

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05412

研究課題名(和文) 酵素機能制御を基盤とするインフルエンザ・新型コロナ治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic agents for influenza and new corona based on enzyme function control

研究代表者

清田 洋正 (Kiyota, Hiromasa)

岡山大学・環境生命自然科学学域・教授

研究者番号：30234397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ治療薬：標的シアリダーゼの基質シアル酸との親和性増大を期待し、カルボキシ基をホスホノ基/スルファモイル基に置換した誘導体を合成した。シアル酸の脱炭酸体にP-/S-アセタールを構築、酸化、(ジフルオロ化、)脱保護を経て、ジフルオロホスホノシアル酸モノエチルエステル/スルファモイルシアル酸を合成した。

新型コロナウイルス疾患治療薬：ファビピラビル(アビガン)およびレムデシビルについて、高活性化・低毒性化と耐性ウイルス対策を目指した誘導体の合成を検討した。ファビピラビル：塩基部の短工程合成と糖部2'-C-メチル体の合成を実施した。レムデシビル：新規な塩基部9-フルオロ体を合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上市までの手段が確立され手軽な安価な低分子薬は、モダリティー多様化の現代においても、依然治療法の主役である。本研究で明らかにした、シアル酸カルボキシ基のヘテロ原子系官能基への置換は、抗インフルエンザ薬シアリダーゼ阻害剤開発の大きな流れになり得る。新型コロナウイルス疾患についても、次のパンデミックの備えとして、本研究の合成ブロックが新薬開発に役立つと期待する。

研究成果の概要(英文)：1. As a lead for influenza treatment, synthesis of analogs in which the carboxy group was replaced with a phosphono group and a sulfamoyl group, hoping to increase the affinity of the target viral sialidase with the substrate sialic acid, was examined. Fully acetylated sialic acid was subjected to decarboxylation, followed by formation of P- or S-acetal intermediate. The target compounds difluorophosphono-sialic acid monoethyl ester or sulfamoyl-sialic acid was synthesized by oxidation, (difluorination,) and deprotection.

2. As a lead for treatment of COVID-19 disease, the synthesis of favipiravir (Avigan) and remdesivir derivatives aimed at high activity/low toxicity, and preparation against emerging resistant viruses was examined. Favipiravir: an improved short-step synthesis of the pyrazine carboxamide portion and preparation of a 2'-C-methyl ribose type precursor were achieved. Remdesivir: a synthesis of a new base portion, 9-fluoro derivative of pyrrolotriazine was performed.

研究分野：有機合成化学

キーワード：シアリダーゼ阻害剤 抗インフルエンザ薬 シアル酸 アビガン レムデシビル ホスホノシアル酸 スルホシアル酸 新型コロナウイルス疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

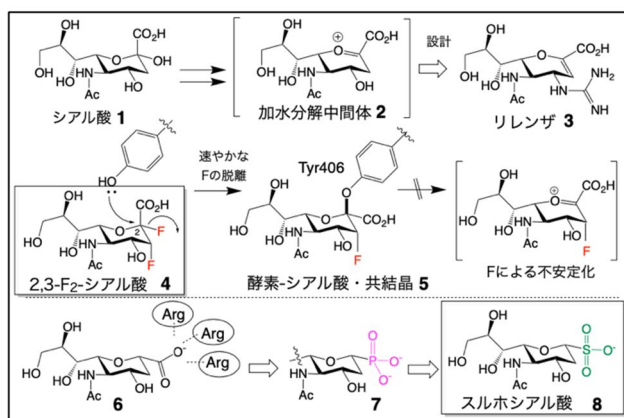
病原性ウイルスによる疾患は、軽度の風邪からインフルエンザ、コロナ SARS Covid-19 に至るまで人類を苦しめている。ウイルスの感染増殖機構を解明した人類は、ヒトとウイルスの相違点に着目、ウイルスに特徴的な酵素反応を化学的にブロックする治療薬を開発して、ウイルスに対抗してきた。ウイルスの感染増殖機構が一つ明らかになると、それをターゲットとする阻害剤が集中的に開発上市される。しかし、たちまち耐性ウイルスが出現し、ヒト側は構造を僅かに改変したアナログ剤の作出で対応するという、対症療法的いたちごっこが繰り返されてきた。

①インフルエンザ

毎年猛威を振るう季節性インフルエンザの治療薬として、タミフル・リレンザ(3)・イナビル・ラピアクタなどが上市され、パンデミックに備えて備蓄されている。これらは、シアリダーゼ本来の基質シアル酸(1)由来のカチオン中間体(2)をモチーフにした拮抗阻害剤であるため、酵素の僅かな構造変化が結合能の低下、即ち耐性獲得に繋がりやすいと考える。かつて反応機構は未確定で、新薬開発は既存モチーフの構造改変に留まっていた。

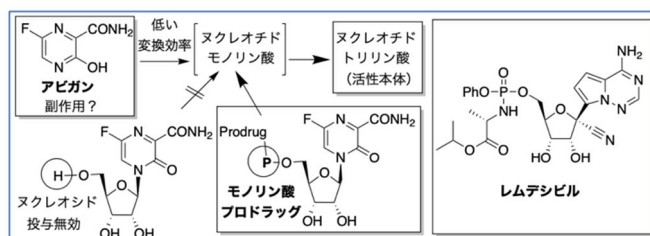
(A)フッ素基の導入：大類(研究協力者)は、フッ化シアル酸のグリコシドが(カチオン中間体がF基の電子求引性により不安定化されるため)酵素加水分解されにくいとの推定から、3-F-シアル酸を合成したが、これは逆にグリコシル化も進行しにくく、酵素阻害活性は弱かった。そこで我々は、アノマー位に脱離基として二つめのF基を導入した2,3-F₂-シアル酸(4)に着目、合成したところ、酵素のTyr406残基とグリコシド(5)を形成し、不可逆的阻害剤として働くことが分かった(共結晶のX線構造解析)。同時に未解明であったインフルエンザシアリダーゼの反応機構の確定に成功した。

(B)カルボキシ基の置換：いずれの上市薬剤でもシアル酸のCO₂H基(酵素の三つのArg残基と静電的相互作用する)は「保存」されている。このCO₂H基(6)はPO₃H₂基で代替可能(7)との報告をもとに、我々はより電子求引性の大きいSO₃H基(8)を設計、合成したところ、阻害活性が向上した。



②コロナ SARS Covid-19

新型コロナウイルス(RNA ウィルス)の深刻なパンデミックに対応するため、治療薬としてRNAポリメラーゼ阻害剤が注目されていた。主に核酸塩基のミミックであるこれら阻害剤は、ATGC塩基との類似性による毒性発現(ミミックとなるため正常細胞にも働く)、非類似性による薬効不全(ミミックとならず活性本体に変換されない)の宿命的欠陥がある。コロナ禍対策は喫緊の課題であったゆえ、いくつかの治療薬候補が先行試験的に供され、アビガン(ファビピラビル)、レムデシビルの有効性についても様々な情報が交錯していた。一刻も早い新薬開発の要求に応えるため、これらの欠点を独自の視点から解析し、補正するための誘導体を標的に定めた。



アビガンは、服薬後に体内で直接ヌクレオチドリン酸を経て三リン酸に変換され、ウイルスのRNAポリメラーゼを阻害する。しかしながら大量の服用を要するのは、この変換効率が悪いと推測された。一方アビガンヌクレオシドはヌクレオチドに変換されないため、薬効の向上のためには、アビガンヌクレオチドリン酸のプロドラッグの投与が有効で、アビガン自体が持つと推定される副作用も抑えられると想定された。

レムデシビルでは、重篤な副作用（肝機能障害、下痢、皮疹、腎機能障害、多臓器不全、敗血症性ショック、急性腎障害）とRNAポリメラーゼ阻害活性が低い点が問題であった。

2. 研究の目的

①2,3-F₂-スルホシアル酸および誘導体の合成と酵素活性評価に基づく、第3世代阻害剤リードの開発を目的とする。第3世代として掲げた設計思想は、「(A) 2,3-F₂-シアル酸による酵素反応の不可逆的阻害」と「(B)電子求引性付与のためのカルボキシ基置換の有用性」である。

②代謝制御設計に基づくアビガン・レムデシビル誘導体の合成を目的とする。作業仮説「核酸医薬の毒性は更なる官能基導入により低減する」に基づき、誘導体設計を行う。アビガン・レムデシビルと共に、フラノース環への嵩の小さい官能基の導入により、分子全体の諸特性への影響を最少限に、フラノース部分の立体配座を僅かに歪ませて、RNAポリメラーゼおよび関連酵素に対する親和性を微妙に変化させる。

3. 研究の方法

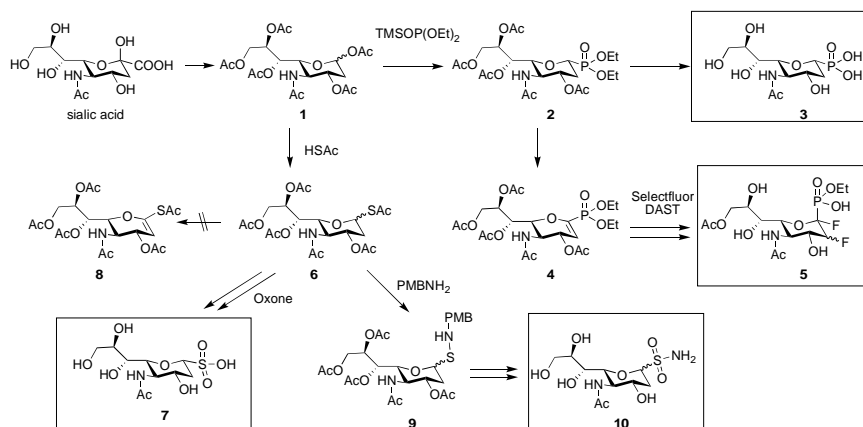
①シアル酸を出発原料に、ヒドロキシ基の保護および脱炭酸後にヘテロ原子（P/S）系官能基を導入して、ホスホノ-/スルホシアル酸骨格を構築する。その後、官能基変換やフルオロ基の導入、脱保護を経て目的誘導体を調製する。

②ファビピラビルおよびレムデシビルのアナログを、既知法あるいはその改良を経て合成する。

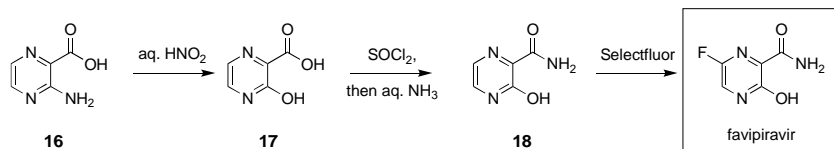
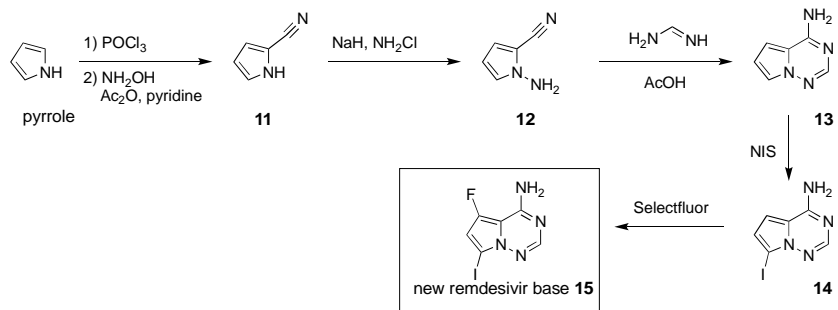
4. 研究成果

①シアル酸のヒドロキシ基をアセチル基で保護した後、加熱・脱炭酸してアセタール **1** に変換した。アセタール **1** に対してホスホノ基を導入(**2**)、脱保護してホスホン酸 **3** を得た。一方、**2** に酸化的に C=C 結合を導入(**4**)後、順次フルオロ基を導入、脱保護してジフルオロホスホノシアル酸モノエチルエステル **5** を合成した。

アセタール交換で S₂O-アセタール **6** に導く経路では、アセチルスルファニル基を酸化した後脱保護して、スルホシアル酸 **7** を合成した。スルホシアル酸型誘導体 **7** への二重結合およびフルオロ基等の導入を試みたが、目的とする変換生成物 **8** は得られなかった。**6** からはスルフェナモイル体 **9** を経てスルファモイルシアル酸 **10** を合成した。一連のホスホノ型およびスルホ型合成化合物については、各種インフルエンザウィルス由来シアリダーゼの阻害活性試験を通じて、カルボキシ型に代わる治療薬リードの発見基盤になると考える。



②レムデシビル：ピロールにシアノ基(**11**)と N-アミノ基を導入し **12** を調製した。**12** とギ酸アミジンとの脱水反応を経て縮合環 **13** を形成、塩基との置換に必要なヨード基(**14**)に続き、9 位にフルオロ基を導入した、新規なレムデシビル塩基部分 **15** の合成を 10g スケールで達成した。ファビピラビル：アミノピラジカルボン酸 **16** のヒドロキシ化体 **17** をアミド化(**18**)し、セレクトフルオルを用いてフルオロ基を導入、ファビピラビルの 3 工程改良合成法を開発した。リボースあるいはグルコースから種々の糖部分の合成を行った。目的化合物の合成には至っていないが、これら塩基部と糖部は新規な新型コロナウイルス疾患治療薬開発に繋がる合成素子である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Vavricka Christopher J., Sriwilaijaroen Nongluk, Suzuki Yasuo, Kiyota Hiromasa	4. 巻 2556
2. 論文標題 Synthesis and Neuraminidase Inhibitory Activity of Sialic Acid Analogues with Fluoro, Phosphono, and Sulfo Functionalities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Springer Protocols, Glycovirolgy Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 303 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2635-1_20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sriwilaijaroen Nongluk, Vavricka Christopher J., Kiyota Hiromasa, Suzuki Yasuo	4. 巻 2556
2. 論文標題 Influenza A Virus Neuraminidase Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Springer Protocols, Glycovirolgy Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 321 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2635-1_21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 ヴァリッカ クリストファー J., 徐超, 桑名晶妃, 森さおり, 清田洋正	4. 巻 97
2. 論文標題 抗インフルエンザ薬開発を指向したシアル酸誘導体 (シアリダーゼ阻害剤) の開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 科学と工業	6. 最初と最後の頁 2-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清田洋正
2. 発表標題 抗インフルエンザ薬を目指して - シアリダーゼ阻害剤の設計 -
3. 学会等名 熊本大学大学院先端科学研究部特別講演 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑名晶妃、松本達磨、森さおり、武藤千明、Christopher J. Vavricka、泉実、清田洋正
2. 発表標題 抗インフルエンザ薬を指向したシアル酸の1位置換誘導体の合成研究
3. 学会等名 日本農薬学会第47回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徐超、桑名晶妃、Christopher J. Vavricka、清田洋正
2. 発表標題 ホスホノシアル酸・スルホシアル酸類の合成研究
3. 学会等名 日本農薬学会第49回大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Yasuo Suzuki	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 357
3. 書名 Glycoviroplogy Methods and Protocols	

1. 著者名 Christopher J. Vavricka, Nongluk Sriwilaijaroen, Yasuo Suzuki and Hiromasa Kiyota	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 18
3. 書名 Methods in Molecular Biology	

1. 著者名 Nongluk Sriwilaijaroen, Christopher J. Vavricka, Hiromasa Kiyota, Yasuo Suzuki	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 33
3. 書名 Methods in Molecular Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学 天然物有機化学（合成）研究室ホームページ https://www.cc.okayama-u.ac.jp/~anpc/res/resJ.html 岡山大学 研究シーズ https://partners.okayama-u.ac.jp/seeds-detail?id=114 岡山大学農学部天然物有機化学（合成）研究室 https://www.cc.okayama-u.ac.jp/~anpc/</p>
--

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
研究分担者	ヴァヴリッカ クリストファー (Vavricka Christopher) (20809199)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (12605)	

	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
研究協力者	大類 洋 (Ohroi Hiroshi)		

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			
タイ	Thammasat University			