

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月22日(22.09.2022)



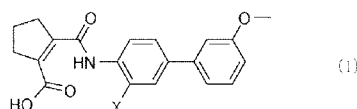
(10) 国際公開番号

WO 2022/196236 A1

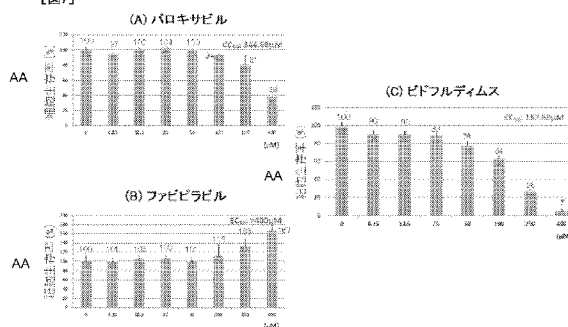
- (51) 国際特許分類:
A61K 31/19 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/006422
- (22) 国際出願日: 2022年2月17日(17.02.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-044575 2021年3月18日(18.03.2021) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人鹿児島大学(KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者: 池田 正徳(IKEDA Masanori); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人 鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 武田 緑(TAKEDA Midori); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人 鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 李 佳洲(LI Jiazhou); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人 鹿児島大学内 Kagoshima (JP).
- (74) 代理人: 木村 満(KIMURA Mitsuru); 〒1010054 東京都千代田区神田錦町二丁目7番地 協販ビル2階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) Title: AGENT AGAINST DRUG-RESISTANT INFLUENZA VIRUS AND USE OF COMPOUND FOR PRODUCING AGENT AGAINST DRUG-RESISTANT INFLUENZA VIRUS

(54) 発明の名称: 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤及び抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の製造のための化合物の使用



【図7】



BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

or amide-modified carboxyl group, or a compound represented by formula (1) having an imine-modified, amide-modified, or urea-modified amino group. In formula (1), X represents a hydrogen atom or a halogen atom.

(57) 要約: 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、下記式(1)に示す化合物、その薬理的に許容される塩、式(1)の化合物の水酸基のエステル修飾体、リン酸修飾体若しくは硫酸修飾体、式(1)の化合物のカルボキシ基のエステル修飾体若しくはアミド修飾体、又は式(1)の化合物のアミノ基のイミン修飾体、アミド修飾体若しくは尿素修飾体を含む。下記式(1)においてXは水素原子又はハロゲン原子を表す。

明 細 書

発明の名称：

抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤及び抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の製造のための化合物の使用

技術分野

[0001] 本発明は、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤及び抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の製造のための化合物の使用に関する。

背景技術

[0002] 季節性のインフルエンザウイルスに対してはノイラミニダーゼ阻害剤とキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤が開発されている。キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤であるバロキサビル（商品名：ゾフルーザ）はノイラミニダーゼ阻害剤よりも強い抗ウイルス活性を有するが、バロキサビルに耐性を有するインフルエンザウイルスの出現が問題となっている。

[0003] 核酸アナログ製剤であるファビピラビル（商品名：アビガン）は、催奇形性を有するため季節性インフルエンザには承認されておらず、新型インフルエンザに限定で承認されている。

[0004] 特許文献1には、ピリミジンの合成に関与するジヒドロオロト酸オキシダーゼ（DHODH）の阻害剤がインフルエンザウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2010/128050号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 特許文献1でDHODH阻害剤の抗ウイルス活性が検討されているインフルエンザウイルスはH7N7亜型である。H7N7亜型は主に鳥での感染が

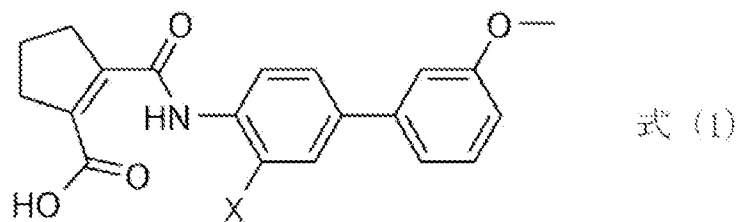
みられ、ヒトでは感染がほとんど拡大しない。ヒトで感染が拡大する H 1 N 1 亜型等のインフルエンザウイルス、特にバロキサビル等の薬剤に耐性を有するインフルエンザウイルスに有効な薬剤の開発が重要である。

[0007] 本発明は上述の事情に鑑みてなされたものであり、薬剤耐性を有するインフルエンザウイルスにも高い抗ウイルス活性を示す抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤及び抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の製造のための化合物の使用を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明の第 1 の観点に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、
下記式 (1) に示す化合物、その薬理学的に許容される塩、式 (1) の化合物の水酸基のエステル修飾体、リン酸修飾体若しくは硫酸修飾体、式 (1) の化合物のカルボキシ基のエステル修飾体若しくはアミド修飾体、又は式 (1) の化合物のアミノ基のイミン修飾体、アミド修飾体若しくは尿素修飾体を含む。

[化1]



[式 (1) において X は水素原子又はハロゲン原子を表す。]

[0009] 上記本発明の第 1 の観点に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、
ポリメラーゼ酸性サブユニットに変異を有するインフルエンザウイルスに対して使用される、
こととしてもよい。

[0010] この場合、前記インフルエンザウイルスの前記ポリメラーゼ酸性サブユニットのアミノ酸配列における N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがトレオニンに置換されている、

こととしてもよい。

[0011] また、前記インフルエンザウイルスは、

H 1 N 1 亜型である、

こととしてもよい。

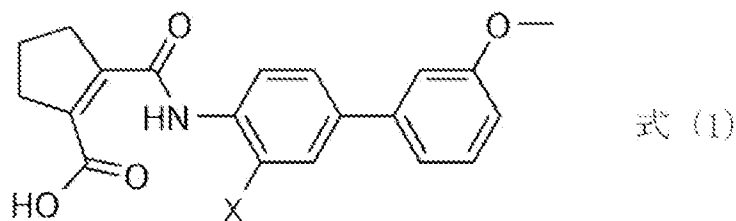
[0012] また、前記式（１）におけるXがフッ素原子である、

こととしてもよい。

[0013] 本発明の第２の観点に係る使用は、

抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の製造のための下記式（１）に示す化合物、その薬理学的に許容される塩、式（１）の化合物の水酸基のエステル修飾体、リン酸修飾体若しくは硫酸修飾体、式（１）の化合物のカルボキシ基のエステル修飾体若しくはアミド修飾体、又は式（１）の化合物のアミノ基のイミン修飾体、アミド修飾体若しくは尿素修飾体の使用である。

[化2]



[式（１）においてXは水素原子又はハロゲン原子を表す。]

発明の効果

[0014] 本発明に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、薬剤耐性を有するインフルエンザウイルスにも高い抗ウイルス活性を示す。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]実施例で用いたレポーターアッセイの原理を示す概念図である。

[図2]実施例で用いたレポーターアッセイにおけるインフルエンザウイルスのRNA複製複合体の各タンパク質とルシフェラーゼ活性との関係を示す図である。

[図3]試験例２における既存薬のルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図4]試験例3におけるバロキサビル耐性変異株のP Aを導入したレポーターアッセイでのルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図5]試験例4における野生型のP Aを導入した場合のルシフェラーゼ活性を示す図である。(A)、(B)及び(C)は、それぞれバロキサビル、ファビピラビル及びビドフルディムスの結果を示す。

[図6]試験例4におけるバロキサビル耐性変異株のP Aを導入した場合のルシフェラーゼ活性を示す図である。(A)、(B)及び(C)は、それぞれバロキサビル、ファビピラビル及びビドフルディムスの結果を示す。

[図7]試験例5における細胞毒性を示す図である。(A)、(B)及び(C)は、それぞれバロキサビル、ファビピラビル及びビドフルディムスの結果を示す。

[図8]試験例6における野生型のP Aを導入した場合の各薬剤のルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図9]試験例6におけるバロキサビル耐性変異株のP Aを導入した場合の各薬剤のルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図10]試験例7における野生型のP Aを導入した場合のBAY 2402234及びビドフルディムスのルシフェラーゼ活性を示す図である。

発明を実施するための形態

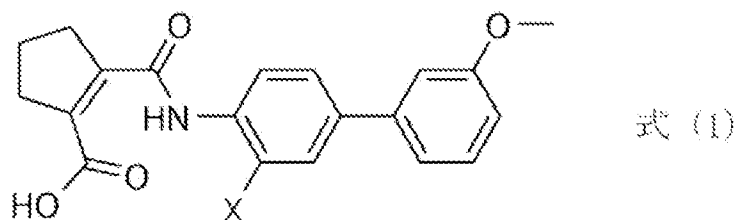
[0016] 本発明に係る実施の形態について図面を参照して説明する。なお、本発明は下記の実施の形態及び図面によって限定されるものではない。なお、下記の実施の形態において、“有する”、“含む”又は“含有する”といった表現は、“からなる”又は“から構成される”という意味も包含する。

[0017] (実施の形態)

本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、下記式(1)に示す化合物を含む。

[0018]

[化3]



[0019] 上記式 (1) において X は水素原子又はハロゲン原子を表す。ハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子 (F)、塩素原子 (Cl)、臭素 (Br) 及びヨウ素 (I) が挙げられる。好ましくは、X はフッ素原子である。X がフッ素原子の場合、上記化合物は、ビドフルディムス (2-[[(3-フルオロ-3'-メトキシ [1, 1'-ビフェニル] -4-イル) アミノ] カルボニル] -1-シクロペンテン-1-カルボン酸) である。

[0020] 本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤に有効成分として含まれる化合物は、薬剤耐性インフルエンザウイルスに対して抗ウイルス活性を示す限り、上記式 (1) に示される化合物の薬理的に許容される塩であってもよいし、式 (1) の化合物の修飾体であってもよい。修飾体としては、式 (1) の化合物の水酸基のエステル修飾体、リン酸修飾体及び硫酸修飾体、式 (1) の化合物のカルボキシ基のエステル修飾体及びアミド修飾体、式 (1) の化合物のアミノ基のイミン修飾体、アミド修飾体及び尿素修飾体が例示される。

[0021] 上記式 (1) に示される化合物の薬理的に許容される塩は、薬理学上許容され、かつ薬剤耐性インフルエンザウイルスに対して抗ウイルス活性を示す塩であれば特に限定されない。当該化合物の塩としては、例えば、アルカリ金属塩及びアルカリ土類金属塩等が挙げられる。アルカリ金属塩としては、例えばリチウム塩、ナトリウム塩及びカリウム塩等が挙げられ、アルカリ土類金属塩としては、マグネシウム塩及びカルシウム塩等が挙げられる。以下、本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤に有効成分として含まれる上記の化合物、その塩、及び上述の修飾体を“化合物等”と総称することもある。

[0022] 抗ウイルス活性とは、インフルエンザウイルスの感染性、増殖能又は免疫回避能を低下させる活性を意味する。本実施の形態における抗ウイルス活性は、特に、インフルエンザウイルスの増殖能を低下させる活性を意味する。ウイルスの増殖能は、宿主細胞におけるウイルス粒子の構成タンパク質の合成能、ウイルス粒子の形成能又はウイルス遺伝子の複製能を含み、特に、ウイルス遺伝子の複製能を意味する。この場合、抗ウイルス活性は、例えば、宿主細胞において、ウイルスタンパク質を阻害して成熟したウイルス粒子の形成を抑制する活性を意味する。下記実施例に示すように、本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、インフルエンザウイルスのRNA複製を阻害する。したがって、上記のウイルスタンパク質は、特に、ウイルス遺伝子の複製に必須であるタンパク質である。

[0023] 本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、A型、B型、C型及びD型のいずれのインフルエンザウイルスに対しても使用され得るが、好ましくは、A型及びB型、特に好ましくは、A型のインフルエンザウイルスに対して使用される。インフルエンザウイルスのサブタイプも特に限定されず、例えば、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤はH1N1亜型及びH3N2亜型等のインフルエンザウイルスに対して使用される。好適には、本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、H1N1亜型のインフルエンザウイルスに対して使用される。

[0024] 本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、薬剤耐性インフルエンザウイルスに対して有効である。薬剤耐性インフルエンザウイルスは、RNA複製複合体を構成するポリメラーゼ酸性サブユニット (polymerase acidic subunit; PA) に変異を有している。これにより、バロキサビル等のキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤の抗ウイルス活性が低減される。

[0025] より詳細には、インフルエンザウイルスは、宿主のmRNAから切断したキャップ構造を利用して、RNA複製複合体によってマイナス鎖RNAからプラス鎖であるウイルスmRNAを合成する。RNA複製複合体は、PB1

、P B 2 及びP A から構成されている。P A は宿主のm R N A からキャップ構造を切断するキャップ依存性エンドヌクレアーゼ活性を有する。H 1 N 1 亜型のインフルエンザウイルスの薬剤耐性株は、P A のアミノ酸配列のN 末端から3 8 番目に位置するイソロイシン（I）がトレオニン（T）、メチオニン（M）又はフェニルアラニン（F）に置換した変異（I 3 8 T、I 3 8 M又はI 3 8 F）を有する。すなわち、インフルエンザウイルスの薬剤耐性株は、P A をコードするP A 遺伝子にI 3 8 T、I 3 8 M又はI 3 8 Fに対応する変異を有する。

[0026] 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、P A にI 3 8 T、I 3 8 M又はI 3 8 Fの変異を有するインフルエンザウイルスに対して使用されてもよい。好ましくは、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、P A にI 3 8 Tの変異を有するインフルエンザウイルスに対して使用される。なお、本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、例えばI 3 8 T等の変異を有しておらず、薬剤耐性能を獲得していないインフルエンザウイルスにも有効である。

[0027] 本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、既知の方法で製造され、有効成分として0. 0 0 0 0 0 1～9 9. 9 重量%、0. 0 0 0 0 1～9 9. 8 重量%、0. 0 0 0 1～9 9. 7 重量%、0. 0 0 1～9 9. 6 重量%、0. 0 1～9 9. 5 重量%、0. 1～9 9 重量%、0. 5～6 0 重量%、1～5 0 重量%又は1～2 0 重量%の化合物等を含む。抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、固形製剤であっても、液状製剤であってもよい。

[0028] 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は化合物等に加え、薬理学上許容される任意の成分を含んでもよい。任意の成分は、例えば、担体、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤及び無痛化剤等である。また、必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤及び甘味剤等の添加物が抗癌作用増強剤に配合されてもよい。

[0029] 本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の投与量は、投

与対象の性別、年齢、体重及び症状等によって適宜決定される。当該抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、化合物等が有効量となるように投与される。有効量とは、所望の結果を得るために必要な化合物等の量であり、インフルエンザウイルスの増殖の抑制、あるいはインフルエンザウイルスの感染による症状の進行の遅延、阻害、予防、逆転又は治癒をもたらすのに必要な量である。

[0030] 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の投与量は、例えば、 $0.01\text{ mg/kg} \sim 1000\text{ mg/kg}$ 、好ましくは $0.1\text{ mg/kg} \sim 200\text{ mg/kg}$ 、より好ましくは $0.2\text{ mg/kg} \sim 20\text{ mg/kg}$ であり、1日に1回、又はそれ以上に分割して投与することができる。抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤を分割して投与する場合、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、1日に1～4回投与される。また、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、毎日、隔日、1週間に1回、隔週及び1ヶ月に1回等の様々な投与頻度で投与してもよい。なお、必要に応じて、上記の範囲外の量を用いることもできる。

[0031] 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の投与経路は特に限定されない。抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、例えば非経口で投与されてもよいし、経口で投与されてもよい。非経口投与の場合、静脈注射、皮下注射、腹腔内注射、筋肉内注射、経皮投与、経鼻投与、経肺投与、経腸投与及び経粘膜投与等であってもよい。抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、点滴を介して投与されてもよい。

[0032] 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、任意の形態の製剤とすることができる。経口投与の場合、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、糖衣錠、バツカル錠、コーティング錠及びチュアブル錠等の錠剤、トローチ剤、丸剤、散剤及びソフトカプセルを含むカプセル剤、顆粒剤、懸濁剤、乳剤及びドライシロップを含むシロップ剤、並びにエリキシル剤等の液剤であってもよい。非経口投与の場合、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、注射剤、吸入剤、経皮吸収テープ、エアゾール剤及び坐剤等であってもよい。

[0033] 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、インフルエンザウイルスが感染する対象であれば、任意の対象に投与される。例えば、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の投与対象は、脊椎動物が好ましく、哺乳類動物がより好ましい。哺乳類動物としては、例えば、ヒト、チンパンジー及びその他の霊長類、ブタ及びウマに加え、カモ及びニワトリ等の鳥類等が挙げられる。特に好ましい投与対象はヒトである。

[0034] 本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、好ましくは、I38Tの変異を有する、すなわちバロキサビル耐性インフルエンザウイルスに感染した対象又はその感染に起因して感染症を発症した対象に投与される。もちろん当該抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、薬剤耐性を獲得していないインフルエンザウイルスに感染した対象又はその感染に起因して感染症を発症した対象に投与されてもよい。

[0035] インフルエンザウイルスの感染に起因するヒトにおける感染症には、37℃以上、特に38℃以上の発熱、全身倦怠感及び食欲不振等全身症状、咳、喉の痛み及び鼻水等の呼吸器症状、腰痛、悪心及び吐き気等の消化器症状等が含まれる。なお、本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、インフルエンザウイルスが検出された対象に対して、明確な症状がない期間、あるいは感染後の潜伏期間に予防的に投与されてもよい。

[0036] 以上詳細に説明したように、本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、薬剤耐性の有無に関わらずインフルエンザウイルスに対して高い抗ウイルス活性を示す。

[0037] 上記式(1)に包含されるビドフルディムスのカルシウム塩を40mg/日でヒトに経口投与した場合の最高血中濃度は30μMで、定常濃度は12.7μMであったことが報告されている(Andreas Muehler, 外4名, 「Vidofludimus calcium, a next generation DHODH inhibitor for the Treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis」, Multiple Scle

rosis and Related Disorders, 2020年, 43, 102129)。下記実施例に示すようにインフルエンザウイルスのRNA複製の阻害活性に関するビドフルディムスのEC₅₀は野生型において1.75 μM又は138 Tにおいて2.60 μMであった。ヒトでの血中濃度は、EC₅₀を十分に上回っており、本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は、臨床上でも高い抗ウイルス活性を有する。

[0038] また、下記実施例に示されるように、ビドフルディムスの細胞毒性濃度（CC₅₀）は、EC₅₀よりも十分に高かった。よって、本実施の形態に係る抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤は高い抗ウイルス活性と高い安全性とを有する。

[0039] また、他の実施の形態では、抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の製造のための上記化合物等の使用が提供される。別の実施の形態では、薬剤耐性インフルエンザウイルス感染症を治療、改善又は予防する方法が提供される。当該方法は、上記の化合物等を対象に投与する工程を含む。

[0040] 以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0041] [試験例1：アッセイ系の構築]

（プラスミドの構築）

ウイルスタンパク質発現プラスミドを次のように構築した。RNA複製複合体（PB1、PB2、PA）及び核タンパク質（NP）をコードする遺伝子をA/WSN/1933（H1N1）株の遺伝子情報に基づいて人工合成した。各遺伝子をP_ol-⁺プロモーター（CMV）を有するpCX4bsrベクター（GenBank ID: AB086384）に導入した（pCX4bsr/PB1、pCX4bsr/PB2、pCX4bsr/PA、pCX4bsr/NP）。NP、PA、PB1及びPB2をコードする遺伝子の塩基配列を、配列番号1～4にそれぞれ示す。

[0042] 次にRNA複製複合体依存的に分泌型ルシフェラーゼ（secNLuc）

を発現する発現ベクターを構築した。NPをsecNLucで置換した図1に示す構成のvRNA（ウイルスRNA）をH1N1株の遺伝子情報に基づいて人工合成し、pUC57ベクター（GenBank ID: Y14837）に導入した（pUC57/WSN33/vsecNLucPol1250Rz）。当該発現ベクターでは、5' UTR（NP）と3' UTR（NP）との間にsecNLucをコードする遺伝子が挿入されている。図1に示すように、この発現ベクターによって、初めに導入した細胞内の宿主のDNAポリメラーゼ（Pol-1）によりsecNLucのマイナス鎖遺伝子が合成される。次にD型肝炎ウイルス（HDV）のリボザイム（Rz）によりマイナス鎖の3' UTR末端が切断されたsecNLucのマイナス鎖遺伝子から、RNA複製複合体によりsecNLucのプラス鎖遺伝子（mRNA）が合成される。インフルエンザウイルスの複製複合体は、インフルエンザウイルスの3' UTRを特異的に認識して結合する。

[0043] 図1におけるvRNAに相当するDNAを5' から3' 方向に記載した塩基配列を配列番号5に示す。配列番号5に示された塩基配列の5' 末端から数えて、1～250番目の塩基配列、251～873番目の塩基配列、874～918番目の塩基配列、919～1005番目の塩基配列及び1006～1044番目の塩基配列は、それぞれPol1プロモーター（hPol1p）、5' UTR（NP）、secNLuc、3' UTR（NP）、Rz及びmPol1Tの塩基配列に相当する。

[0044] （複製複合体依存的なルシフェラーゼ活性の評価）

インフルエンザウイルスのポリメラーゼはPB1、PB2、PAで構成される複製複合体である。また、構造タンパク質であるNPはRNAと結合して安定性に寄与する。そこで、これらの4種類のタンパク質のいずれがsecNLuc活性に必要であるかについて以下のように検討した。

[0045] ヒト胎児腎細胞株HEK293細胞を24ウェルプレートに 4×10^4 細胞／ウェルとなるように播種した。24時間後、各プラスミド0.2 μ gずつ（pCX4bsr/PB1, PB2, PA, NP, pUC57/WSN33

／vsecNLucPolI 250Rz)をFugene HD試薬(Promega社製)を用いて細胞に導入した。48時間培養後、培養上清を採取し、Nano-Glo Luciferase Assay System(Promega社製)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。上記で構築した4種類のタンパク質発現ベクターのすべてを細胞に導入したsecNLuc活性と4種類のうちから1種類ずつ除いた場合のsecNLuc活性について比較した。

[0046] (結果)

図2に示すように、PB1、PB2及びPA発現ベクターのいずれか1種類を除くとsecNLuc活性は検出できなかった。NP発現ベクターを除くと、すべてを導入したときのsecNLuc活性の約1/100程度に減弱するものの活性が検出された。このことから、本アッセイ系ではインフルエンザウイルスの複製複合体依存的にルシフェラーゼ活性が検出されることが示された。

[0047] [試験例2：既存薬の評価]

試験例1で構築したアッセイ系を用いて、抗インフルエンザ薬としてキャップ依存型エンドヌクレアーゼ阻害剤であるバロキサビル及びノイラミニダーゼ阻害剤であるオセルタミビルのルシフェラーゼ活性を評価した。HEK293細胞を24ウェルプレートに 4×10^4 細胞/ウェルとなるように播種した。24時間後、各プラスミド0.2 μ gずつ(pCX4bsr/PB1, PB2, PA, NP, pUC57/WSN33/vsecNLucPolI 250Rz)をFugene HD試薬を用いて細胞に導入した。24時間後、抗インフルエンザ薬を10 μ Mの濃度になるように培地に添加した。24時間培養後、培養上清を採取し、試験例1と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。

[0048] (結果)

本アッセイ系で評価できる作用機序には、mRNA合成に必要なキャップ依存型エンドヌクレアーゼが関与するが、ノイラミニダーゼは関与しない。

図3に示すように、バロキサビルによってルシフェラーゼ活性が抑制されたが、オセルタミビルではルシフェラーゼ活性が抑制されなかった。本試験例により、当該アッセイ系によって、インフルエンザウイルスのRNA複製を阻害する薬剤をスクリーニングできることが示された。

[0049] [試験例3：バロキサビル耐性変異株に対する活性評価系の構築]

バロキサビル耐性変異はPAのアミノ酸配列のN末端から38番目に位置するイソロイシンがトレオニンに置換した変異である。QuickChange Mutagenesis (Stratagene社製)を用いて、PAのアミノ酸配列のN末端から38番目に位置するイソロイシンに対応するコドン (ata) をトレオニンに対応するコドン (aca) に置換し、pCX4 bsr / PA mt を構築した。

[0050] HEK293細胞を24ウェルプレートに 4×10^4 細胞/ウェルとなるように播種した。24時間後、各プラスミド0.2 μ gずつ (pCX4 bsr / PB1, PB2, PA又はPA mt (PA I38T), NP, pUC57 / WSN33 / vsecNLucPolI 250Rz) をFugene HD試薬を用いて細胞に導入した。24時間後、バロキサビルを1 μ Mの濃度になるよう培地に添加した。24時間培養後、培養上清を採取し、試験例1と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。

[0051] (結果)

図4に示すように、変異型PA (PA I38T) を導入した場合、バロキサビルのルシフェラーゼ活性が低下した。この結果から、変異型PAを用いた本アッセイ系によって、バロキサビル耐性インフルエンザウイルスのRNA複製を阻害することで抗ウイルス活性を示す薬剤をスクリーニングできることが示された。

[0052] [試験例4：野生型及び変異型インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性の評価]

試験例3と同様に、pCX4 bsr / PA又はPA mtを導入したHEK293細胞を用いて、所定の濃度のバロキサビル、ファビピラビル及びビ

ドフルディムスのルシフェラーゼ活性を測定した。ビドフルディムスは、本アッセイを用いた約1500化合物のスクリーニングにより、ルシフェラーゼ活性の抑制を示した化合物である。

[0053] (結果)

図5は野生型PAを導入した場合のルシフェラーゼ活性を示す。いずれの薬剤も濃度依存的にルシフェラーゼ活性を抑制した。野生型PAの場合、図5(A)に示すように、バロキサビルは、図5(B)及び図5(C)にそれぞれ示すファビピラビル及びビドフルディムスよりもルシフェラーゼ活性を大きく抑制した。

[0054] 図6は変異型PAを導入した場合のルシフェラーゼ活性を示す。いずれの薬剤も濃度依存的にルシフェラーゼ活性を抑制した。変異型PAの場合、図6(C)に示すように、ビドフルディムスは、図6(A)及び図6(B)にそれぞれ示すバロキサビル及びファビピラビルよりもルシフェラーゼ活性を大きく抑制した。野生型PAを導入した場合のビドフルディムスのEC₅₀は1.75 µMであったのに対し、変異型PAを導入した場合のビドフルディムスのEC₅₀は2.60 µMで大きな違いはみられなかった。

[0055] [試験例5：毒性試験]

HEK293細胞を、96ウェルプレートに5×10³個播種した。培養24時間後、所定の濃度のバロキサビル、ファビピラビル又はビドフルディムスを培地に添加した。24時間培養した後、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (タカラバイオ社製) 10 µLを培地に添加して、37℃で2時間培養後、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸光度を測定した。

[0056] (結果)

図7(A)、(B)及び(C)はそれぞれバロキサビル、ファビピラビル及びビドフルディムスの細胞生存率を示す。バロキサビル、ファビピラビル及びビドフルディムスのCC₅₀は、それぞれ344.68 µM、>400 µM及び137.68 µMであった。

[0057] [試験例6：血中最高濃度 (C_{max}) におけるビドフルディムスの抗ウイルス活性の評価]

臨床応用に際して培養細胞により得られた抗ウイルス活性を示す化合物の濃度が、実際にヒトの血中で得られるかが重要になる。バロキサビル、ファビプラビル、ビドフルディムスのカルシウム塩のヒトでの C_{max} は、それぞれ $1.7 \mu M$ 、 $230 \mu M$ 及び $30 \mu M$ であると報告されている。 C_{max} で細胞を処理したときの野生型及び変異型インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性を試験例4と同様に評価した。

[0058] (結果)

図8は、野生型PAを導入したHEK293細胞を、バロキサビル、ファビプラビル及びビドフルディムスの濃度をそれぞれの C_{max} の濃度とした場合のルシフェラーゼ活性を示す。バロキサビル、ファビプラビル及びビドフルディムスによるルシフェラーゼ活性の抑制は、それぞれ89%、60%及び87%であった。野生型におけるビドフルディムスの抗ウイルス活性はバロキサビルとほぼ同等で、ファビプラビルよりも強いと考えられる。

[0059] 図9は、変異型PAを導入したHEK293細胞を、バロキサビル、ファビプラビル及びビドフルディムスの濃度をそれぞれの C_{max} の濃度とした場合のルシフェラーゼ活性を示す。バロキサビル、ファビプラビル及びビドフルディムスによるルシフェラーゼ活性の抑制は、それぞれ40%、41%及び79%であった。ビドフルディムスは変異型インフルエンザウイルスに対して C_{max} ではバロキサビル及びファビプラビルよりも強い抗ウイルス活性を示すと考えられる。

[0060] [試験例7：インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性とDHODH活性との関係]

ビドフルディムスはDHODHを阻害することでピリミジンの産生を抑制することが知られている。そこで、DHODH阻害活性とインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性とが相関するかについて検討した。ビドフルディムスのDHODH阻害濃度 IC_{50} は $134 nM$ であるのに対し、BAY

2402234のDHODH阻害濃度 IC_{50} は1.2 nMで、約100倍活性が高い。DHODH阻害活性が抗ウイルス活性と相関する場合にはBAY 2402234のほうがビドフルディムスよりも強くルシフェラーゼ活性を抑制するはずである。そこで、10 μ MのBAY 2402234又はビドフルディムスで細胞を処理したときの野生型のインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性を試験例4と同様に評価した。

[0061] (結果)

図10に示すように、BAY 2402234及びビドフルディムスによるルシフェラーゼ活性の抑制効果はそれぞれ72%及び81%で、ビドフルディムスはBAY 2402234より強くルシフェラーゼ活性を抑制した。この結果は、DHODH阻害活性の強さからインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性を予想できないことを示している。

[0062] 上述した実施の形態は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。すなわち、本発明の範囲は、実施の形態ではなく、特許請求の範囲によって示される。そして、特許請求の範囲内及びそれと同等の発明の意義の範囲内で施される様々な変形が、本発明の範囲内とみなされる。

[0063] 本出願は、2021年3月18日に出願された、日本国特許出願2021-44575号に基づく。本明細書中に日本国特許出願2021-44575号の明細書、特許請求の範囲、図面全体を参照として取り込むものとする。

産業上の利用可能性

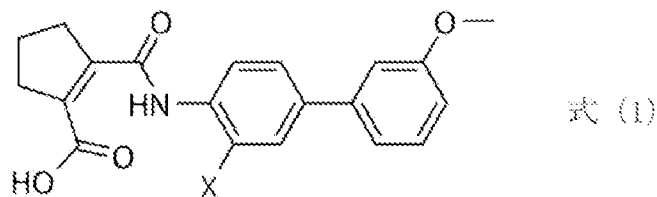
[0064] 本発明は、インフルエンザウイルス感染症の治療に有用である。

請求の範囲

【請求項1】 下記式（１）に示す化合物、その薬理学的に許容される塩、式（１）の化合物の水酸基のエステル修飾体、リン酸修飾体若しくは硫酸修飾体、式（１）の化合物のカルボキシ基のエステル修飾体若しくはアミド修飾体、又は式（１）の化合物のアミノ基のイミン修飾体、アミド修飾体若しくは尿素修飾体を含む、

抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤。

【化1】



【式（１）においてXは水素原子又はハロゲン原子を表す。】

【請求項2】 ポリメラーゼ酸性サブユニットに変異を有するインフルエンザウイルスに対して使用される、

請求項１に記載の抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤。

【請求項3】 前記インフルエンザウイルスの前記ポリメラーゼ酸性サブユニットのアミノ酸配列におけるN末端から３８番目に位置するイソロイシンがトレオニンに置換されている、

請求項２に記載の抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤。

【請求項4】 前記インフルエンザウイルスは、

H 1 N 1 亜型である、

請求項１から３のいずれか一項に記載の抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤。

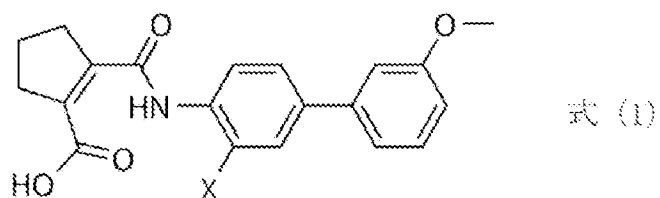
【請求項5】 前記式（１）におけるXがフッ素原子である、

請求項１から４のいずれか一項に記載の抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤。

【請求項6】 抗薬剤耐性インフルエンザウイルス剤の製造のための下記式（１）

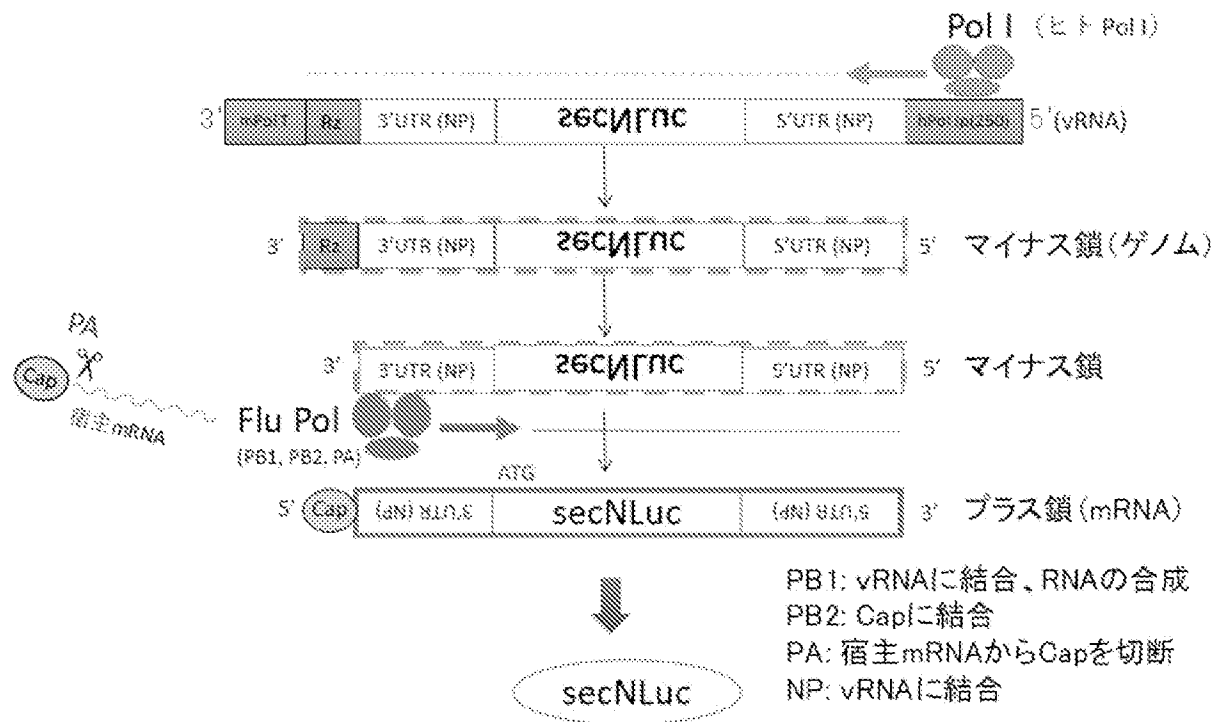
に示す化合物、その薬理学的に許容される塩、式（１）の化合物の水酸基のエステル修飾体、リン酸修飾体若しくは硫酸修飾体、式（１）の化合物のカルボキシ基のエステル修飾体若しくはアミド修飾体、又は式（１）の化合物のアミノ基のイミン修飾体、アミド修飾体若しくは尿素修飾体の使用。

[化2]

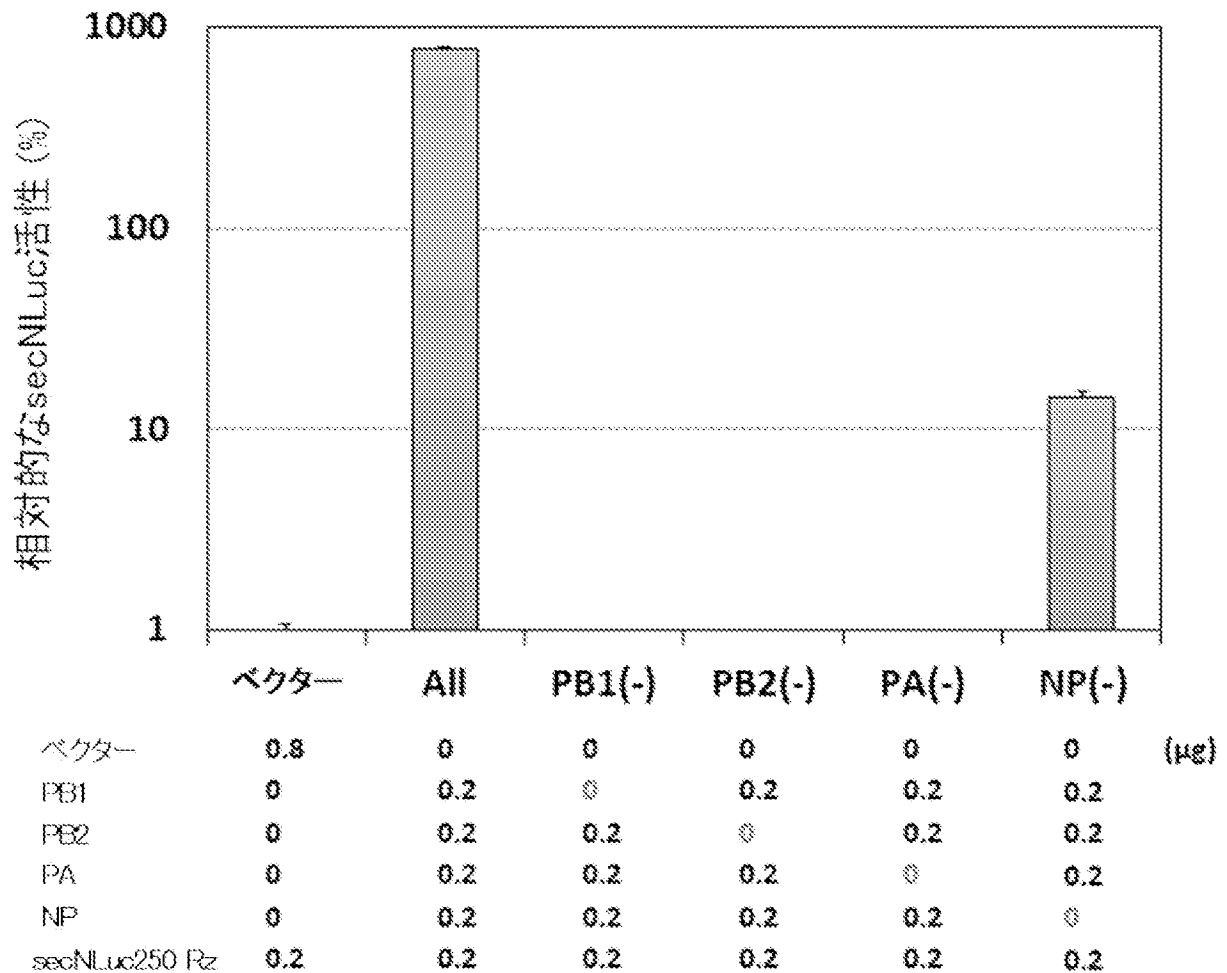


[式（１）においてXは水素原子又はハロゲン原子を表す。]

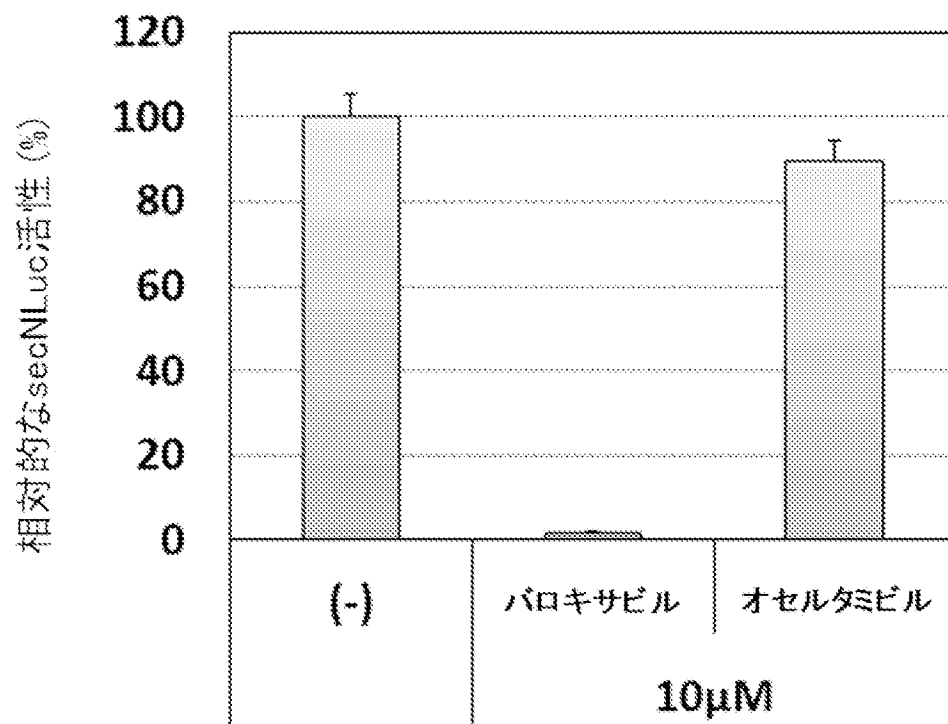
[図1]



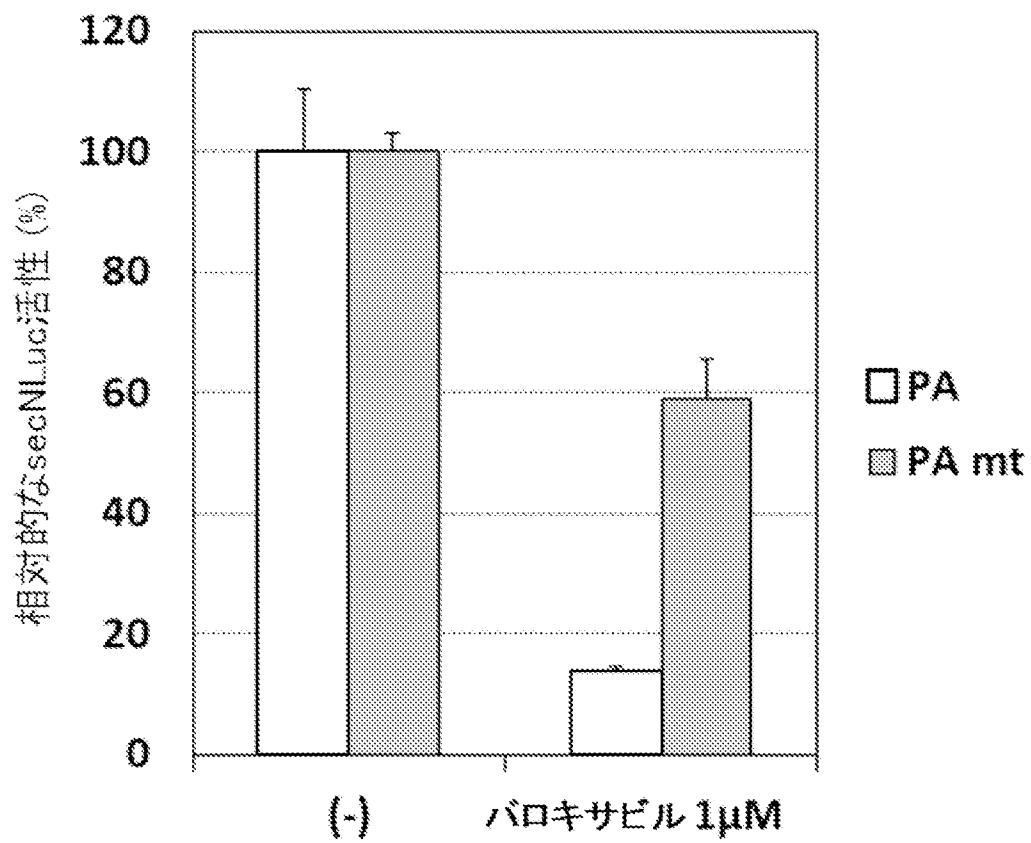
[図2]



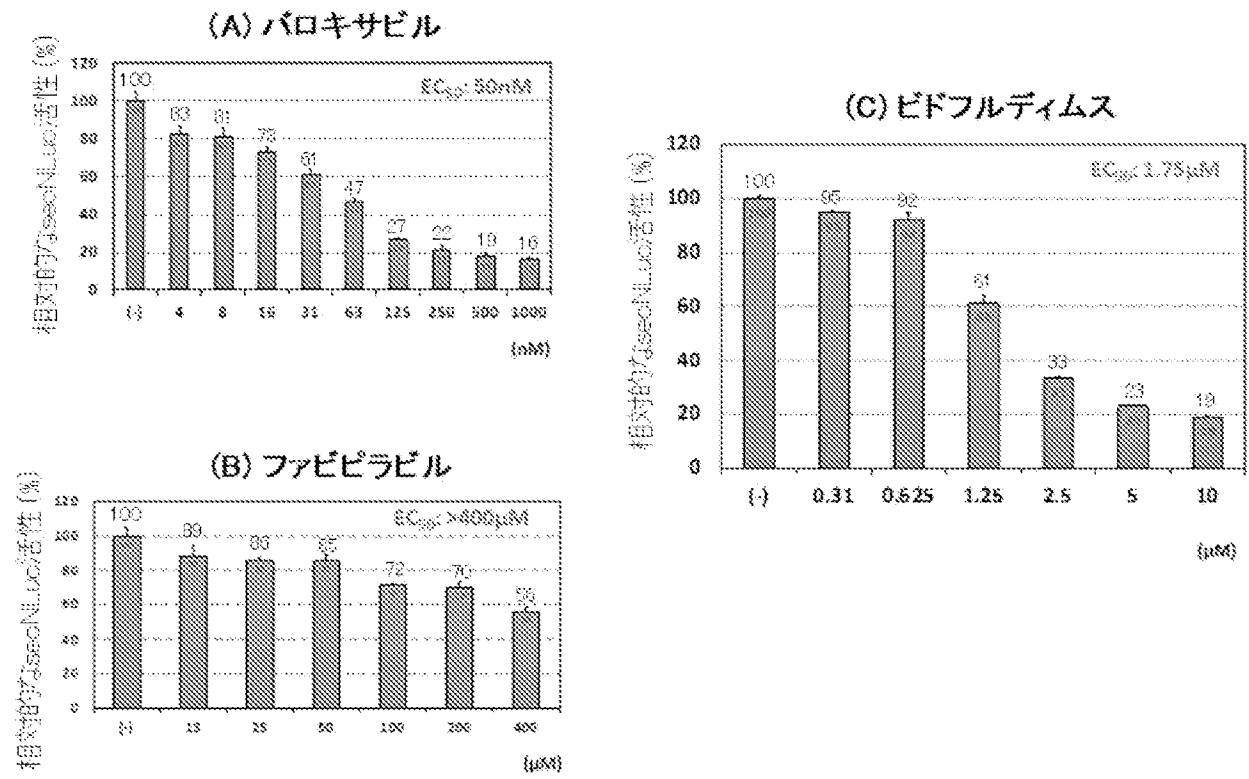
[図3]



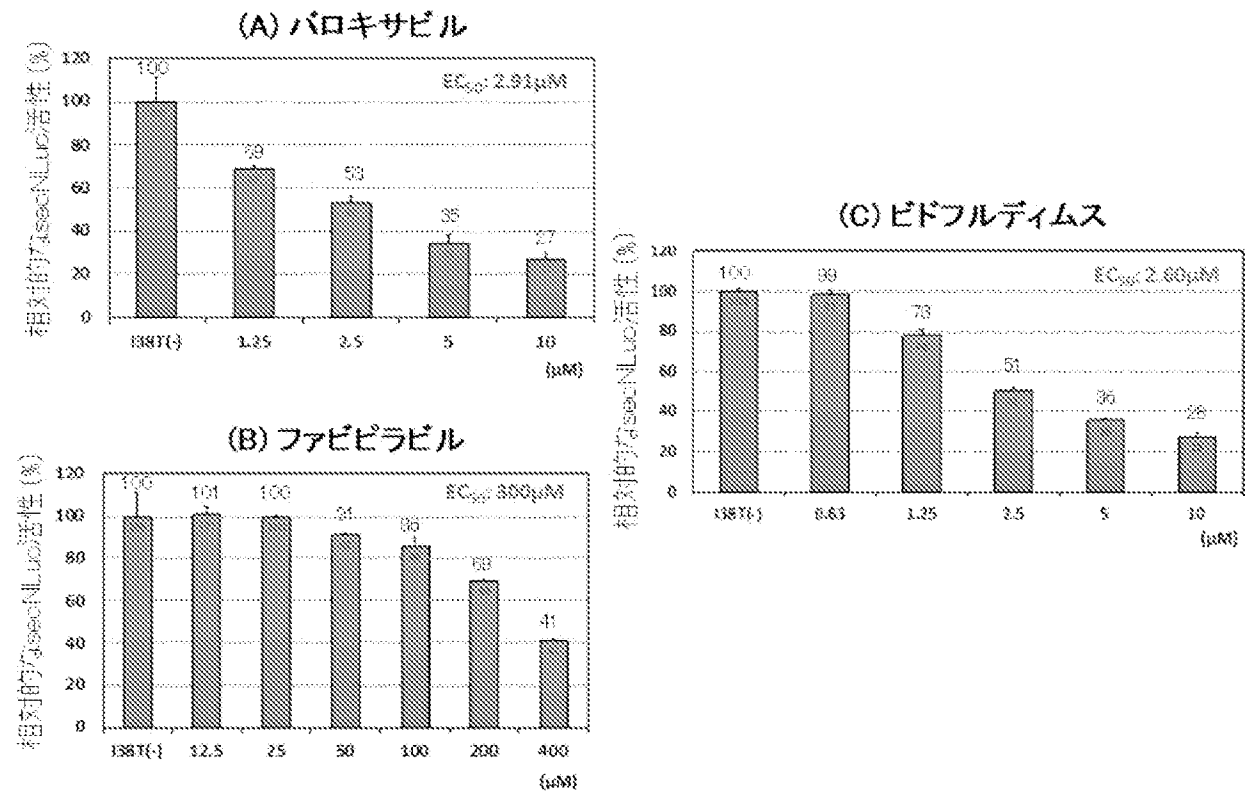
[図4]



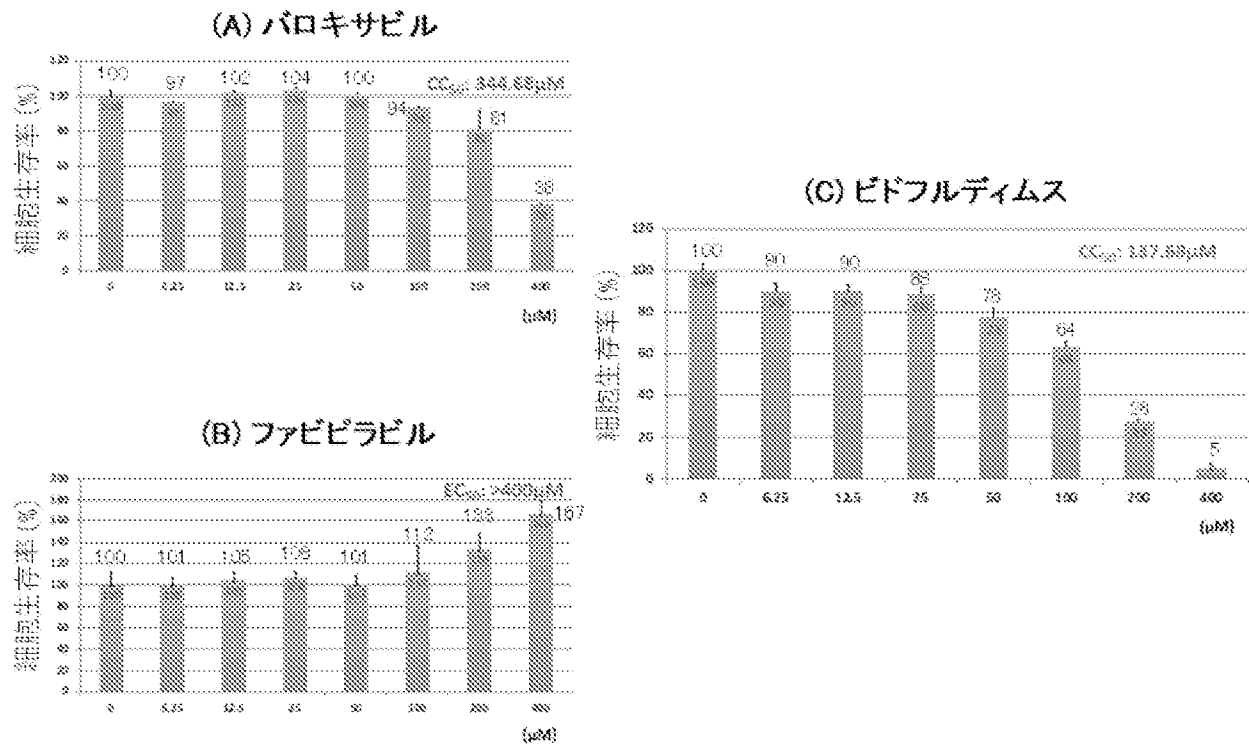
[図5]



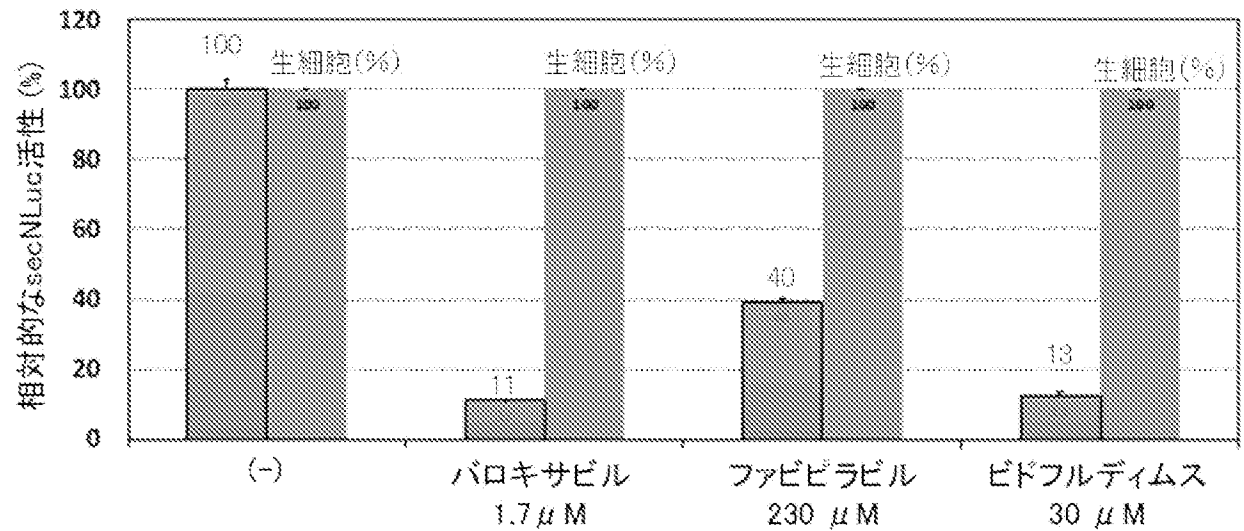
[図6]



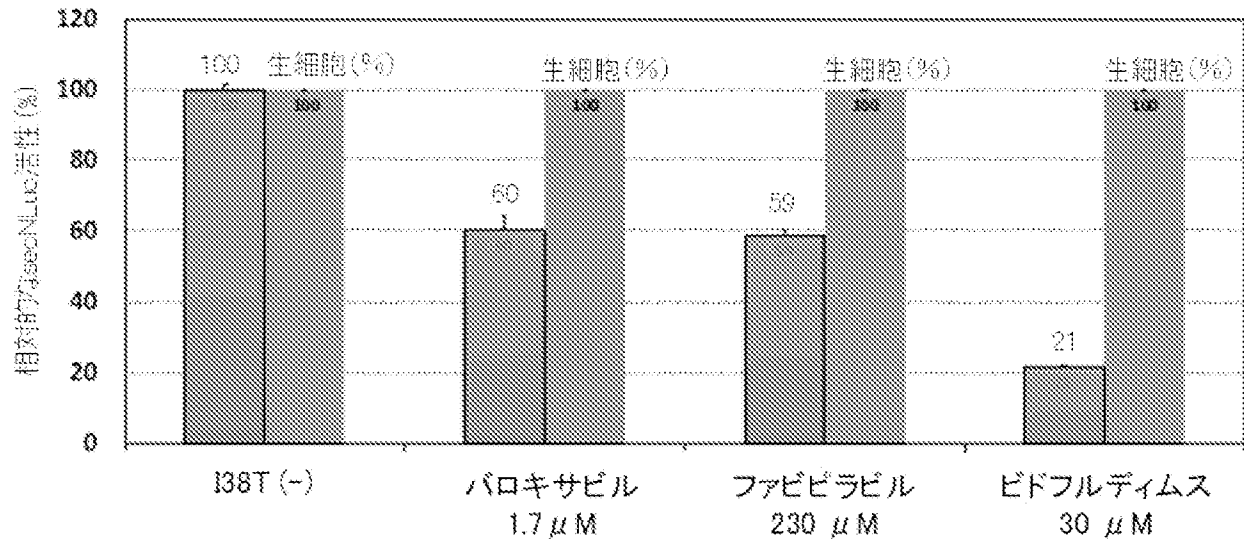
[図7]



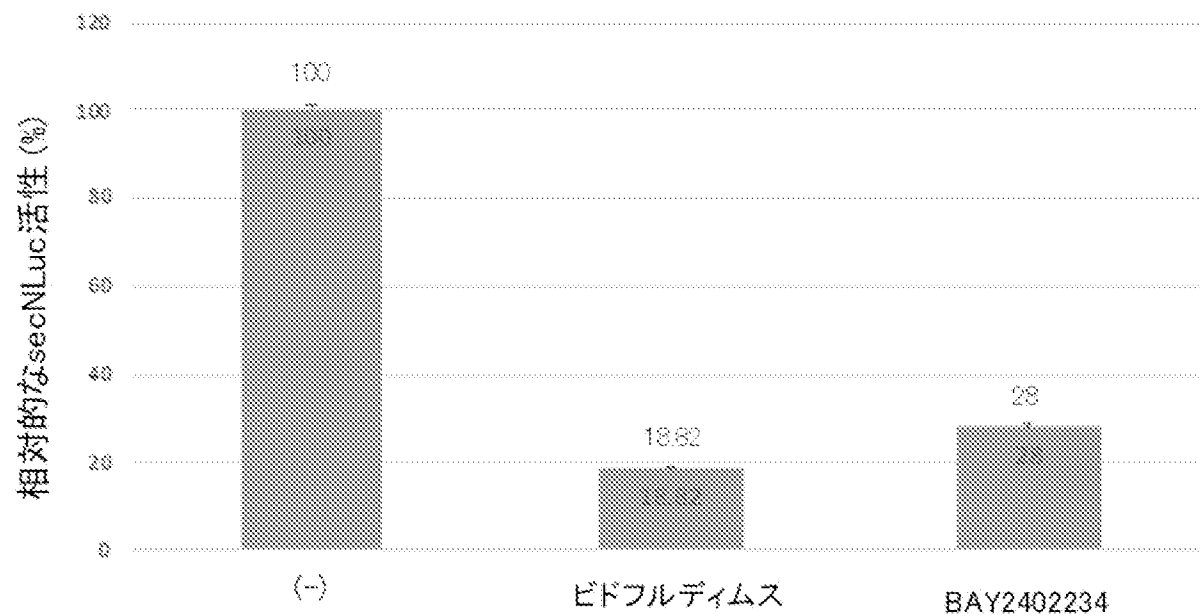
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/006422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A61K 31/19**(2006.01)i; **A61P 31/16**(2006.01)i

FI: A61K31/19; A61P31/16 ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/19; A61P31/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022

Registered utility model specifications of Japan 1996-2022

Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/128050 A2 (4SC AG) 11 November 2010 (2010-11-11) claims, p. 101, compound 6, example 5	1-6
A	JP 2017-513935 A (PANOPTES PHARMA GMBH) 01 June 2017 (2017-06-01) claims, paragraph [0060], compound 6, examples	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 April 2022

Date of mailing of the international search report

12 April 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/006422

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/006422

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2010/128050	A2	11 November 2010	US 2010/0280081 A1 claims, p. 33, compound 6, example 5 EP 2427186 A2	
JP	2017-513935	A	01 June 2017	US 2017/0027905 A1 claims, p. 6, compound 6, examples WO 2015/154820 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 31/19(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i FI: A61K31/19; A61P31/16 ZNA										
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K31/19; A61P31/16 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2022年									
日本国実用新案登録公報	1996-2022年									
日本国登録実用新案公報	1994-2022年									
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
A	WO 2010/128050 A2 (4SC AG) 11.11.2010 (2010-11-11) Claims, 第101頁, Compound 6, Example 5	1-6								
A	JP 2017-513935 A (パノプテス・ファーマ・ゲーエムベーハー) 01.06.2017 (2017-06-01) 特許請求の範囲, [0060], 化合物6, 実施例	1-6								
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 </td> <td> “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献 </td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献						
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 04.04.2022		国際調査報告の発送日 12.04.2022								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 石井 裕美子 4C 3402 電話番号 03-3581-1101 内線 3452								

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/006422

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2010/128050	A2	11.11.2010	US 2010/0280081 A1 Claims, 第33頁, Compound 6, Example 5 EP 2427186 A2	
JP	2017-513935	A	01.06.2017	US 2017/0027905 A1 Claims, 第6頁, Compound 6, Examples WO 2015/154820 A1	