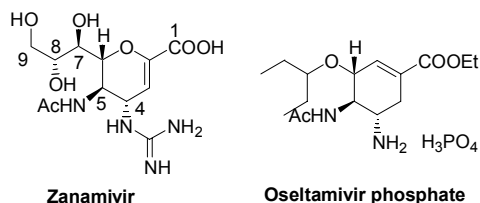


論文の内容の要旨

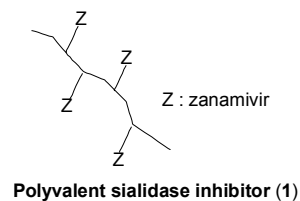
論文題目 新規インフルエンザ・シアリダーゼ阻害剤の合成と生物活性
氏名 益田 剛

インフルエンザウイルス表面に存在するシアリダーゼは、感染細胞（ヒトにおいては上気道粘膜）のシアル酸（Neu5Ac）を切断する酵素であり、複製されたウイルス粒子の出芽と以後の感染に重要な役割を果たしている。本酵素の阻害剤であるザナミビル（Biota/GSK、吸入投与）及びリン酸オセルタミビル（Gilead/Roche、経口投与）は、抗インフルエンザ治療薬として既に世界的に上市されている。これら 2 剤は、安全性が高く、耐性ウイルスが出現しにくいので、優れた治療剤であるが、問題点として、発症後 48 時間以内の投薬が必要であること、また、体内半減期が短いため、予防投与は頻回服用しつづけなければ効果がないことが挙げられる。そこで本研究は上記の問題点を克服すべく、ザナミビルをリード化合物とした新規な抗インフルエンザ薬（吸入剤及び経口剤）の創製を行った。



1. 吸入剤の創製

吸入剤については、ザナミビルに比べより少ない投与回数での治療及び予防効果が期待できる薬剤の合成を目標とした。はじめに、呼吸器（活性部位）からの消失が早いことが問題であるザナミビルに対し、体内に吸収されずに呼吸器に長期貯留すべく修飾できれば問題が解決できると考えた。その手段として、シアリダーゼ阻害剤が適切な密度



でポリマー支持体に共有結合したポリマー型シアリダーゼ阻害剤 (**1**) をデザインした。そこで問題になるのは、シアリダーゼ阻害剤の活性を保持しつつ、そのどの位置で高分子と共有結合させるかである。Itzstein らの酵素とザナミビルの複合体の X 線結晶解析の結果より、グリセロール部の 7 位水酸基は酵素の外側を向いて配置しており、酵素と直接水素結合していないことが報告されている。これを参考にしてザナミビルの 7 位と高分子がリンカーを介して結合するのが適切と考えた。そこでまずグリセロール側鎖部の 7 位水酸基を修飾した一連のザナミビル誘導体を合成し、その構造活性相関から、ポリマーとどの結合様式が適当かを検討した。

1-1. 7 位修飾ザナミビルの合成と生物活性

当初シアル酸の 7 位の修飾については、小倉らが報告しているシアル酸保護誘導体 (**5**) の 7 位アシル化の例を除いては直接修飾した報告は無かった。筆者もザナミビル中間体 **7** ($R^2=H$) の 7 位水酸基の修飾を種々検討したが、目的物を得ることはできず、シアル酸 7 位水酸基は立体的に混んでいるために修飾が難しいと判断した。そこで化学的な直接修飾ではなく、4 位修飾 *N*-アセチルマンノサミン (**2**) を基質とするシアル酸アルドラーゼを用いる酵素法により 7 位修飾シアル酸 (**3**) を得る合成法を検討した。その結果 $R^1=F, N_3, OMe, OEt$ などの **2** を基質として酵素反応により収率良く対応する 7 位修飾シアル酸を得た。あとは常法に従い各種 7 位修飾ザナミビル (**4**) に導いた (Scheme 1)。得られた **4** のウイルス増殖阻害活性を評価した結果、7 位フッ素体 **4a**、アジド体 **4b**、メトキシ体 **4e**、エトキシ体 **4f** がザナミビルと比べてより高い阻害活性を有していることが判明した (Table 1)。次により長鎖のアルキルエーテル体の活性に興味を抱いたが、当化合物は酵素法では合成困難であったため、再度シアル酸の 7 位アルキル化について検討した。その結果、基質 **5** を用いた場合にのみ 7 位水酸基のアルキル化が進行することを見出した。対応する 7 位長鎖アルキルエーテル誘導体 **6** を得、引き続き **4** に導いた (Scheme 2)。

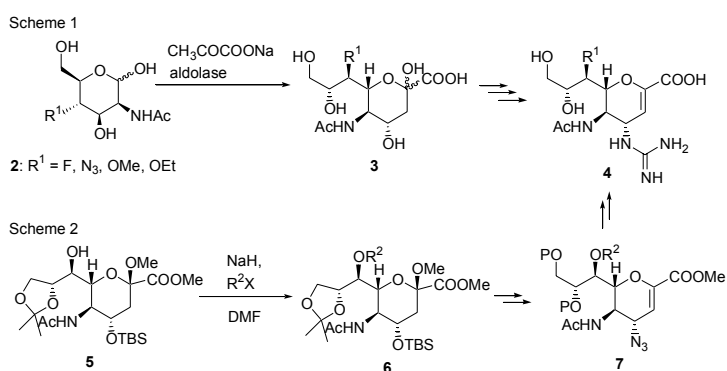


Table 1. Sialidase inhibitory and virus growth inhibitory activities of **4**
IC₅₀ (ng/mL)

	R ¹	Sialidase inhibitory assay		Virus growth inhibitory assay	
		A/PR/8/34	A/Yamagata/32/89	A/PR/8/34	A/Yamagata/32/89
Zanamivir	OH	1.8	7.0		
4a	F	2.2	3.0		
4b	N ₃	1.3	0.7		
4c	NH ₂	6.6	40.0		
4d	NHCOCH ₂ CH ₃	8.5	140.0		
4e	OCH ₃	2.6	1.1		
4f	OCH ₂ CH ₃	1.3	1.0		
4g	O(CH ₂) ₁₁ CH ₃	8.8	3.6		
4h	OCH ₂ CH ₂ NHAc	2.6	1.4		

アルキルエーテル体 **4e-4h** はいずれもザナミビルと同等以上の酵素阻害活性を有していた。さらに、これらの誘導体のウイルス増殖阻害活性は、ザナミビルに比べて 2 倍から 10 倍向上した (Table 1)。

1-2. ポリマー型シアリダーゼ阻害剤の合成と生物活性

上記7位修飾ザナミビルの構造活性
 相関より、結合様式としては最も活性
 が保持されるアルキルエーテル体を選
 択し、**8**のアルキルエーテル末端アミン
 とWSC、HOBtで活性化したポリ-L-
 グルタミン酸と縮合した後、透析によ
 り精製を行いポリマー誘導体 (**9**) を得
 た (Scheme 3)。これらのポリマー誘
 導体は、側鎖 (アルキル鎖) の長さ及びザナミ
 ビルの配置密度によらず、ザナミビルに比べウ
 イルス増殖阻害活性が約 100 倍向上し、シア
 リダーゼ阻害剤を高分子化とすることで単分
 子では望めない高い *in vitro* 活性を示した
 (Table 2)。

さらにマウス/インフルエンザ感染系で、
9c 及びザナミビルを感染 2 日後に一回経鼻投
 与し、感染 20 日間後の延命率で薬効を評価した結果、
 ザナミビル投与群が全数死亡したのに対して、**9c** 投
 与群は全数生存、治癒した (Table 3)。

また予防効果を評価するため感染 7 日前に **9c** を
 経鼻投与した場合も薬効が保持された。

投与 5 日後の **9c** 投与群の肺洗浄液は、シアリダ
 ーゼ阻害活性を示したことから、ポリマー誘導体が呼吸器へ貯留していることが示唆され、
 以上に示した薬効の向上はポリマーの呼吸器への長期貯留に基づくと考えている。

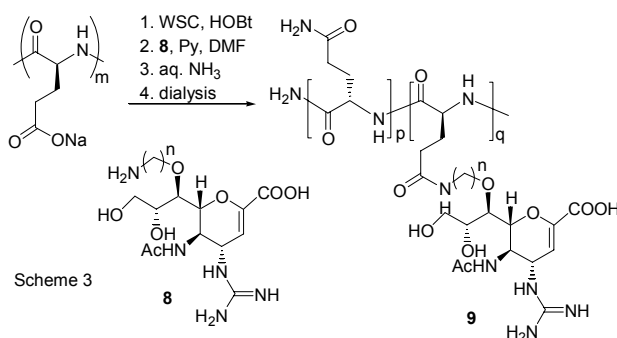


Table 2. Sialidase inhibitory and virus growth inhibitory activities of compounds **9**
 IC₅₀ (ng/mL)

	n	p : q ^a	Sialidase inhibitory assay		virus growth inhibitory assay	
			A/PR/8/34	A/Yamagata/32/89	A/PR/8/34	A/Yamagata/32/89
Zanamivir			1.8	7.0		
9a	2	10:1	9.4	0.054		
9b	2	3:1	41.0	0.140		
9c	5	10:1	13.1	0.060		
9d	10	10:1	3.8	0.160		

^aThe ratios were determined by ¹H NMR.

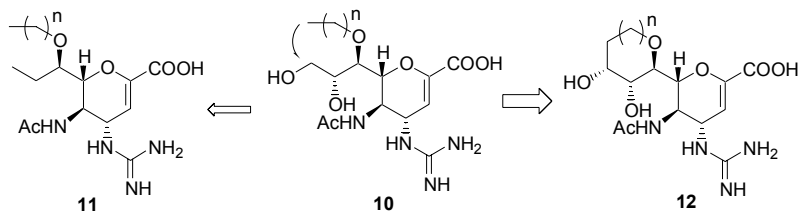
Table 3. Survival rates of infected mice dosed with 0.17 mg/kg of compound **9c** or zanamivir at 2 days after infection.

	No. of survivors / total No. of mice	
	10 days after infection	20 days after infection
Zanamivir	0/8	0/8
9c	7/7	7/7

2. 経口剤の創製—環状側鎖を有するザナミビル誘導体の合成と生物活性

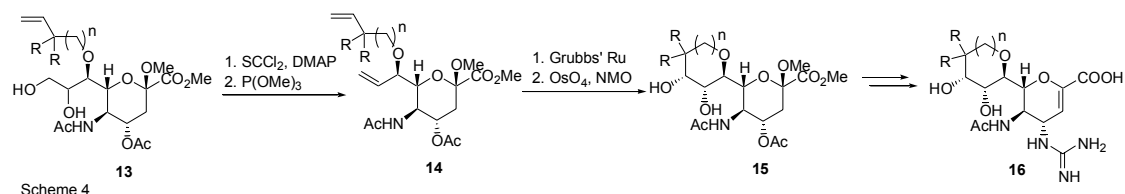
リン酸オセルタミビルは経口投与可能であるが、ザナミビルはその極性の高さゆえ消化管で吸収されず、経口投与では薬効がない。この 2 剤は 2000 年に同時に上市されたが、当初から簡便に内服できるリン酸オセルタミビルが抗インフルエンザ治療剤市場を優先している。この現状をふまえて筆者は経口投与可能なシアリダーゼ阻害剤の創製を行った。

ザナミビルの 1-カルボン酸、4-グアニジノ基、5-アセトアミド基はいずれも活性発現に必須であると考え、グリセ
 ロール部に脂溶性が向上
 するべく修飾を行った。し
 かし 7 位アルキルエーテ



ル誘導体 (**10**)、および 8, 9-ジデオキシアシルエーテル誘導体 (**11**) は、ザナミビルよりも脂溶性が高いが、経口投与によるマウス/インフルエンザ感染系で薬効を評価した結果、リン酸オセルタミビルには及ばなかった。そこでアシルエーテルの末端と 9 位を結合した環状側鎖を有する化合物 (**12**) をデザインした。

合成はオレフィン末端を有する 7 位アシルエーテルシアル酸誘導体 **13** の 8, 9 位の水酸基をオレフィンに還元した **14** を閉環メタセシス後、オスミン酸でジオール化し **15** を得、引き続き各種二環性化合物 (**16**) に導いた (Scheme 4)。これはメタセシス反応を用いて、グリセロール側鎖部を修飾し、新規シアリダーゼ阻害剤を合成した初めての例である。



得られた化合物 **16** の酵素阻害活性およびウイルス増殖阻害活性を評価した (Table 4)。その結果、6 員環の側鎖を有する **16b** がザナミビルの 2 倍のウイルス増殖阻害活性を有していた。さらにマウス/インフルエンザ感染系で、**16b** 及びリン酸オセルタミビルを感染後一日二回 5 日間経口投与し、評価した結果、リン酸オセルタミビルと同等の薬効を示した。

Table 4. Sialidase inhibitory and virus growth inhibitory activities of bicyclic sialidase inhibitors **16**
IC₅₀ (ng/mL)

	n	R	Sialidase inhibitory assay		virus growth inhibitory assay	
			A/PR/8/34		A/Yamagata/32/89	
Zanamivir			1.8		7.0	
16a	0	H	2.2		5.7	
16b	1	H	1.7		3.2	
16c	1	F	1.6		3.7	
16d	2	H	2.0		10.3	

3. 結論

今まで修飾困難だったシアル酸グリセロール側鎖部の 7 位水酸基のアシルエーテル化する方法を見出し、一連のザナミビル誘導体を合成した。続いてザナミビルの 7 位アシルエーテル体を共有結合したポリ-L-グルタミンを合成し、その *in vitro* および *in vivo* における薬効は既存薬をはるかに凌駕するものであった。また、シアル酸にメタセシス反応を用いることで環状側鎖を有するザナミビル誘導体を新規に合成し、経口投与が可能となった。化合物 **9c** 及び **16b** は医薬としての可能性に更なる検討が加えられている。