

博士論文要旨

新規非対称型 HCV NS5A 阻害薬の開発研究
Development of a novel unsymmetrical structural class
of HCV NS5A inhibitors

自然科学研究科物質化学専攻

中村 洋

Abstract

In recent years, several drugs for type-C hepatitis have been demonstrated to exert a dramatic effect on the reduction of the viral load. Nonstructural 5A protein (NS5A) plays an important role in virus replication as a component factor of hepatitis C virus (HCV) replication complex. The oral NS5A inhibitor, daclatasvir, showed extremely potent viral RNA replication inhibitory activity in HCV replicon cells and dramatically reduced RNA of HCV in the clinical studies. The NS5A inhibitors currently on the market had structural characteristics in common and there is concern that these structural similarities would confer similar antiviral profiles and cross-resistance among these inhibitors. In this study, the identification of a novel unsymmetrical structural class of HCV NS5A inhibitors was described by exploring unknown binding sites on the target protein. An unsymmetrical lead compound, generated from a substructure of a known symmetrical inhibitor, was optimized by extension of its substituents to interact with the hitherto unexplored site of the target protein. This approach afforded novel highly potent unsymmetrical inhibitor which not only equally inhibited HCV genotypes 1a, 1b, and 2a with EC_{50} values in the picomolar range, but also inhibited the 1a Q30K mutant induced by a launched symmetrical inhibitor daclatasvir with an EC_{50} in the low nanomolar range.

肝炎は何らかの要因により肝臓に炎症が生じ、肝細胞が破壊されて肝機能が徐々に低下する疾患であり、その原因はアルコールの摂取や肥満など様々な原因で起こるが、最も多いものはウイルス感染によって肝臓に炎症が起こる「ウイルス性肝炎」である。その中でも C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) 感染者は、現在全世界で 1 億 7,000 万人、日本では 100 万～150 万人存在すると推定されている。有効なワクチンはなく、感染すると約 70%が慢性化し、ウイルスが自然排除されることはほとんどなく、HCV 感染による炎症の持続により肝硬変や肝細胞癌へと進展するため、無治療の場合には少なくとも 20%～30%が死亡すると推定されている。初期の C 型肝炎の治療には、インターフェロンとリバビリンとの併用療法が中心であったが、著効率や副作用の面で課題が残るため、より効果が高く副作用の少ない薬剤の開発が期待されていた。HCV 研究において、効率の良いウイルス培養系が存在しないことが治療薬開発の妨げになってきたが、1990 年後半に培養細胞内で HCV の増殖複製が簡単に再現できる HCV レプリコンシステムを利用した細胞評価系により、HCV タンパクを標的とした様々なメカニズムの薬剤開発が盛んに行われるようになった。そのターゲットタンパクの一つである HCV NS5A は、その機能は明確には判明していないものの、HCV 複製複合体の構成因子としてウイルスの複製に重要な役割を果たすとされている。その阻害薬である daclatasvir は、HCV レプリコン細胞を用いた評価で pM オーダーの非常に強力なウイルス RNA 複製阻害活性を示し、また、第 I 相の臨床試験にて単剤の一回投与で、他のメカニズムの薬剤よりも HCV RNA 量を劇的に低下させた。この非常にインパクトの大きい臨床報告を受け、我々のグループも含め

て多くの競合他社にて NS5A をターゲットとした治療薬の開発研究が盛んに行われるようになった。しかしながら、他のメカニズムの薬剤と同様、単剤のみでは短期間に薬剤耐性株が出現することがわかった。

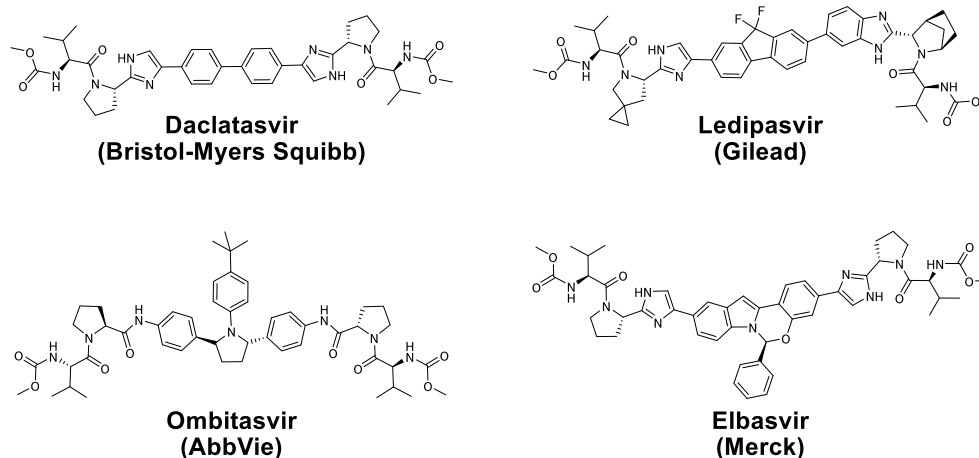


Figure 1. HCV NS5A inhibitors on market.

現在承認されている HCV NS5A 阻害薬は高い対称性や両側にある末端メチルカーバメートの存在など共通の構造特性を持っているため、構造類似性によってこれらの阻害薬は同様の薬剤特性を示すことが予想された (**Figure 1**)。そこで、これまでの対称型阻害薬が持たないユニークな置換基を有する阻害薬を創出できれば、これまでと異なる抗ウイルス作用を示す次世代の阻害薬となると考えた。本研究では、強力な抗ウイルス作用を有する新規 NS5A 阻害薬の創製を目指し、既知の対称型阻害薬からダウンサイズして最小活性発現構造を見出した後、既知の阻害薬と異なる形へ変換する方針で阻害薬の開発研究を行った。研究の基準となる対称型化合物は、強力な抗ウイルス作用を示し、末端部分から先へ置換基導入が容易な D-フェニルグリシン基を有する対称型化合物 **1** を設定した (**Figure 2**)。

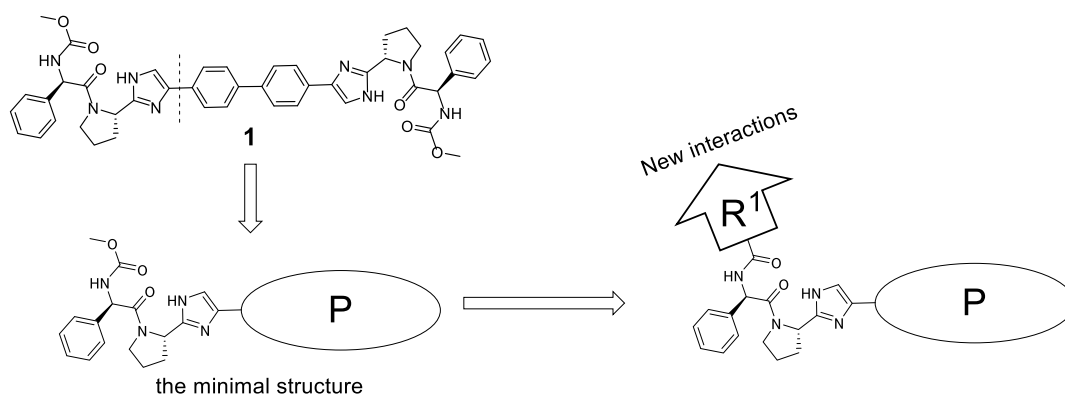


Figure 2. Strategy for discovery of a novel structural class of HCV NS5A inhibitors.

対称型 NS5A 阻害薬 **1** から最小活性発現構造を確認するため、部分構造を削減した化合物を合成した。その結果、化合物 **3** において最低限の活性が保たれることがわかり、対称型阻害薬 **1** の最小活性発現構造としてビフェニル構造までが重要であることがわかった。また、ビフェニルから先のイミダゾール部分を単純な構造へ模倣した化合物を探索した結果、アミド構造へ変換した化合物 **11** が HCV の遺伝子型である 1b 型に対して対称型阻害薬と同程度の強い阻害活性を示した。本化合物は分子サイズが低減し、1a 型および 1b 型ともに抗ウイルス作用を示したことから、リード化合物として設定した (Figure 3)。

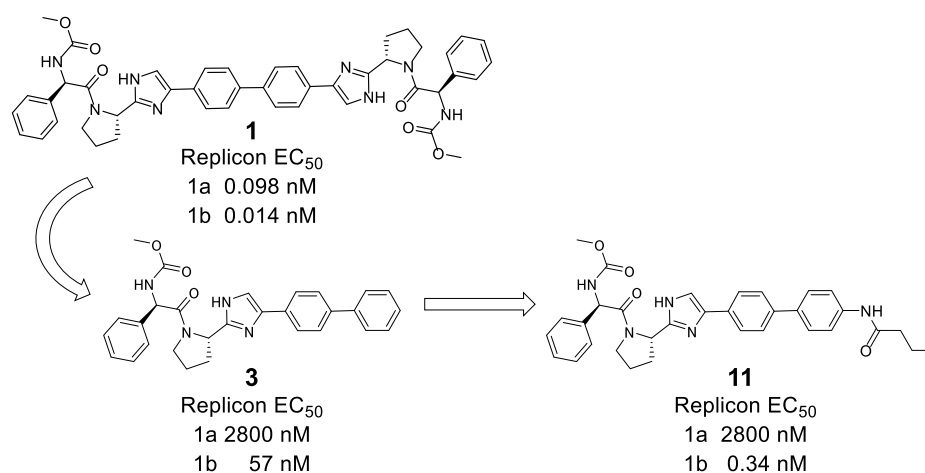


Figure 3. Exploration of minimal active structure at P region.

評価に用いた化合物の合成戦略として、数多くの各種化合物を効率よく合成するため、市販の 3 つの原料から鈴木宮浦クロスカップリング、続く HATU を用いた縮合反応により共通中間体 **17** を合成し、この中間体 **17** から各末端部分の部分パーツと縮合反応により、各化合物を合成した (Figure 4)。

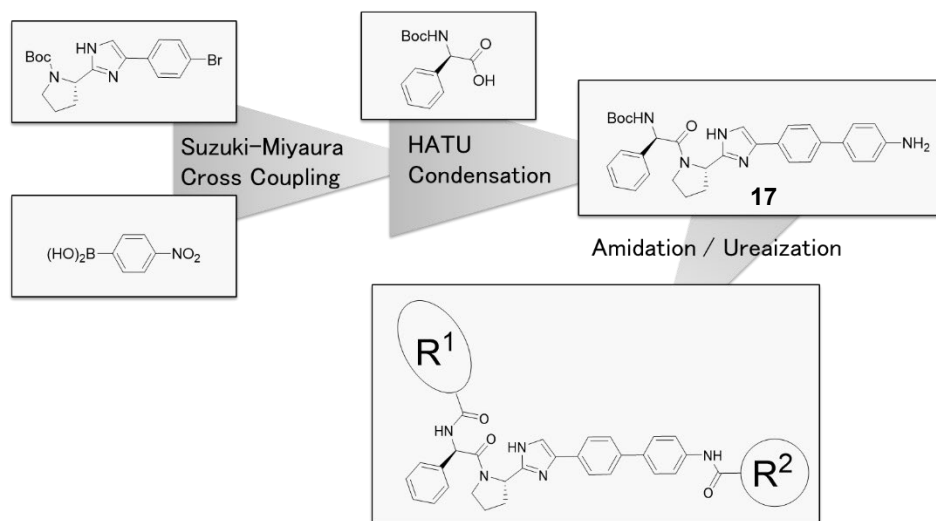


Figure 4. Efficient synthetic strategy for test compounds.

リード化合物 **11** から NS5A タンパクの新規相互作用の獲得を目指す方針として、既存の NS5A 阻害薬の開発研究であまり変換例がないフェニルグリシン部分の末端メチルカーバメートの先への伸長を試みることにした。検討の結果、炭素鎖の先へベンジルカーバメート基を導入した化合物 **23** に 1a 型阻害活性の大幅な向上が見られた。この阻害活性が向上した理由は、自由度が高い炭素直鎖がカーバメートへ変換されたことでコンホメーションが固定されて末端ベンゼン環が適当な位置への配置されたため、或は、新たに導入したカーバメート基の官能基が HCV 蛋白質と極性相互作用を獲得したためと推測した。そこで、更に強固にコンホメーションを固定することで阻害活性が向上するのではないかと考え、環構造を介してカーバメート基を固定した化合物の合成を実施した。その結果、5員環の (*R*)-3-置換ピロリジン環を有する **30** がリード化合物 **11** と比較し、1a 型は 2500 倍、1b 型は 70 倍の強い阻害活性を示した。フェニルグリシン部分の末端メチルカーバメートの先の変換によって阻害活性が大きく向上した本結果はこれまでに報告例がなく、新規阻害薬を創出するうえで重要な知見である (Figure 5)。

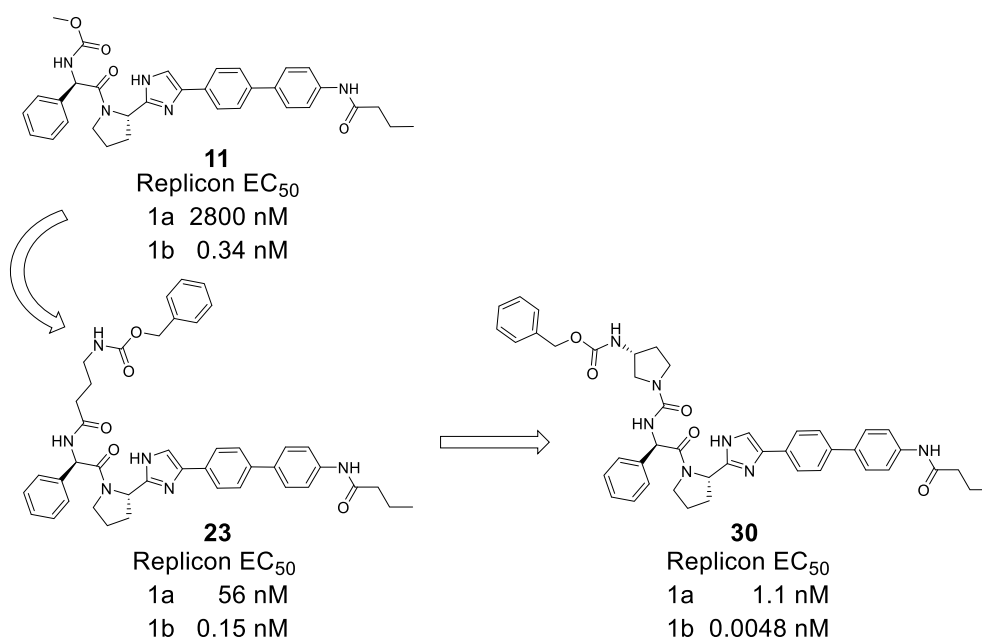


Figure 5. Optimization at region R¹ toward novel interactions with target protein.

次に見出したフェニルグリシンアミド側の構造を固定し、仮置いたブタン酸アミドの脂溶性部分の変換を実施した。その結果、安息香酸アミド、シクロヘキサンアミドおよびピペリジンウレアの 6 員環それぞれの 4 位の置換基が 1a 型に対して強力な阻害活性を示すために重要であることがわかった。その中でも、メトキシピペリジンウレア構造へ変換した化合物 **38** が 1a 型に対して最も強力な阻害活性を示した。R¹ 部は化合物 **30** の構造が最適であることから、その相加効果を狙って両方の構造を合わせ持つ化合物 **39** を合成

したところ、1a, 1b および 2a 型のレプリコン細胞に対して既存の対称型阻害薬である daclatasvir と同等の強力な抗ウイルス作用を示した。また、臨床で確認された daclatasvir の耐性変異株の 1 つである 1a Q30K 型に対する阻害活性の減弱度合は、daclatasvir と比較するとかなり小さいことがわかった。以上の結果から、本研究で見出した新規非対称型 NS5A 阻害薬は daclatasvir とは異なる抗ウイルス作用を有することが明らかとなり、本研究内容は、次世代の NS5A 阻害薬を創出する上での新しい方法論を示すものと期待される (Figure 6)。

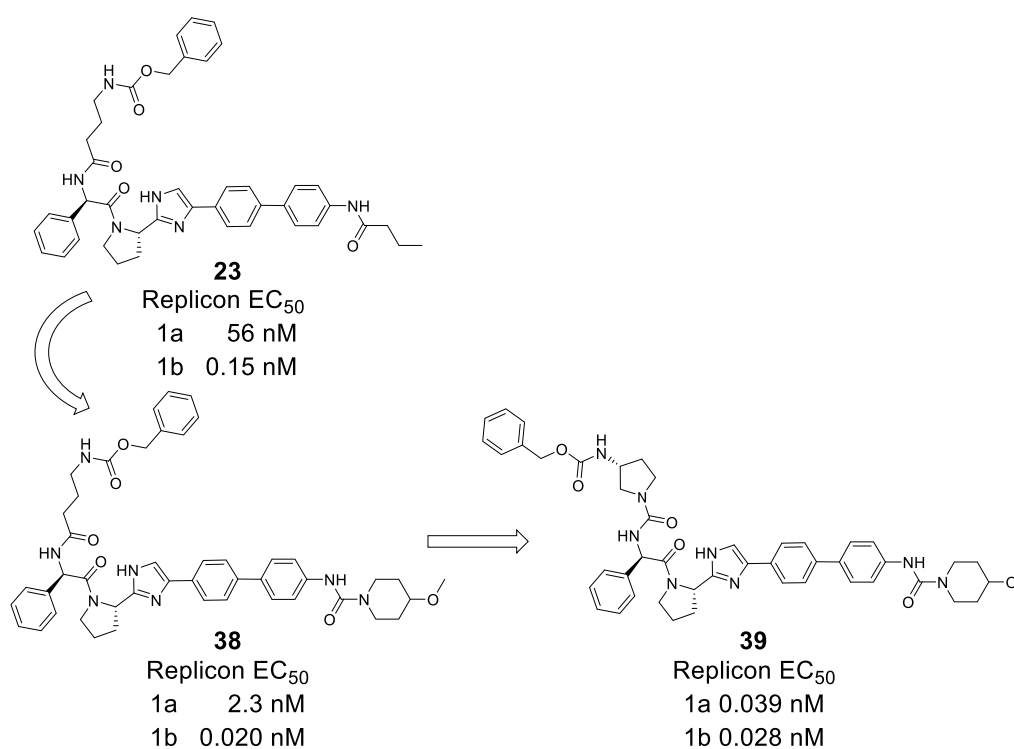


Figure 6. Development of HCV NS5A inhibitor via improvement of region R² in addition to R¹.

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

新規非対称型 HCV NS5A 阻害薬の開発研究

Development of a novel unsymmetrical structural class of HCV NS5A inhibitors

2. 論文提出者 (1) 所 属 物質化学 専攻

(2) 氏 名 ^{ふり} ^{がな} ^{なか} ^{むら} ^{ひろし}
中 村 洋

3. 審査結果の要旨（600～650字）

提出学位論文について、各審査委員により個別に予備審査を実施するとともに、令和3年8月4日に開催された口頭発表の結果を踏まえて、同日に論文審査委員会を開催して協議を行った。その結果、以下の様に判定した。

C型肝炎はC型肝炎ウイルス（HCV）の感染により起こる肝臓の病気で、無治療の場合30%が死亡すると推定され、有効な治療薬の開発が強く望まれている。HCV NS5Aは非構造タンパクの一つであり、ウイルス複製に重要な役割を果たすとされている。本論文では、強力な抗ウイルス作用を有する新規NS5A阻害薬の開発を目指し、既知の対称型阻害薬からダウンサイズして最小活性発現構造を見出した後、既知の阻害薬と異なる非対称化という方針で阻害薬の開発を行った。対称要素のイミダゾール部分をアミド構造へ変換して非対称化する一方、環構造を介したカルバメート基の導入により新たな相互作用獲得が可能であることを明らかにし、強力な抗ウイルス作用を有する化合物の開発に成功した。また、非対称化により、既存薬に比べて変異株に対する阻害活性の減少を大幅に抑える効果があることも明らかにした。本論文の内容は、非対称化という概念導入により、新たな創薬の可能性を示し、合成化学的にも一般性の高い手法により新規医薬品候補化合物の創製を実現した研究として非常に意義深いことから、博士（理学）の学位に値するものと判断した。

4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) 合格・不合格

(2) 授与学位 博士（理学）