

明 細 書

発明の名称：抗ウイルス剤

技術分野

[0001] 本発明は、コロナウイルスやフラビウイルス等のウイルスに対する治療剤として有効な抗ウイルス剤に関する。

背景技術

[0002] コロナウイルスは、プラス鎖一本鎖RNAを遺伝子とするエンベロープウイルスである。ヒトに感染するコロナウイルスとしては、一般的な風邪の原因ウイルスの他に、急性呼吸器症候群の原因となるものがある。例えば、2003年に大流行した重症急性呼吸器症候群（SARS）の原因であるSARS-CoV、2013年に大流行した中東呼吸器症候群（MERS）の原因であるMERS-CoV、2019年から大流行した新型コロナウイルス感染症COVID-19の原因であるSARS-CoV-2がある。特に、COVID-19は未だ治療薬が少なく、より有効な治療薬の開発が求められている。

[0003] COVID-19の治療薬として、レムデシビルがある。レムデシビル（GS-5734）はGS-441524のモノホスホルアミデートプロドラッグであり、エボラ出血熱及びマールブルグウイルス感染症の治療薬として開発された核酸化合物からなる抗ウイルス薬であり、一本鎖RNAウイルスに対する抗ウイルス活性がある。GS-441524も、COVID-19に対する治療効果が期待されている（非特許文献1）。GS-441524は、アデノシン類似体であって、レムデシビルの親ヌクレオシドでもある。

非特許文献5は、GS-441524がフラビウイルス及びコロナウイルスに対して抗ウイルス活性があることを報告した。

非特許文献6は、GS-621763及びMPV（Molnupiravir）がSARS-CoV-2感染症に対して治療効果があることを報告した。GS-621763は、GS-441524のプロドラッグであり、M

PVは、NHC (N-hydroxycytidine) のプロドラッグである。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Yan and Muller, ACS Medicinal Chemistry Letters, 2020, vol.11, p.1361-1366.

非特許文献2: Watanabe and Ueda, Nucleosides & Nucleotides, 1983, vol. 2(2), p.113-125.

非特許文献3: Bergstrom et al., Journal of Organic Chemistry, 1981, vol.46(7), p.1423-1431.

非特許文献4: Uematsu and Suhadolnik, Journal of Medicinal Chemistry, 1973, vol.16(12), p.1405-1407.

非特許文献5: Cho et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 22 (2012), 2705-2707.

非特許文献6: Schafer et al., bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.13.460111>, Version 9.4, 2021.9.13.

非特許文献7: Rasmussen et al., Viruses 2021, 13(7), 1369.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、COVID-19を始めとするウイルス感染症疾患の治療薬として有効な抗ウイルス剤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

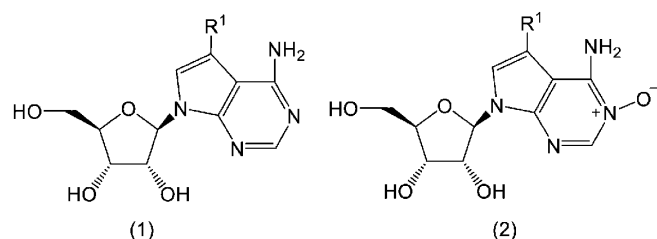
[0006] 本発明者らは、国立大学法人北海道大学薬学研究院創薬科学研究教育センターが保有する核酸化合物を母核とする化合物ライブラリーを用いて、新型コロナウイルスSARS-CoV-2及びヒトコロナウイルス2種類(229E株及びOC43株)に対する抗ウイルス活性を有する化合物をスクリーニングし、抗ウイルス活性の高い化合物を選抜することにより、本発明を完

成させた。

[0007] すなわち、本発明は、以下の、抗ウイルス剤等を提供するものである。

[1] 下記一般式(1)又は(2)

[0008] [化1]



[0009] [式中、 R^1 は、 $-(CH_2)_{n_1}-Z^1-R^{11}$ 又は $-CH-(Z^1-R^{11})_2$ (n_1 は、0又は1であり； Z^1 は、単結合、酸素原子、 $-NH-$ 、硫黄原子、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CO-$ 、 $-CO-O-$ 、又は $-CH=N-O-$ であり； R^{11} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-NR^{12}R^{13}$ 、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-CH_2-CO-O-R^{14}$ 、又は窒素原子を含む5員又は6員のヘテロシクロ環基であり； R^{12} 及び R^{13} は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素数1～6のアルキル基であり； R^{14} は、水素原子又は炭素数1～6のアルキル基である。ただし、前記ヘテロシクロ環基は、当該環基中の窒素原子と Z^1 が連結する。)である。]

で表される化合物若しくはその誘導体、これらの化合物の塩、又はこれらの溶媒和物からなる、抗ウイルス剤。

[2] 前記一般式(1)が、下記一般式(1-1)～(1-15)

[式中、 R^{21} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-CH_2-COOH$ 、又はアミノ基であり； R^{22} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、又はアミノ基であり； R^{23} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{31} 、 R^{32} 、及び R^{33} は、水素原子、又は炭素数1～6のアルキル基であり； R^{24} 、 R^{25} 、 R^{29} 、 R^{30} 、及び R^{35} は、炭素数1～6のアルキル基であり； R^{28} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、又はシアノ基であり； R^{34} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-CH_2-N_3$ 、シアノ基、アミノ基、ニトロ基、又はアジ基で

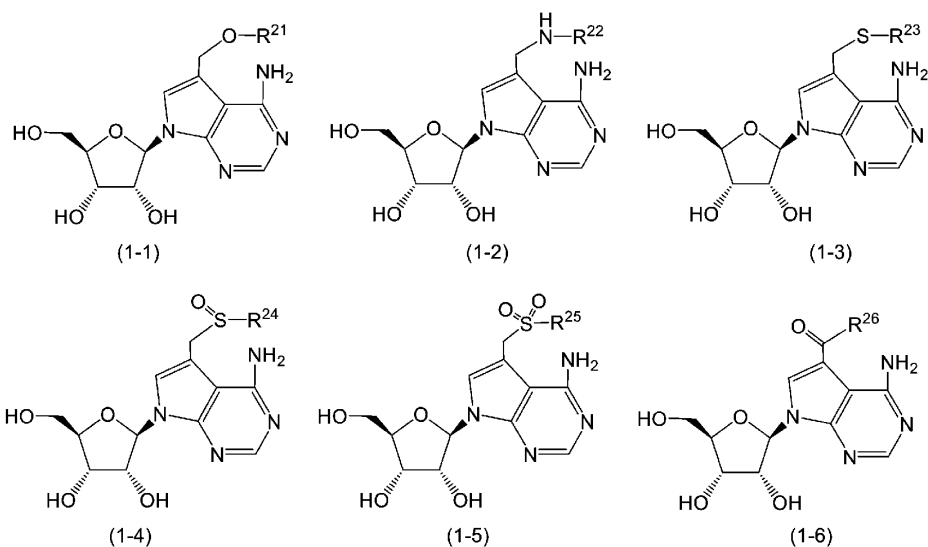
あり；Aは、窒素原子を含む5員又は6員のヘテロシクロ環基である。]

のいずれかであり、前記一般式(2)が下記一般式(2-1)～(2-15)

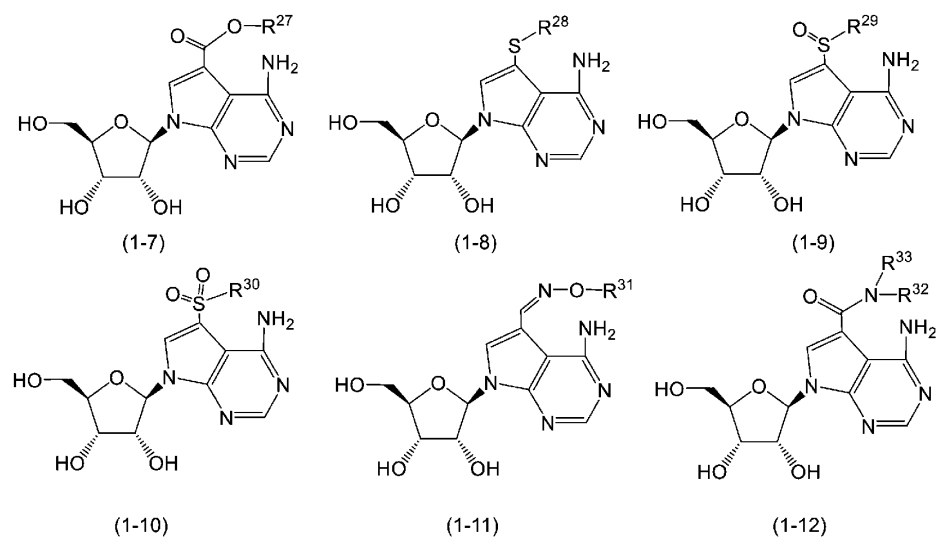
[式中、 R^{21} ～ R^{35} 、及びAは、前記と同じである。]

のいずれかである、[1]の抗ウイルス剤。

[0010] [化2]

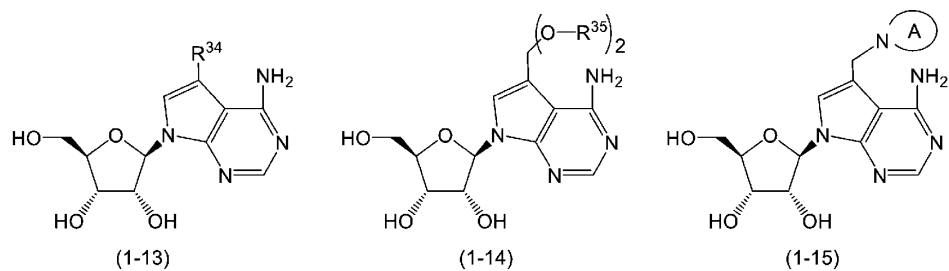


[0011] [化3]

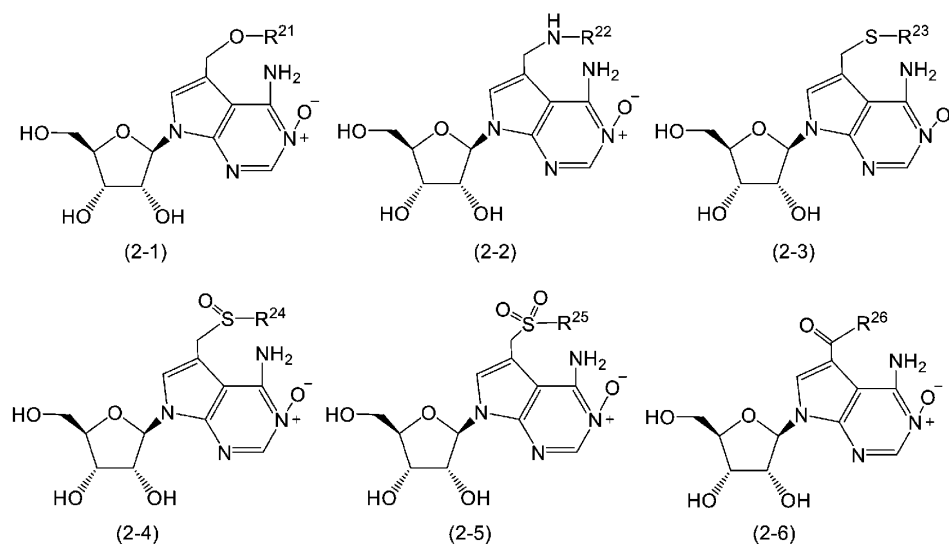


[0012]

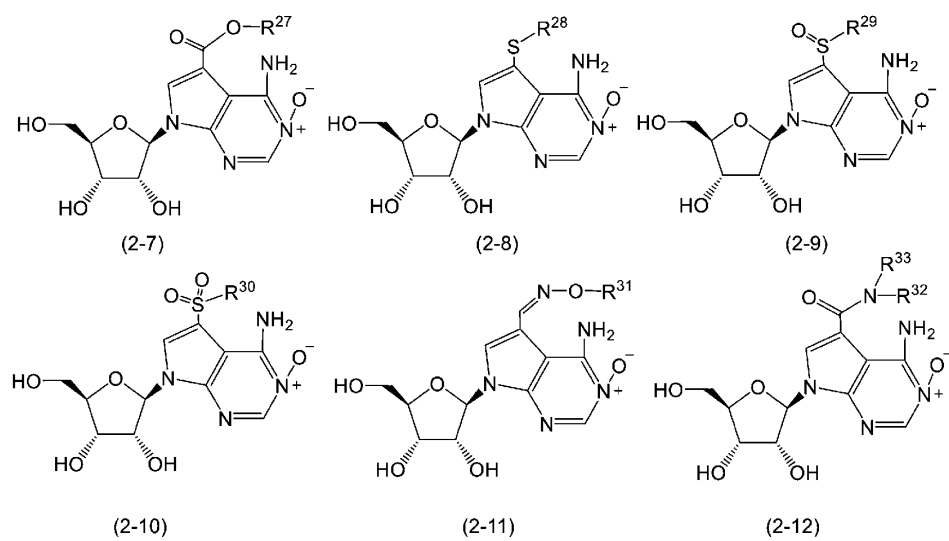
[化4]



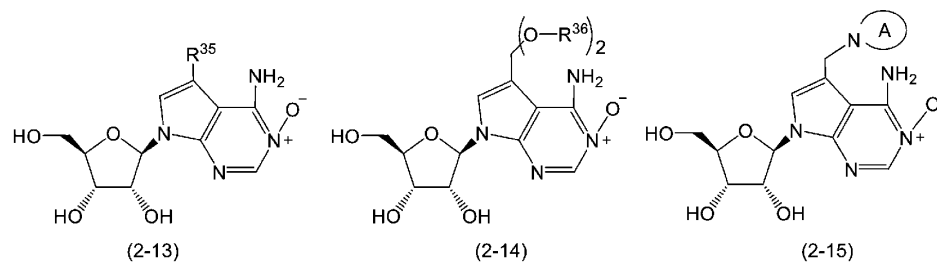
[0013] [化5]



[0014] [化6]

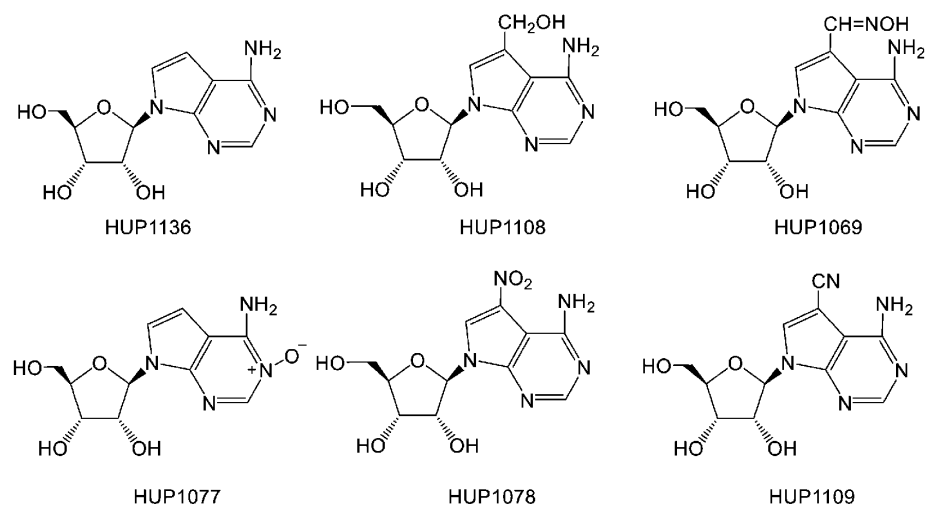


[0015] [化7]



[0016] [3] HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078、及びHUP1109からなる群より選択される一種以上の化合物からなる、[1]又は[2]の抗ウイルス剤。

[0017] [化8]



[0018] [4] [1]～[3]のいずれかの抗ウイルス剤を有効成分とする、医薬用組成物。

[5] コロナウイルス又はフラビウイルスによる感染症の治療に用いられる、前記[4]の医薬用組成物。

[6] COVID-19の治療に用いられる、[5]の医薬用組成物。

[7] 3CLプロテアーゼの阻害剤との併用療法に使用される、[4]～[6]のいずれかの医薬用組成物。

[8] 前記3CLプロテアーゼの阻害剤は、PF-07304814及び

S-217622からなる群より選ばれる少なくとも一種である、[7]に記載の医薬用組成物。

[0019] [9] [1]～[3]のいずれかの抗ウイルス剤を有効量投与することにより、コロナウイルス感染症又はフラビウイルス感染症を治療する、治療方法。

[10] HUP1108からなる抗ウイルス剤を有効量投与する、[9]に記載の治療方法。

[11] 前記有効量は、60mg/kg未満である、[9]又は[10]に記載の治療方法。

[12] 前記有効量は、20mg/kgである、[11]に記載の治療方法。

[13] 前記コロナウイルスは、SARS-CoV-2である、請求項9～12のいずれかの治療方法。

[14] 前記SARS-CoV-2は、WK-521株、 α 株、 β 株、 γ 株、 δ 株及び θ 株からなる群より選ばれる少なくとも一種である、[13]に記載の治療方法。

[15] 前記フラビウイルスは、デングウイルス(DENV)、ジカウイルス(ZIKV)、黄熱ウイルス(YFV)、ウエストナイルウイルス(WNV)及び日本脳炎ウイルス(JEV)からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項9～12のいずれかの治療方法。

[16] 3CLプロテアーゼの阻害剤を併用投与する、[9]～[15]のいずれか一項に記載の治療方法。

[17] 前記3CLプロテアーゼの阻害剤は、PF-07304814及びS-217622からなる群より選ばれる少なくとも一種である、[16]に記載の治療方法。

[0020] [18] [1]～[3]のいずれかの抗ウイルス剤と3CLプロテアーゼの阻害剤との、治療上の組み合わせ。

[19] 前記3CLプロテアーゼの阻害剤は、PF-07304814及

びS-217622からなる群より選ばれる少なくとも一種である、[18]に記載の組み合わせ。

[20] コロナウイルス感染症又はフラビウイルス感染症の治療に用いられる、[1]～[3]のいずれかの抗ウイルス剤。

[21] 前記コロナウイルスは、SARS-CoV-2のWK-521株、 α 株、 β 株、 γ 株、 δ 株及び ρ 株からなる群より選ばれる少なくとも一種であり、

前記フラビウイルスは、デングウイルス(DENV)、ジカウイルス(ZIKV)、黄熱ウイルス(YFV)、ウエストナイルウイルス(WNV)及び日本脳炎ウイルス(JEV)からなる群より選ばれる少なくとも一種である、[20]に記載の抗ウイルス剤。

発明の効果

[0021] 本発明に係る抗ウイルス剤は、コロナウイルスやフラビウイルスのようなプラス鎖一本鎖RNAを遺伝子とするエンベロープウイルスに対して高い抗ウイルス活性を有する核酸化合物を有効成分とする。このため、当該抗ウイルス剤は、*in vivo*又は*ex vivo*における抗ウイルス剤として好適であり、当該ウイルス剤を有効成分とする医薬用組成物は、コロナウイルスやフラビウイルスによる感染症の治療又は予防のために用いられる医薬用組成物として非常に有用である。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]実施例2において、SARS-CoV-2を感染させたCaco-2細胞を、化合物HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078、及びHUP1109のいずれかで処理した場合のウイルスRNA量($\log_{10}$ [ウイルスRNAコピー数])の測定結果を示した図である。

[図2]実施例2において、SARS-CoV-2を感染させたCaco-2細胞を、化合物HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078、及びHUP1109のいずれかで処理した場合の

ウイルスRNA複製阻害率（〔被験試料で処理した細胞由来のウイルスRNAコピー数〕／〔被験試料非添加群の細胞由来のウイルスRNAコピー数〕 $\times 100\%$ ）の測定結果を示した図である。

〔図3〕実施例3において、SARS-CoV-2を感染させたCaco-2細胞を、3種のタイミング（Whole、Entry、及びPost-entry）でHUP1108処理した場合の相対ウイルスRNA量の測定結果を示した図である。

〔図4〕実施例3において、SARS-CoV-2を感染させたCaco-2細胞を、3種のタイミング（Whole、Entry、及びPost-entry）でHUP1108処理した場合のウイルス力価（TCID₅₀の対数値）の測定結果を示した図である。

〔図5〕実施例5において、SARS-CoV-2の各種株を感染させたCaco-2細胞を、化合物HUP1108で処理した場合のウイルスRNA量（Log₁₀〔ウイルスRNAコピー数〕）の測定結果を示した図である。

〔図6〕実施例6において、HUP1108を投与したSARS-CoV-2感染マウスとHUP1108を投与していないSARS-CoV-2感染マウスの、肺内ウイルス力価を測定した結果を示す図である。

〔図7〕実施例7において、HUP1108を投与したSARS-CoV-2感染マウスとHUP1108を投与していないSARS-CoV-2感染マウスの生存率を測定した結果を示す図である。

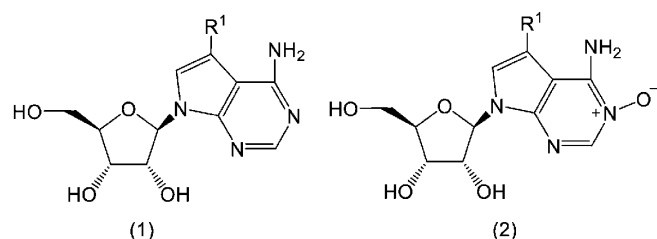
発明を実施するための形態

[0023] 本発明及び本願明細書において、「C_{y-z}（y及びzは、 $y < z$ を充たす正の整数である。）」は、炭素数がy以上z以下であることを意味する。

[0024] 本発明に係る抗ウイルス剤は、下記一般式（1）で表される化合物（以下、「化合物（1）」ということがある。）又は下記一般式（2）で表される化合物（以下、「化合物（2）」ということがある。）からなる。

[0025]

[化9]



[0026] 一般式(1)及び一般式(2)中、 R^1 は、 $-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{Z}^1-\text{R}^{11}$ 又は $-\text{CH}(\text{Z}^1-\text{R}^{11})_2$ で表される基である。ここで、 n_1 は、0又は1であり、 Z^1 は、単結合、酸素原子、 $-\text{NH}-$ 、硫黄原子、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、又は $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-$ である。 n_1 が0の場合、 $-(\text{CH}_2)_0-$ は単結合であり、プリン環の炭素原子に Z^1 が直絶結合することを意味する。

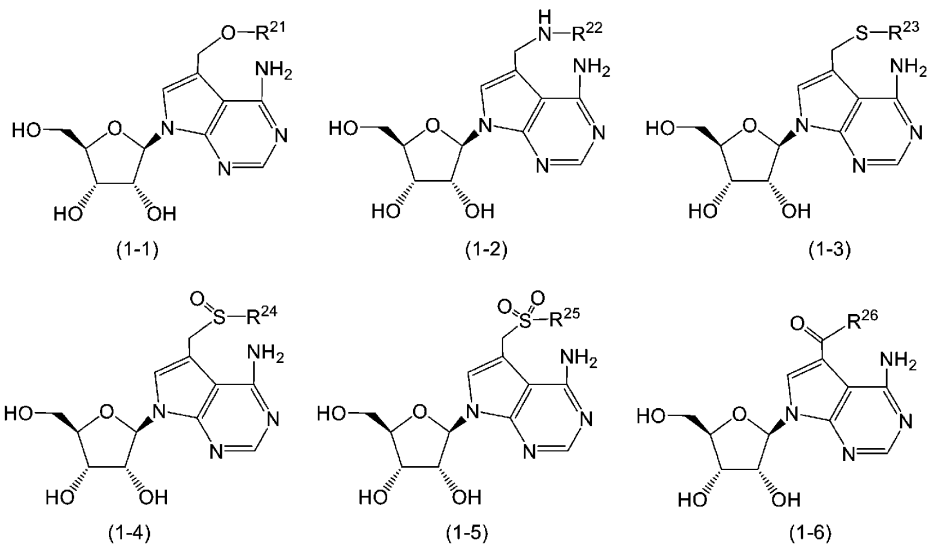
[0027] R^{11} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}^{14}$ 、又は窒素原子を含む5員又は6員のヘテロシクロ環基である。 R^{12} 及び R^{13} は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素数1～6のアルキル基であり、 R^{14} は、水素原子又は炭素数1～6のアルキル基である。ただし、前記ヘテロシクロ環基は、当該環基中の窒素原子と Z^1 が連結している。

[0028] R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、及び R^{14} が炭素数1～6のアルキル基の場合、当該アルキル基としては、直鎖状であってもよく、分岐状であってもよい。より詳細には、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、 sec -ブチル基、イソブチル基、 $tert$ -ブチル基、 n -ペンチル基、 sec -ペンチル基、イソペンチル基、 n -ヘキシル基、 sec -ヘキシル基、イソヘキシル基等が好ましく、炭素数1～4のアルキル基がより好ましく、炭素数1～3のアルキル基がさらに好ましく、メチル基、エチル基がよりさらに好ましい。

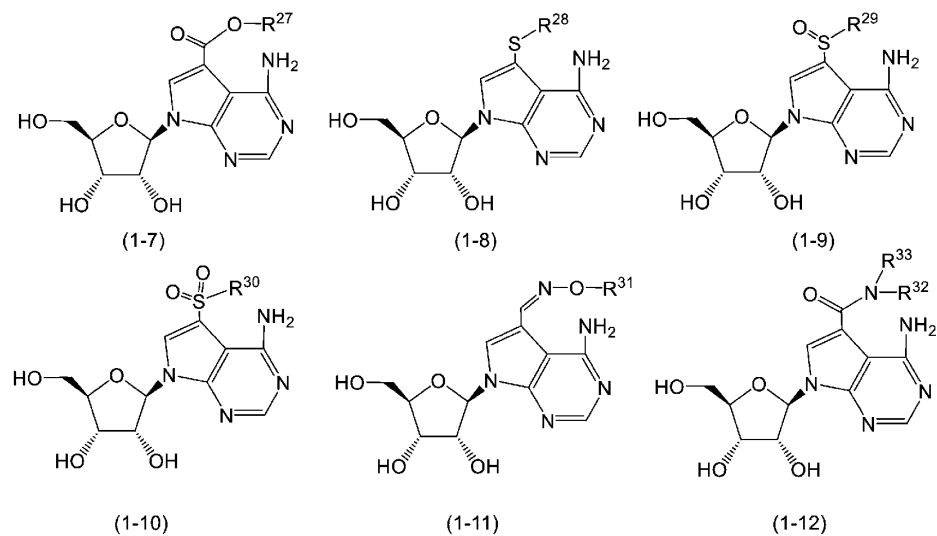
[0029] より具体的には、化合物(1)としては、一般式(1-1)～(1-15)のいずれかで表される化合物が挙げられ、化合物(2)としては、一般式

(2-1) ~ (2-15) のいずれかで表される化合物が挙げられる。

[0030] [化10]

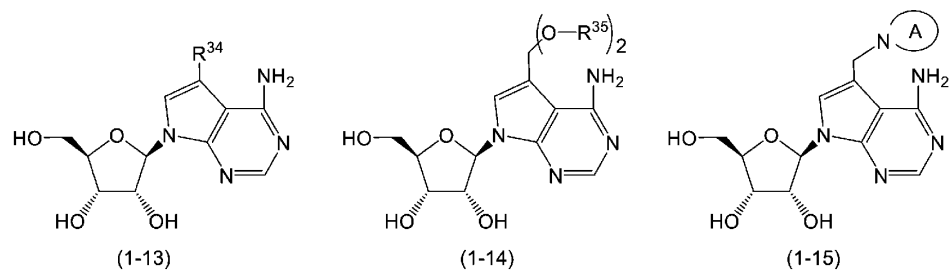


[0031] [化11]

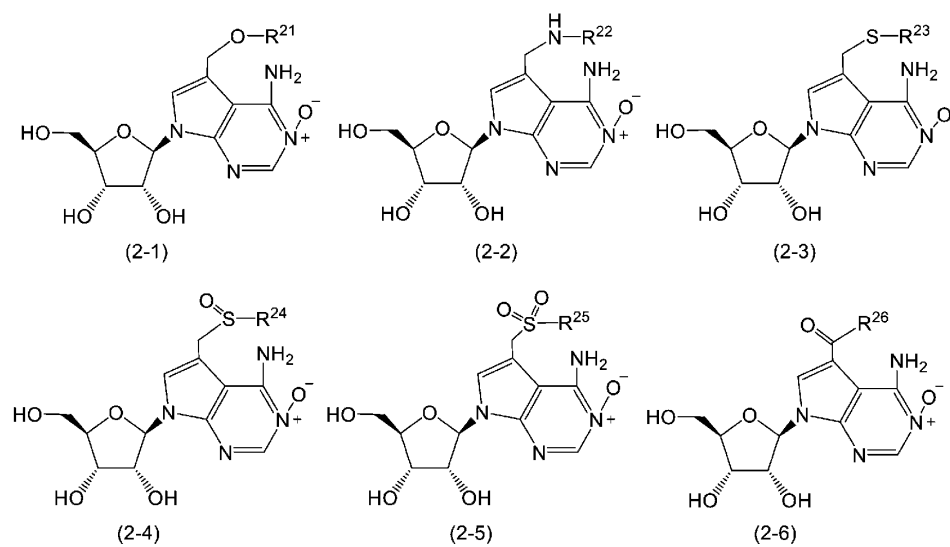


[0032]

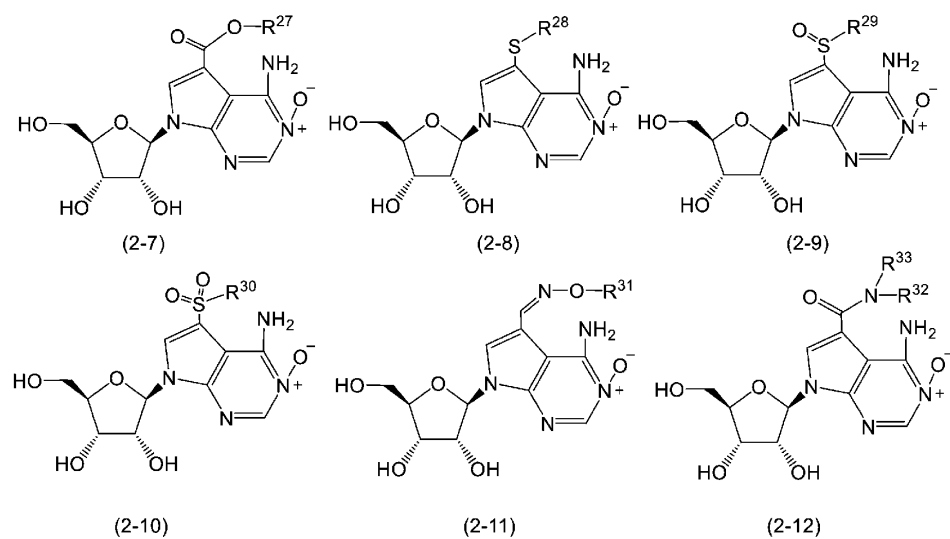
[化12]



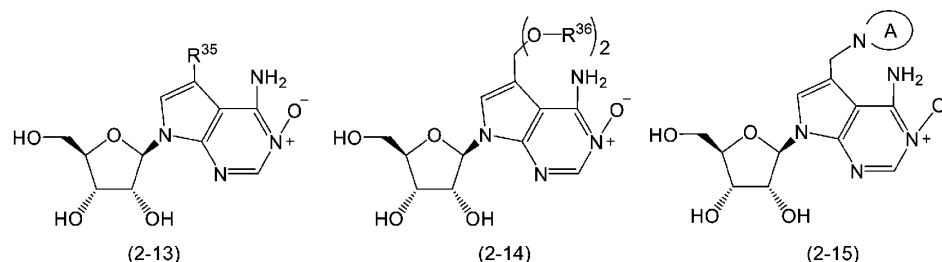
[0033] [化13]



[0034] [化14]



[0035] [化15]



[0036] 一般式(1-1)及び一般式(2-1)中、 R^{21} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 、又はアミノ基($-\text{NH}_2$)である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。

[0037] 一般式(1-2)及び一般式(2-2)中、 R^{22} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、又はアミノ基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。

[0038] 一般式(1-3)及び一般式(2-3)中、 R^{23} は、水素原子、又は炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。

[0039] 一般式(1-4)及び一般式(2-4)中、 R^{24} は、炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。

[0040] 一般式(1-5)及び一般式(2-5)中、 R^{25} は、炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。

[0041] 一般式(1-6)及び一般式(2-6)中、 R^{26} は、水素原子、又は炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。

[0042] 一般式(1-7)及び一般式(2-7)中、 R^{27} は、水素原子、又は炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。

- [0043] 一般式(1-8)及び一般式(2-8)中、 R^{28} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、又はシアノ基($-\text{CN}$)である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。
- [0044] 一般式(1-9)及び一般式(2-9)中、 R^{29} は、炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。
- [0045] 一般式(1-10)及び一般式(2-10)中、 R^{30} は、炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。
- [0046] 一般式(1-11)及び一般式(2-11)中、 R^{31} は、水素原子、又は炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。
- [0047] 一般式(1-12)及び一般式(2-12)中、 R^{32} 及び R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、又は炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。 R^{32} 及び R^{33} としては、それぞれ独立して、水素原子、メチル基、又はエチル基が好ましく、 R^{32} 及び R^{33} が、いずれも、水素原子、メチル基、又はエチル基であることがより好ましい。また、 R^{32} が水素原子であり、 R^{33} がメチル基又はエチル基であることも好ましい。
- [0048] 一般式(1-13)及び一般式(2-13)中、 R^{34} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、シアノ基、アミノ基、ニトロ基($-\text{NO}_2$)、又はアジ基($-\text{N}_3$)である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。
- [0049] 一般式(1-14)及び一般式(2-14)中、 R^{35} は、炭素数1～6のアルキル基である。炭素数1～6のアルキル基としては、 R^{11} で列挙した基と同様の基を用いることができる。1分子中に2個ある R^{35} は、互いに同種の基であってもよく、異種の基であってもよい。 R^{35} としては、水素原子、メチル基、又はエチル基が好ましく、メチル基又はエチル基がより好ましく

、メチル基がさらに好ましい。

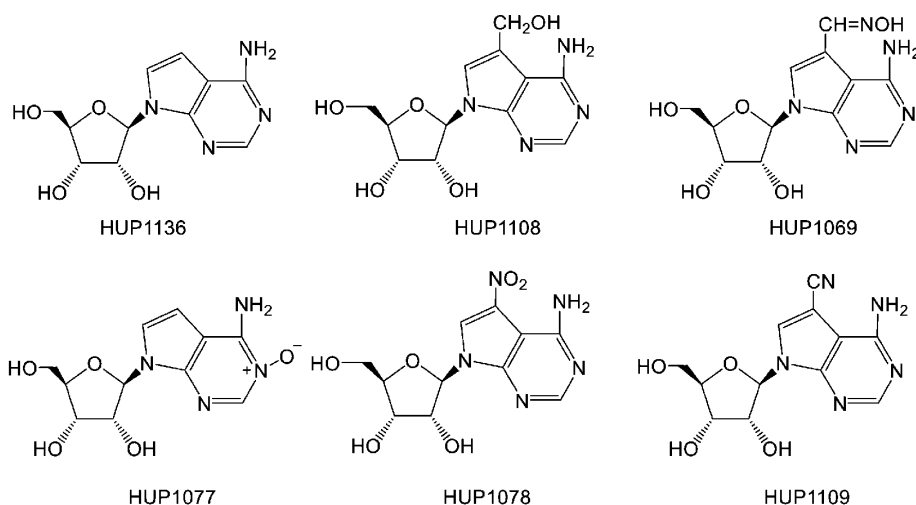
[0050] 一般式(1-15)及び一般式(2-15)中、Aは、窒素原子を含む5員又は6員のヘテロシクロ環基である。当該ヘテロシクロ環基は、当該環基中の窒素原子が、メチレン基を介してプリン環の炭素原子と連結している。当該ヘテロシクロ環基としては、ピロリジン、ピペリジン、モルホリン、及びチオモルホリンから、窒素原子と結合する水素原子を引き抜いた一価基が挙げられる。

[0051] 化合物(1)としては、一般式(1-13)で表される化合物、一般式(1-1)で表される化合物、又は一般式(1-11)で表される化合物が好ましく、一般式(1-13)中の R^{34} が水素原子、炭素数1～3のアルキル基、シアノ基、若しくはニトロ基である化合物、一般式(1-1)中の R^{21} が水素原子若しくは炭素数1～3のアルキル基である化合物、又は一般式(1-11)中の R^{31} が水素原子若しくは炭素数1～3のアルキル基である化合物がより好ましい。

[0052] 化合物(2)としては、一般式(2-13)で表される化合物、一般式(2-1)で表される化合物、又は一般式(2-11)で表される化合物が好ましく、一般式(2-13)中の R^{34} が水素原子、炭素数1～3のアルキル基、シアノ基、若しくはニトロ基である化合物、一般式(2-1)中の R^{21} が水素原子若しくは炭素数1～3のアルキル基である化合物、又は一般式(2-11)中の R^{31} が水素原子若しくは炭素数1～3のアルキル基である化合物がより好ましい。

[0053] 本発明に係る抗ウイルス剤としては、HUP1136(ツベルシジン)(CAS No. : 69-33-0)、HUP1108(5-ヒドロキシメチルツベルシジン)、HUP1069(5-フォルミルツベルシジン オキシム)、HUP1077(ツベルシジンN-オキシド)、HUP1078(5-ニトロツベルシジン)、及びHUP1109(5-シアノツベルシジン、トヨカマイシン)からなる群より選択される一種以上の化合物であることが特に好ましい。

[0054] [化16]



[0055] HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078、及びHUP1109は、HUP1136から非特許文献2に記載の方法で合成できる。HUP1108は、HUP1136から非特許文献3に記載の方法でも合成でき、天然物であるサングバマイシンから非特許文献4に記載の方法でも合成できる。

[0056] 本発明に係る抗ウイルス剤において、化合物(1)及び化合物(2)は、塩を形成してもよく、その塩を形成する酸又は塩基としては、塩酸、硫酸などの鉱酸；酢酸、コハク酸、クエン酸等の有機酸；ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属；カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属等が挙げられる。また、化合物(1)及び化合物(2)は、水和物等の溶媒和物の形態であってもよい。

[0057] 化合物(1)の誘導体又は化合物(2)の誘導体を、本発明に係る抗ウイルス剤としてもよい。化合物(1)の誘導体又は化合物(2)の誘導体としては、生体内で酵素処理等を受けることによって化合物(1)又は化合物(2)が産生される誘導体が好ましい。本発明において、抗ウイルス剤として用いることができる化合物(1)の誘導体又は化合物(2)の誘導体としては、例えば、核酸化合物を有効成分とする医薬品に対して行われているプロドラッグ化によって得られる誘導体により好ましい。具体的には、一般式(

1) 又は一般式 (2) 中、フラン環とメチレン基を介して連結したヒドロキシ基が、リン酸基 (PO_4^-) に置換されたリン酸誘導体や、当該ヒドロキシ基がモノホスホルアミダイト基に置換されたモノホスホルアミダイト誘導体、当該ヒドロキシ基がモノホスホロチオエート基に置換されたモノホスホロチオエート誘導体などが挙げられる。また、化合物 (1) の誘導体及び化合物 (2) の誘導体は、塩を形成していてもよく、水和物等の溶媒和物の形態であってもよい。塩としては、前記で列挙したものを用いることができる。

[0058] 化合物 (1)、化合物 (1) の誘導体、化合物 (2)、化合物 (2) の誘導体、これらの化合物の塩、又はこれらの溶媒和物（以降において、これらをまとめて、「本発明に係る核酸化合物」ということがある。）は、ウイルス、特に、コロナウイルスやフラビウイルス (*Flavivirus*) に対する抗ウイルス活性を有しているため、ウイルス感染症の治療又は予防に用いられる医薬用組成物の有効成分として有用である。

[0059] コロナウイルスとしては、SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 などがある。SARS-CoV-2 には、様々な変異株があり、例えば、 α 株（アルファ株）(B.1.1.7 系統)、 β 株（ベータ株）(B.1.351 系統)、 γ 株（ガンマ株）(P.1 系統)、 δ 株（デルタ株）(B.1.617.2 系統)、 $\omicron$ 株（オミクロン株）(B.1.1.529)、E484K 株 (R.1 系統)、 ϵ 株（イプシロン株）(B.1.427/B.1.429 系統)、 θ 株（シータ株）(P.3 系統)、 κ 株（カッパ株）(B.1.617.1 系統)、及びその他の変異株がある。

フラビウイルスとしては、コロナウイルスと同様に、プラス鎖一本鎖 RNA を遺伝子とするエンベロープウイルスであり、デング熱（デング出血熱）の原因であるデングウイルス (DENV)、ジカ熱（ジカウイルス感染症）の原因であるジカウイルス (ZIKV)、黄熱の原因である黄熱ウイルス (YFV)、ウエストナイル熱（ウエストナイル脳炎）の原因であるウエストナイルウイルス (WNV)、日本脳炎の原因である日本脳炎ウイルス (JEV) が挙げられる。DENV には、1 型から 4 型までの 4 種 (DENV1、DENV2、DENV3、DENV4) が存在する。

[0060] 本発明に係る核酸化合物は、レムデシビルと同様に、RNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRp）を阻害する。そのため、RdRpによって複製されるウイルスに対して抗ウイルス活性を有する。当該ウイルスとしては、例えば、コロナウイルス、フラビウイルス、及びヘパシウイルスCなどのようなウイルス性肝炎を引き起こすウイルスなどがある。本発明に係る核酸化合物は、RdRpによって複製されるウイルスによる感染症の治療に用いることができる。

[0061] 本発明に係る核酸化合物は、特に、COVID-19を始めとするコロナウイルスの感染症の治療又は予防に用いられる医薬用組成物の有効成分として非常に有用である。SARS-CoV-2の各種変異株は、いずれも複製にRdRpが必要であるので、本発明に係る核酸化合物は、いずれの変異株に対しても抗ウイルス活性を有する。

また、本発明に係る核酸化合物は、デング熱、ジカ熱、黄熱、ウエストナイル熱、及び日本脳炎を始めとするフラビウイルスの感染症の治療又は予防に用いられる医薬用組成物の有効成分としても非常に有用である。本発明に係る核酸化合物は、低分子化合物であることから、免疫原性等の問題がない。また、経口投与も可能であり、投与経路もあまり制限されないため、特に、ヒトを含む哺乳類に対する医薬の有効成分として有用である。

[0062] 非特許文献7は、GS-441524の細胞への取り込みについて考察している。著者らは、GS-441524の細胞への取り込みは、細胞表面に存在するアデノシントランスポーターに完全に依存しているが、これらのトランスポータは低酸素肺上皮細胞及び特定の細胞株において減少しているため、GS-441524の細胞への取り込みが減少すると推察している。

GS-441524と、ツベルシジン誘導体、例えばHUP1108との1つの大きな違いは、GS-441524の1位にはシアノ基（-CN）が結合されているのに対して、HUP1108には結合されていないことである。したがって、本発明の化合物がGS-441524に比べて優れた効力を示す原因の一つは、この違いである可能性がある。

[0063] したがって、本発明の化合物は複数のメカニズムを介して細胞へ取り込まれると考えられ、それにより、アデノシントランスポーターが減少している低酸素肺上皮細胞への取り込みが減少している問題が改善し、抗ウイルス活性が優れていると考えられる。

[0064] 1種又は2種以上の本発明に係る核酸化合物を医薬組成物に含有せしめる場合、必要に応じて薬学的に許容される担体と配合し、予防又は治療目的に応じて各種の投与形態を採用可能である。該形態としては、例えば、経口剤、注射剤、坐剤、軟膏剤、貼付剤等が挙げられるが、経口剤が好ましい。これらの投与形態は、各々当業者に公知慣用の製剤方法により製造できる。

[0065] 薬学的に許容される担体としては、固形製剤における賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等が用いられる。また、必要に応じて防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、安定化剤等の製剤添加物を用いることもできる。

[0066] 経口用固形製剤を調製する場合は、本発明に係る核酸化合物に賦形剤、必要に応じて、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味・矯臭剤等を加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を製造することができる。

[0067] 経口用液体製剤を調製する場合は、本発明に係る核酸化合物に、矯味剤、緩衝剤、安定化剤、矯臭剤等を加えて、常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等を製造することができる。

[0068] 注射剤を調製する場合は、本発明に係る核酸化合物に、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉内及び静脈内用注射剤を製造することができる。

[0069] 坐剤を調製する場合は、本発明に係る核酸化合物に当業界において公知の製剤用担体、例えば、ポリエチレングリコール、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセリド等を加えた後、常法により製造することができる。

軟膏剤を調製する場合は、本発明に係る核酸化合物に通常使用される基剤、安定剤、湿潤剤、保存剤等が必要に応じて配合され、常法により混合、製

剤化される。

貼付剤を調製する場合は、通常の支持体に前記軟膏、クリーム、ゲル、ペースト等を常法により塗布すればよい。

[0070] 前記の各製剤中の本発明に係る核酸化合物の含有量は、患者の症状、その剤形等により一定ではないが、一般に経口剤では約0.001～1000mg、注射剤では約0.001～500mg、坐剤では約0.01～1000mg程度である。

[0071] また、これらの製剤の1日あたりの投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概には決定できないが、通常成人（体重60kg）1日あたり約0.005～5000mg程度であり、0.01～1000mgが好ましく、これを1日1回又は2～3回程度に分けて投与するのが好ましい。

[0072] また、本発明に係る核酸化合物の投与量は、特に限定されないが、60mg/kg未満であることが好ましく、10mg/kg以上60mg/kg未満であることがより好ましく、15～40mg/kgであることがさらに好ましい。

例えば、本発明に係る核酸化合物の投与量は、15～30mg/kgにすることができ、20mg/kgにすることもできる。また、例えば、60mg/kg未満のHUP1108（5-ヒドロキシメチルツベルシジン）を投与することができ、20mg/kgのHUP1108を投与することが好ましい。

[0073] 本発明に係る核酸化合物を有効成分とする抗ウイルス剤及び医薬用組成物が投与される動物は、特に限定されるものではなく、ヒトであってもよく、ヒト以外の動物であってもよい。非ヒト動物としては、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等の哺乳動物や、ニワトリ、ウズラ、カモ等の鳥類等が挙げられる。

実施例

[0074] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0075] <コロナウイルス>

以降の実験で使したコロナウイルスのうち、SARS-CoV-2は、国立感染症研究所より分与されたJPN/TY/WK-521株とその変異株として、国立感染症研究所より分与されたQK002 (α 株)、TY8-612 (β 株)、TY5-501 (γ 株)、TY11-927 (δ 株)を用いた。

ヒトに日常的に感染するコロナウイルス (Human Coronavirus: HCoV) として、ATCCから入手したHCoV-229E (ATCC: VR-740)、及びHCoV-OC43 (ATCC: VR-1558)を用いた。

[0076] <フラビウイルス>

以降の実験で使したフラビウイルスのうち、DENV1-4は、それぞれD1/hu/PHL/10-07株、D2/hu/INDIA/09-74株、D3/hu/Thailand/00-40株、D4/hu/Solomon/08-11株を用いた。ZIKVは、MR766株を用いた。YFVは、17D-204株を用いた。WNVは、NY99株を用いた。JEVは、Beijing-1株を用いた。

[0077] <培養細胞>

以降の実験で、ウイルスを感染させるために、ヒト胎児肺由来の培養細胞株MRC5細胞、又はヒト結腸癌由来の培養細胞株Caco-2細胞を用いた。いずれの細胞についても、培養液として、2% FBS/MEMを用いた。2% FBS/MEMは、MEM (Minimum Essential Medium: ニッスイ社製) に、2% FBS (ウシ胎児血清: Gibco社製) とL-グルタミン (Wako社製) を添加して調製した。

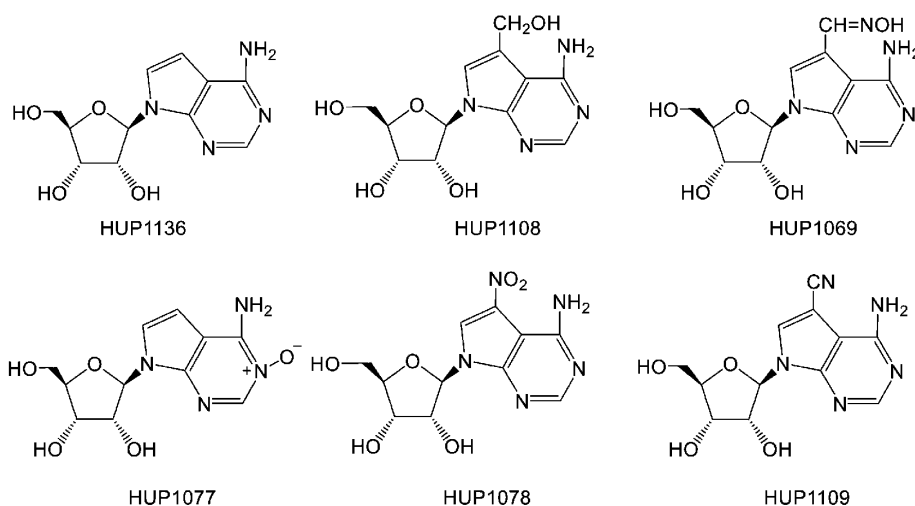
[0078] [実施例1]

国立大学法人北海道大学薬学研究院創薬科学研究教育センターが保有する

核酸化合物を母核とする化合物ライブラリーの化合物を被験試料として、ヒトコロナウイルスに感染させた細胞の細胞死を抑制する効果を奏する化合物をスクリーニングした。ヒトコロナウイルスとして、HCoV-229E及びHCoV-OC43を用いた。

この結果、使用した化合物ライブラリーに含まれる化合物のうち、HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078、及びHUP1109の6種の化合物に、抗ウイルス活性があることがわかった。

[0079] [化17]



[0080] <細胞死抑制効果の確認>

抗ウイルス活性があると評価された6種の化合物について、コロナウイルス感染による細胞死抑制効果を調べた。ポジティブコントロールとして、GS-5734（レムデシビル）とGS-441524についても同様に調べた。

[0081] まず、96ウェルプレートの各ウェル内で、各化合物で処理した細胞にウイルスを感染させて、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）内で3日間培養した。

3日間培養した96ウェルプレートを、肉眼及び顕微鏡下で観察し、細胞の形態、結晶の有無等を確認した。その後、Resazurin溶液（Resaz

urin sodium salt (Sigma社製) を 0.24 mg/mL になるようにPBSで溶解させた溶液) を、各ウェルに $20 \mu\text{L}$ ずつ分注し、 CO_2 インキュベーター内で2時間培養した後、反応停止液(ウイルス不活化液: Sodium dodecyl sulfate (SDS) を 7.5% になるように蒸留水で溶解させた溶液) を各ウェルに $20 \mu\text{L}$ ずつ分注し、プレートミキサーで混和した。

その後、当該96ウェルプレートについて、マルチプレートリーダー(機器名: EnVision、パーキンエルマー社製) で 531 nm (Emission) / 590 nm (Excitation) における蛍光強度を測定した。

[0082] 統計解析ソフトウェア(製品名: GraphPad Prism 8、GraphPad Software社製)を用いて、以下のような計算式に基づき、ウイルス感染細胞の50%細胞死阻害濃度(EC_{50})を算出した。さらに、 EC_{50} と CC_{50} の値から、 SI ($\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$)を算出した。算出結果を表1に示す。

[0083] [Agonist] vs response—Variable slope (four parametric)

$$Y = \text{Bottom} + (X^{\text{HillSlope}} * (\text{Top} - \text{Bottom}) / (X^{\text{HillSlope}} + \text{EC50}^{\text{HillSlope}}))$$

[0084] X: 被験試料の濃度

Y: 感染細胞死阻害率(細胞生存率)

HillSlope: 一連の曲線の傾き

Bottom (基底反応) = 0 (感染細胞死阻害率0%)

Top (最大反応) = 100 (感染細胞死阻害率100%)

[0085]

[表1]

	HCoV-OC43		HCoV-229E		CC ₅₀ (μM)
	EC ₅₀ (μM)	SI	EC ₅₀ (μM)	SI	
HUP1136	0.11	5.9	< 0.078	> 8.5	0.66
HUP1108	0.35	> 141	0.43	> 117	> 50
HUP1069	0.055	13	< 0.078	> 9.5	0.74
HUP1077	4.3	5.6	4.0	6.1	24
HUP1078	> 10		2.0	0.17	0.33
HUP1109	> 10		2.3	0.26	0.59
GS-441524	3.7	> 13.7	3.1	> 16.1	> 50
GS-5734	0.23	> 221.1	0.072	> 694.1	> 50

[0086] [実施例2]

実施例1において、抗ウイルス活性が確認された6種の化合物について、SARS-CoV-2に対するウイルスRNA複製抑制効果を調べた。ウイルスを感染させる培養細胞はCaco-2細胞を用いた。

[0087] <ウイルスRNA複製抑制効果の確認>

(1) 培養細胞へのウイルス感染

被験試料（抗ウイルス活性が確認された6種の化合物）、ウイルス及び細胞の希釈には、2% FBS/MEMからなる培養液を用いた。

まず、96ウェルプレートに、適当細胞数に調製したCaco-2細胞溶液を100 μL/ウェルずつ分注し、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で一晩培養した。次いで、この96ウェルプレート中のCaco-2細胞を入れた各ウェルに、予め培養液で適度な濃度に希釈した被験試料を、3倍段階希釈系列を作製するように添加し（50 μL/ウェル）、プレートミキサーで混和した。この被験試料を入れた96ウェルプレートに、予め培養液で適度な濃度に希釈したウイルス液を50 μL/ウェルずつ分注した。その後、当該96ウェルプレートをプレートミキサーで混和し、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で48時間培養した。

[0088] (2) RNA抽出・精製

48時間培養後の前記96ウェルプレートの各ウェルから、培養上清を1

50 μ L ずつ回収した。さらに、RNA抽出キット（製品名：PureLink Pro 96 Viral RNA/DNA Kit、Thermo Fisher Scientific社製）に付属のLysisバッファーを各ウェルに添加してウイルスを不活化した。その後、当該キットに付属のプロトコルに従って、ウイルスRNAを精製した。

[0089] (3) ウイルスRNAの測定

精製したウイルスRNAとSARS-CoV-2のnucleocapsid領域に設計したProbe/Primerセットを用いて、qRT-PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR) を実施した。qRT-PCRは、市販のキット（製品名：THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR kit、TOYOBO社製）と、リアルタイムPCRシステム（製品名：QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System、Thermo Fisher Scientific社製）を用いて行った。

[0090] 検量線法を用いて各サンプル中のウイルスRNAコピー数を算出した。検量線は、前記nucleocapsid領域を含む塩基配列を組み込んだプラスミドを鋳型として同様にqRT-PCRを行って作成した（ $10^9 \sim 10^3$ copies）。

[0091] (4) ウイルスRNA複製阻害率の算出

被験試料非添加群のウイルスRNAコピー数をもとに、各濃度における被験試料のウイルスRNA複製阻害率（%）を算出した。各被験試料で処理した細胞由来のウイルスRNA量（ $\log_{10}$ [ウイルスRNAコピー数]）の測定結果を図1に、ウイルスRNA複製阻害率（[被験試料で処理した細胞由来のウイルスRNAコピー数] / [被験試料非添加群の細胞由来のウイルスRNAコピー数] $\times 100\%$ ）の測定結果を図2に、それぞれ示す。

[0092] その後、次のような計算式に基づき、統計解析ソフトウェア（製品名：GraphPad Prism 8、GraphPad Software社製）を用いて、90%ウイルスRNA複製阻害濃度（ EC_{90} ）を算出した。算

出結果を表 2 に示す。

[0093] [Agonist] vs response—Find ECanything

$$EC50 = ECF / (F / (100 - F))^{(1 / HillSlope)}$$

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + (EC50 / X)^{HillSlope})$$

[0094] ECF : 反応の値がBottomとTopの間のF%の値になる被験試料の濃度

F : 求めたい阻害率の値 (EC₉₀の場合、F = 90)

X : 被験試料の濃度

Y : ウイルスRNA複製阻害率

HillSlope : 一連の曲線の傾き

Bottom (基底反応) = 0 (ウイルスRNA複製阻害率0%)

Top (最大反応) = 100 (ウイルスRNA複製阻害率100%)

[0095] [表2]

	SARS-CoV-2
	EC ₉₀ (μM)
HUP1136	0.087
HUP1108	0.57
HUP1069	0.20
HUP1077	3.5
HUP1078	0.10
HUP1109	0.20

[0096] 図 1 及び図 2 に示すように、実施例 1 において抗ウイルス活性が確認された 6 種の化合物で処理した細胞では、化合物によって異なるものの、処理した化合物量依存的に、感染細胞から放出されるウイルス量が低下し、ウイルス RNA 複製阻害率が上昇する傾向が観察され、これらの化合物が SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス活性を有することが確認された。

[0097] 試験実施時に顕微鏡下で観察した結果、HUP1109 で処理した細胞では、細胞が死滅するほど強い細胞毒性が認められた。また、HUP1078 (0.123 μM)、HUP1136 (1.11 μM)、HUP1108 (10 μM) は、いずれも、細胞が死滅するほどには至らないマイルドな細胞毒性が観察された。HUP1078 及び HUP1109 で処理した細胞

では、これらの化合物の細胞毒性の影響で抗ウイルス活性を示している可能性が示唆された。一方で、HUP1136とHUP1108は、抗ウイルス活性が確認された濃度は、細胞毒性よりも低濃度域であった。特に、HUP1108は、3.33 μ Mよりも高濃度域では、細胞毒性の影響でウイルスの増殖が抑えられている可能性があるが、3.33 μ Mよりも低濃度域においても、ウイルスの増殖が抑制されており、細胞毒性を示さない低濃度領域でも抗ウイルス活性があることが確認された。これらの6化合物のうち、特にHUP1077とHUP1108は、細胞毒性の懸念が低く、濃度依存的なウイルスRNA複製阻害活性を示しており、抗ウイルス剤として非常に有用であると考えられた。

[0098] [実施例3]

Time-of-Addition試験を行い、HUP1108の抗SARS-CoV-2活性の作用点を調べた。ウイルスを感染させる培養細胞はCaco-2細胞を用いた。

[0099] <Time-of-Addition試験>

(1) 培養細胞へのウイルス感染

被験試料(HUP1108)、ウイルス及び細胞の希釈には、2% FBS/MEMからなる培養液を用いた。

まず、48ウェルプレートに、適当細胞数に調製したCaco-2細胞溶液を300 μ L/ウェルずつ分注し、CO₂インキュベーター(37℃、5% CO₂)で一晩培養した。次いで、この48ウェルプレート中のCaco-2細胞を入れた各ウェルから培養上清を除去した後、予め培養液で適当な濃度に希釈したウイルス液(150 μ L/ウェル)を添加し、さらに下記の3種のタイミング(Whole、Entry、及びPost-entry)で予め培養液で希釈した被験試料を添加し(150 μ L/ウェル、最終濃度: 1 μ M)、プレートミキサーで混和した後、CO₂インキュベーター(37℃、5% CO₂)で計24時間培養した。

[0100] ・Whole: ウイルス感染の全工程において被験試料が存在している

ウイルス液の添加と同じタイミングで被験試料を添加し、プレートミキサーで混和した後、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で1時間培養した。その後、培養上清を除去し、培養液で洗浄後、新たな被験試料含有培養液を添加し、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で24時間培養した。

[0101] ・ E n t r y : ウイルスの侵入時にのみ被験試料が存在している

ウイルス液の添加と同じタイミングで被験試料を添加し、プレートミキサーで混和した後、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で1時間培養した。その後、培養上清を除去し、培養液で洗浄後、新たな被験試料を含む培養液を添加し、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で2時間培養した。その後、再び培養上清を除去し、培養液で洗浄後、被験試料を含まない培養液を添加し、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で22時間培養した。

[0102] ・ P o s t - e n t r y : ウイルス侵入後にのみ被験試料が存在している

ウイルス添加時には被験試料を添加せずに、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で1時間培養した。その後、培養上清を除去し、培養液で洗浄後、新たな培養液（被験試料を含有していない培養液）を添加し、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で2時間培養した。その後、再び培養上清を除去し、培養液で洗浄後、被験試料を含有する培養液を添加し、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で22時間培養した。

[0103] （2）RNA抽出・精製

24時間培養後の前記48ウェルプレートの各ウェルから、培養上清を回収し、ウイルス力価測定に使用した。ウェル内の細胞は、PBS（リン酸生理食塩水）で洗浄（300μL×2回）し、さらに、RNA抽出キット（製品名：PureLink RNA Mini Kit、Thermo Fisher Scientific社製）に付属のLysisバッファを各ウェルに添加して細胞を溶解した。その後、当該キットに付属のプロトコルに従って、total RNAを精製した。

[0104] (3) ウイルスRNAの測定

精製したtotal RNAとSARS-CoV-2のnucleocapsid領域に設計したProbe/Primerセットを用いて、qRT-PCRを実施した。qRT-PCRは、ACTBを内在性コントロールとして使用した以外は、実施例2と同様にして行った。

[0105] (4) ウイルスRNA複製阻害率の算出

qRT-PCRで得られた各サンプルのCt値に基づいて、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて、被験試料非添加群のウイルスRNA量を1とした場合の相対ウイルスRNA量を算出し、ウイルスRNA複製阻害率を算出した。各サンプルの相対ウイルスRNA量の算出結果を図3に示す。図3に示すグラフは、統計解析ソフトウェア（製品名：GraphPad Prism 8、GraphPad Software社製）を用いて作成した。

[0106] (5) ウイルス力価の測定

96ウェルプレートに分注したVeroE6/TMPRSS2細胞（100 μ L/ウェル）に、前記（2）で回収した培養上清を培養液で適当な濃度に希釈した液を添加し（100 μ L/ウェル）、プレートミキサーで混和した後、CO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）で72時間培養した。その後、ウイルス感染による細胞変性効果（CPE）を観察し、Median tissue culture infectious dose（TCID₅₀）を算出した。算出されたTCID₅₀の対数値を図4に示す。図4に示すグラフは、統計解析ソフトウェア（製品名：GraphPad Prism 8、GraphPad Software社製）を用いて作成した。

[0107] 図3及び図4に示すように、HUP1108の処理時期が、WholeとPost-entryの場合に、相対ウイルスRNA量及びウイルス力価の低下が観察された。これらの結果から、HUP1108の抗SARS-CoV-2活性の作用点は、ウイルス侵入後の複製過程にあることが示唆された。

[0108] [実施例4]

実施例 1 において抗ウイルス活性があると評価された 6 種の化合物について、フラビウイルス感染による細胞死抑制効果を調べた。

[0109] <細胞死抑制効果の評価>

(1) 培養細胞

以降の実験において、ウイルスを感染させるために、シリアンハムスター腎由来の培養細胞株 BHK-21 細胞を用いた。培養液として、2% FBS/MEM 又は 2% FBS/RPMI-1640 を用いた。各種培養液は、MEM (Minimum Essential Medium: ニッスイ社製) 又は RPMI-1640 (Gibco 社製) に、2% FBS (ウシ胎児血清: Gibco 社製) と L-グルタミン (Wako 社製) を添加して調製した。

[0110] (2) ウイルス感染と MTT アッセイ

まず、96 ウェルプレートの各ウェル内で、各化合物で処理した細胞に各種ウイルスを感染させて、CO₂ インキュベーター (37℃、5% CO₂) 内で、DENV2 は 4 日間、DENV1、3、4 は 5 日間、ZIKV、YFV、WNV、JEV は 3 日間培養した。

培養した 96 ウェルプレートを、肉眼及び顕微鏡下で観察し、細胞の形態、結晶の有無等を確認した。次いで、MTT 溶液 (3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (ナカライテスク社製) を 5 µg/mL になるように PBS で溶解させた溶液) を、各ウェルに 30 µL ずつ添加し、CO₂ インキュベーター内で 2 時間培養した。その後、当該プレートから、細胞を吸わないようにして上清を 150 µL ずつ除き、細胞溶解液 (ウイルス不活化液: 500 mL のイソプロパノールに、50 mL の Triton X-100、4 mL の塩酸 (12 N) を入れて調製したもの) を各ウェルに 150 µL ずつ添加し、プレートミキサーで混和した。その後、当該 96 ウェルプレートについて、吸光度計を用いて 570 nm/630 nm の 2 波長の吸光度を測定した。

[0111] (3) EC₅₀ の算出

以下の計算式に基づき、Microsoft Excel 又は同等の計算

処理能力を有するプログラムを使用し、ウイルス感染細胞の50%細胞死阻害濃度 (EC_{50}) を算出した。結果を表3に示す。

[0112] $[EC_{50}] = 10^Z$

$$Z = ([50\% \text{ OD}] - [\text{Low OD}]) / ([\text{High OD}] - [\text{Low OD}]) \times \{\log(\text{High conc.}) - \log(\text{Low conc.})\} + \log(\text{Low conc.})$$

$$[50\% \text{ OD}] = \{\text{OD}(\text{cell control}) - \text{OD}(\text{virus control})\} \times 0.5 + \text{OD}(\text{virus control})$$

[0113] OD: 吸光度

conc.: 薬剤濃度

OD (cell control): コントロールのウェルの吸光度の平均値

OD (virus control): ウイルスコントロールのウェルの吸光度の平均値

[0114] EC_{50} は、吸光度と薬剤濃度曲線上の50% OD値を挟む2点A-High (High OD, High conc.) とB-Low (Low OD, Low conc.)から計算した。

[0115] 結果を表3に示す。表3に示すように、6種の化合物のうち、HUP1136、HUP1108、HUP1069、及びHUP1077の4種の化合物はいずれも、DENV1、DENV2、DENV3、DENV4、ZIKV、YFV、WNV、及びJEVに対して、高い抗ウイルス活性があることがわかった。

[0116] また、非特許文献5は、DENV2に対するGS-441524の抗ウイルス活性 (EC_{50}) が9.46 μM あることを報告した。この値は、本発明の化合物HUP1136、HUP1108、HUP1069、及びHUP1077のいずれに比べて、顕著に高く、特にHUP1108に比べて約10倍近く、HUP1136に比べて約40倍近く高い。

また、非特許文献5は、YFVに対するGS-441524の抗ウイルス活性 (EC_{50}) が11 μM あることを報告した。この値は、HUP1136及びHUP1108のいずれに比べて顕著に高く、特にHUP1108に比べて約40倍以上、HUP1136に比べて約73倍以上高い。

したがって、本発明の化合物の抗ウイルス活性がGS-441524に比

べて顕著に高いことは明らかである。

[0117] [表3]

	EC ₅₀ (μM)							
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	JEV	ZIKV	YFV	WNV
HUP1136	>16	<0.125	<0.125	>16	<0.13		0.15	0.2
HUP1108	0.35	0.24	0.42	0.52	0.5	1.3	0.27	0.95
HUP1069	>16	<0.125	>16	>16	<0.13			<0.13
HUP1077	3.2	0.95	2.3	2.5	6.9	6.3		10.7
HUP1078		>20						
HUP1109		>20						

[0118] [実施例5]

HUP1108について、SARS-CoV-2のWK-521株及び各種変異株（α株、β株、γ株、δ株）に対するウイルスRNA複製抑制効果を、実施例2と同様な方法で調べた。ただし、培養細胞へウイルス感染させる際、96ウェルプレート中のCaco-2細胞を入れた各ウェルに、予め培養液で適度な濃度に希釈した被験試料を、3倍段階希釈系列ではなく、2倍段階希釈系列を作製するように添加し（50 μL/ウェル）、プレートミキサーで混和した。

[0119] 図5に示すように、HUP1108の化合物量依存的に、感染細胞から放出されるウイルス量が低下する傾向が観察され、HUP1108がSARS-CoV-2の5種の株すべてに対して抗ウイルス活性を有することが確認された。この結果から、HUP1108はSARS-CoV-2の他の変異株（例えば、オミクロン株など）に対しても抗ウイルス活性を有すると言える。

[0120] [実施例6]

(1) In vivoマウスモデル（肺内ウイルス量測定モデル）

BALB/cマウスにSARS-CoV-2（WK-521株）を経鼻接種し、感染3日後の肺ホモジネート上清を次のマウスに接種する継代を、10回繰り返した。パッセージ3（P3）から安定して高いウイルス力価が得られ、P9以降は、死亡する個体も出てきた。次世代シーケンシング（NG

S) によるP10ウイルスの遺伝子解析を実施した。その結果、ウイルスの感染性を決定付けるスパイクタンパク質領域に、Q498H変異が確認された。

このマウスにアダプトしたウイルス(MA-P10株)を用いた増殖評価モデルにより、HUP1108によるマウス肺内ウイルス増殖抑制効果を調べた。5週齢のBALB/cマウスにMA-P10株(2×10^2 TCID₅₀/マウス)を経鼻接種し、感染翌日に各個体の肺を回収し、肺内のウイルス力価を測定した(各群5匹)。その結果、HUP1108を感染2時間前に筋肉内投与(単回、20mg/kg)した群の肺内ウイルス量は、薬剤なしの媒体のみを投与した群(Vehicle)の肺内ウイルス量に比べて、約1.310g低かった(図6)。

[0121] (2) In vivoマウスモデル(致死モデル)

次に、このMA-P10株感染マウスモデルを用いて、HUP1108の致死抑制効果を調べた。

30~50週齢のBALB/cマウスにSARS-CoV-2(MA-P10株)(2×10^2 TCID₅₀/マウス)を経鼻接種し、HUP1108を感染2時間前に1回、感染翌日から感染4日後まで1日1回の合計5日間筋肉内投与(20mg/kg)し、生存率を算出した(各群5匹)。その結果、HUP1108を投与した群のマウス生存率が100%であったのに対して、薬剤なしの媒体のみを5日間投与した群(Vehicle)のマウス生存率は40%であった(図7)。すなわち、HUP1108を連投することで、SARS-CoV-2の致死効果を抑制する結果が得られた。

[0122] 非特許文献6は、SARS-CoV-2-MA10モデルに、GS-621763を1日60mg/kg以上経口投与する、またはMPV(Molnupiravir)を1日120mg/kg以上経口投与することにより、急性呼吸窮迫症候群(Acute Respiratory Distress Syndrome)が改善することを報告した。

これに対して、本発明の化合物HUP1108を同様のマウスモデルに1

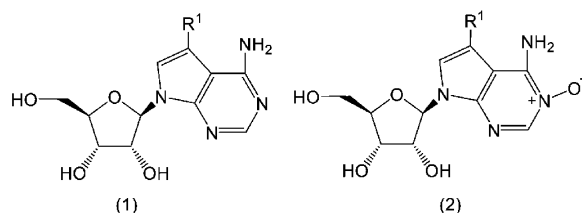
日 20 mg / kg 筋肉内投与することにより、肺内ウイルス量が顕著に減少し、生存率が 100%であった。

HUP1108は、*in vivo*においても、低用量の使用でSARS-CoV-2に対して非常に高い抗ウイルス活性を示す化合物であることが確認された。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（1）又は（2）

[化1]

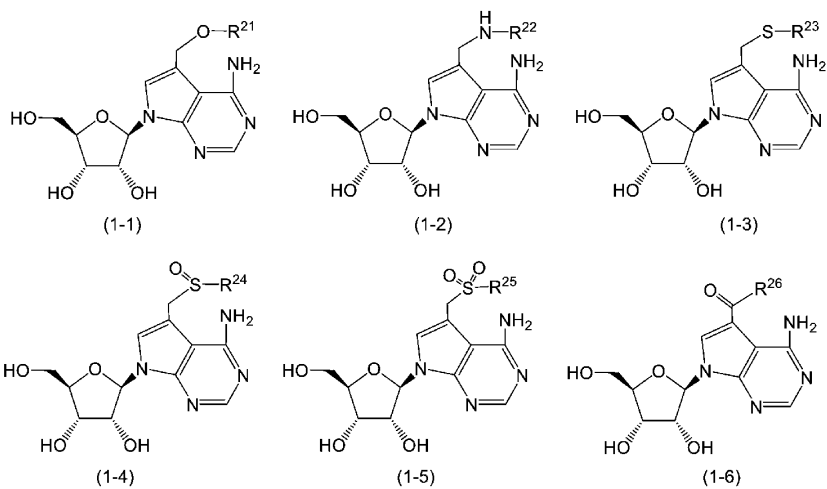


[式中、 R^1 は、 $-(CH_2)_{n_1}-Z^1-R^{11}$ 又は $-CH-(Z^1-R^{11})_2$ （ n_1 は、0又は1であり； Z^1 は、単結合、酸素原子、 $-NH-$ 、硫黄原子、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CO-$ 、 $-CO-O-$ 、又は $-CH=N-O-$ であり； R^{11} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-NR^{12}R^{13}$ 、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-CH_2-CO-O-R^{14}$ 、又は窒素原子を含む5員又は6員のヘテロシクロ環基であり； R^{12} 及び R^{13} は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素数1～6のアルキル基であり； R^{14} は、水素原子又は炭素数1～6のアルキル基である。ただし、前記ヘテロシクロ環基は、当該環基中の窒素原子と Z^1 が連結する。）である。]

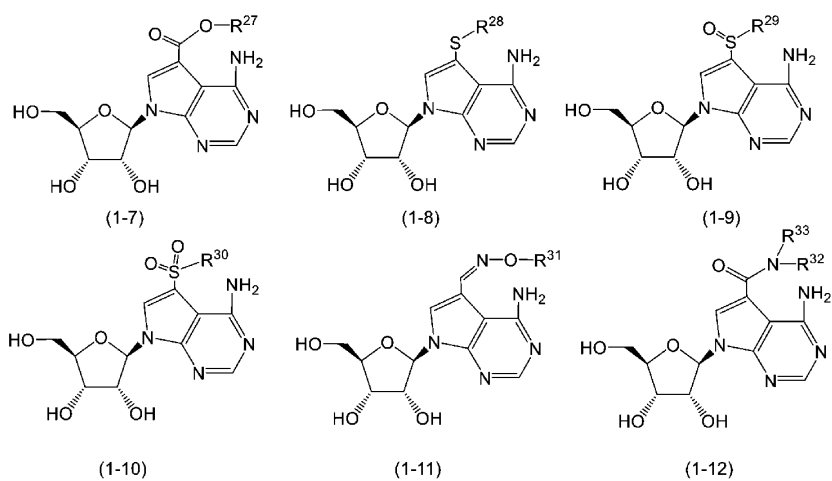
で表される化合物若しくはその誘導体、これらの化合物の塩、又はこれらの溶媒和物からなる、抗ウイルス剤。

[請求項2] 前記一般式（1）が、下記一般式（1-1）～（1-15）

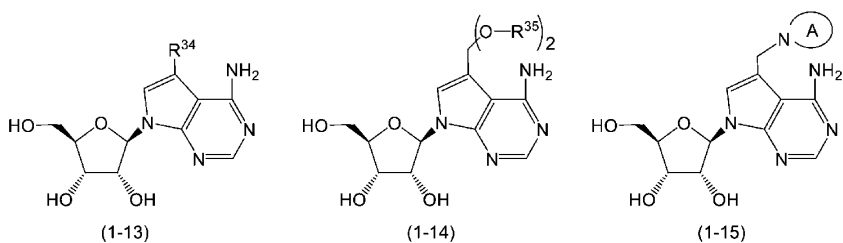
[化2]



[化3]



[化4]

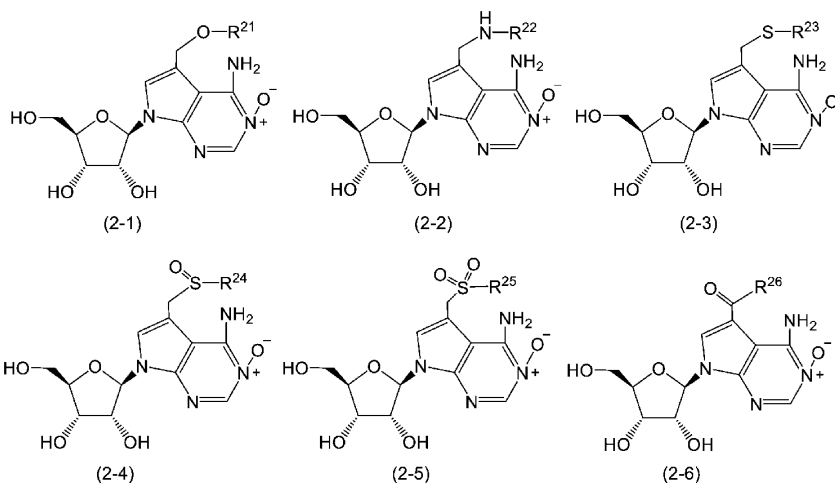


[式中、 R^{21} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-CH_2-COOH$ 、又はアミノ基であり； R^{22} は、水素原子、炭素数1～6

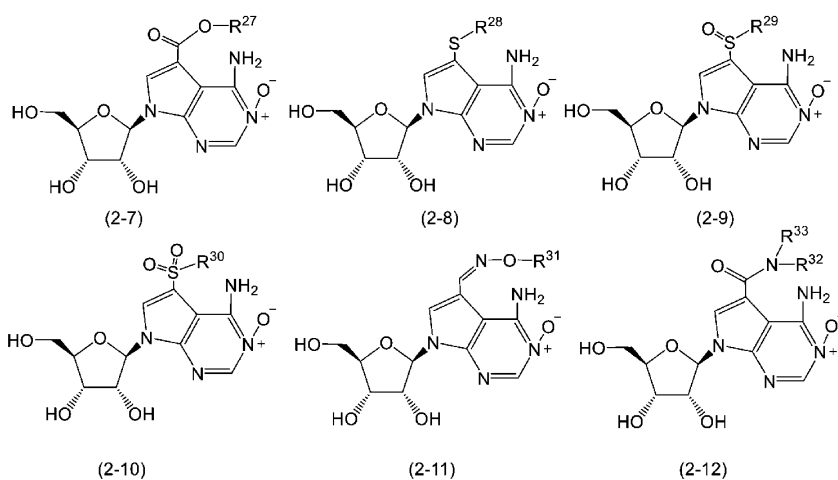
のアルキル基、又はアミノ基であり； R^{23} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{31} 、 R^{32} 、及び R^{33} は、水素原子、又は炭素数1～6のアルキル基であり； R^{24} 、 R^{25} 、 R^{29} 、 R^{30} 、及び R^{35} は、炭素数1～6のアルキル基であり； R^{28} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、又はシアノ基であり； R^{34} は、水素原子、炭素数1～6のアルキル基、 $-CH_2-N_3$ 、シアノ基、アミノ基、ニトロ基、又はアジ基であり； A は、窒素原子を含む5員又は6員のヘテロシクロ環基である。]

のいずれかであり、前記一般式(2)が下記一般式(2-1)～(2-15)

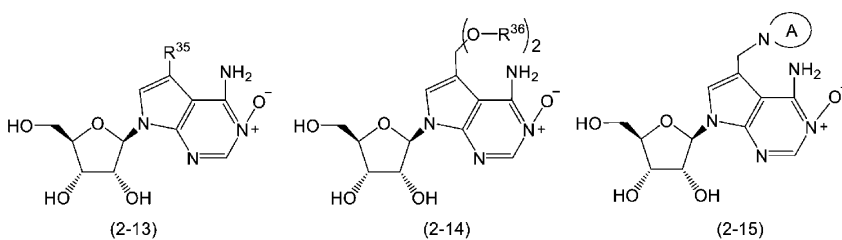
[化5]



[化6]



[化7]



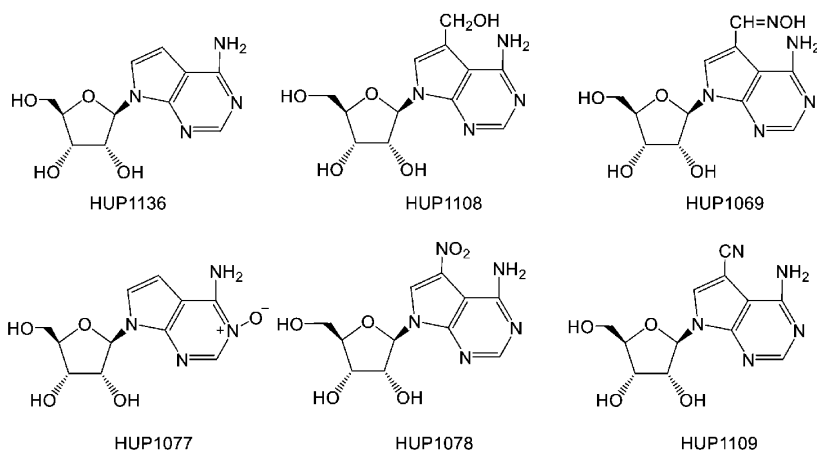
[式中、 $R^{21} \sim R^{35}$ 、及びAは、前記と同じである。]

のいずれかである、請求項1に記載の抗ウイルス剤。

[請求項3]

HUP1136、HUP1108、HUP1069、HUP1077、HUP1078、及びHUP1109からなる群より選択される一種以上の化合物からなる、請求項1又は2に記載の抗ウイルス剤。

[化8]



- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載の抗ウイルス剤を有効成分とする、医薬用組成物。
- [請求項5] コロナウイルス又はフラビウイルスによる感染症の治療に用いられる、請求項4に記載の医薬用組成物。
- [請求項6] COVID-19の治療に用いられる、請求項5に記載の医薬用組成物。
- [請求項7] 3CLプロテアーゼの阻害剤との併用療法に使用される、請求項4～6のいずれか一項に記載の医薬用組成物。
- [請求項8] 前記3CLプロテアーゼの阻害剤は、PF-07304814及びS-217622からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項7に記載の医薬用組成物。
- [請求項9] 請求項1～3のいずれか一項に記載の抗ウイルス剤を有効量投与することにより、コロナウイルス感染症又はフラビウイルス感染症を治療する、治療方法。
- [請求項10] HUP1108からなる抗ウイルス剤を有効量投与する、請求項9に記載の治療方法。
- [請求項11] 前記有効量は、60mg/kg未満である、請求項9又は10に記載の治療方法。
- [請求項12] 前記有効量は、20mg/kgである、請求項11に記載の治療方法。

法。

- [請求項13] 前記コロナウイルスは、SARS-CoV-2である、請求項9～12のいずれか一項に記載の治療方法。
- [請求項14] 前記SARS-CoV-2は、WK-521株、 α 株、 β 株、 γ 株、 δ 株及び θ 株からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項13に記載の治療方法。
- [請求項15] 前記フラビウイルスは、デングウイルス（DENV）、ジカウイルス（ZIKV）、黄熱ウイルス（YFV）、ウエストナイルウイルス（WNV）及び日本脳炎ウイルス（JEV）からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項9～12のいずれか一項に記載の治療方法。
- [請求項16] 3CLプロテアーゼの阻害剤を併用投与する、請求項9～15のいずれか一項に記載の治療方法。
- [請求項17] 前記3CLプロテアーゼの阻害剤は、PF-07304814及びS-217622からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項16に記載の治療方法。
- [請求項18] 請求項1～3のいずれか一項に記載の抗ウイルス剤と3CLプロテアーゼの阻害剤との、治療上の組み合わせ。
- [請求項19] 前記3CLプロテアーゼの阻害剤は、PF-07304814及びS-217622からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項18に記載の組み合わせ。
- [請求項20] コロナウイルス感染症又はフラビウイルス感染症の治療に用いられる、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項21] 前記コロナウイルスは、SARS-CoV-2のWK-521株、 α 株、 β 株、 γ 株、 δ 株及び θ 株からなる群より選ばれる少なくとも一種であり、
前記フラビウイルスは、デングウイルス（DENV）、ジカウイルス（ZIKV）、黄熱ウイルス（YFV）、ウエストナイルウイルス

(WNV) 及び日本脳炎ウイルス (JEV) からなる群より選ばれる
少なくとも一種である、請求項 20 に記載の抗ウイルス剤。