

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07588

研究課題名（和文）抗インフルエンザ薬の安全性と有効性を高めるプロドラッグ化修飾の研究

研究課題名（英文）Prodrug modification to enhance the safety and efficacy of anti-influenza drugs

研究代表者

松下 隆彦（Matsushita, Takahiko）

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：10435745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、インフルエンザウイルスのシアル酸分解酵素であるノイラミニダーゼの作用により抗インフルエンザ薬が放出される機構を持つプロドラッグを開発した。薬物ブロックとノイラミニダーゼ感受性のシアル酸ブロックを合成し、それらを連結してプロドラッグを構築した。プロドラッグにノイラミニダーゼを作用させると、まずシアル酸の加水分解が起こり、続いてシアル酸と薬物をつなぐリンカーが自発的に分解し、最終的に薬物が放出されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では新型インフルエンザ発生に備えて、抗インフルエンザ薬ファビピラビル（アビガン錠）が備蓄されている。既存の抗インフルエンザ薬とは作用機序が異なり、発症後48時間経過した感染者や薬物耐性ウイルスにも効果があるとされる。しかし、必要量がオセルタミビルよりも約70倍多く、胎児の催奇形性が懸念されるなど問題があった。本研究で提案したプロドラッグ化によって、非感染細胞への薬剤取り込みが抑制されれば、有効薬物濃度の増大と副作用の軽減が期待できる。また、インフルエンザウイルスに限らず、ノイラミニダーゼ活性をもつ他の病原性微生物の治療にも役立つことも期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a prodrug with a mechanism for the release of anti-influenza drugs by the action of neuraminidase, the sialic acid degrading enzyme of the influenza virus. A drug block and a neuraminidase-sensitive sialic acid block were synthesized and linked to form a desired prodrug. When the prodrug was subjected to the action of neuraminidase, hydrolysis of the sialic acid occurred first, followed by spontaneous degradation of the linker connecting the sialic acid and the drug, and finally the drug was observed to be released.

研究分野：生物有機化学

キーワード：インフルエンザウイルス プロドラッグ パンデミック シアル酸 ノイラミニダーゼ ファビピラビル アビガン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは20世紀に入って以降、少なくとも3回のパンデミックを起こしており、数千万人が死亡した。次のパンデミックにそなえて今からできる限りの準備をしておく必要がある。ファビピラビルはインフルエンザ用の薬剤であり、細胞内でウイルス遺伝子の複製を抑制することでウイルス増殖を阻害する。既存のノイラミニダーゼ(NA)阻害薬とは異なる作用機序をもち、それらの耐性ウイルスにも治療効果がある。厚生労働省は2017年、パンデミック対策としてファビピラビル約200万人分の備蓄を決めた。しかし、胎児に対する催奇形性が確認されており、妊婦や妊娠の可能性のある女性への投与は禁忌とされている。また、経口投与薬で内服量が多いことから重症化患者への投与の難しさも指摘されている。緊急事態に誰もが安心して備蓄薬を服用できるように対策をほどこす必要があるものの、現時点で有効な打開策はない。非感染細胞の薬剤取り込みが副作用と内服量の多さの要因になっていることから、ファビピラビルが非感染細胞に取り込まれず、感染細胞に集中して取り込まれるようなプロドラッグ化戦略が合理的と考えられるが、これまで研究されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究は、ファビピラビルがインフルエンザウイルス感染細胞に集中して取り込まれるように機能化したプロドラッグを試作することが目的である。これまでに開発してきたノイラミニダーゼ感受性モジュールでファビピラビルを修飾したプロドラッグを作製する。合成条件の確立、プロドラッグ試作、薬物遊離の実証、薬物遊離の迅速化を試みる。

3. 研究の方法

ファビピラビルの代わりに安価で入手に容易なT-1105を用いて、NAによるシアル酸の解離をきっかけとして薬剤を遊離するNA感受性T-1105プロドラッグを合成した。目的とするプロドラッグ化合物(初期型と改良型の二種類)は、シアル酸(Neu5Ac)を出発物とした糖ブロックの合成と、T-1105を出発物とした薬剤ブロックの合成を行ったのち、両ブロックを結合して脱保護することにより合成した。

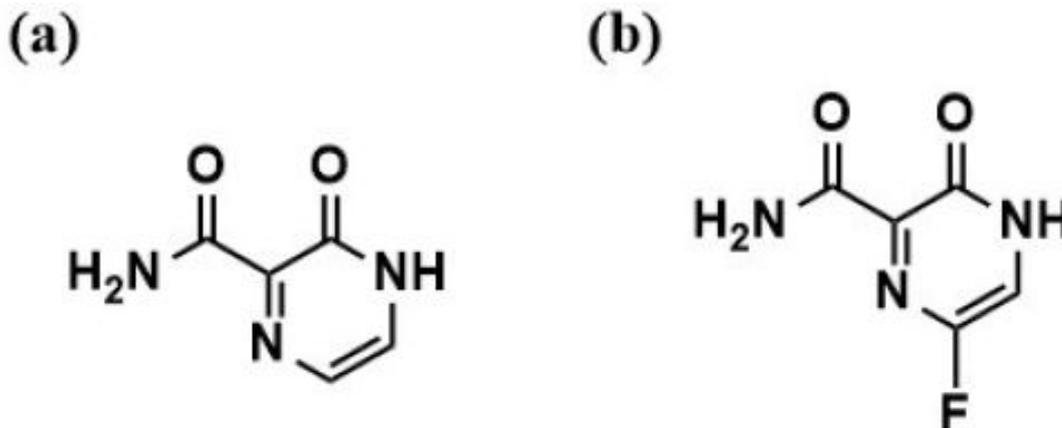


図1. T-1105(a)とファビピラビル(b)の化学構造。

初期型 T-1105 プロドラッグの合成

糖ブロックの合成は、Neu5Ac のメチルエステル保護、アセチル保護ののち、4-ヒドロキシベンズアルデヒドと結合、アルデヒド還元後に *p*-ニトロフェニルクロロフォーマートと反応させて糖ブロックを構築した。薬剤ブロックの合成は、*N,N'*-ジメチルエタンジアミンを、モノ Boc 保護したのちに、*N*-クロロカルボニル化して T-1105 前駆体と結合させ、アミド化と脱保護を経て薬剤ブロックを構築した。先に合成した糖ブロックと反応させ、脱アセチル化と脱メチル化を行うことで、目的とする初期型プロドラッグ化合物を得た。

改良型 T-1105 プロドラッグの合成

糖ブロックは初期型と同じ化合物を使用した。薬剤ブロックについては、1-(ベンジルオキシカルボニル)-*L*-プロリンアミドから合成を開始し、ニトリル化、Boc 保護、メチル化した後に、脱 Boc し、*N*-クロロカルボニル化を行い、メチル-3-ヒドロキシ-2-ピラジンカルボキシレートと結合させた。その後、アミド化と脱 Cbz 化を経て薬剤ブロックを構築した。この薬剤ブロックを糖ブロックと反応させたのち、脱保護して目的とする改良型プロドラッグ化合物を得た。

4. 研究成果

初期型 T-1105 プロドラッグの薬剤遊離評価

初期型 T-1105 プロドラッグにウェルシュ菌由来のノイラミニダーゼを作用させ、反応の経時変化を逆相 HPLC で追跡した。試験結果を図 2 に示す。T-1105 プロドラッグのピーク（保持時間 12.0 min）は反応開始から 3 時間で完全に消失しており、24 時間経過後から T-1105 の遊離（保持時間 4.7 min）が確認された。薬剤はその後もゆっくりと遊離されつづけ、216 時間後には 15.6%の遊離が確認された。薬剤遊離速度には 1 次の線形性が認められた。その後、溶液の pH を 7.4 から 9.6 に調整すると、薬剤遊離が加速して、24 時間後には 72.4%の薬剤遊離が確認された（図 3）。塩基性条件下で求核性が高まり、薬剤遊離の律速段階になっていた中間体にてリンカ一部分の崩壊が加速することで、薬剤が効率的に遊離されるようになったためと考えられる。これらの結果から、中性条件下でも短時間で薬物が遊離するよう改善する必要性が見出された。

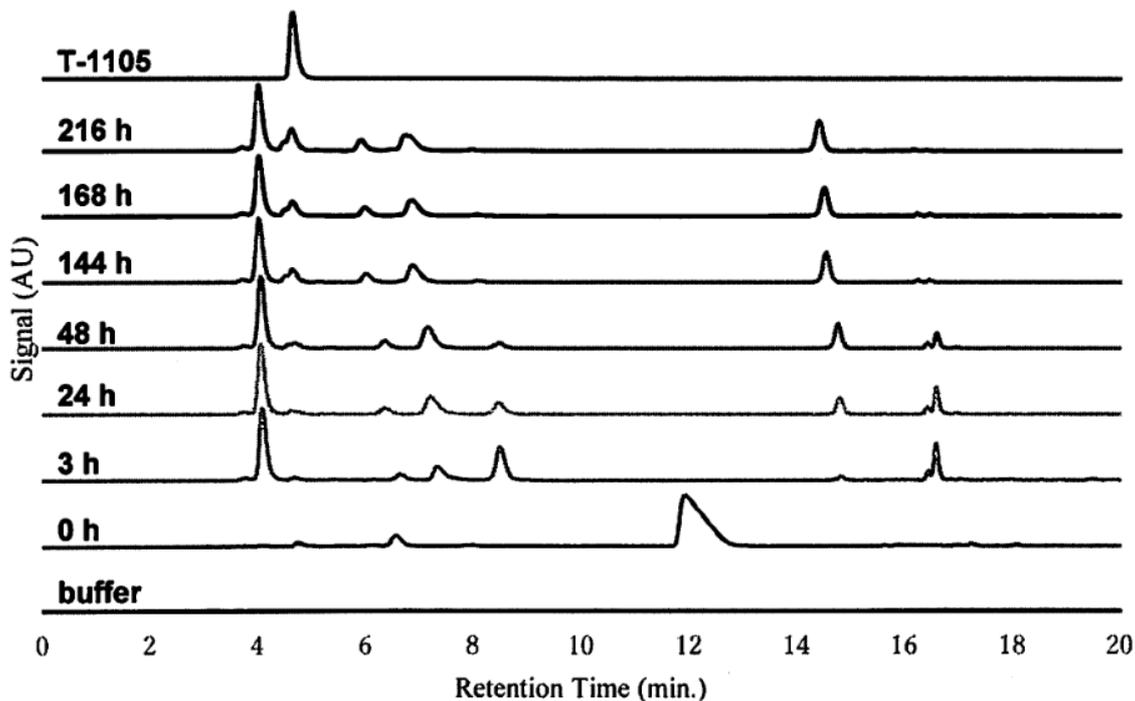


図 2. 初期型 T-1105 プロドラッグの NA 感受性試験 (pH7.4)。酵素の作用でプロドラッグが崩壊し、薬剤モデルの T-1105 が遊離する過程を逆相 HPLC で追跡した。

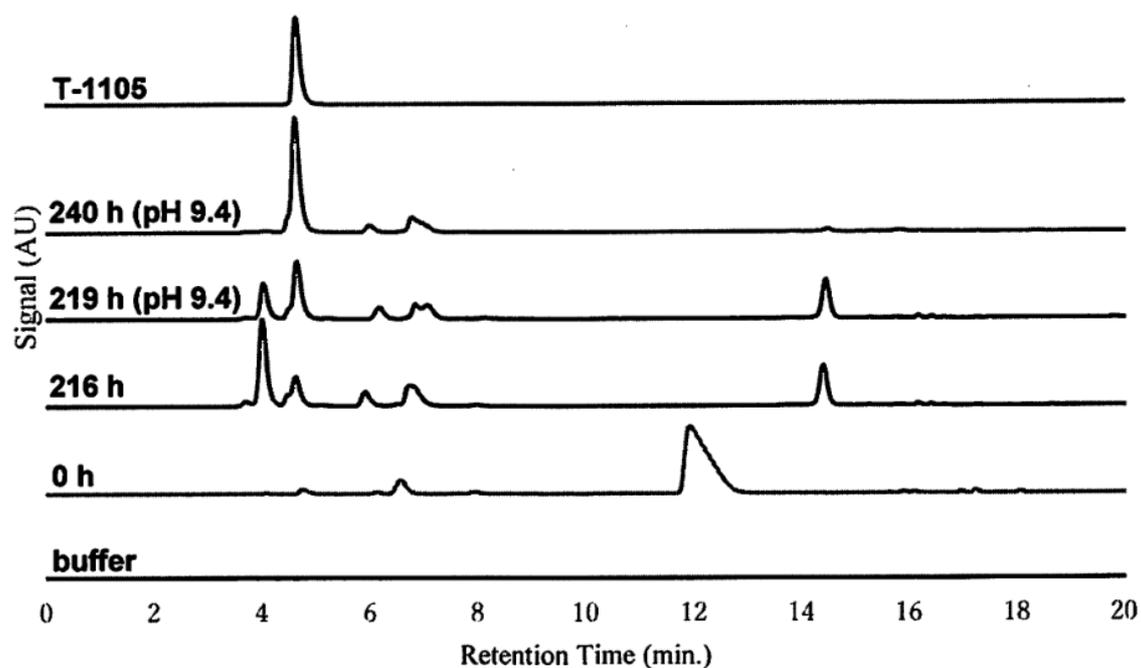


図 3. 初期型 T-1105 プロドラッグの NA 感受性試験 (pH9.4)。図 1 に示した酵素処理から 216 時間が経過した溶液の pH を 9.4 に調整し、T-1105 の遊離を継続して逆相 HPLC で追跡した。

改良型 T-1105 プロドラッグの薬剤遊離評価

初期型 T-1105 プロドラッグにおけるリンカー部位の構造を見直した改良型 T-1105 プロドラッグを合成し、上記と同様にノイラミダーゼを作用させた。試験結果を図 4 に示す。酵素添加直後のクロマトグラム(0 h)では、保持時間 8.0 min に出発物であるプロドラッグのピークが検出された。この出発物ピークは 1 時間後にほぼ消失し、その一方で保持時間 3.0 min に新たなピークが出現した。このフラクションを質量分析した結果、このピークは目的とする薬剤 T-1105 であることがわかった。90 時間後に反応溶液を再度 HPLC 分析したところ、T-1105 のピークはわずかに増大していた。ピーク面積から定量した結果、反応開始から 1 時間後には 16.9%、90 時間後には 27.0% の薬剤が遊離したことが明らかになった。反応開始から 90 時間後のクロマトグラムにおける保持時間 9.9 min のピーク面積は 48% であることから、おおよそ半分量の化合物においてはリンカーの崩壊途中で停止している可能性が示唆された。結果として、改良型 T-1105 プロドラッグでは、初期型と比べて薬剤遊離速度が大きく向上したが、薬物遊離機構をになうリンカー部位の構造についてはさらなる検討が必要であることも示された。

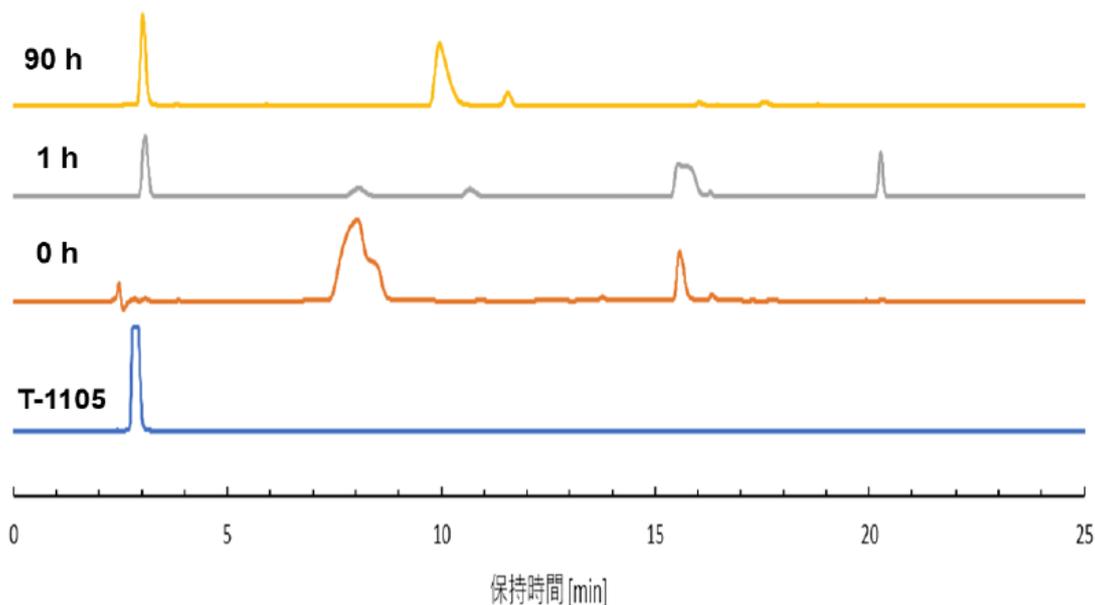


図 4. 改良型 T-1105 プロドラッグの NA 感受性試験 (pH7.4)。酵素の作用によるプロドラッグの崩壊から薬剤が遊離されるまでの経時変化を逆相 HPLC で追跡した。(図 2 および図 3 とは、HPLC 分析における溶離液組成グラジエントが異なっているため、保持時間が一致していない)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野悠河, 松下隆彦, 小山哲夫, 幡野健, 松岡浩司
2. 発表標題 シアル酸リンカーを介したT-1105のインフルエンザノイラミニダーゼ感受性プロドラッグの合成研究
3. 学会等名 日本化学会, 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野悠河, 松下隆彦, 小山哲夫, 幡野健, 松岡浩司
2. 発表標題 NAIによるシアル酸の解離機構を用いたプロドラッグの合成研究 (II) ~シアル酸リンカーの合成及び薬物の選択的保護の検討~
3. 学会等名 東京糖鎖研究会, GlycoTOKYO2019 Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野悠河, 松下隆彦, 小山哲夫, 幡野健, 松岡浩司
2. 発表標題 NAIによるシアル酸の解離機構を用いたプロドラッグの合成研究 (): 薬剤の選択的保護条件及び薬剤リンカーのモデル検討
3. 学会等名 高分子学会, 第31回埼玉地区懇話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内山凌, 星野悠河, 松下隆彦, 小山哲夫, 幡野健, 松岡浩司
2. 発表標題 NAによるシアル酸の解離機構を用いたプロドラッグの合成研究(IV): シアル酸誘導体の合成と合成の再現性の検討
3. 学会等名 高分子学会, 第4回北関東地区講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内山 凌, 星野 悠河, 松下 隆彦, 小山 哲夫, 幡野 健, 松岡 浩司
2. 発表標題 NA によるシアル酸の解離機構を用いたプロドラッグの合成研究(): 薬剤リンカーの合成
3. 学会等名 日本化学会, 第102回春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------