活性の評価を集中的に進める予定である。

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 FY2016, 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 of the 32 derivatives was evaluated by plaque assay. The eleven X ring substituents showed the antiviral activity at 30 μ M concentration and those of two substituents showed the antiviral activity at 10 μ M concentration. And, by introducing substituent to the X ring, a part of derivatives showed strong cell toxicity. On the other hand, at 30 μ M concentration, the four Y ring substituents indicated the antiviral activity. However, they had cell toxicity and showed no improvement of antiviral activity. These results suggest that introducing substituents in the X ring of ETIP-0293 may improve antiviral activity of ETIP-0293. Thus, we plan to focus on X ring of ETIP-0293 and test antiviral activity of derivatives introduced the X ring substitutions of ETIP-0293.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし
- (4) 特許出願
なし