

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350976

研究課題名(和文) シアル酸のアニオン型誘導体ライブラリーを利用した新規抗ウイルス薬の探索

研究課題名(英文) Development of novel anti-virus drugs by means of libraries of sialic acid derivatives possessing an anion at the 1-position

研究代表者

千葉 順哉 (CHIBA, Junya)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：50436789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しい抗インフルエンザ薬の開発を目指した。電荷に着目したオリジナルの分子設計を施し、クリック反応を利用して効率よく新薬候補化合物を合成した。得られた阻害剤は、ノイラミニダーゼに対してリレンザに匹敵する阻害能力を示した。またそれらは、タミフル耐性を獲得した変異体に対して、高い結合力を保持したままであった。これらの得られた成果を、特許出願3件、そのうち特許取得1件、学会発表17件、論文3報、図書1報にて報告した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed novel candidates of anti-flu medicine. We originally designed them based on the plus and minus charge in the zanamivir and derivatized them efficiently by means of click chemistry. The candidate inhibitors showed high inhibitory ability to neuraminidase comparable to that of zanamivir. In addition, they also exhibited high affinity to the mutant neuraminidase with oseltamivir resistant. We applied 3 patents, got 1 patent, had 17 presentations, reported 3 original articles, and published 1 book in regard to the results in this study.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：医薬品探索 シアル酸誘導体 クリックケミストリー アシルスルホンアミド スルホニルアミジン
ノイラミニダーゼ 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

人類はこれまでに、さまざまなウィルスの脅威にさらされて来た。その中でもインフルエンザは毎年のように流行し、多くの亜型が存在する。タミフルやリレンザに代表される抗インフルエンザ薬が開発され、実際の医療現場で処方されている。しかしながら、場合によっては現れてしまう重篤な副作用と、これらに薬剤耐性を示す変異ウィルスの出現が大きな社会問題となっていた。実際に研究開始の数年前には、新型ウィルスの出現とパンデミックが全世界を震撼させた。さらに研究開始当初にも、動物に感染するインフルエンザウィルスのヒトへの感染が懸念される事案が発生し、今なお人類にとって大きな脅威となっている。したがって、新しい作用機序をもつ、あるいはウィルスの変異に対しても効能を落とさない新しい抗ウィルス薬の開発には、国家的さらには全世界規模の戦略が必要不可欠な状況にあった。

2. 研究の目的

タミフルやリレンザなどの抗インフルエンザ薬は、細胞表面に存在する糖鎖末端のシアル酸を切断するタンパク質(ノイラミニダーゼ)を阻害する。これらの薬は、その酵素切断反応におけるシアル酸の遷移状態アナログ(創薬リード化合物)を基に開発されてきた。リード化合物の化学構造を少しずつ変換しつつ、コンピューターでの計算化学も利用しながら、これらの薬が開発されてきた。これらに共通のユニットとして、C1位のマイナス電荷(カルボキシレートアニオン)と、C4位のプラス電荷(グアニジウムカチオン)が重要とされてきた。さまざまな化学構造の変換が試みられてきたが、C1位の誘導化例は非常に少なく、プロドラッグとしてのエステル化が見られる程度であった。これは、C1位のカルボン酸をエステルやアミドへと誘導化すると、カルボキシレートのマイナス電荷が損なわれるためである。

そこで本研究では、生理的条件下でマイナス電荷をもつカルボキシレートアニオンの等価体として「アシルスルホンアミド」を利用して、マイナス電荷を残したまま新規抗ウィルス薬候補群の化合物ライブラリー作成を目指すことにした(図1)。

「スルホクリック反応」を利用することで、アシルスルホンアミドを形成しつつC1位にさまざまな分子骨格を簡単に導入することが可能となる。これにより新規抗インフルエ

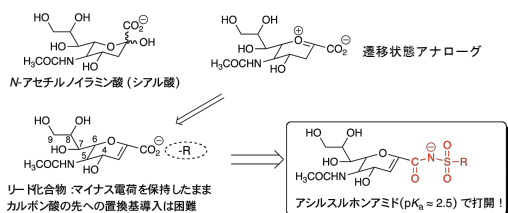


図1 新薬開発の戦略

ンザ薬の候補ライブラリーを構築し、新薬スクリーニングへと展開する。

3. 研究の方法

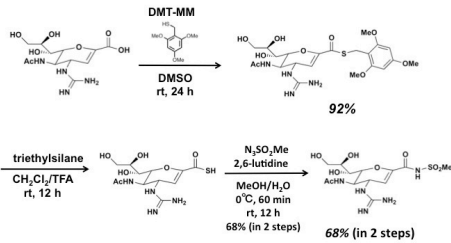
(1) 「アシルスルホンアミドを導入したシアル酸誘導体(新薬候補化合物)の合成」スルホクリック反応を利用した効率的な化合物合成には、シアル酸ユニットのチオカルボン酸への変換が必要である。そこで、市販のシアル酸誘導体やザナミビルのカルボキシ基を、チオカルボキシ基へと変換する。次に、得られたチオ酸誘導体と各種スルホニルアジド化合物とでスルホクリック反応を行い、新薬候補化合物を合成する。

(2) 「スルホニルアミジンを導入したシアル酸誘導体(新薬候補化合物)の合成」アシルスルホンアミドのマイナス電荷の対比として、プラス電荷を持つスルホニルアミジンを導入したシアル酸誘導体を合成する。これには、当研究室で開発を進めているチオアミドを利用したクリック反応が有用である。そこで、(1)と同様に、市販のシアル酸誘導体やザナミビルのカルボキシ基を、チオアミド基へと変換する。次に、得られたチオアミド誘導体と各種スルホニルアジド化合物とでスルホクリック反応を行い、新薬候補化合物を合成する。

(3) 「新薬候補化合物のノイラミニダーゼに対する結合能評価」(1), (2)にて合成した新薬候補化合物を用いて、蛍光法によるノイラミニダーゼに対する結合能を評価する。ノイラミニダーゼには亜型が存在するため、市販の簡単に入手可能な数種類のノイラミニダーゼについて評価する。50%阻害濃度(IC50)、阻害形式、阻害定数(Ki)を蛍光測定により求め、比較検討する。

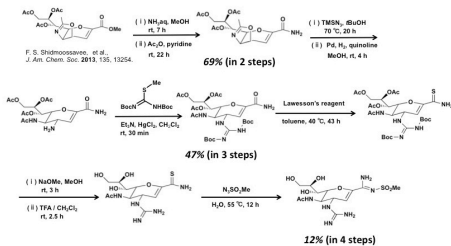
4. 研究成果

(1) 「アシルスルホンアミドを導入したシアル酸誘導体(新薬候補化合物)の合成」始めに、市販のシアル酸誘導体やザナミビルのカルボキシ基を、チオカルボキシ基へと変換した。チオカルボン酸誘導体は空气中で不安定で保存に不向きであったため、保護基を導入した形で保存し、次のスルホクリック反応で使用する際に逐次脱保護して使用することにした。続いてのスルホクリック反応には、メチル基、フェニル基などさまざまな置換基をもつスルホニルアジドを準備することで、最終的に19種類のアシルスルホンアミド型新薬候補化合物を合成することが出来た。スキーム1には、メタンスルホニルアジドを用いた場合のザナミビル型メチル誘導体の合成スキームを示した。以上の合成で開発したスルホニルアジド化合物やアシルスルホンアミド化合物、そのシアル酸誘導体については、特許2件を出願し、そのうち1件については特許を取得するに至った。



スキーム 1 ザナミビル骨格とメチル置換基をもつアシルスルホンアミド誘導体の合成

(2) 「スルホニルアミジンを導入したシアル酸誘導体 (新薬候補化合物) の合成」次に、市販のシアル酸誘導体やザナミビルのカルボキシ基を、チオアミド基へと変換した。チオアミド誘導体はチオカルボン酸体比べて安定で単離可能であり、取り扱いやすい化合物であった。続いてのチオアミドクリック反応には、メチル基、フェニル基などさまざまな置換基をもつスルホニルアジドを準備することで、最終的に 11 種類のスルホニルアミジン型新薬候補化合物を合成することが出来た。スキーム 2 には、メタンスルホニルアジドを用いた場合のザナミビル型メチル誘導体の合成スキームを示した。



スキーム 2 ザナミビル骨格とメチル置換基をもつスルホニルアミジン誘導体の合成

これらの新薬候補化合物の合成と並行して、我々が開発したチオアミドクリック反応に関して、その反応性や反応の特長について精査した。反応性についての知見が得られれば、新薬候補化合物の効率的な合成が可能となるからである。計算化学を利用した反応性の考察と実際の実験事実から、チオアミドクリック反応の反応性には、チオアミドの双極子モーメントとスルホニルアジドの電子求引性が特に重要であることが判明した。以上の研究で合成したチオアミド化合物やチオアミドクリック反応については、1 件の特許を出願し、2 報の論文にて報告した。

(3) 「新薬候補化合物のノイラミニダーゼに対する結合能評価」(1), (2) で合成した新薬

C1 位の負電荷の重要性

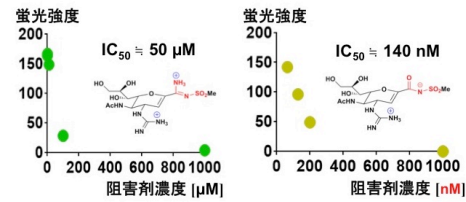


図 2 アシルスルホンアミド (右) とスルホニルアミジン (左) 誘導体の H5N1 ノイラミニダーゼに対する蛍光測定を利用した IC50 評価

候補化合物全てについて、ノイラミニダーゼに対する結合能を評価した。6 種類のノイラミニダーゼ (H1N1, H1N1 [H274Y mutant], H5N1, H5N1 [H274Y mutant], H7N9, H3N2) を準備し、蛍光基をもつ市販のシアル酸誘導体 (MUNANA) を利用した蛍光法にて、まずは 50% 阻害濃度 (IC50) を測定した。図 2 では、アシルスルホンアミドとスルホニルアミジン骨格を比較した。マイナス電荷を持つアシルスルホンアミド誘導体が nM オーダーの強い会合を示したことから、C1-位の負電荷の重要性を確認することが出来た。この誘導体を用いて、ノイラミニダーゼに対する阻害形式を評価したところ競合阻害であることが確認でき、その阻害定数 K_i は 19.5 nM と求めた (図 3)。

阻害形式の評価

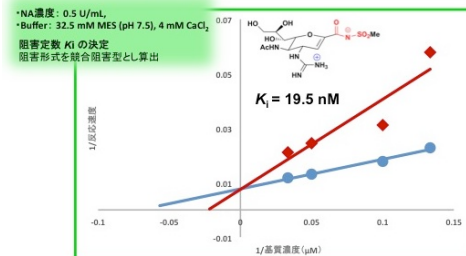


図 3 アシルスルホンアミド誘導体の H5N1 ノイラミニダーゼに対する蛍光測定を利用した阻害形式と阻害定数 (K_i) の評価

さらにこの誘導体を用いて、様々なノイラミニダーゼの亜型に対しての結合能を評価した (図 4)。アシルスルホンアミド誘導体は、リレンザには及ばなかったものの、試した 6 種類全てのノイラミニダーゼに対して nM オーダーの強い会合を示した。注目すべきは、タミフルに対する耐性株 (H1N1 [H274Y mutant] および H5N1 [H274Y mutant]) に対して、結合力が低下しなかった点である。リレンザとともに、変異に対して影響を受けにくい新薬となる可能性が示唆された。



IC ₅₀ (nM)	Me 誘導体	ザナミビル	オセルタミビル酸
H1N1	170	0.9	0.9
H1N1 (H274Y mutant)	160	1.0	9.0
H5N1	140	2.5	0.8
H5N1 (H274Y mutant)	140	3.0	75
H7N9	380	5.0	0.8
H3N2	50	0.5	0.8

測定条件
各種ノイラミニダーゼ: 1 U/mL
MUNANA: 10 μM
Buffer: 32.5 mM MES (pH 6.5)
*Pre-incubation: 37 °C, 10 min
*Incubation: 37 °C, 30 min
*蛍光測定: 励起 365 nm
観測 450 nm

図4 さまざまな亜型のノイラミニダーゼに対する IC₅₀ の評価

今回の研究期間中に開発した合計 30 種類の候補化合物の中で、図5に示した化合物が特に強くノイラミニダーゼと会合した。本研究によって、今後 C1-位に導入する置換基をさらに工夫することで、タミフルやリレンザよりも強く相互作用し、タンパク質の変異に対して影響をうけにくい新薬候補開発への可能性を示すことができた。

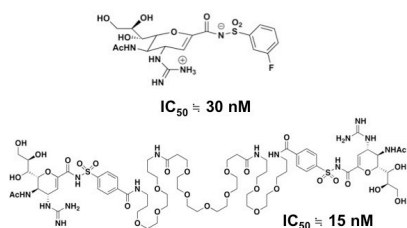


図5 強い会合を示したアシルスルホンアミド誘導体

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Muhammad Aswad, Junya Chiba*, Takenori Tomohiro, Yasumaru Hatanaka*, “CSimple Synthesis of Sulfonyl Amidine-Containing Glucosidase Inhibitors by a Chemoselective Coupling Reaction Between D-Gluconothiolactam and Sulfonyl Azides”, *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.*, **14**(2), 1-8 (2017), 査読有

DOI:10.9734/IRJPAC/2017/34259

② Muhammad Aswad, Junya Chiba*, Takenori Tomohiro, Yasumaru Hatanaka, “Evaluation of dipole moment and electrophilicity on the nature of click-type coupling reaction between thioamide and sulfonyl azide”, *Tetrahedron Lett.*, **57**, 1313-1316 (2016), 査読有

DOI:10.1016/j.tetlet.2016.02.028

③ Muhammad Aswad, Junya Chiba*, Takenori Tomohiro, Yasumaru Hatanaka*, “Coupling reaction of thioamides with sulfonyl

azides: An efficient catalyst-free click-type ligation under mild conditions”, *Chem. Commun.*, **49**, 10242-10244 (2013), 査読有
DOI:10.1039/C3CC46055J

[学会発表] (計17件)

① 千葉 順哉, 「触媒不要の新規なクリック型の化学反応に用いる試薬類」、Toyama Science GALA 2016、2016年9月30日、富山大学多目的ホール (富山県富山市)

② Kyoko Yamamoto, Muhammad Aswad, Junya Chiba, Yasumaru Hatanaka, Takenori Tomohiro, “A novel coupling reaction between thioamides and sulfonyl azides”, The 1st International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network, 2016年9月12日~13日、富山国際会議場 (富山県富山市)

③ Muhammad Aswad, Junya Chiba, Yasumaru Hatanaka, Takenori Tomohiro, “Novel click-type coupling reaction of thioamides with sulfonyl azides: scope, mechanism and application”, The 1st International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network, 2016年9月12日~13日、富山国際会議場 (富山県富山市)

④ 坂口 知美, 千葉 順哉, 中山 純, 畑中 保丸, 友廣 岳則, 「チオアミドとスルホニルアジドのクリック型反応を利用したノイラミニダーゼ阻害剤の標的誘導型合成」、日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会、2016年6月15日~17日、京都テルサ (京都府京都市)

⑤ 山本 恭子, 千葉 順哉, Muhammad Aswad, 高橋 惇, 畑中 保丸, 友廣 岳則, 「チオアミドとスルホニルアジドを用いる新規クリック型反応」、日本薬学会第136年会、2016年3月26日~29日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑥ Muhammad Aswad, Junya Chiba, Takenori Tomohiro, Yasumaru Hatanaka, “A click-type coupling reaction between thioamides and sulfonyl azides as a versatile approach to generate new pharmacologically active compounds”, The 2nd International Current Breakthrough (ICB)-Pharma Symposium 2015, 2015年10月31日、Solo (Indonesia)

⑦ 千葉 順哉, 志村 みさき, 國安 和仁, 中山 純, 橋田 まみ, 鈴木 千尋, 畑中 保丸, 友廣 岳則, 「ザナミビル C1 位カルボキシ基変換型の新規ノイラミニダーゼ阻害剤の開

発」、第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10日～12日、熊本大学工学部黒髪キャンパス（熊本県熊本市）

⑧ 千葉 順哉、「新規なクリック反応に用いる試薬類」、イノベーションジャパン-2015 大学見本市、2015年8月27日～28日、東京ビッグサイト（東京都江東区）

⑨ 志村 みさき、千葉 順哉、國安 和仁、中山 純、橋田 まみ、鈴木 千尋、畑中 保丸、友廣 岳則、「ザナミビル C1 位変換型の新規ノイラミニダーゼ阻害薬の開発」、日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会、2015年6月10日～12日、東北大学川内キャンパス（宮城県仙台市）

⑩ 志村 みさき、千葉 順哉、國安 和仁、中山 純、橋田 まみ、鈴木 千尋、畑中 保丸、友廣 岳則、「ザナミビル C1 位誘導化によるノイラミニダーゼ阻害剤の探索」、フォーラム富山 創薬 第41回研究会、2015年5月28日、オークスカナルパークホテル富山（富山県富山市）

⑪ 千葉 順哉、中山 純、橋田 まみ、鈴木 千尋、志村 みさき、畑中 保丸、友廣 岳則、「ザナミビル C1 位カルボキシ基誘導化体のノイラミニダーゼ阻害能評価」、日本薬学会第135年会、2015年3月25日～28日、神戸学院大学（兵庫県神戸市）

⑫ Junya Chiba, Muhammad Aswad, Takenori Tomohiro, Yasumaru Hatanaka, “A catalyst-free bio-orthogonal coupling reaction of thioamides and sulfonyl azides”, 24th French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (FJS 2014), 2014年9月14日～17日、Lyon (France)

⑬ 友廣 岳則、増田 宗太、森本 正大、山口昇太、千葉 順哉、畑中 保丸、「光アフィニティー蛍光ラベルによる構造情報に基づいた結合解析」、第36回日本光医学・光生物学学会、2014年7月25日～26日、大阪大学医学部学友会館（大阪府吹田市）

⑭ 中山 純、橋田 まみ、志村 みさき、千葉 順哉、友廣 岳則、畑中 保丸、「C1 位カルボキシ基の誘導化によるシアル酸アナログの開発」、日本薬学会第134年会、2014年3月27日～30日、熊本大学工学部黒髪キャンパス（熊本県熊本市）

⑮ 千葉 順哉、畑中 保丸、「チオアミドを利用した水中での無触媒クリック型反応」、平成25年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会、2013年12月12日、ウインクあいち（愛知県名古屋市中区）

⑯ Muhammad Aswad、千葉 順哉、友廣 岳則、畑中 保丸、「チオアミドとスルホニルアジドによる新規クリック型反応」、日本薬学会北陸支部第125回例会、2013年11月17日、北陸大学薬学部アネックスファーム（石川県金沢市）

⑰ Muhammad Aswad、加藤 日奈、中山 純、千葉 順哉、友廣 岳則、畑中 保丸、「A mild coupling of thioamide and sulfonyl azide as a novel click reaction without activation additives」、日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会、2013年6月19日～21日、東京医科歯科大学鈴木章夫記念講堂（東京都文京区）

〔図書〕（計1件）

Junya Chiba, Takenori Tomohiro, Yasumaru Hatanaka, Wiley, “Methanesulfonyl azide” in e-EROS Encyclopedia of Reagents and Organic Synthesis, 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：2-デオキシ-2,3-ジデヒドロシアル酸誘導体およびその製造方法

発明者：畑中 保丸、千葉 順哉、友廣 岳則、中山 純

権利者：富山大学

種類：特許

番号：特願2014-227212

出願年月日：2014年11月7日

国内外の別：国内

名称：チオアミド誘導体

発明者：千葉 順哉、友廣 岳則、畑中 保丸

権利者：富山大学

種類：特許

番号：特願2014-207775

出願年月日：2014年10月9日

国内外の別：国内

名称：スルホニルアジド誘導体およびアシルスルホンアミド誘導体の製造方法並びにそれらの利用

発明者：畑中 保丸、千葉 順哉、友廣 岳則

権利者：富山大学

種類：特許

番号：特願2013-089114

出願年月日：2013年4月22日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：スルホニルアジド誘導体およびアシルスルホンアミド誘導体の製造方法並びにそれらの利用

発明者：畑中 保丸、千葉 順哉、友廣 岳則

権利者：富山大学
種類：特許
番号：特許第 6112659 号
取得年月日：2017 年 3 月 24 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
富山大学薬学部 生体認識化学研究室
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/anachem/anachem/homu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 順哉 (CHIBA, Junya)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
助教
研究者番号：5 0 4 3 6 7 8 9

(2) 連携研究者

畑中 保丸 (HATANAKA, Yasumaru)
富山大学・事務局・理事・副学長
研究者番号：3 0 1 1 1 1 8 1

(3) 連携研究者

友廣 岳則 (TOMOHIRO, Takenori)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
准教授
研究者番号：7 0 3 5 7 5 8 1