

博士論文

薬剤耐性病原体に対する新規治療戦略に関する研究

吉田 一平

原著論文

本学位論文は、以下の原著論文に基づき作成されたものである。

第 I 部

TP0586532, a Novel Non-Hydroxamate LpxC Inhibitor: Potentiating Effect on In Vitro Activity of Meropenem against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae.

Microbiol Spectr. 2022;10:e0082822.

Ippei Yoshida, Ichiro Takata, Kiyoko Fujita, Hajime Takashima, Hiroyuki Sugiyama

第 II 部

Pharmacological Characterization of TP0591816, a Novel Macrocyclic Respiratory Syncytial Virus Fusion Inhibitor with Antiviral Activity against F Protein Mutants.

Antimicrob Agents Chemother. 2020;65:e01407-20.

Ippei Yoshida, Kaho Arikawa, Yusuke Honma, Shoko Inatani, Mitsukane Yoshinaga, Hiroyuki Sugiyama

目次

序論	1
第 I 部 新規 LpxC 阻害化合物 TP0586532 によるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌に 対するメロペネムの抗菌活性増強作用	
1.1 緒言	4
1.2 方法	8
1.3 結果	10
1.4 考察	21
第 II 部 新規 F タンパク質阻害化合物 TP0591816 の F タンパク質変異耐性 RS ウイルスに対する薬理作用	
2.1 緒言	26
2.2 方法	31
2.3 結果	38
2.4 考察	49
小括	54
総括	57
参考文献	58
謝辞	76

略語一覽

ADAM	advanced dissolution, absorption, and metabolism
AMK	Amikacin
AUC _{0-∞}	area under the concentration-time curve from time zero to infinity
<i>B/P</i>	blood-to-plasma ratio
BID	bis in die
CAMHB	cation-adjusted Mueller-Hinton broth
CC ₅₀	50% cytotoxicity concentration
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	colony-forming unit
CIP	Ciprofloxacin
CL	Clearance
CL _{int}	hepatic intrinsic clearance
CL _R	renal clearance
CL _{tot}	total clearance from plasma
C _p	plasma concentration
CPE	cytopathic effect
CRE	carbapenem-resistant Enterobacterales
CSE	carbapenem-susceptible Enterobacterales
CST	Colistin
C _u	unbound concentration
D	distribution coefficient
dpi	days post-infection
DMSO	dimethyl sulfoxide
EC ₅₀	50% effective concentration
EC ₉₅	95% effective concentration
EtBr	ethidium bromide
Fa	fraction absorbed
FBS	fetal bovine serum
<i>f</i> C _{max}	free maximum concentration
FEP	Cefepime
FICI	fractional inhibitory concentrations index

$f_{m,CYP3A4}$	fraction metabolized by CYP3A4
$f_{u,gut}$	fraction unbound in the gut
$f_{u,mic}$	fraction unbound in fraction unbound in human liver microsomes
$f_{u,p}$	fraction unbound in plasma
HIA	heart infusion agar
hpi	hours post-infection
ka	absorption rate constant
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LPS	lipopolysaccharides
MEM	Meropenem
MIC	minimum inhibitory concentration
MOI	multiplicity of infection
paEC ₉₅	plasma-adjusted 95% effective concentration
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
P_{app}	apparent permeability
PBP	penicillin-binding protein
PBPK	physiologically based pharmacokinetic
PBS	phosphate buffered saline
$P_{eff,man}$	effective permeability in humans
PFU	plaque-forming unit
PIP	Piperacillin
RdRp	RNA dependent RNA polymerase
RSV	respiratory syncytial virus
SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
$t_{1/2}$	terminal-phase half-life
TGC	Tigecycline
Vd _{ss}	steady-state volume of distribution
WHO	World Health Organization
WT	wild-type

序論

感染症による死者数は、細菌やウイルスによる下気道感染症を中心に世界で年間約 1,400 万人と推計されている¹⁾。これまでに感染症に対しては、様々な治療薬の開発が継続的に行われてきたが、細菌やウイルスなど病原体の分類によらず薬剤耐性病原体の出現が問題となっている (Figure 1)。細菌感染症については、1929 年にペニシリンが発見されて以来、多様な系統の抗菌薬が登場したにもかかわらず、いずれの系統の抗菌薬に対しても耐性菌の出現が認められており²⁾、感染症の原因となる細菌の 70%以上がいずれかの抗菌薬に耐性を示すことが報告されている³⁾。また、複数の抗菌薬に対して耐性を示す多剤耐性菌では有効な抗菌薬に限られており、いずれの抗菌薬でも有効性を示さない薬剤耐性菌も報告されている⁴⁾。以上の通り、薬剤耐性菌に対する治療について難渋することが多いことを背景として、薬剤耐性菌が関連する感染症による死者数は下気道、血流および腹腔内感染症を中心に約 500 万人と感染症による死者数全体の 1/3 以上を占めており、2050 年には死者数が 1,000 万人に達するとも予測されている⁵⁾。この医療上の課題に対して、特に緊急性が高く脅威となる薬剤耐性菌については、世界保健機関 (WHO)⁶⁾ および米国疾病対策予防センター (CDC)⁷⁾ から新規抗菌薬の必要性が訴えられている。また、近年上市されたセフィデロコルに対してもすでに耐性菌が認められており、新薬に対して次々に出現する薬剤耐性菌の脅威が拡大することが懸念されている。したがって、新薬の開発に加え、既存薬を有効活用することで耐性菌が拡散する前に駆逐することも重要となっている。

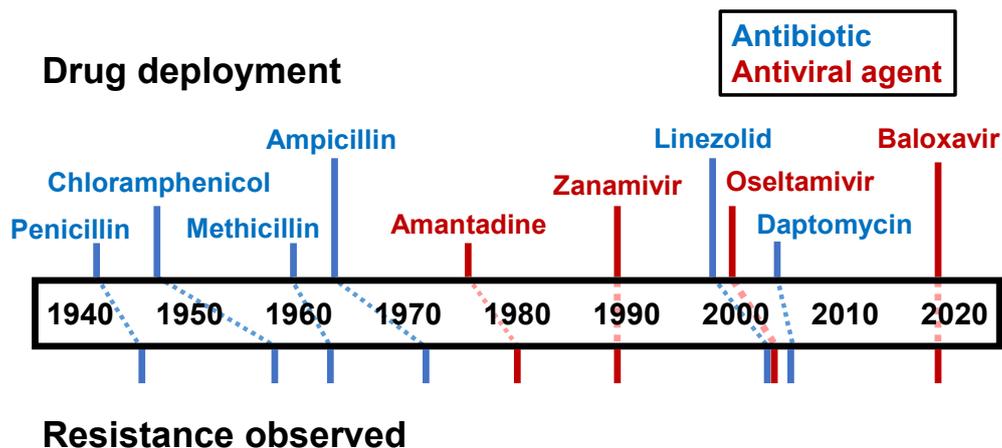


Figure 1 Timeline of antibiotic and antiviral agent deployment and the evolution of resistance ⁸⁻¹³).

ウイルス感染症においても耐性ウイルスの出現が問題となることがある。例えば、インフルエンザウイルス感染症では、2008/2009年のシーズンにおいて、オセルタミビルに対して耐性を示すノイラミニダーゼ H274Y 変異を有するインフルエンザウイルス A/H1N1 の世界的な流行が認められた¹⁴⁾。この耐性ウイルスはオセルタミビルによる治療を受けていない患者からも検出され、その耐性率は南アフリカ、東南アジアおよびオセアニアにおいて1年以内に1%未満から90%を超えるまでに急速に上昇した¹⁴⁾。このため、最も広く使用されていたオセルタミビルが一時的に使用できない状況に陥った。また、2020年にWHOから緊急事態が宣言されてから3年以上に渡り世界中で猛威を振るった新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) についても、治療薬であるニルマトレビル、レムデシビルおよびエンシトレビルに対する耐性ウイルスが臨床で認められている¹⁵⁻¹⁷⁾。抗ウイルス薬は抗菌薬と比べ種類が少ないため、1つ1つの薬剤に対する耐性ウイルスの出現が治療手段の枯渇につながりやすく、致命的となる恐れがある。

本研究は、薬剤耐性を示す細菌感染症およびウイルス感染症に対して有効な新規治療手段を確立し、薬剤耐性病原体が拡散する前に駆逐する治療戦略を立てることを目的として実施した。細菌感染症に対しては世界中で感染拡大が危惧されているカルバペネム耐性腸

内細菌目細菌（CRE）における LpxC 阻害化合物、ウイルス感染症に対しては小児を中心に下気道感染症が問題となる RS ウイルス（RSV）における F タンパク質阻害化合物について、新規治療薬としての可能性について薬理作用を検証した。

第 I 部 新規 LpxC 阻害化合物 TP0586532 によるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌に 対するメロペネムの抗菌活性増強作用

1.1 緒言

β -ラクタム系抗菌薬であるカルバペネム系抗菌薬は抗菌活性に優れており、他系統の抗菌薬と比べて抗菌スペクトラムも広いことから、重症細菌感染症に対する切り札として処方されてきた。CRE は、我が国では 1991 年に初めて分離されたが¹⁸⁾、2014 年から感染症法に基づく 5 類全数把握疾患に指定されている。欧米を中心に腸内細菌目細菌のうち CRE が占める割合が世界的に増加しており¹⁹⁾、CRE は WHO および CDC の薬剤耐性菌リストにおいて最も緊急性が高い薬剤耐性菌に指定されている^{6,7)}。

入院を必要とする CRE 感染症患者数は世界で 270 万～310 万人と推定されており²⁰⁾、CRE 感染症による致死率はカルバペネム感性腸内細菌目細菌(CSE)感染症と比べ高い^{21,22)}。CRE 感染症が重症化しやすい原因として、CRE に対する治療選択肢が限られており適切な治療が施行されていないことが報告されている^{21,22)}。CRE は、カルバペネム分解酵素であるカルバペネマーゼ産生の有無によりカルバペネマーゼ産生 CRE と非産生 CRE に分けられるが、米国などでは KPC 型を中心にカルバペネマーゼ産生 CRE が問題となっている²³⁾。また、カルバペネマーゼ遺伝子はプラスミドに存在することが多いことから接合により異なる菌種にまで水平伝播発現するため拡散しやすく、NDM 型や KPC 型のカルバペネマーゼを産生する CRE では多くの抗菌薬に耐性を示すため²⁴⁾、カチオン性のポリペプチド系抗菌薬であるポリミキシシン（コリスチンおよびポリミキシシン B）が有効性を示す唯一の治療薬となる場合もある²⁵⁾。しかしながら、ポリミキシシンの薬理作用は静電的相互作用により膜破壊を惹起するものであり、哺乳類の細胞膜に対しても同様に作用するため²⁶⁾、ポリミキシシンが投与された患者の 50～60%で血尿や蛋白尿を主症状とする急性腎障害等の腎毒性を誘導することが課題である²⁷⁾。また、CRE 感染症の治療では CSE 感染症と比べてコ

リスチンが使用される頻度が高いことから、CRE のコリスチン耐性率が上昇しているという課題もある²⁸⁾。近年、CRE 感染症に対して有効で腎毒性の懸念が低い抗菌薬として、セフトジジム・アビバクタム、メロペネム・バボルバクタムおよびプラズマイシンが上市された²⁹⁻³¹⁾。しかしながら、これらの抗菌薬に耐性を持つ CRE が臨床ですでに報告されていることから耐性菌の拡大が懸念されており³²⁻³⁴⁾、CRE 感染症に有効な新規治療戦略は喫緊の課題である。

敗血症診療の国際ガイドライン並びに米国感染症学会および米国胸部学会による院内肺炎・人工呼吸器関連肺炎の診療ガイドラインにおいて、敗血症、院内肺炎および人工呼吸器関連肺炎といった重症感染症の治療法としてエンピリックな抗菌薬の併用療法が推奨されている^{35,36)}。これは、治療開始時には起炎菌の特定が困難であり、併用療法により起炎菌をカバーしやすくなるためである。このような背景から、近年、CRE に対する抗菌薬の *in vitro* 併用効果の報告が増加している。注目すべきことに、CRE に対して単独では殺菌活性を示さない濃度の抗菌薬でも、カルバペネム系抗菌薬と併用することで *in vitro* 殺菌作用を示すことが報告されている³⁷⁻⁴⁰⁾。さらに、複数の臨床研究において、致死率の高い CRE による血流感染症の治療に対して併用療法が有用であることも報告されている⁴¹⁻⁴⁵⁾。特に、カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* による血流感染症のコホート研究では、カルバペネム系抗菌薬を含む併用療法を行うことで、致死率が単剤治療と比べ大幅に低下した^{41,42)}。これら先行研究から、カルバペネム系抗菌薬を含む併用療法は CRE 感染症の治療において有用であると考えられている。一方で、メロペネムの最小発育阻止濃度 (MIC) が 8 µg/mL を超える高度耐性の CRE による感染症に対しては、メロペネムを含む併用療法を行った場合でも致死率が高く、有効性の観点で課題となっている⁴¹⁾。

UDP-3-O-アシル-N-アセチルグルコサミンデアセチラーゼ (LpxC) は、グラム陰性菌の外膜構成成分であるリポ多糖 (LPS) の膜アンカー部分である Lipid A の合成を担う酵素である⁴⁶⁾。このため、LpxC の阻害によりグラム陰性菌の外膜構成成分の合成を抑制するこ

とで、菌体膜透過性を亢進させて抗菌作用を発揮することが考えられる。これまでに LpxC を標的とした創薬研究が行われてきたが、その一つであるヒドロキサム酸誘導体である ACHN-975 (Figure 2) はグラム陰性菌感染症を対象として臨床試験が行われたが、ラットにおいて代償性頻脈を伴わない低血圧といった心血管毒性が認められて開発が中止になった⁴⁷⁾。この原因として、ヒドロキサム酸化合物には強力な亜鉛キレート作用があることから、ヒト体内の亜鉛酵素を阻害することで副作用を引き起こした可能性が考えられた⁴⁸⁾。そこで、我々はヒドロキサム酸構造を持たない LpxC 阻害化合物の探索研究を行い、LPS 合成を阻害して CRE である *K. pneumoniae*、*Escherichia coli* および *Enterobacter cloacae* に対して良好な抗菌活性を示す TP0586532 を見出した (Figure 3 および 4)⁴⁹⁾。また、TP0586532 は、モルモットを用いた心血管試験において、血圧、心拍数および心電図のいずれにおいても異常を示さなかったことから、CRE 感染症に対する新規治療薬になりうると考えられた⁵⁰⁾。

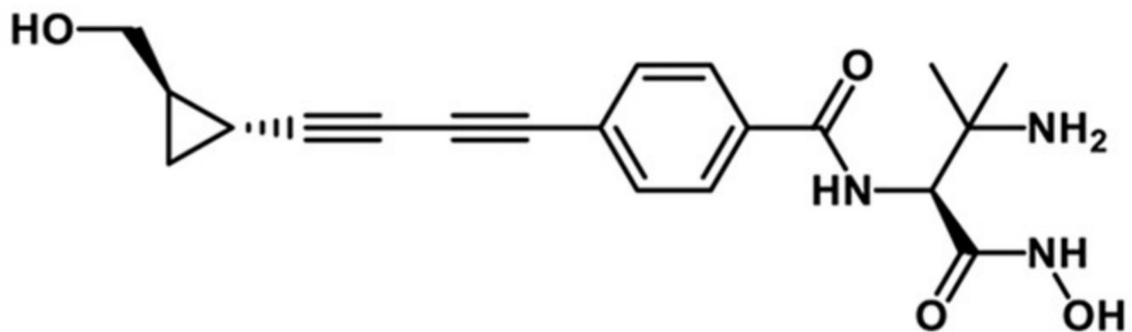


Figure 2 Chemical structure of ACHN-975⁴⁷⁾.

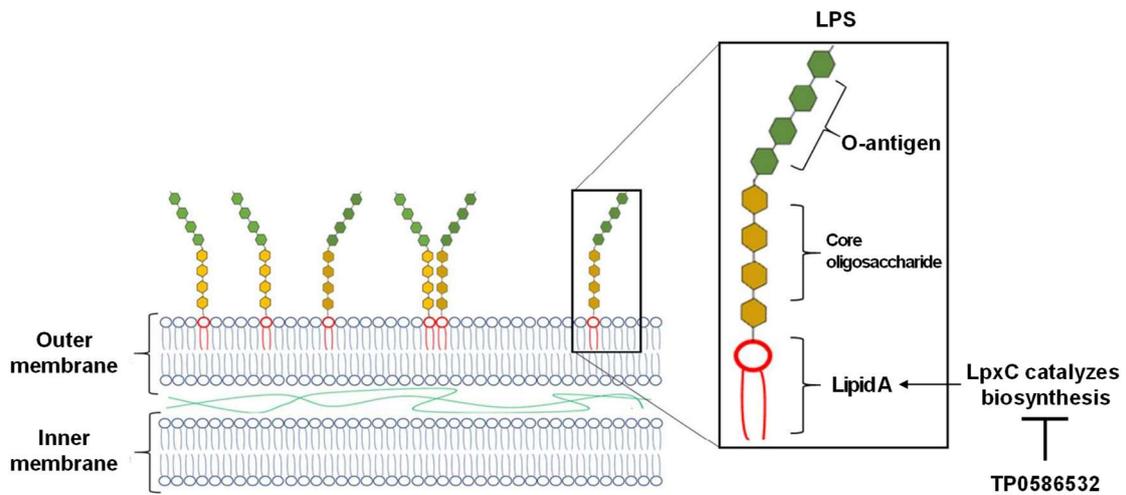


Figure 3 Mechanism of action of TP0586532.

Modified figure with permission from reference ⁵¹).

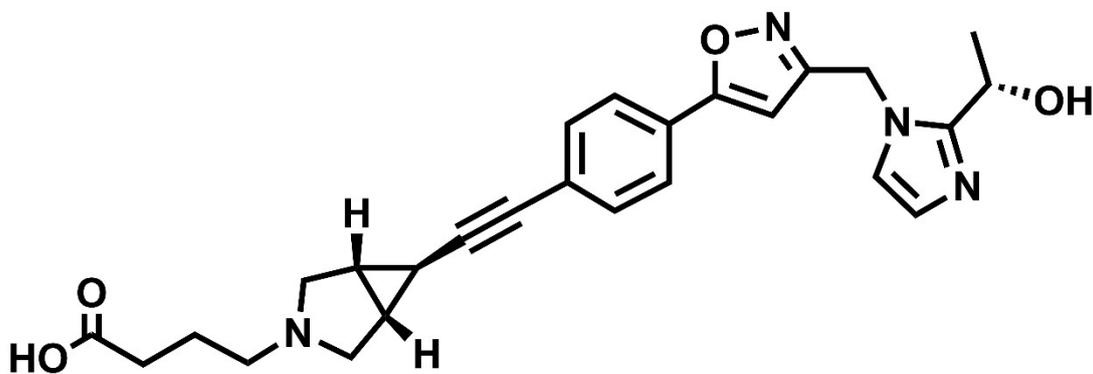


Figure 4 Chemical structure of TP0586532.

本研究では、TP0586532 がグラム陰性菌の外膜を構成する LPS の合成を阻害することにより菌体の外膜透過性を亢進し、併用したカルバペネム系抗菌薬の抗菌活性を増強するという仮説を立て、TP0586532 とメロペネムの併用療法による CRE 感染症に対する新規治療手段の可能性を薬理的に検証した。

1.2 方法

使用菌株、培地、抗菌薬

K. pneumoniae および *E. coli* の各菌株は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) または National Collection of Type Cultures (London, United Kingdom) から購入した。抗菌活性、殺菌作用および膜透過性亢進作用の評価にはカチオン調整ミュラーヒントンブロス (CAMHB) を使用し、生菌数の測定にはハートインヒュージョン寒天培地 (HIA) を使用した。

TP0586532 は大正製薬株式会社 (Saitama, Japan) にて合成された。アミカシン二硫酸塩、コリスチン硫酸塩、ピペラシリン、チゲサイクリン水和物およびアジスロマイシン二水和物は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。セフェピム塩酸塩は、US Pharmacopeia (Rockville, MD) から購入した。メロペネム三水和物は、US Pharmacopeia または富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。シプロフロキサシン塩酸塩一水和物は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。

併用での抗菌活性の評価

Clinical and Laboratory Standards Institute のガイドライン⁵²⁾に従って、微量液体希釈法により各抗菌薬の単独または TP0586532 との併用での MIC を測定した。CAMHB で 0.5 McFarland 相当に懸濁した菌液を 100 倍希釈して接種菌液を調製した。96 ウェルプレートに 2 倍段階希釈した試験物質含有 CAMHB および接種菌液を添加して、35°C で 18 時間培養した。肉眼で観察し、菌の発育が認められない最も低い試験物質濃度を MIC と判定した。以下の数式を用いて MIC から fractional inhibitory concentrations index (FICI) を算出した。

$$\text{FICI} = \text{試験物質 B との併用での試験物質 A の MIC} / \text{単独での試験物質 A の MIC} \\ + \text{試験物質 A との併用での試験物質 B の MIC} / \text{単独での試験物質 B の MIC}$$

既報⁵³⁾を参考に、相互作用の定義を次の通りとした。FICI が ≤ 0.5 の場合は相乗効果、FICI が $>0.5\sim 1$ の場合は相加効果、FICI が $>1\sim 2$ の場合は不関、FICI が >2 の場合は拮抗効果とした。

TP0586532 とメロペネムの併用での殺菌作用の評価

35°Cで2時間振盪培養した菌液に、TP0586532 0.5 または 1 MIC およびメロペネム 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう各試験物質を単独または併用で添加した。35°Cで振盪培養し、試験物質添加後 0、6 および 24 時間に菌液を段階希釈して HIA に塗布した。35°Cで 16~18 時間培養した後、コロニー数を計数して生菌数を算出した (検出下限 1.70 \log_{10} CFU/mL)。既報⁵⁴⁾を参考に、併用時の相互作用の定義を次の通りとした。TP0586532 またはメロペネムのいずれか生菌数をより大きく減少させた試験物質単独と比較して、メロペネムと TP0586532 を併用した際の生菌数が $\geq 2 \log$ 減少した場合には相乗効果、 $1\sim < 2 \log$ 減少した場合には相加効果とした。また、殺菌作用は、生菌数が試験物質添加時から $\geq 3 \log$ 減少した場合と定義した⁵⁴⁾。

膜透過性亢進作用の評価

既報⁵⁵⁾を参考に、エチジウムブロマイド (EtBr) の菌体内取り込みを指標として膜透過性亢進作用を評価した。35°Cで2時間振盪培養した菌液に 0.125、0.25 または 0.5 MIC の TP0586532 またはアジスロマイシンを添加した。35°Cで2時間振盪培養した後、菌液を 10,000 $\times g$ で1分間遠心して集菌した。ペレットをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、PBS またはシアン化カルボニル m-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有 PBS で $1\sim 2 \times 10^8$ CFU/mL となるよう調製した。EtBr を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、蛍光強度 (励起波長: 530 nm/蛍光波長: 600 nm) を 60 分間測定した。

1.3 結果

TP0586532 による併用薬の抗菌活性増強作用

TP0586532 が併用薬の抗菌活性を増強するか否かを明らかにするため、メロペネム（セフェム系）、アミカシン（アミノグリコシド系）、セフェピム（セフェム系）、シプロフロキサシン（ニューキノロン系）、コリスチン（ポリペプチド系）、ピペラシリン（ペニシリン系）およびチゲサイクリン（テトラサイクリン系）といった様々な系統の抗菌薬 (Figure 5) に TP0586532 を併用して、*K. pneumoniae* ATCC 13883 および *E. coli* ATCC 25922 に対する抗菌活性を評価した (Table 1)。*K. pneumoniae* ATCC 13883 に対する各抗菌薬の MIC は、TP0586532 を併用することにより単独時と比べて 1/2~1/8 倍の値であった。さらに、併用効果の指標である FICIs は 0.375~0.625 であり、TP0586532 をいずれの抗菌薬と併用した場合においても相乗効果または相加効果が認められた。特に、TP0586532 とメロペネムを併用した際の FIC index は 0.375 であり、評価した組み合わせの中で最も併用効果が高かった。また、*E. coli* ATCC 25922 に対する各抗菌薬の MIC は、TP0586532 を併用することにより単独時と比べて 1/2~1/32 倍の値であった (Table 2)。さらに、シプロフロキサシンおよびコリスチンを除いた抗菌薬における FICIs は 0.370~0.750 であり、TP0586532 との併用により相乗効果または相加効果が認められた。一方、TP0586532 をシプロフロキサシンまたはコリスチンと併用した場合は、不関であった。以上より、TP0586532 は様々な系統の抗菌薬と併用することにより、*K. pneumoniae* ATCC 13883 および *E. coli* ATCC 25922 に対する抗菌活性を増強することが明らかとなった。

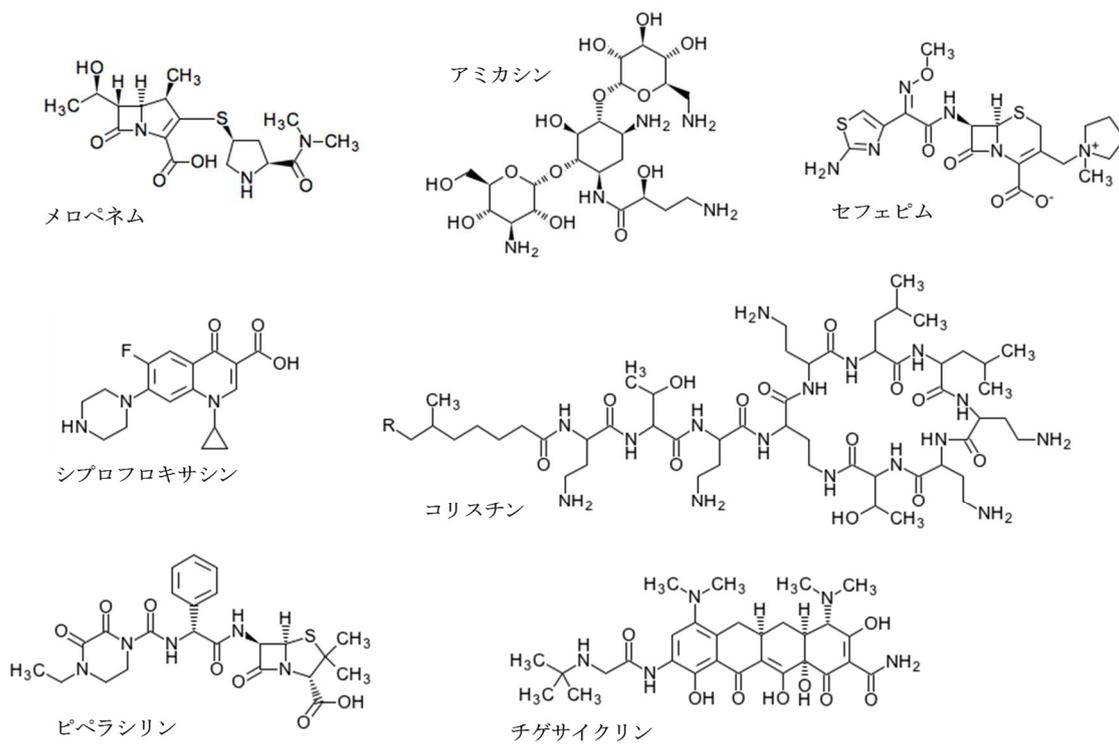


Figure 5 Chemical structures of antibiotics used in combination with TP0586532.

Table 1 FICIs of antibacterial drugs used in combination with TP0586532 against*K. pneumoniae* ATCC 13883^a

Antibiotic	MICs ($\mu\text{g/mL}$)				FICI	Outcome ^b
	Antibiotic		TP0586532			
	Alone	Combination	Alone	Combination		
MEM	0.12	0.03/0.015 ^c	4	0.5/1 ^c	0.375	Synergistic
AMK	1	0.25	4	1	0.500	Synergistic
FEP	0.12	0.06	4	0.5	0.625	Additive
CIP	0.06	0.03	4	0.12	0.530	Additive
CST	2	1	4	0.5	0.625	Additive
PIP	32	8	2	0.5	0.500	Synergistic
TGC	1	0.5	4	0.5	0.625	Additive

^a MEM, meropenem; AMK, amikacin; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; PIP, piperacillin, TGC, tigecycline; MIC, minimum inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index.

^b FICI interpretation: ≤ 0.5 , synergistic; $.0.5$ to ≤ 1 , additive.

^c Two MIC pairs of TP0586532 and MEM had the same FICI.

Table 2 FICIs of antibacterial drugs used in combination with TP0586532 against *E. coli*ATCC 25922^a

Antibiotic	MICs (µg/mL)				FICI	Outcome ^b
	Antibiotic		TP0586532			
	Alone	Combination	Alone	Combination		
MEM	0.03	0.015	1	0.25	0.750	Additive
AMK	4	1	1	0.12	0.370	Synergistic
FEP	0.06	0.03	2	0.12	0.560	Additive
CIP	0.008	0.00025	1	1	1.03	Indifferent
CST	0.5	0.015	1	1	1.03	Indifferent
PIP	4	0.5	1	0.25	0.375	Synergistic
TGC	0.25	0.12	1	0.12	0.600	Additive

^a MEM, meropenem; AMK, amikacin; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; PIP, piperacillin, TGC, tigecycline; MIC, minimum inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index.

^b FICI interpretation: ≤ 0.5 , synergistic; 0.5 to ≤ 1 , additive; 1 to ≤ 2 , indifferent between antibiotic alone or antibiotic + TP0586532 combination.

TP0586532 によるメロペネムの CRE に対する抗菌活性増強作用

カルバペネム系抗菌薬を含む併用療法は、カルバペネム系抗菌薬の MIC が ≤ 8 µg/mL の CRE 感染症に対して有効である一方、高度耐性 CRE (カルバペネム系抗菌薬の MIC が > 8 µg/mL) には有効でないことが報告されている^{41,42}。そこで、TP0586532 が高度耐性 CRE に対するメロペネムの抗菌活性を増強するか否かを明らかにするため、高度耐性カルバペネマーゼ産生 CRE である *K. pneumoniae* 16 株 (*bla*_{KPC+} 12 株、*bla*_{NDM-1+} 2 株および *bla*_{VIM+} 2 株) および *E. coli* 5 株 (*bla*_{KPC+} 1 株、*bla*_{NDM-1+} 3 株および *bla*_{IMP+} 1 株) に対して、TP0586532 とメロペネムの併用での抗菌活性を評価した (Table 3)。その結果、メロペネムの MIC は、0.125~0.5 MIC の濃度で TP0586532 を併用することにより、メロペネム単独時と比較して

1/2～1/512 倍の値であった。さらに TP0586532 とメロペネムの併用により、*K. pneumoniae* 7 株および *E. coli* 5 株に対して相加効果が認められ、*K. pneumoniae* 9 株に対しては相乗効果が認められた。以上より、評価した全ての CRE 菌株に対して TP0586532 とメロペネムの併用による相乗効果または相加効果が認められ、不関または拮抗効果は認められなかった。以上の結果から、TP0586532 は、様々な種類のカルバペネマーゼを産生する CRE に対してメロペネムの抗菌活性を増強することが明らかになった。

Table 3 FICIs of meropenem used in combination with TP0586532 against carbapenem resistantEnterobacteriales^a

Strain	Resistance gene	MICs (µg/mL)				FICI	Outcome ^b
		MEM		TP0586532			
		Alone	Combination	Alone	Combination		
<i>K. pneumoniae</i>							
ATCC BAA-1705	<i>bla_{KPC}</i>	64	32	2	1	1.00	Additive
ATCC BAA-1898	<i>bla_{KPC-2}</i>	64	32	2	0.5	0.750	Additive
ATCC BAA-1899	<i>bla_{KPC-2}</i>	128	0.25	4	2	0.502	Additive
ATCC BAA-1900	<i>bla_{KPC-3}</i>	32	4	4	1	0.375	Synergistic
ATCC BAA-1902	<i>bla_{KPC-3}</i>	64	2	2	1	0.531	Additive
ATCC BAA-1903	<i>bla_{KPC-2}</i>	32	8	4	1	0.500	Synergistic
ATCC BAA-1904	<i>bla_{KPC-3}</i>	16	0.25	2	1	0.516	Additive
ATCC BAA-1905	<i>bla_{KPC-2}</i>	32	8	2	0.5	0.500	Synergistic
ATCC BAA-2078	<i>bla_{KPC}</i>	32	8	2	0.5	0.500	Synergistic
ATCC BAA-2342	<i>bla_{KPC}</i>	32	8	2	0.5	0.500	Synergistic
ATCC BAA-2343	<i>bla_{KPC}</i>	32	8	1	0.25	0.500	Synergistic
ATCC BAA-2344	<i>bla_{KPC}</i>	64	32/16 ^c	2	0.5/1 ^c	0.750	Additive
ATCC BAA-2470	<i>bla_{NDM-1}</i>	64	16	2	0.5	0.500	Synergistic
ATCC BAA-2578	<i>bla_{NDM-1}</i>	64	16	2	0.5	0.500	Synergistic
NCTC 13439	<i>bla_{VIM-1}</i>	32	1	4	2	0.531	Additive
NCTC 13440	<i>bla_{VIM-1}</i>	64	16/8 ^c	2	0.25/0.5 ^c	0.375	Synergistic
<i>E. coli</i>							
ATCC BAA-2340	<i>bla_{KPC}</i>	16	8	2	1	1.00	Additive
ATCC BAA-2452	<i>bla_{NDM-1}</i>	64	0.5	1	0.5	0.508	Additive
ATCC BAA-2469	<i>bla_{NDM-1}</i>	64	2	2	1	0.531	Additive
ATCC BAA-2471	<i>bla_{NDM-1}</i>	128	64	1	0.5	1.00	Additive
NCTC 13476	<i>bla_{IMP}</i>	16	8	1	0.5	1.00	Additive

^a MEM, meropenem; MIC, minimum inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index.

^b FICI interpretation: ≤0.5, synergistic; .0.5 to ≤1, additive.

^cTwo pairs of MICs against *K. pneumoniae* ATCC BAA-2344 and *K. pneumoniae* NCTC 13440 had the same FICI, respectively.

TP0586532 による CRE に対するメロペネムの殺菌作用の増強効果

TP0586532 が CRE に対するメロペネムの殺菌作用を増強するか否かについて明らかにするため、高度耐性カルバペネマーゼ産生 CRE である *K. pneumoniae* 9 株 (bla_{KPC+} 5 株、 bla_{NDM-1+} 2 株および bla_{VIM+} 2 株) および *E. coli* 3 株 (bla_{KPC+} 1 株および bla_{NDM-1+} 2 株) に対して TP0586532 とメロペネムの併用での殺菌作用を検討した (Figure 6)。メロペネムは臨床において血中濃度を参考にして 8 $\mu\text{g/mL}$ 、TP0586532 は 0.5 および 1 MIC の濃度で実施した。メロペネムは *K. pneumoniae* ATCC BAA-1902 に対して、単独では生菌数を減少させなかった一方で、TP0586532 (0.5 MIC) との併用により 6 時間後に生菌数を 3 log 以上減少させる殺菌作用を示した (Figure 6A)。さらに、メロペネムに TP0586532 を 1 MIC の濃度で併用することで、24 時間後に生菌数が検出下限以下まで減少した。また、*E. coli* ATCC BAA-2469 に対して、メロペネム単独では 6 時間後まで一時的な静菌効果を示したものの、24 時間後には再増殖が認められた (Figure 6B)。これに対して、メロペネムに TP0586532 を 1 MIC の濃度で併用した場合には 24 時間後まで再増殖は認められず、検出下限まで生菌数が減少した。メロペネムに TP0586532 を併用した際の 12 菌株の CRE に対する殺菌作用の評価結果は、Table 4 に示した通りに 10 株に対して相乗効果、1 株に対して相加効果が認められた。さらに、メロペネムと TP0586532 との併用により 9 株に対して殺菌作用が認められた。以上より、TP0586532 は様々な種類のカルバペネマーゼを産生する CRE に対するメロペネムの殺菌作用を増強することが明らかとなった。

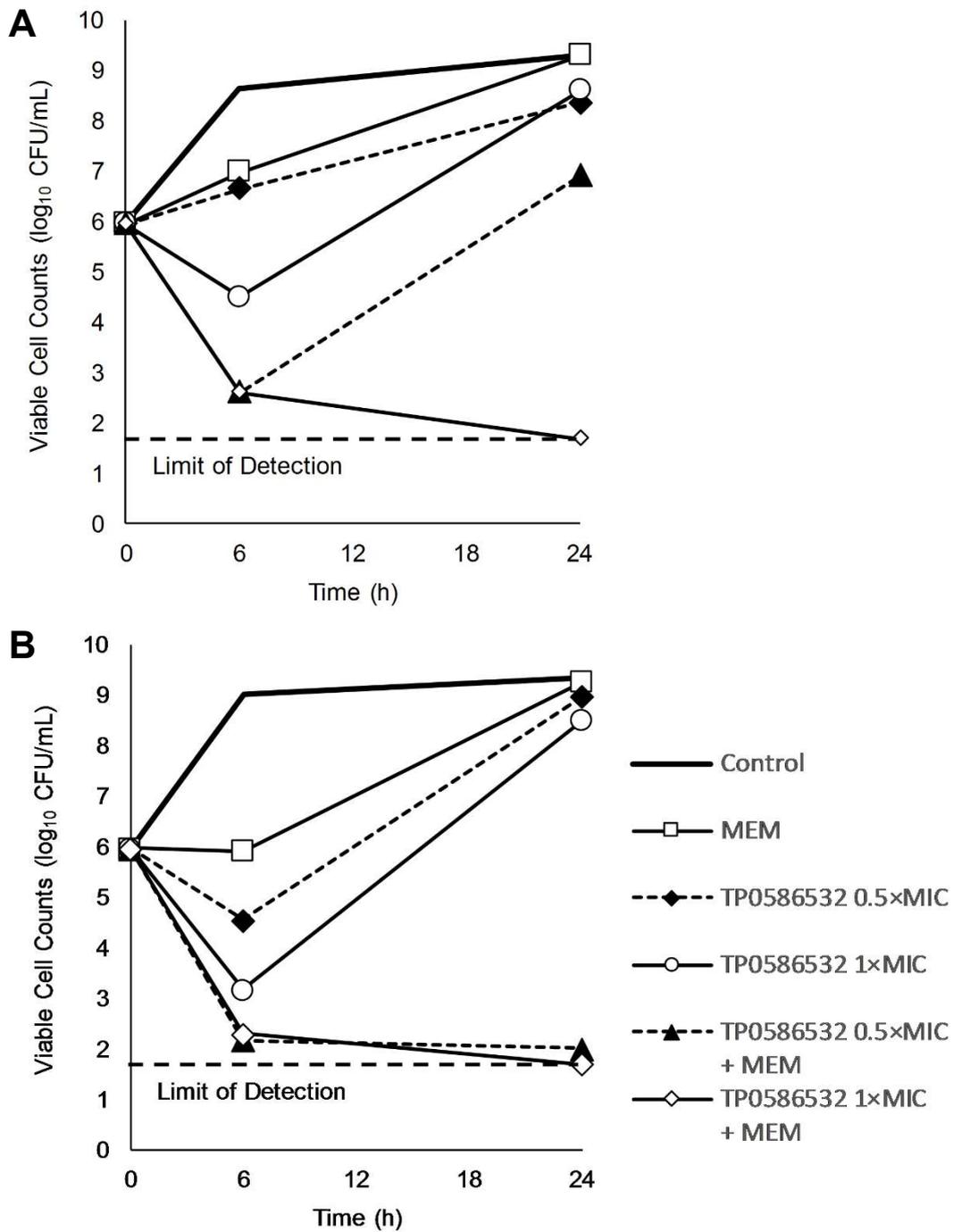


Figure 6 Time-kill curves of meropenem used in combination with TP0586532 against carbapenem resistant *K. pneumoniae* ATCC BAA-1902 (A) and *E. coli* ATCC BAA-2469 (B). The bacteria were treated with meropenem (MEM, 8 mg/mL) alone or in combination with TP0586532 at 0.5 or 1 minimum inhibitory concentration (MIC).

Table 4 Change in viable cell counts of carbapenem-resistant Enterobacterales treatedwith meropenem in combination with TP0586532^a

Strain	MEM MIC (µg/mL)	Time (h)	Change compared to initial inoculum (log ₁₀ CFU/mL) ^b				
			Alone			Combination	
			MEM	TP 0.5	TP 1	MEM +TP 0.5	MEM +TP 1
<i>K. pneumoniae</i>							
ATCC BAA-1900	32	6	-0.01	-0.36	-1.61	-2.46	-2.38
		24	3.61	3.46	3.50	-0.07	-0.27
ATCC BAA-1902	64	6	1.02	0.69	-1.45	-3.35	-3.35
		24	3.32	2.40	2.63	0.95	-4.26
ATCC BAA-1904	16	6	-1.81	0.71	-1.11	-3.62	-0.38
		24	3.53	3.21	3.31	-3.74	-0.49
ATCC BAA-2078	32	6	-0.73	0.63	-1.55	-3.21	-3.21
		24	3.32	3.32	3.28	1.71	-0.57
ATCC BAA-2343	32	6	-0.18	1.97	0.93	-0.86	-3.72
		24	3.02	2.79	2.79	2.50	2.66
ATCC BAA-2470	64	6	-1.58	1.66	0.38	-1.53	-0.91
		24	3.03	3.16	2.70	1.84	-1.70
ATCC BAA-2578	64	6	-1.39	0.90	0.21	-3.50	-3.20
		24	3.17	3.20	3.10	-0.86	-1.53
NCTC 13439	32	6	-1.33	-1.20	-1.37	-3.68	-1.92
		24	3.24	3.12	3.14	<-4.28	-1.02
NCTC 13440	64	6	-2.38	1.73	-0.16	-1.64	-4.28
		24	3.12	2.98	2.72	1.23	-4.28
<i>E. coli</i>							
ATCC BAA-2340	16	6	-1.96	0.00	-2.30	-2.10	-1.75
		24	-3.27	2.26	2.39	-3.75	-2.22
ATCC BAA-2452	64	6	-0.32	0.51	-1.18	-1.73	-2.99
		24	3.49	3.09	2.72	3.13	2.83
ATCC BAA-2469	64	6	-0.07	-1.43	-2.79	-3.79	-3.67
		24	3.29	2.98	2.51	-3.97	-4.27

^a MEM, meropenem (8 mg/mL); MIC, minimum inhibitory concentration; TP 0.5, TP0586532 at 0.5 MIC; TP 1, TP0586532 at 1 MIC.

^b The dark gray and light gray boxes indicate synergistic (≥ 2 log₁₀ reduction) and additive (1 to < 2 log₁₀ reduction) effects when used in combination, compared with the effect of the most active single agent, respectively. Bold type indicates a bactericidal effect (≥ 3 log₁₀ reduction compared with the initial inoculum).

TP0586532 による膜透過性亢進作用

TP0586532 は LPS 合成酵素である LpxC を阻害するため、菌体膜透過性を亢進して併用した抗菌薬の抗菌活性を増強することが考えられた。この仮説を検証するため、カルバペネム耐性 *K. pneumoniae* NCTC 13440 を用いて TP0586532 による EtBr の菌体内取り込み作用を評価した (Figure 7)。陽性対照として、菌体膜透過性を亢進させるイオノフォアである CCCP を用いた⁵⁶⁾。また、陰性対照としては、タンパク合成阻害薬であり菌体膜透過性に影響を及ぼさないアジスロマイシンを用いた。EtBr の菌体内取り込みについて蛍光強度を指標として評価した結果、CCCP を作用させた場合にはコントロールと比べて EtBr の菌体内取り込みの上昇が認められた一方、アジスロマイシンでは認められなかった (Figure 7A および B)。これに対して、TP0586532 を作用させた場合には濃度依存的な EtBr の菌体内取り込みの上昇が認められたことから、TP0586532 は CCCP と同様に EtBr の菌体内取り込みを促進させたと考えられた (Figure 7A)。以上より、TP0586532 は、CRE の膜透過性を亢進することにより、併用した抗菌薬の菌体内取り込みを促進させることが示唆された。

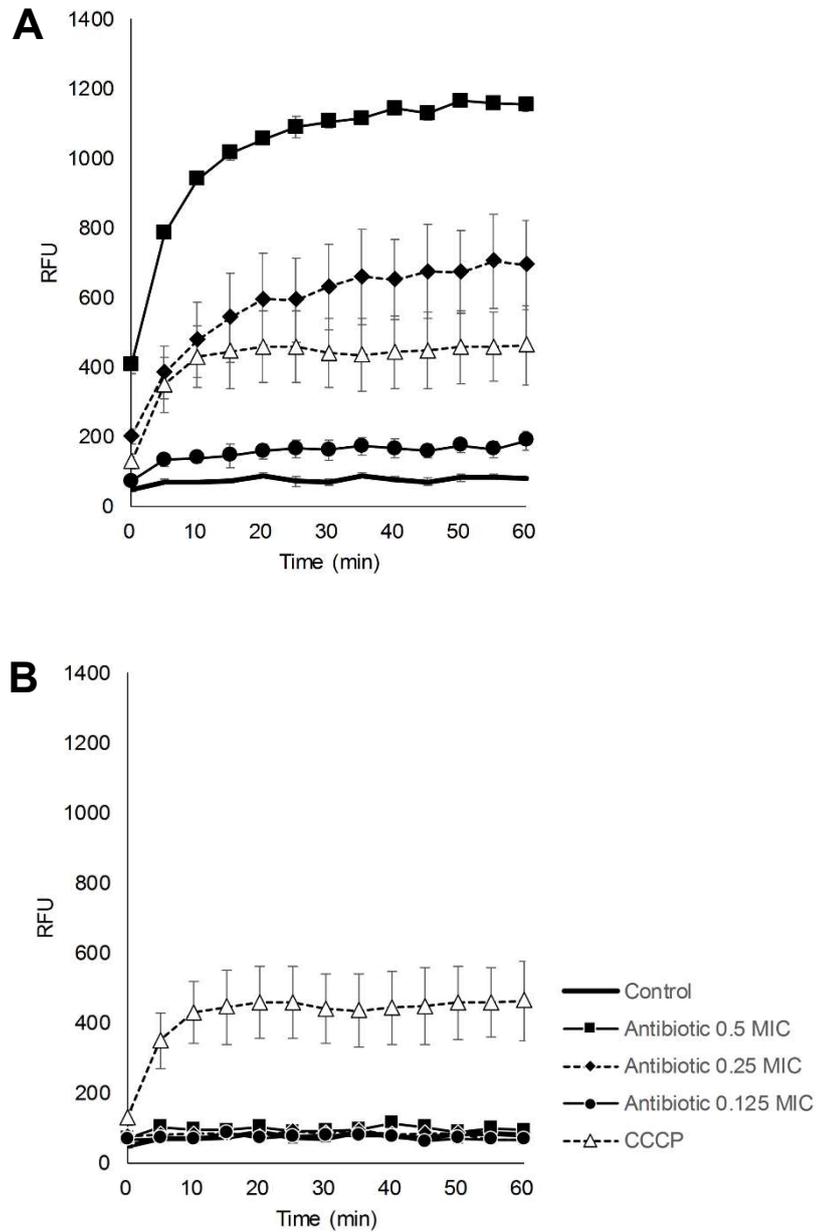


Figure 7 Membrane permeability of *K. pneumoniae* NCTC 13440 treated with TP0586532 (A) or azithromycin (B). The bacteria were treated with TP0586532 or azithromycin at 0.125, 0.25, or 0.5 MIC for 2 h, and then prepared at 1 to 2×10^8 CFU/mL in phosphate-buffered saline (PBS). The sample of carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) was prepared in PBS containing $20 \mu\text{g/mL}$ of CCCP without antibiotic treatment. Data are represented as the means \pm standard error of the mean (SEM) of three independent experiments.

1.4 考察

CRE 感染症に対して、メロペネムを含む併用療法の治療効果についての臨床研究が行われている⁴¹⁻⁴⁵⁾。これら研究のうち、Daikos ら⁴¹⁾ および Tumbarello らの報告では⁴²⁾、カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* による感染症に対してカルバペネム系抗菌薬を含む併用療法の有用性が示された。しかしながら、カルバペネム系抗菌薬の MIC が 8 µg/mL を超える高度耐性株の場合では、高用量/長時間注入 (2 g/3 h) レジメンでも血中濃度が MIC を超える時間が不十分のため有用性が認められない⁵⁷⁾。一方、本研究では TP0586532 をメロペネムと併用することで、評価した全ての高度耐性 CRE に対する抗菌活性において相乗効果または相加効果が認められた (Table 3)。さらに、メロペネムの高用量/長時間注入 (2 g/3 h) レジメンで達成可能な血中濃度 8 µg/mL⁵⁸⁾ に TP0586532 を併用することで、多くの高度耐性 CRE に対する殺菌作用についても相乗効果または相加効果を示した (Table 4)。また、メロペネムに TP0586532 を 1 MIC の濃度で併用することで、メロペネムの MIC が 64 µg/mL である高度耐性菌株 (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1902、*K. pneumoniae* ATCC NCTC 13440 および *E. coli* ATCC BAA-2469) に対しても、24 時間後まで殺菌作用が認められた。TP0586532 とメロペネムを併用した際に再増殖が認められた菌株も存在したが、それらの 24 時間後の生菌数はメロペネム単独時と比べ少なかったことから、何れの菌株に対してもメロペネム単独と比較してメロペネムと TP0586532 の併用効果は有用であると考えられた。また、TP0586532 は濃度依存的に CRE に対するメロペネムの殺菌活性を増強したことから、高濃度の TP0586532 をメロペネムに併用することにより生菌数を速やかに減少させることができ、新たな耐性菌の出現の抑制につながる事が考えられる。

これまでに報告された抗菌薬の *in vitro* 併用効果の中には、臨床における治療効果を反映できていないものがあつたが、臨床では達成できない高濃度で検討が行われていることが原因として考えられる⁵⁹⁾。実際に、臨床における血中薬物濃度で併用効果が検討された研究では、臨床での治療成績と相関があることが示されている⁶⁰⁾。TP0586532 を推定臨床用

量で投与した際の TP0586532 の最高血漿中遊離型薬物濃度 (fC_{max}) は 13.1 $\mu\text{g/mL}$ と算出されている⁶¹⁾。この濃度は、本研究においてメロペネムと併用した際に殺菌作用が認められた TP0586532 の濃度と比べ 3 倍以上高いことから、TP0586532 は臨床においてもメロペネムに併用することで速やかな殺菌作用を発揮することが期待できる。

メロペネムは、グラム陰性菌の外膜に存在するポーリンを介して菌体内に取り込まれることで、標的分子であるペニシリン結合タンパク質 (PBP) に結合して抗菌活性を発揮する。しかしながら、カルバペネマーゼ産生 CRE では、菌体内に取り込まれたメロペネムがカルバペネマーゼにより分解されるため、十分な濃度のメロペネムが PBP に作用することができず抗菌活性が消失すると考えられる。したがって、メロペネムが抗菌活性を発揮するためには、菌体内のメロペネム濃度がカルバペネマーゼによる分解を上回る必要がある。LPS の発現阻害により、*Acinetobacter baumannii* の膜透過性が増加し、抗菌薬に対する感受性が亢進することが報告されている⁵⁵⁾。EtBr は膜透過性の亢進により菌体内への取り込みが促進されることから⁵⁵⁾、その菌体内への取り込みを指標として TP0586532 の膜透過性亢進作用を評価した。その結果、TP0586532 は、LPS 量を 1/10 以下に減少させる 0.25 MIC 以上の濃度で⁴⁹⁾、EtBr の CRE 菌体内への取り込みを促進することが示された (Figure 7)。また、TP0586532 は同じ 0.25 MIC 以上の濃度で併用したメロペネムの抗菌活性増強作用を示した (Table 3)。したがって、TP0586532 は、LPS 合成阻害により菌体膜透過性を亢進させることで、菌体内に取り込まれるメロペネムを増加させてその抗菌活性を増強させたと考えられる。

CRE のカルバペネム耐性機序として、カルバペネマーゼによる分解作用の他に、ポーリンの活性低下や排出ポンプによる抗菌薬の菌体外排出による菌体内濃度の低下も関与することが知られている⁶²⁾。TP0586532 とメロペネムを併用した結果、*K. pneumoniae* に対しては相乗効果または相加効果が認められた一方、*E. coli* に対しては相加効果のみが認められており効果が弱かった。カルバペネマーゼ産生 CRE の性状を解析した報告⁶³⁾において、

K. pneumoniae はポーリンが消失している一方、*E. coli* は排出ポンプの耐性への寄与が大きいことが示されている。このことから、*K. pneumoniae* では TP0586532 の併用によりメロペネムの菌体内濃度が上昇しやすく抗菌活性が増強された一方、*E. coli* では TP0586532 を併用しても排出ポンプの影響でメロペネムの菌体内濃度が比較的上昇しにくかった可能性が考えられた。また、TP0586532 による抗菌活性増強作用の強さは菌株間で異なっていた。この原因についても、菌株によってポーリンや排出ポンプの有無や発現量が異なり、TP0586532 を併用した際のメロペネムの菌体内濃度の上昇の程度が異なっていた可能性が考えられた。TP0586532 によるメロペネムの抗菌活性増強作用の詳細な機序を解明するためには、今後、使用菌株のポーリンおよび排出ポンプの発現解析や、メロペネムの菌体内濃度の LC/MS による測定⁶⁴⁾ が有用であると考えられる。

TP0586532 は *K. pneumoniae* および *E. coli* 感性株に対して、メロペネム以外の抗菌薬と併用した場合においても相乗効果または相加効果を示した (Table 1、2)。これは、併用したアミカシン、セフェピム、シプロフロキサシン、ピペラシリンおよびチゲサイクリンの標的分子はいずれも菌体内で作用するため、メロペネムと同様に TP0586532 により菌体膜透過性が亢進した結果、各々の抗菌薬の標的分子に作用する濃度が上昇したためであると考えられた。併用した抗菌薬によって併用効果が異なった原因としては、併用薬の分子量や物性の違いにより TP0586532 を併用した際の菌体内への取り込まれやすさが異なる可能性が考えられた。一方、コリスチンと TP0586532 の併用は不関または相加効果を示し、その併用効果は評価した全ての抗菌薬の中で最も弱かった。この原因として、コリスチンは LPS に結合することで抗菌活性を生み出すのに対し⁶⁵⁾、TP0586532 は LPS レベルを低下させるため⁴⁹⁾、TP0586532 はコリスチンの抗菌活性に及ぼす影響が小さいことが考えられた。

本研究は *in vitro* での TP0586532 の抗菌活性増強作用の検討にとどまっているが、我々はこれまでに、TP0586532 が *K. pneumoniae* 肺感染マウスにおいて肺内 LPS 量および肺内生菌数を減少させることを明らかとしている^{61,66)}。このことから、TP0586532 は、*in vivo*

においても *in vitro* と同様に LPS 合成阻害による菌体膜透過性を亢進して併用したメロペネムの菌体内取り込みを促進することが期待できる。さらに、我々は、*K. pneumoniae* 肺感染マウスにおいて、メロペネムの作用により菌体外に放出された LPS による IL-6 誘導を TP0586532 が抑制することを明らかとしている⁶⁶⁾。したがって、TP0586532 はメロペネムの抗菌活性を増強するのみならず、メロペネムによって誘発される炎症を軽減することも期待できる。

β -ラクタマーゼはアミノ酸配列に基づく Ambler の分類によりクラス A~D に分類されるが、そのうちカルバペネマーゼはクラス A、B および D に分類される⁶⁷⁾。アピバクタム、バボルバクタムおよびレレバクタムなどの β -ラクタマーゼ阻害薬は β -ラクタム系抗菌薬との合剤として上市されているが、全てのクラスのカルバペネマーゼを阻害する β -ラクタマーゼ阻害薬は見出されていない。また、特に活性中心に亜鉛を有するメタロ β -ラクタマーゼであるクラス B のカルバペネマーゼを産生する CRE は多剤耐性の傾向があり、プラゾマイシンやエラバサイクリンといった比較的新しい抗菌薬に対しても耐性を示す。TP0586532 は、クラス A の KPC 型またはクラス B の NDM、VIM または IMP 型のカルバペネマーゼを産生する CRE に対するメロペネムの抗菌活性を増強した (Table 3)。メロペネムは、単独で CRE に作用させた場合、カルバペネマーゼによる分解を受けるため抗菌活性を示すことができない (Figure 8A)。一方、TP0586532 を併用した場合、膜透過性の亢進により菌体内へのメロペネムの取り込みが促進されるため、菌体内のメロペネム濃度がカルバペネマーゼによる分解を上回り抗菌活性を示したことが示唆された (Figure 8B)。したがって、TP0586532 はカルバペネマーゼの産生の有無や産生するカルバペネマーゼの種類によらずメロペネムの抗菌活性を増強すると考えられた。しかしながら、本研究ではクラス A および B のカルバペネマーゼ産生 CRE のみを使用したため、クラス D のカルバペネマーゼ産生 CRE およびカルバペネマーゼ非産生 CRE に対しても TP0586532 が同様の抗菌活性増強作用を示すかについては今後の検討課題である。

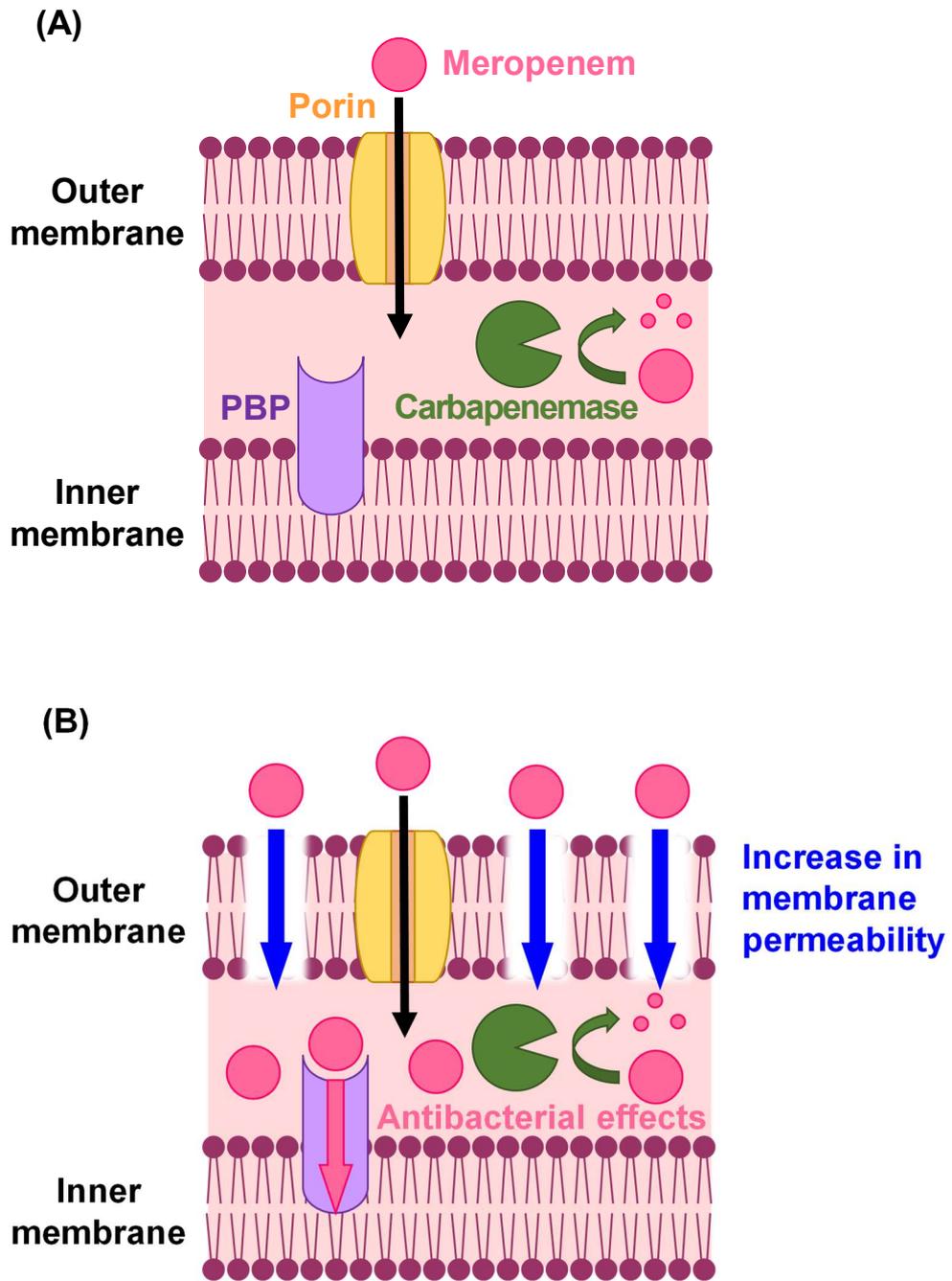


Figure 8 Mechanism of action of the potentiating effects of TP0586532.

Meropenem alone (A) cannot show antibacterial activity against CRE, but when combined with TP0586532 (B), it can show antibacterial activity.

第 II 部 新規 F タンパク質阻害化合物 TP0591816 の F タンパク質変異耐性

RS ウイルスに対する薬理作用

2.1 緒言

RSV は年齢を問わず呼吸器感染を引き起こすが、乳幼児への感染時には細気管支炎および肺炎に重症化して入院や呼吸管理が必要となる場合がある⁶⁸⁾。世界で年間 3,380 万人の 5 歳未満の子供が RSV による急性下気道感染症に苦しんでおり、そのうち 340 万人以上が入院を必要とし 66,000~199,000 人が死亡していると推計されている⁶⁹⁾。RSV の乳幼児に対する死亡リスクはインフルエンザウイルス感染症よりも高く⁷⁰⁾、早産児や心肺系の基礎疾患または免疫不全がある場合には、重症化リスクが上昇することが報告されている⁷¹⁾。成人についても、乳幼児と同様に心肺系の基礎疾患や免疫不全が RSV 感染症の重症化のリスク因子となるが⁷²⁾、特に 65 歳以上の高齢者の致死率は人口 10 万人当たり 46.8 人と、インフルエンザウイルス感染症と同程度に高い⁷⁰⁾。また、ウイルスが排泄される期間は通常 7~10 日間であるが重症度によっては 30 日間ウイルス感染が持続する場合もあり⁷³⁾、接触感染と飛沫感染により家庭内や保育施設において感染が広がりやすく問題となる^{74,75)}。感染対策については、RSV 感染症のワクチンとして、妊婦への能動免疫による新生児および乳児向けのものや高齢者向けのが 2023 年に承認された。また、予防抗体については、高リスク患者の感染予防に使われてきた RSV の F タンパク質 (fusion protein) に対するモノクローナル抗体パルビズマブに加え^{76,77)}、長期間の予防効果が期待できるニルセビマブも承認された。RSV 感染症による症状を緩和する治療薬として、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) を阻害するグアノシン誘導体であるリバビリンが承認されているが、抗ウイルス活性が弱いことから臨床における有用性については依然として課題が残されている⁷⁸⁾。また、リバビリンは毒性濃度と有効濃度の乖離が小さく⁷⁹⁾、催奇形性および遺伝毒性も報告されていることから⁸⁰⁾、安全性についても懸念されている。したがって、予防

抗体やワクチンによる RSV の感染予防対策は進んでいる一方で、RSV 感染症に対する有用な治療薬は依然として医療ニーズが満たされておらず、安全で有効性の高い新規治療薬が必要とされている。

RSV は、ニューモウイルス科オルソニューモウイルス属に属するマイナス一本鎖 RNA ウイルスであり、宿主細胞由来の脂質二重膜（エンベロープ）を有している。ウイルス粒子の表面に発現する G タンパク質（attachment glycoprotein）の血清型により、大きく A 型と B 型に分類される。RSV のライフサイクルは、G タンパク質による気道上皮細胞への吸着から始まり、次に F タンパク質を介したウイルスエンベロープと宿主細胞膜との融合による細胞内への侵入が起こる（Figure 9）⁸¹⁾。その後、リボヌクレオプロテイン複合体が感染細胞の細胞質に放出され、RdRp によりウイルスの mRNA 転写とゲノム複製が行われる。最終的に、形成された子孫ウイルスが感染細胞から放出され、新たな細胞に感染することで感染を拡大する⁸²⁾。さらに、RSV は F タンパク質を介して感染細胞と隣接する細胞との膜融合によっても感染を広げ、これにより特徴的な合胞体を形成する⁸³⁾。このように、F タンパク質は RSV の感染拡大において重要な役割を担っている一方で、同じくウイルス侵入時に機能する G タンパク質と比べて宿主の免疫応答により生じる変異の頻度が低いことが知られている⁸⁴⁾。このような背景から、F タンパク質の機能阻害が RSV 感染症の拡大抑制につながると考えられ、新規 F タンパク質阻害化合物の研究が多く行われてきた。

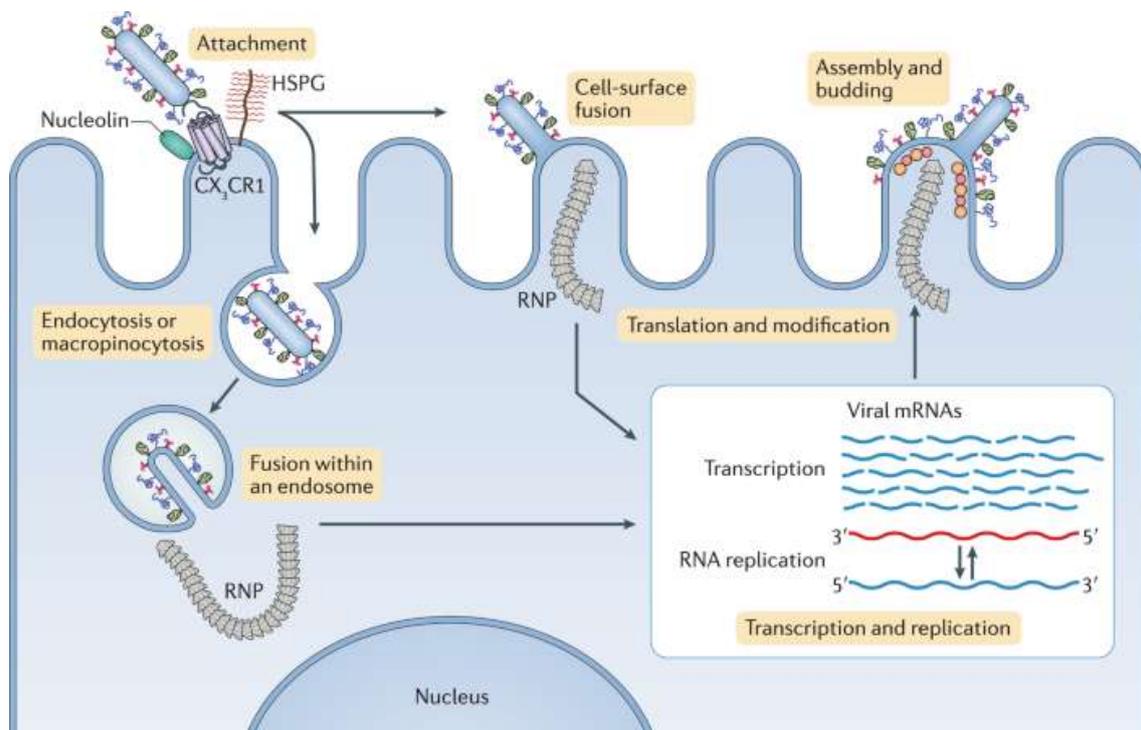


Figure 9 The life cycle of respiratory syncytial virus.

Reprinted figure with permission from reference ⁸²).

F タンパク質阻害化合物として、2000 年代から BMS-433771 や VP-14637 などの開発が行われてきた ^{85,86}。近年、presatovir (GS-5806)、rilematovir (JNJ-53718678) および sisunatovir (RV521) が健康成人を対象とした RSV チャレンジ試験で臨床症状スコアの改善およびウイルス量の減少を示すなど、臨床試験においても有効性を示す化合物が見出されている ⁸⁷⁻⁸⁹。特に、最も開発が進んでいる ziresovir (AK0529) は、RSV 感染症の小児患者を対象とした phase 3 臨床試験においてプラセボ対照群に対して有意な症状の軽減およびウイルス量の減少を示しており、海外で新薬承認申請が行われた ⁹⁰。このように、F タンパク質阻害化合物は RSV 感染症治療薬として期待されている一方、F タンパク質のアミノ酸点変異により耐性化が生じることが課題である。F タンパク質阻害化合物に対する耐性株は fusion peptide および heptad repeat A 領域に変異を有する例も報告されているが、多くの場

合は cysteine-rich 領域の 392~401 番目のアミノ酸または heptad repeat B 領域の 486~489 番目のアミノ酸に変異を認める⁹¹⁾。Ziresovir 耐性株として、ziresovir 存在下での感染細胞の継代培養実験において heptad repeat B 領域に D486N、D489A、D489V または D489Y 変異株の出現が認められている⁹²⁾。さらに、RSV 感染症が原因で入院した小児を対象とした ziresovir の Phase 2 臨床試験では、cysteine-rich 領域の T400I 変異株が出現したとの報告もある⁹³⁾。このため、ziresovir が上市された後に様々な耐性変異株が拡散する可能性が考えられ、その場合には RSV 感染症に対する治療薬を失うことになる。したがって、これらの耐性変異株が拡散する前に RSV 感染症を駆逐するための対策が必要であると考えられる。

ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン化合物である presatovir は、初めて RSV ヒトチャレンジ試験において有効性を示した F タンパク質阻害化合物である⁹⁴⁾。我々は、このピラゾロ[1,5-a]ピリミジン化合物をマクロサイクル化して活性コンフォメーションを固定化することで、F タンパク質の D486N 変異株に対しても抗ウイルス活性を示す化合物を見出した⁹⁵⁾。さらに、このマクロサイクル化合物のリンカー部位および側鎖の置換基を最適化することで、RSV 野生株および D486N 変異株に対する抗ウイルス活性を向上させた新規環状化合物 TP0591816 を創出した (Figure 10)。

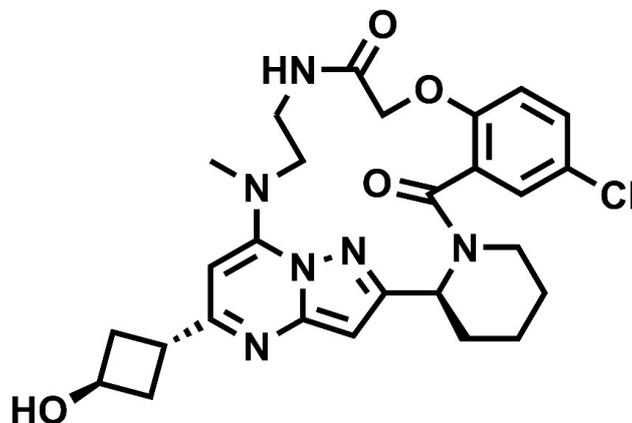


Figure 10 Chemical structure of TP0591816.

本研究では、TP0591816 の RSV に対する薬理的評価を行うことにより、TP0591816 の RSV 治療薬としての有効性について検証した。まず、ziresovir などの F タンパク質阻害化合物に耐性を示す F タンパク質変異株に対する抗ウイルス活性を評価することで、TP0591816 の耐性変異株に対する有効性を明らかとした。また、感染細胞における阻害過程を検討することで TP0591816 の作用機序を解析し、TP0591816 耐性変異株の遺伝子解析により F タンパク質が標的であることを検証した。さらに、RSV 感染マウスに対する *in vivo* 薬効を評価し、耐性 RSV 感染症に対する TP0591816 の臨床有効用量を算出することで臨床における有用性を予測した。

2.2 方法

試験物質

TP0591816 は大正製薬株式会社 (Saitama, Japan) にて合成された。BMS-433771、VP-14637、リバビリンおよびシナジス (パリビズマブ) は、それぞれ Sigma-Aldrich、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) およびアッヴィ合同会社 (Tokyo, Japan) から購入した。

使用細胞および使用ウイルス株

RSV の細胞感染実験での使用されている HEp-2 細胞⁹⁶⁾ を DS ファーマバイオメディカル株式会社 (Osaka, Japan) から購入し、10%ウシ胎児血清 (FBS)、50 µg/mL ゲンタマイシンおよび 600 µg/mL L-グルタミンを添加した minimum essential medium で培養した。RSV A2 (ATCC VR-1540, subgroup A) および RSV 18537 (ATCC VR-1580, subgroup B) は、American Type Culture Collection から購入した。RSV A2 の F タンパク質 T400I、D486N または F488L 変異株は、既報⁹⁷⁾ の通り、ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン誘導体 9c または 14e の存在下での RSV A2 の培養により取得した。

抗ウイルス活性および細胞毒性の評価

HEp-2 細胞を 1×10^4 cells/ウェルで 96 ウェルプレートに播種して一晩培養した。2% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンおよび 300 µg/mL L-グルタミンを添加した最小必須培地 (維持培地) で各試験物質溶液を調製した。細胞を PBS で洗浄して、試験物質を添加した。RSV A2 を感染多重度 (MOI) 0.5 または他のウイルス株を MOI 0.75 でそれぞれ接種した。5%CO₂ 存在下、37°C で 4 日間培養した後、細胞増殖キット II (Sigma-Aldrich) を使用して、2,3-ビス-(2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム-5-カルボキサニリド塩 (XTT) アッセイにより細胞変性効果 (CPE) を定量した。細

胞毒性は、同様の方法でウイルス感染を行わずに評価した。試験物質の EC₅₀ および EC₉₅ を最小二乗法により算出した。

試験物質の添加時間による抗ウイルス活性への影響

HEp-2 細胞を 12 ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるまで培養した後、MOI 0.5 で RSV A2 を感染させた。1 時間吸着させた後、感染細胞を PBS で 3 回洗浄した。5%CO₂ 存在下、37°C で培養し、各試験物質をウイルス接種後 0、6 または 24 時間 (hpi) に EC₅₀ の約 20 倍濃度となるよう添加した。5%CO₂ 存在下、37°C で 3 日間培養後、培養上清中のウイルス力価を次の通りプラークアッセイにより測定した。12 ウェルプレートにてコンフルエントまで培養した HEp-2 細胞に培養上清を添加して 1 時間吸着させた後、0.75% メチルセルロース含有培地を添加した。5%CO₂ 存在下、37°C で 5 日間培養した後、細胞をホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオシン染色した。プラーク数を計数し、培養上清中のウイルス力価を算出した。

吸着および膜融合阻害作用の評価

感染細胞を、吸着のみを誘導する 4°C から膜融合を誘導する 37°C に温度変化させて、試験物質を各温度で添加した際の抗ウイルス活性を評価した。HEp-2 細胞を 12 ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるまで培養した。各試験物質を終濃度が EC₅₀ の約 20 倍濃度となるよう調製した。試験物質含有培地 (4°C で試験物質を添加する条件) または試験物質不含有培地 (37°C で試験物質を添加する条件) で RSV A2 ウイルス液を調製し、MOI 0.5 で細胞に接種した。4°C で 1 時間吸着させた後、感染細胞を氷冷 PBS で 3 回洗浄し、試験物質不含有培地 (4°C で試験化合物を添加する条件) または試験物質含有培地 (37°C で試験化合物を添加する条件) を添加した。5%CO₂ 存在下、37°C で 3 日間培養した後、培養上清中のウイルス力価を上記と同様にプラークアッセイにより測定した。

合胞体形成阻害作用の評価

HEp-2 細胞を 1×10^4 cells/ウェルで 96 ウェルプレートに播種し、一晚培養した。PBS で洗浄した後、維持培地で調製した RSV A2 ウイルス液を MOI 1 で接種した。各試験物質を 24 hpi に感染細胞に添加した。感染細胞を 5%CO₂ 存在下、37°C で 3 日間培養し、形成された合胞体を顕微鏡下で観察した。

TP0591816 耐性株の取得と遺伝子解析

HEp-2 細胞を 12 ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるまで培養した。細胞を PBS で洗浄し、TP0591816 0.3 nM 存在下で RSV A2 を MOI 0.05 となるよう接種した。5%CO₂ 存在下、37°C でインキュベートし、CPE が観察されたときに細胞を懸濁液して回収した。この感染細胞懸濁液を、同濃度または 3 倍濃度の TP0591816 を含有する培地で 10 倍希釈し、新たに培養した細胞に接種した。同様に、TP0591816 の濃度が 72.9 nM となるまで感染細胞の継代培養を繰り返した。コントロールについては、TP0591816 不含有培地を用いて感染細胞の継代培養を同様に繰り返した。取得した TP0591816 耐性株および野生株の RNA を抽出して逆転写し、F 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 産物のシーケンス解析を行い、TP0591816 耐性株の遺伝子配列を野生株と比較して変異箇所を同定した⁸⁵⁾。

RSV 肺感染マウスに対する薬効評価

本研究における全ての動物実験は、大正製薬株式会社 動物実験委員会によって実施前に承認を受け、動物実験の適正な実施に関するガイドライン（日本学術会議、2006）に準拠して実施した。

雌性の 8 週齢の BALB/c マウスを日本チャールス・リバー株式会社（Kanagawa, Japan）から購入して使用した。TP0591816 を 10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンに溶

解し、ウイルス接種の1時間前に1、10 および 100 mg/kg の用量でマウスに皮下投与した。ケタミン (62.5 mg/kg) ・キシラジン (12.5 mg/kg) の筋肉内注射によって麻酔したマウスに、100 μ L 培地中 1×10^7 PFU の RSV A2 を経鼻接種した。RSV 接種後4日 (dpi) にマウスを安楽死させて肺を採取した。肺ホモジネート中のウイルス力価を、上記と同様にプラークアッセイによって測定した。TP0591816 投与群と媒体対照群の間で、Steel の検定により統計解析を行った。

並行人工膜透過性試験 (PAMPA)

PAMPA Evolution 装置 (Pion, Inc., Woburn, MA) を使用して TP0591816 の膜透過性を評価した。室温で4時間インキュベートして人工膜を通過した TP0591816 を UV プレートリーダーで測定した。PAMPA Evolution ソフトウェア (Pion, Inc.) を使用して pH 6.2 における透過係数 (P_{app}) を算出した。

In vitro 代謝安定性試験

ヒト肝マイクロソームのプール品 (XenoTech, LLC, Lenexa, KS) を使用して、TP0591816 の代謝安定性を測定した。0.25 mg/mL ヒト肝マイクロソームおよび NADPH 生成系 (1.3 mmol/L β -NADP⁺, 3.3 mmol/L グルコース-6-リン酸, 3.3 mmol/L MgCl₂, 0.4 U/mL グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) を含む 100 mmol/L リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH7.4) 中で、NADPH 再生成系を添加して TP0591816 のインキュベートを開始した。37°C で 5、10、15 および 30 分間インキュベートした後、アセトニトリル/メタノール (体積比 9:1) を添加して反応を停止した。得られた反応物を 4°C、3,974 \times g で 10 分間遠心した。上清を液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) に注入した。肝固有クリアランス (CL_{int}) は Obach⁹⁸⁾ らの方法により算出し、ヒト肝マイクロソーム反応液中の非結合型分率 ($f_{u,mic}$) は Halifax および Houston のアルゴリズムを使用して推定した⁹⁹⁾。

血漿タンパク結合

ヒトにおける TP0591816 の血漿タンパク結合を平衡透析法により評価した。12~14 kDa カットオフの透析膜を用いて、96 ウェル平衡透析装置 (HTDialysis, LLC, Gales Ferry, CT) で平衡透析を実施した。ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した TP0591816 をブランク血漿に終濃度 1 µg/mL となるよう添加した。血漿サンプルをリン酸緩衝液 (pH 7.4) で 5%CO₂ 存在下、37°C で 4 時間平衡化した。透析後、TP0591816 の血漿濃度 (C_p) および非結合型濃度 (C_u) を LC-MS/MS により測定し、 $f_{u,p}$ (血漿中非結合率) を次の数式から算出した。

$$f_{u,p} = C_u/C_p$$

サルにおける薬物動態評価

雄のカニクイザルに TP0591816 を静脈内投与して、薬物動態と尿中排泄を評価した。TP0591816 を 20% 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンに溶解し、絶食状態のカニクイザルの伏在静脈に 0.25 mg/kg の用量で静脈内投与した。投与前、および投与後 0.0833、0.25、0.5、1、2、4、6、8、および 24 時間に動物の橈側皮静脈から採血し、遠心して血漿を分離した。また、投与後 24 時間に採尿した。

各血漿および尿サンプル中の TP0591816 濃度を LC-MS/MS により測定した。薬物動態解析ソフトウェア Phoenix WinNonlin v8.0 (Certara, Princeton, NJ) を用いてノンコンパートメント解析法により TP0591816 の血漿濃度-時間曲線を解析し、全身クリアランス (CL) および見かけの定常状態の分布体積 ($V_{d,ss}$) を算出した。尿中排泄率は、尿中排泄量を投与量で除して算出した。腎クリアランス (CL_R) は、CL に尿中排泄率を乗じて算出した。

生理学的薬物動態 (PBPK) モデリング

Simcyp software v17 release 1 (Simcyp, Sheffield, UK) を使用して PBPK モデリングを行

い、ヒトにおける TP0591816 の血漿濃度-時間曲線を予測した。TP0591816 の Simcyp モデルは、物理化学的パラメータ、*in vitro* データおよび予測薬物動態パラメータを使用して設定した。Vd_{ss} は、サルのデータから数式 1¹⁰⁰⁾ を使用して単純アロメトリックスケーリングにより予測した。

$$Vd_{ss, human} = 0.79 \times Vd_{ss, monkey} \quad (\text{数式 1})$$

肝クリアランスは、ヒト肝ミクロソームにおける固有クリアランスから予測した。CL_R は、サルのデータから数式 2¹⁰¹⁾ を使用して単純なアロメトリックスケーリングにより予測した。

$$CL_{R, human} = 0.407 \times CL_{R, monkey} \quad (\text{数式 2})$$

バイオアベイラビリティは、TP0591816 が主に CYP3A4 によって代謝されるという仮定に基づいて、PAMPA 透過性とヒト肝ミクロソームにおける固有クリアランスを使用して予測した。TP0591816 を 200 mg の用量で経口投与した際の血漿濃度-時間曲線は、100 人の被験者（10 被験者 × 10 試験）を対象としてシミュレーションした。

RSV 感染症に対する TP0591816 の臨床有効用量の予測

RSV A2 野生株および F タンパク質 D486N、F488L または T400I 変異株による感染症を治療する際の TP0591816 の臨床有効用量を予測した。トラフ血漿濃度の目標値となる各ウイルス株に対する血漿補正 95%有効濃度（paEC₉₅）を数式 3 から算出した。

$$\text{目標濃度} = \frac{95\% \text{有効濃度}}{\text{血漿中非結合率}} \quad (\text{数式 3})$$

TP0591816 200mg を 1 日 2 回（BID）経口投与した際にトラフ値となる 12 時間後の血漿

濃度を、上記のように Simcyp を使用して PBPK モデリングによってシミュレーションした。薬物動態が線形である仮定に基づいて、予測有効用量 (mg/day) を数式 4 から算出した。

$$\text{用量} = \frac{\text{目標血漿濃度}}{\text{TP0591816 200 mg 経口投与時の平均シミュレーション血漿濃度}} \times 200 \text{ (数式 4)}$$

2.3 結果

TP0591816 の F タンパク質変異耐性株に対する抗ウイルス活性

RSV の野生株および F タンパク質変異株に対する TP0591816 の抗ウイルス活性を明らかにするため、HEp-2 細胞を使用した XTT アッセイにより評価した (Table 5)。その結果、A 型 RSV A2 および B 型 RSV 18537 に対する TP0591816 の 50%有効濃度 (EC₅₀) はそれぞれ 0.255 および 0.0824 nM であり、対照物質である F タンパク質阻害化合物 BMS-433771 および VP-14637、RdRp 阻害薬リバビリンと比べ強い抗ウイルス活性が認められた。注目すべきことに、BMS-433771 および VP-14637 は F タンパク質変異株に対して抗ウイルス活性を示さなかった一方で、TP0591816 は D486N、F488L および T400I 変異株に対する EC₅₀ がそれぞれ 0.549、5.09 および 2.97 nM と、変異株に対しても抗ウイルス活性を維持していた。また、非感染細胞を用いた XTT アッセイにより細胞毒性を評価した結果、TP0591816 の 50%細胞毒性濃度 (CC₅₀) は >30,000 nM であり、BMS-433771 および VP-14637 と同様に細胞毒性は認められなかった。

Table 5 Antiviral activities against wild-type and F protein mutant RSV, and cytotoxicity of TP0591816 and known RSV inhibitors

Compound	EC ₅₀ (nM) ^a for:					CC ₅₀ (nM) ^a
	A2 (subgroup A)				18537 (subgroup B)	
	WT ^b	D486N	F488L	T400I	WT ^b	
TP0591816	0.255	0.549	5.09	2.97	0.0824	>30,000
BMS-433771	50.0	>1,000	>1,000	>1,000	68.4	>30,000
VP-14637	0.467	>1,000	>1,000	>1,000	0.458	>30,000
Ribavirin	11,700	12,700	13,700	9,710	8,450	159,000

^a All 50% effective concentration (EC₅₀) and 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) values are represented as the geometric means of the results of at least four independent experiments.

^b WT, wild-type

TP0591816 による細胞侵入時のウイルスエンベロープと細胞膜の融合阻害

TP0591816 が RSV のライフサイクルにおいて何れの過程を阻害することで抗ウイルス活性を示すか否かを明らかにするため、HEp-2 細胞を用いた RSV 感染実験においてウイルス接種後に TP0591816 を継時的に添加することで抗ウイルス活性への影響を評価した (Figure 11)。非処置コントロールの 3 dpi における培養上清中ウイルス力価は $6 \log_{10}$ PFU/mL 以上であったのに対し、TP0591816 を 0 hpi に添加した際の培養上清中ウイルス力価は $3 \log_{10}$ PFU/mL 以下に減少した。一方、TP0591816 による抗ウイルス作用は添加時間を遅くするほど減弱した。同様に、F タンパク質阻害化合物 BMS-433771 および VP-14637 の抗ウイルス作用も、添加時間を遅くするほど減弱した。この結果から、TP0591816 は RSV のライフサイクルにおける最初の過程である細胞へのウイルス侵入を阻害することが示唆された。

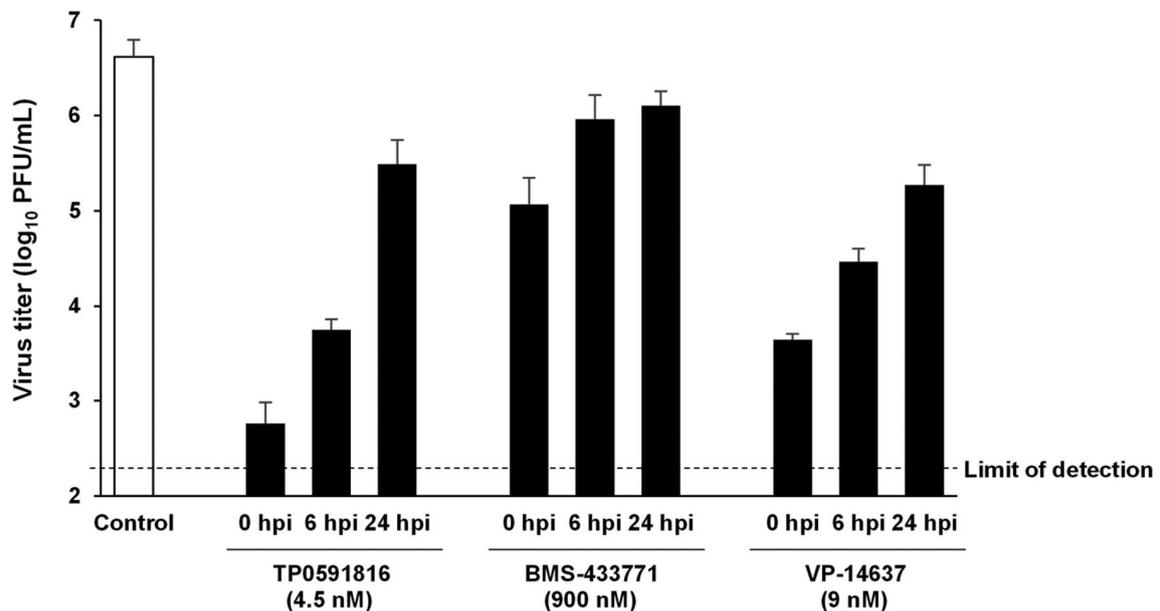


Figure 11 Effect of time of addition of TP0591816 and known fusion inhibitors on the antiviral efficacy. HEp-2 cells were infected with RSV A2, and 4.5 nM TP0591816, 900 nM BMS-433771, or 9 nM VP-14637 was added at 0, 6, or 24 h post-infection (hpi). The virus titers in the supernatants were determined at 3 days post-infection (dpi). Data are represented as the means \pm standard errors of the means (SEM) from three independent experiments performed in triplicate.

RSV は 4°C で細胞に吸着するが、ウイルスエンベロープの細胞膜との融合には 18°C 以上の温度が必要である¹⁰²⁾。このことを利用して、TP0591816 が吸着と膜融合のいずれを阻害するか否かを明らかとするため、感染細胞に吸着のみを起こす 4°C から膜融合を誘導する 37°C に温度変化させて TP0591816 を各温度で添加した際の抗ウイルス活性を評価した (Figure 12)。その結果、対照物質として用いた RSV 吸着阻害作用のあるヘパリン¹⁰³⁾ は 4°C で添加した場合に抗ウイルス活性を示し、37°C で添加した場合には抗ウイルス活性を示さなかった。一方、F タンパク質阻害化合物 BMS-433771 および VP-14637 は、37°C で添加した場合に抗ウイルス活性を示した。同様に、TP0591816 も 37°C で添加した場合に抗ウイルス活性を示し、4°C で添加した場合には抗ウイルス活性を示さなかった (Figure 12)。

この結果から、TP0591816 は RSV の細胞侵入時において、ウイルスエンベロープと細胞膜の融合を阻害することで抗ウイルス活性を発揮することが示唆された。

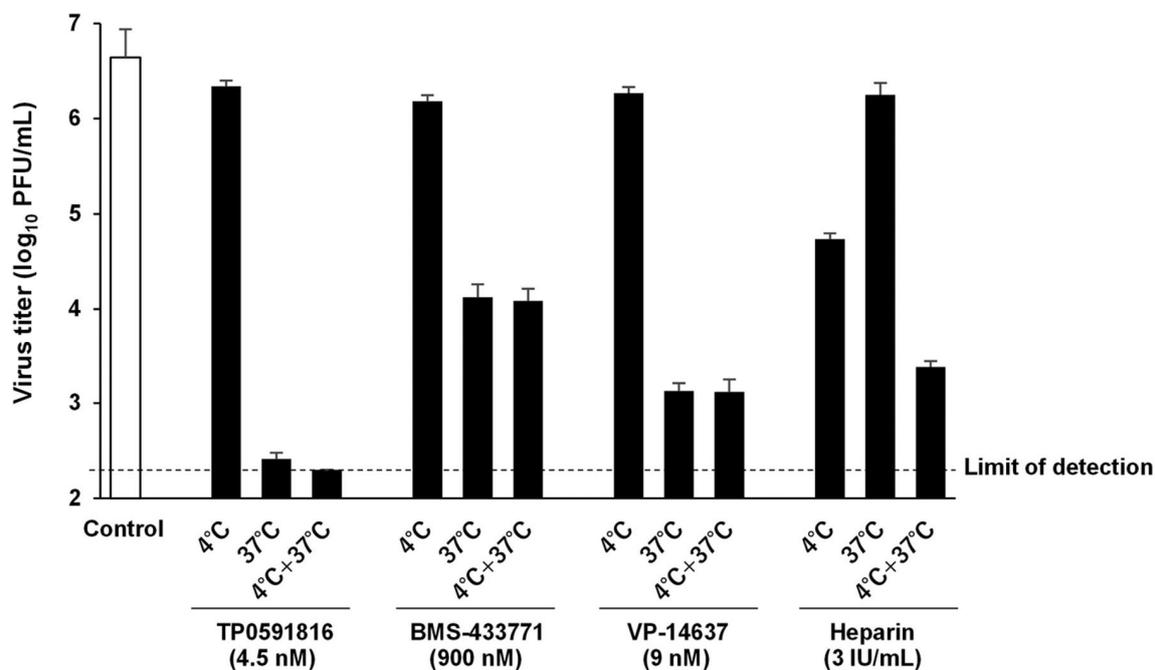


Figure 12 Temperature shift assay of TP0591816 and known fusion inhibitors. HEp-2 cells were infected with RSV A2 at 4°C for 1 h, and the temperature was shifted to 37°C; 4.5 nM TP0591816, 900 nM BMS-433771, or 9 nM VP-14637 was added only at 4°C, only at 37°C, or for the entire duration of the experiment (4°C and 37°C). The virus titers in the supernatants were determined at 3 days post-infection (dpi). Data are represented as the means \pm standard errors of the means (SEM) from three independent experiments performed in triplicate.

TP0591816 による合胞体形成阻害

RSV は細胞内に侵入する際にエンベロープと細胞膜を融合するだけでなく、感染後に感染細胞と隣接する細胞との膜融合を F タンパク質を介して誘導することにより合胞体を形成して感染を拡大する。そこで、この合胞体形成に対する TP0591816 の阻害作用を検討した (Figure 13)。RSV の細胞への侵入が完了したと考えられる 24 hpi に TP0591816 を添加

して評価した結果、1.5 nMにより合胞体形成は阻害され、0.75 nMでも部分的な阻害が認められた。BMS-433771 および VP-14637 も同様に合胞体形成を阻害した一方、リバビリンでは阻害がほとんど認められなかった。この結果から、TP0591816 は合胞体形成を阻害することが明らかとなり、TP0591816 が RSV F タンパク質の機能を阻害することが示唆された。

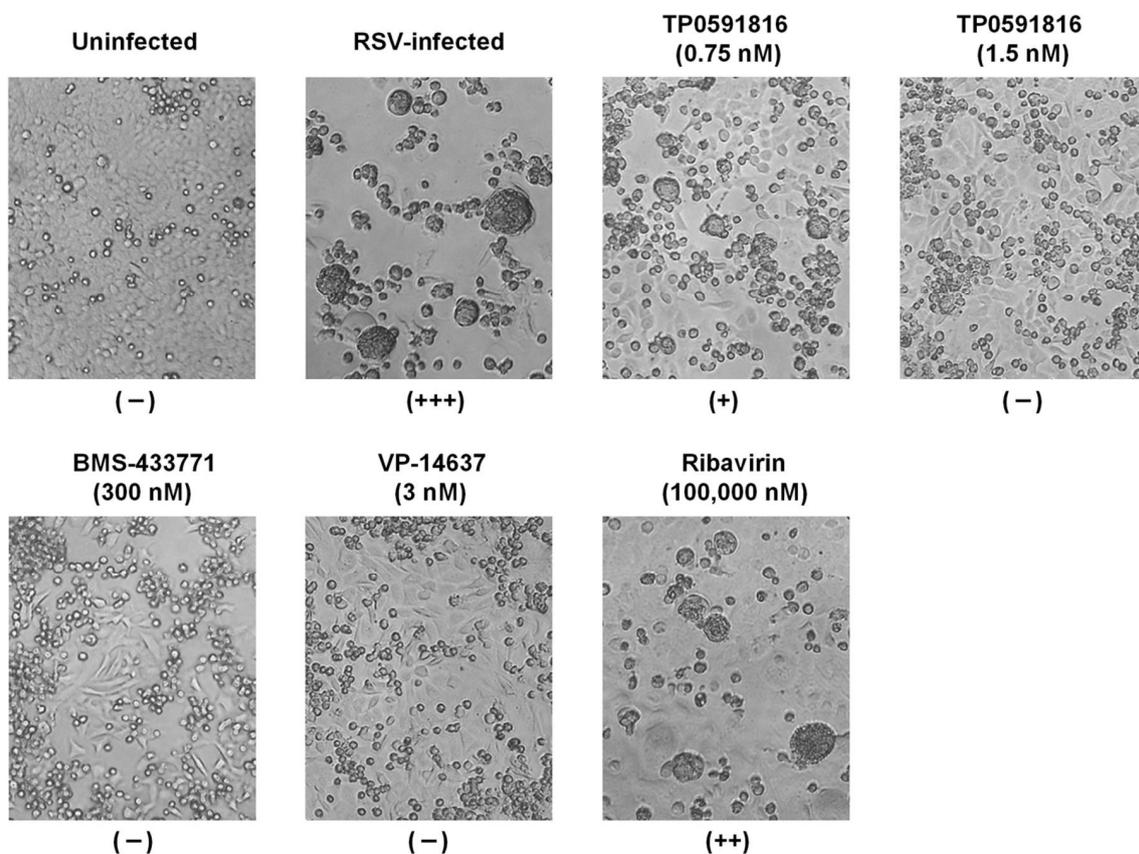


Figure 13 Inhibitory effect of TP0591816 and known RSV inhibitors on syncytium formation. HEp-2 cells were infected with RSV A2, and 0.75 or 1.5 nM TP0591816, 300 nM BMS-433771, 3 nM VP-14637, or 100,000 nM ribavirin was added at 24 hpi. The inhibition of syncytium formation was evaluated at 3 days post-infection (dpi). Syncytium scores are shown as follows: -, no syncytium; +, <1/3; ++, ~1/3 to 2/3; +++, \geq 2/3 of syncytium compared to uninfected control. Each image is representative of two independent experiments.

TP0591816 耐性 RSV の解析

次に、TP0591816 耐性株を取得してその遺伝子を解析することにより、TP0591816 の標的が F タンパク質であることを検証した。TP0591816 の添加濃度を上昇させながら RSV 感染細胞の継代培養を行い、EC₅₀ の約 300 倍濃度の TP0591816 存在下で増殖する耐性株を取得した。この耐性株のシーケンス解析を行った結果、F タンパク質の fusion peptide 領域に L141F 変異が認められた。なお、ziresovir 耐性株において変異が認められていた cysteine-rich 領域や heptad-repeat B 領域には変異が認められなかった。

取得した L141F 変異株に対して、TP0591816 および既知の RSV 阻害物質の抗ウイルス活性を評価した (Table 6)。その結果、リバビリンおよび F タンパク質の 258~275 番目のアミノ酸に結合する予防抗体であるパリビズマブは、L141F 変異株に対して親株と同程度の抗ウイルス活性を示した (Table 6)。一方、TP0591816 および既知の F タンパク質阻害化合物の L141F 変異株に対する EC₅₀ は、親株と比べそれぞれ 4,000 倍以上および 10 倍以上上昇した。したがって、TP0591816 の標的分子は F タンパク質であることが確認された。

Table 6 Susceptibility testing of TP0591816-resistant virus

Compound	EC ₅₀ (nM) ^a for			EC ₅₀ fold difference (×) ^b for:	
	Parent virus	Untreated control virus	TP0591816-resistant virus (L141F)	Untreated control virus	TP0591816-resistant virus (L141F)
TP0591816	0.212	0.459	>1,000	2.17	>4,720
BMS-433771	54.8	242	>1,000	4.41	>18.3
VP-14637	0.502	0.846	5.57	1.69	11.1
Ribavirin	11,900	17,000	14,000	1.42	1.17
Palivizumab	0.317	0.657	0.398	2.07	1.26

^a All EC₅₀ values are represented as the geometric means of the results of at least three independent experiments. Values are expressed as nM for all compounds except palivizumab (μg/mL).

^b Relative to the value for the parent virus.

RSV 肺感染マウスに対する TP0591816 の有効性

TP0591816 が RSV に対して期待される *in vitro* 抗ウイルス活性を示したことから、次に、TP0591816 の RSV 肺感染マウスに対する *in vivo* 薬効を評価した (Figure 14)。TP0591816 をマウスに皮下投与した 1 時間後に RSV A2 を経鼻接種し、4 dpi の肺中ウイルス力価を測定した。その結果、TP0591816 は、1、10 および 100 mg/kg の用量で肺中ウイルス力価を用量依存的に減少させることが示された (Figure 14A)。TP0591816 投与群の肺中ウイルス力価は、いずれの用量においても媒体対照群と比べ統計学的に有意な低下が認められ、100 mg/kg 投与群では 2.04 log の減少が認められた。さらに、RSV 感染マウスの肺重量についても TP0591816 投与群の全ての用量で媒体対照群と比べ有意に減少した (Figure 14B)。以上より、TP0591816 は RSV 肺感染マウスに対して高い抗ウイルス作用を示すことが明らかとなった。

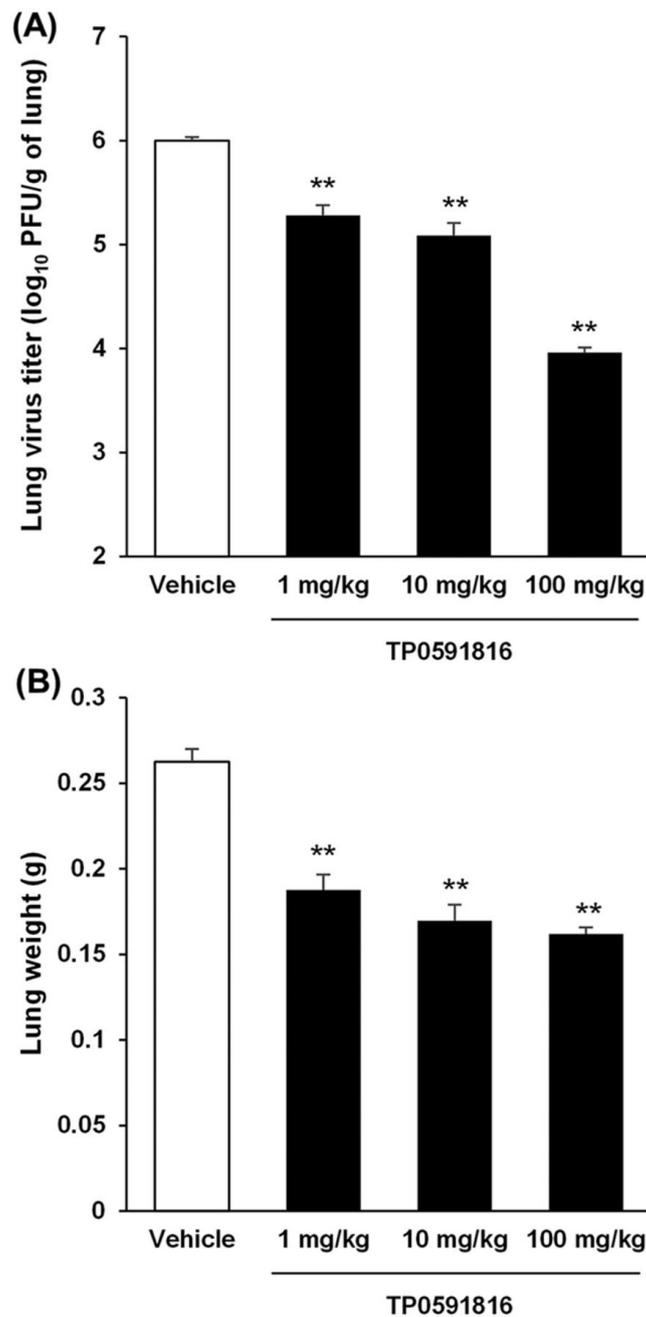


Figure 14 Efficacy of TP0591816 in a mouse model. TP0591816 was administered subcutaneously to mice at doses of 1, 10, and 100 mg/kg at 1 h before virus inoculation. The mice were then inoculated intranasally with 1×10^7 PFU of RSV A2, and the lung virus titers (A) and lung weights (B) were determined at 4 days post-infection (dpi). Data are represented as the means \pm standard errors of the means (SEM) ($n = 8$ mice per group).

***P* < 0.01 versus vehicle (Steel's test).

TP0591816 の臨床有効用量の予測

TP0591816 が *in vivo* においても有効性を示したことから、臨床における有効性を予測するためヒトシミュレーションを行い、臨床有効用量を算出した (Table 7 および Table 8)。まず、TP0591816 の *in vitro* 薬物動態パラメータを評価した (Table 7)。TP0591816 の pH 6.2 における見かけの P_{app} を PAMPA から算出した結果、 63.7×10^{-6} cm/秒であった。また、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験において TP0591816 は一次反応により消失し、その CL_{int} は $182 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ であり、 $f_{u,mic}$ は 0.966 と推定された。さらに、TP0591816 のヒト血漿タンパク結合率は 90.7% であり、 $f_{u,p}$ は 0.093 と算出された。

次に、TP0591816 の *in vivo* 薬物動態パラメータについてカニクイザルを用いて評価した (Table 8)。TP0591816 の血漿濃度-時間曲線から薬物動態パラメータを算出した結果、TP0591816 の Vd_{ss} および CL_R は、それぞれ $1,800 \text{ mL}/\text{kg}$ および $241 \text{ mL}/\text{h}/\text{kg}$ であった。得られた物理化学的パラメータ、*in vitro* および *in vivo* 薬物動態パラメータを用いて、PBPK モデルにより、TP0591816 のヒトにおける血漿濃度-時間曲線をシミュレーションした (Table 7)。シミュレーションから、TP0591816 の BID 経口投与時の臨床有効用量として、トラフ血漿濃度が $paEC_{95}$ となる用量を算出した。その結果、RSV A2 野生株による感染症の治療に必要な TP0591816 の用量は、1 日 2 回の用法で 26.9 mg と算出された。また、TP0591816 は、D486N、T400I および F488L 変異株による感染症に対しても $55.5 \sim 955 \text{ mg}$ の用量で有効性を示すと予測された (Table 9)。

Table 7 Input parameters used for TP0591816 in a human PBPK model

Parameter ^a	Value or condition
Physicochemical properties and blood binding	
Molecular weight	539.03
Compound type	Neutral
LogD (pH 7.4)	1.54
$f_{u,p}$	0.093
B/P^b	0.7
Absorption	
Absorption model	ADAM
Formulation	Solution
$f_{u,gut}^b$	1
$P_{eff,man}$ (10^{-4} cm/sec) ^c	5.32
Fa^c	0.995
ka (h^{-1}) ^c	2.32
PAMPA P_{app} (10^{-6} cm/sec)	63.7
Distribution	
Distribution model	Full PBPK Model
Vd_{ss} (L/kg) ^d	1.45
Elimination	
Clearance type	Enzyme kinetics
CL_{int} (μ L/min/mg protein)	182
$f_{m,CYP3A4}^b$	1
$f_{u,mic}^d$	0.966
CL_R (L/h) ^d	7.88

^a D, distribution coefficient; $f_{u,p}$, fraction unbound in plasma; B/P, blood-to-plasma ratio; ADAM, advanced dissolution, absorption, and metabolism; $f_{u,gut}$, fraction unbound in the gut; $P_{eff,man}$, effective permeability in humans; Fa , fraction absorbed; ka , absorption rate constant; PAMPA, parallel artificial membrane permeability assay; P_{app} , apparent permeability; PBPK, physiologically based pharmacokinetic; Vd_{ss} , steady-state volume of distribution; CL_{int} , hepatic intrinsic clearance; $f_{m,CYP3A4}$, fraction metabolized by CYP3A4; $f_{u,mic}$, fraction unbound in fraction unbound in human liver microsomes; CL_R , renal clearance.

^b Assumed.

^c Calculated from the PAMPA in Simecyp.

^d Predicted.

Table 8 Pharmacokinetic parameters of TP0591816 in the male cynomolgus monkey^b

Parameter ^a	Value
CL _{tot} (mL/h/kg)	1,770 ± 170
Vd _{ss} (mL/kg)	1,800 ± 220
t _{1/2} (h)	1.3 ± 0.3
AUC _{0-∞} (h·ng/mL)	140 ± 13
Urinary excretion (% of dose)	13.6 ± 1.8
CL _R (mL/h/kg)	241

^a CL_{tot}, total clearance from plasma; Vd_{ss}, steady-state volume of distribution; t_{1/2}, terminal-phase half-life; AUC_{0-∞}, area under the concentration-time curve from time zero to infinity; CL_R, renal clearance.

^b TP0591816 was administered intravenously to male cynomolgus monkeys at a dose of 0.25 mg/kg.

Data are represented as the means ± standard deviation (SD) (*n* = 3 monkeys per group).

Table 9 paEC₉₅ and predicted clinical effective dose of TP0591816

Parameter	F protein type			
	WT ^a	D486N	F488L	T400I
paEC ₉₅ (ng/mL)	3.23	6.67	115	84.6
Predicted dose (mg BID) ^b	26.9	55.5	955	705

^a WT, wild-type.

^b Dose required to achieve a trough plasma concentration greater than the paEC₉₅.

2.4 考察

F タンパク質阻害化合物は RSV 感染症に対する有効な治療薬となることが期待されている一方、課題として F タンパク質阻害化合物間の交差耐性がある^{104,105}。これまでに、様々な化合物クラスの F タンパク質阻害化合物の F タンパク質との複合体の X 線結晶構造が解析されている¹⁰⁵。その報告によると、いずれの化合物も、融合前コンフォメーションの F タンパク質の 3 量体が形成する中央部ポケットに結合することが示されている。このことから、異なる化合物クラスの F タンパク質阻害化合物であっても共通の結合領域の変異によって交差耐性を示すと考えられる。その耐性変異のうち、特に、heptad repeat B 領域の D486N および F488L、cysteine-rich 領域の T400I が多く報告されている。*In vitro* において、D486N 変異は ziresovir、JNJ-2408068 および TMC353121 によって^{92,106,107}、F488L 変異は presatovir および VP-14637 によって^{96,108}、また、T400I 変異は VP-14637 および P13 によって^{96,109}、それぞれ誘導されることが報告されている。さらに、T400I 変異株は、開発が最も進んでいる F タンパク質阻害化合物である ziresovir の Phase 2 臨床試験において、ziresovir を投与した RSV 感染患者から検出されている⁹³。BMS-433771 および VP-14637 は heptad repeat B 領域および cysteine-rich 領域の変異株に対して抗ウイルス活性を失うことが報告されており^{85,96,110}、本研究において評価したいずれの F タンパク質変異株に対する EC₅₀ も >1,000 nM と、抗ウイルス活性を示さなかった。一方、TP0591816 は、D486N、F488L および T400I 変異株に対する EC₅₀ が 0.549~5.09 nM と (Table 5)、ziresovir の RSV A2 野生株に対する EC₅₀ 2 nM⁹² と同程度であり、抗ウイルス活性を維持していた。以上より、TP0591816 は、既知の F タンパク質阻害化合物に対して耐性を示す F タンパク質変異株に対しても、高い抗ウイルス活性を有する F タンパク質阻害化合物であると考えられた。

細胞感染実験において TP0591816 を RSV 接種後の様々な時間に添加して抗ウイルス活性評価した結果、TP0591816 の抗ウイルス活性は、0 hpi に添加した場合に比べ 6、24 hpi と

添加時間を遅らせるにつれて減弱した (Figure 11)。この結果から、TP0591816 が RSV 感染の最初の過程である細胞内への侵入を阻害することが示唆された。しかしながら、ウイルス接種 6 および 24 時間後の添加においても TP0591816 の抗ウイルス活性は一部残っていた。RSV の子孫ウイルスの感染細胞からの放出は 10~12 hpi に始まり、24 hpi にピークとなった後、30~48 hpi まで持続することが報告されている¹¹¹⁾。このことから、TP0591816 は 6 および 24 hpi に添加した場合においても子孫ウイルスの新たな細胞への感染を阻害した可能性が考えられた。また、TP0591816 による RSV の細胞侵入阻害の詳細を明らかにするため、感染細胞の温度を 4°C から 37°C に変化させて 4°C または 37°C で TP0591816 を添加した際の抗ウイルス活性を評価した。その結果、TP0591816 は 37°C での添加により抗ウイルス活性を示したことから (Figure 12)、TP0591816 が RSV の細胞侵入時の膜融合を阻害すると考えられた。また、TP0591816 は感染細胞と隣接する細胞との膜融合による合胞体形成も阻害したことから (Figure 13)、TP0591816 が F タンパク質の機能を阻害することが示唆された。さらに、TP0591816 耐性変異株の遺伝子を解析した結果、F タンパク質に変異が認められ、標的が F タンパク質であることが確認された。

TP0591816 耐性株として認められた F タンパク質 L141F 変異株は既知の F タンパク質阻害化合物 presatovir および sisunatovir に対する耐性株としても報告されていることから^{89,112)}、TP0591816 がこれらの F タンパク質阻害化合物と類似する F タンパク質の箇所に結合することが示唆された。一方、ziresovir^{92,93)}、presatovir^{96,112)} および sisunatovir¹¹³⁾ 存在下で出現した cysteine-rich 領域や heptad repeat B 領域の変異株は TP0591816 によって選択されず、TP0591816 はこれらの領域の変異株に対して抗ウイルス活性を維持していた。したがって、TP0591816 の RSV F タンパク質に対する結合箇所は、ziresovir などの既知の F タンパク質阻害化合物とはやや異なる可能性が示唆された (Figure 15)。また、Fusion peptide 領域は RSV のエンベロープが細胞膜に融合する際に細胞膜に挿入される部分に当たるため、膜融合において重要な領域と考えられる¹¹⁴⁾。一方、アミノ酸違いの L141W 変異 F タ

ンパク質の膜融合活性は野生型と比べ低下することや¹⁰⁵⁾、L141F 変異株は野生株と比べ細胞内増殖能が低下することが報告されている¹¹⁵⁾。したがって、141 番目のロイシンは F タンパク質の膜融合活性に重要なアミノ酸であり、L141F 変異株は野生株と比較して感染能が低下して拡散しにくい可能性が考えられる。

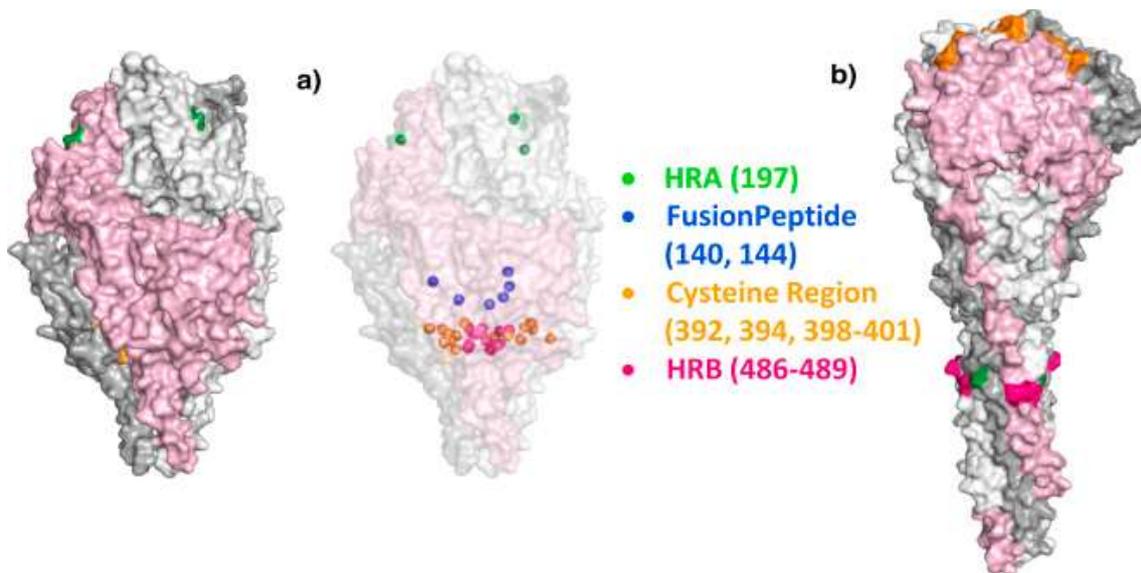


Figure 15 Mutation region of F protein in TP0591816 or ziresovir-resistant strains.

Although ziresovir-resistant strain has D486N, D489A or D489V in heptad-repeat B (HRB) or T400I in cysteine-rich region, TP0591816-resistant strain has L141F mutation in fusion peptide. Reprinted figure with permission from reference⁹¹⁾.

本研究では TP0591816 の F タンパク質との複合体構造解析を実施しなかったが、TP0591816 のプロトタイプである大環状ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン誘導体は、F タンパク質との結合シミュレーションにおいて野生型および D486N 変異の F タンパク質に対してほぼ重なるように結合することが示されている⁹¹⁾。これは、マクロサイクル化により分子構造が活性コンフォメーションに固定化されたことで、D486N 変異 F タンパク質に対してもコンフォメーションが変わることなく結合できるようになったためであると考察している。

さらに、今回の研究において TP0591816 は D486N 変異株に加え、F488L および T400I 変異株に対しても抗ウイルス活性を維持していた。このため、これらの変異 F タンパク質に対しても野生型 F タンパク質と同様に結合して阻害した可能性が考えられる。TP0591816 がこれらの変異株に対して抗ウイルス活性を示す機序の詳細を明らかとするためには、TP0591816 と変異 F タンパク質の複合体構造解析を行うなどの詳細検討が必要である。

Ziresovir は、RSV 肺感染マウスに対して、1 日 2 回 50 mg/kg (100 mg/kg/day) の経口投与により肺中ウイルス力価を病態対照群と比べ 1.86 log 減少させることが報告されている⁹²⁾。TP0591816 は、100 mg/kg の単回経口投与により、RSV 感染マウスの肺中ウイルス力価を病態対照投与群と比べ 2.04 log 減少させた (Figure 14)。実験条件が異なるため単純比較は難しいものの、TP0591816 は RSV 肺感染マウスに対して ziresovir と遜色ない有効性を示す可能性が考えられた。さらに、TP0591816 は、RSV 肺感染マウスに対して肺重量の減少作用を示した。RSV 感染は肺の炎症を誘導するため¹¹⁶⁾、RSV 肺感染マウスではインフルエンザウイルス感染と同様に肺に炎症細胞が浸潤して肺重量が増加することが報告されている^{117,118)}。したがって、TP0591816 は RSV の感染ウイルス量を減少させ、その結果として炎症反応による呼吸器系の傷害も抑制することが示唆された。また、TP0591816 をカニクイザルに 0.25 mg/kg 静脈内投与した際の PK パラメータは CL_{tot} 1,770 mL/h/kg、 V_{dss} 1,800 mL/kg および $t_{1/2}$ 1.3 h であり (Table 8)、ziresovir をサルに 2 mg/kg 静脈内投与した際の CL_{tot} 1,560 mL/h/kg、 V_{dss} 1,900 mL/kg および $t_{1/2}$ 1.0 h⁹²⁾ と同程度であった。したがって、経口吸収性を加味する必要はあるものの、TP0591816 は ziresovir と同程度のヒト PK プロファイルを示すことが期待できる。

ヒトチャレンジ試験の結果から、presatovir の薬効は血漿中薬物濃度のトラフ値に依存することが示されている⁸⁷⁾。この試験においてコホート 7 (負荷用量として 10 mg、その後 5 mg を 1 日 1 回投与) では血漿中薬物濃度が $paEC_{95}$ に達しなかったものの、有意なウイルス量の減少および症状スコアの低下が認められた。このことから $paEC_{95}$ は薬効発現に十

分な血漿中薬物濃度と考え、TP0591816 の臨床有効用量を算出する際の薬効基準濃度と考えた。薬物動態パラメータを用いた PBPK モデルにより TP0591816 のヒト血漿濃度-時間曲線のシミュレーションを行い、トラフ値の血漿中薬物濃度が $paEC_{95}$ となる用量を臨床有効用量として算出した。その結果、TP0591816 の BID 臨床有効用量は、RSV 野生株に対して 26.9 mg、F タンパク質変異株に対して 55.5~955 mg とそれぞれ推定された (Table 9)。

Ziresovir は、Phase 3 臨床試験において、RSV 感染症を罹患した乳児に対して 10、20 または 40 mg (体重に基づく用量) の BID によりウイルス量を 77%減少させ、症状スコアを 30%低下させることが報告されている^{119,120)}。TP0591816 の RSV A2 に対する EC_{50} は 0.255 nM と ziresovir の 2 nM と比べ強く、サル PK パラメータは同程度であったことから、推定された TP0591816 の RSV 野生株に対する有効用量 26.9 mg が ziresovir の有効用量 10~40 mg と同程度であることは妥当であると考えられる。また、ヒトには F タンパク質と相同性の高い因子がないため、F タンパク質阻害化合物は一般的に忍容性が高いことが想定される。

実際に、ziresovir および JNJ-53718678 は、Phase 1 臨床試験において健康成人に対して 1,000 mg 以上の用量で重篤な有害事象を示さなかった^{121,122)}。さらに、TP0591816 の細胞毒性は他の F タンパク質阻害化合物と同程度に低く (CC_{50} : >30,000 nM)、有効濃度と細胞毒性濃度は大きく乖離していた ($CC_{50}/F488L$ 変異株 EC_{50} : >5000)。したがって、TP0591816 は、既知の F タンパク質阻害化合物と同様に忍容性が高く、推定有効用量 26.9~955 mg は投与可能であることが期待される。

小括

第 I 部 新規 LpxC 阻害化合物 TP0586532 によるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌に 対するメロペネムの抗菌活性増強作用

欧米を中心に世界的に、腸内細菌目細菌のうち CRE が占める割合が増加している。また、CRE は多剤耐性を示すことが多いため有効な抗菌薬が限られており重症化する傾向がある。さらに、近年上市された新規抗菌薬に対しても耐性を示す CRE がすでに出現しており、有効な新規治療戦略は喫緊の課題である。TP0586532 は、グラム陰性菌の外膜の構成成分である LPS の合成を担う LpxC の阻害化合物として見出された。本研究では、TP0586532 が CRE の外膜透過性を亢進することによって併用した既存抗菌薬の抗菌活性を増強するという仮説を立て、TP0586532 とメロペネムの併用療法による CRE 感染症に対する新規治療手段の可能性を薬理的に検証した。まず、カルバペネマーゼを産生する高度耐性 CRE である *K. pneumoniae* および *E. coli* に対して TP0586532 とメロペネムを併用して抗菌活性を評価した結果、TP0586532 によるメロペネムの抗菌活性増強作用が認められた。さらに、これらの菌株に対してメロペネムの高用量/長時間注入 (2 g/3 h) レジメンで達成可能な血中濃度 8 µg/mL に TP0586532 を併用して殺菌作用を評価した結果、TP0586532 またはメロペネムそれぞれ単独では殺菌作用が認められなかった菌株に対しても殺菌作用が認められた。また、TP0586532 の抗菌活性増強作用の機序を解析するため EtBr の菌体内取り込みを指標として膜透過性亢進作用を評価した結果、TP0586532 による CRE 菌体内への EtBr の流入量の増加が認められた。さらに、TP0586532 は菌体内因子を標的とするメロペネム以外の抗菌薬の抗菌活性も増強したことから、TP0586532 が CRE の菌体膜透過性を亢進してメロペネムの抗菌活性を増強したことが示唆された。

以上より、TP0586532 とメロペネムの併用療法は、それぞれの単独療法よりも強い殺菌作用を発揮し、高度耐性 CRE が拡散する前に駆逐する有用な新規治療手段になりうることが期待される。

第 II 部 新規 F タンパク質阻害化合物 TP0591816 の F タンパク質変異耐性 RS ウイルス に対する薬理作用

RSV 感染症は、特に、早産児や心肺系の基礎疾患または免疫不全がある小児において細気管支炎や肺炎に重症化しやすい。また、高齢者においても致死率がインフルエンザウイルス感染症と同程度に高く、RSV 感染症が問題となる。しかしながら、RSV 感染症に対する有用な治療薬は依然として医療ニーズが満たされておらず、安全で有効性の高い新規治療薬が求められている。このような状況の中で、F タンパク質阻害化合物である ziresovir は Phase 3 臨床試験において RSV 感染症に罹患した小児患者に対して有意な症状の軽減およびウイルス量の減少を示した。しかしながら、ziresovir 耐性株が臨床試験においてすでに認められており、ziresovir が上市された後に様々な耐性株が拡散することが懸念される。したがって、これらの耐性変異株が拡散する前に駆逐するための対策が必要である。我々は、既知の F タンパク質阻害化合物に対して耐性を示す F タンパク質 D486N 変異株に対しても抗ウイルス活性を示す TP0591816 を見出した。本研究では、TP0591816 の RSV に対する薬理的評価を行うことにより、TP0591816 の RSV 治療薬としての有効性について検証した。TP0591816 は、D486N 変異株に加え、ziresovir の臨床試験で出現が認められた T400I 変異耐性株に対しても良好な抗ウイルス活性を示した。また、TP0591816 は、細胞侵入時のウイルスエンベロープと細胞膜の融合や、感染細胞と隣接する細胞の膜融合による合胞体形成といった F タンパク質の機能を阻害することが示唆された。さらに、TP0591816 耐性変異株では F タンパク質に変異が認められたことから、TP0591816 が F タンパク質を標的とすることが検証された。また、この TP0591816 耐性株は ziresovir 耐性株とは異なり F タンパク質の fusion peptide 領域に L141F 変異を有していた一方、ziresovir などの既知の F タンパク質阻害化合物の耐性株で認められた cysteine-rich 領域や heptad repeat B 領域の変異株は TP0591816 によって選択されなかった。このことから、TP0591816 の RSV F タンパク質に対する結合部位は、ziresovir などの既知の F タンパク質阻害化合物とはやや異なる

可能性が示唆された。TP0591816 は RSV 肺感染マウスに対して肺中ウイルス力価を減少させる作用を示し、その結果として炎症反応による呼吸器系の傷害も抑制することが示唆された。さらに、ヒト血漿濃度-時間曲線のシミュレーションから、TP0591816 が RSV 感染症患者に対して投与可能な用量で有効性を示す可能性が示唆された。

以上より、TP0591816 は ziresovir とは異なる様式で F タンパク質を阻害する可能性が示唆され、ziresovir 耐性株に対しても有効な F タンパク質阻害薬になりうることが明らかとなった。

総括

細菌およびウイルス感染症に対して様々な治療薬が開発されてきたが、いずれの治療薬に対しても薬剤耐性病原体の出現が認められており、薬剤耐性病原体の出現を防ぐことは困難である。したがって、薬剤耐性病原体に対する治療戦略として、有効な新薬を開発することに加え、出現した薬剤耐性病原体が拡散する前に駆逐することを考える必要がある。本研究では、単独でも CRE に対して良好な抗菌活性を示す TP0586532 をメロペネムと併用することで、それぞれの単独療法よりも強い殺菌作用を発揮することを明らかとした。これにより、世界中で危惧されている CRE 感染症の拡大の食い止めにつながることを期待される。また、TP0591816 は、RSV 野生株だけでなく F タンパク質阻害化合物の開発先行品に対する耐性変異株に対しても抗ウイルス活性を示した。さらに、TP0591816 は、臨床においても投与可能な用量で耐性変異株に対して有効性を示すと予測された。したがって、将来、開発先行品に対する耐性変異株が出現した場合においても、TP0591816 がその拡散を防ぐことで治療手段の確保につながると考えられる。

以上より、TP0586532 とメロペネムの併用療法および TP0591816 による治療が、それぞれ耐性病原体である CRE および F タンパク質変異耐性 RSV が拡散する前に駆逐する治療戦略として有用であることを提案する。

参考文献

1. GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. 2022. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 400:2221-2248.
2. Zainab SM, Junaid M, Xu N, Malik RN. 2020. Antibiotics and antibiotic resistant genes (ARGs) in groundwater: A global review on dissemination, sources, interactions, environmental and human health risks. *Water Res*. 187:116455.
3. Economou V, Gousia P. 2015. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist*. 8:49-61.
4. Chen L; Todd R, Kiehlbauch J, Walters M, Kallen A. 2017. Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*—Washoe County, Nevada, 2016. *CDC Morbidity and Mortality Weekly Report*. 66:33.
5. Antimicrobial Resistance Collaborators. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 399:629-655.
6. World Health Organization. 2017. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.
7. Centers for Disease Control and Prevention. 2019. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019.
8. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol*. 3:541-548.
9. Heider H, Adamczyk B, Presber HW, Schroeder C, Feldblum R, Indulen MK. 1981. Occurrence of amantadine- and rimantadine-resistant influenza A virus strains during the 1980 epidemic. *Acta Virol*. 25:395-400.

10. Gubareva LV, Matrosovich MN, Brenner MK, Bethell RC, Webster RG. 1998. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis.* 178:1257-1262.
11. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, Hayden FG, Sugaya N, Kawaoka Y. 2004. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet.* 364:759-765.
12. Memoli MJ, Hrabal RJ, Hassantoufighi A, Eichelberger MC, Taubenberger JK. 2010. Rapid selection of oseltamivir- and peramivir-resistant pandemic H1N1 virus during therapy in 2 immunocompromised hosts. *Clin Infect Dis.* 50:1252-1255.
13. National Institute of Infectious Diseases. 2019. Influenza virus 2018/19 season. *Infectious Agents Surveillance Report.* 40:177-179.
14. Hurt AC, Holien JK, Parker MW, Barr IG. 2009. Oseltamivir resistance and the H274Y neuraminidase mutation in seasonal, pandemic and highly pathogenic influenza viruses. *Drugs.* 69:2523-2531.
15. Iketani S, Mohri H, Culbertson B, Hong SJ, Duan Y, Luck MI, Annavajhala MK, Guo Y, Sheng Z, Uhlemann AC, Goff SP, Sabo Y, Yang H, Chavez A, Ho DD. 2023. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature.* 613:558-564.
16. Gandhi S, Klein J, Robertson AJ, Peña-Hernández MA, Lin MJ, Roychoudhury P, Lu P, Fournier J, Ferguson D, Bakhash SAKM, Muenker MC, Srivathsan A, Wunder EA Jr, Kerantzas N, Wang W, Lindenbach B, Pyle A, Wilen CB, Ogbuagu O, Greninger AL, Iwasaki A, Schulz WL, Ko AI. 2022. De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report. *Nat Commun.*13:1547.

17. Kiso M, Yamayoshi S, Iida S, Furusawa Y, Hirata Y, Uraki R, Imai M, Suzuki T, Kawaoka Y. 2023. In vitro and in vivo characterization of SARS-CoV-2 resistance to ensitrelvir. *Nat Commun.* 14:4231.
18. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:71-78.
19. Castanheira M, Deshpande LM, Mendes RE, Canton Rafael, Sader HS, Jones RN. 2019. Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among Enterobacteriaceae Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open Forum Infect Dis.* 6:S23-S33.
20. Temkin E, Fallach N, Almagor J, Gladstone BP, Tacconelli E, Carmeli Y. 2018. Estimating the number of infections caused by antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 2014: a modelling study. *Lancet Glob Health* 6:e969-e979.
21. Martin A, Fahrbach K, Zhao Q, Lodise T. 2018. Association Between Carbapenem Resistance and Mortality Among Adult, Hospitalized Patients With Serious Infections Due to Enterobacteriaceae: Results of a Systematic Literature Review and Meta-analysis. *Open Forum Infect Dis* 5:ofy150.
22. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. 2008. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:1099-1106.
23. Castanheira M, Doyle TB, Kantro V, Mendes RE, Shortridge D. 2020. Meropenem-Vaborbactam Activity against Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates Collected in U.S. Hospitals during 2016 to 2018. *Antimicrob Agents Chemother.* 64:e01951-19.

24. Ikenoue C, Matsui M, Inamine Y, Yoneoka D, Sugai M, Suzuki S. 2024. The importance of meropenem resistance, rather than imipenem resistance, in defining carbapenem-resistant Enterobacterales for public health surveillance: an analysis of national population-based surveillance. *BMC Infect Dis.* 24:209.
25. Malchione MD, Torres LM, Hartley DM, Koch M, Goodman JL. 2019. Carbapenem and colistin resistance in Enterobacteriaceae in Southeast Asia: Review and mapping of emerging and overlapping challenges. *Int J Antimicrob Agents* 54:381-399.
26. Mohapatra SS, Dwibedy SK, Padhy I. 2021. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *J Biosci.*46:85.
27. Moubareck CA. 2020. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of Resistance. *Membranes (Basel).* 10:181.
28. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. 2014. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 44:8-15.
29. Shields RK, Nguyen MH, Chen L, Press EG, Potoski BA, Marini RV, Doi Y, Kreiswirth BN, Clancy CJ. 2017. Ceftazidime-Avibactam Is Superior to Other Treatment Regimens against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00883-17.
30. Wunderink RG, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rahav G, Mathers AJ, Bassetti M, Vazquez J, Cornely OA, Solomkin J, Bhowmick T, Bishara J, Daikos GL, Felton T, Furst MJL, Kwak EJ, Menichetti F, Oren I, Alexander EL, Griffith D, Lomovskaya O, Loutit J, Zhang S, Dudley MN, Kaye KS. 2018. Effect and Safety of Meropenem-Vaborbactam versus Best-Available Therapy in Patients with Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: The TANGO II Randomized Clinical Trial. *Infect Dis Ther* 7:439-455.
31. McKinnell JA, Dwyer JP, Talbot GH, Connolly LE, Friedland I, Smith A, Jubb AM, Serio AW,

- Krause KM, Daikos GL. 2019. Plazomicin for Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *N Engl J Med* 380:791-793.
32. Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, Ward KW, Hindler JA, Miller SA, Gregson A. 2015. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6605-6607.
 33. Shields RK, McCreary EK, Marini RV, Kline EG, Jones CE, Hao B, Chen L, Kreiswirth BN, Doi Y, Clancy CJ, Nguyen MH. 2020. Early experience with meropenem-vaborbactam for treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Clin Infect Dis.* 71:667-671.
 34. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, Woodford N. 2011. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 66:48-53.
 35. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubinfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellinghan GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. 2017. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 43:304-377.
 36. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, Napolitano LM, O'Grady NP, Bartlett JG, Carratalà J, El Solh AA, Ewig S, Fey PD, File TM Jr, Restrepo MI, Roberts JA, Waterer GW, Cruse P, Knight SL, Brozek JL. 2016. Management of Adults With

Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis.* 63:e61-e111.

37. Lagerbäck P, Khine WW, Giske CG, Tängdén T. 2018. Evaluation of antibacterial activities of colistin, rifampicin and meropenem combinations against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in 24 h in vitro time-kill experiments. *J Antimicrob Chemother* 71:2321-2325.
38. Rodríguez-Avial I, Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Culebras E. 2019. In vitro activity of the next-generation aminoglycoside plazomicin alone and in combination with colistin, meropenem, fosfomycin or tigecycline against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains. *Int J Antimicrob Agents* 46:616-621.
39. Barth N, Ribeiro VB, Zavascki AP. 2015. In vitro activity of polymyxin B plus imipenem, meropenem, or tigecycline against KPC-2-producing Enterobacteriaceae with high MICs for these antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3596-3597.
40. Nath S, Moussavi F, Abraham D, Landman D, Quale J. 2018. In vitro and in vivo activity of single and dual antimicrobial agents against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 73:431-436.
41. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouvelekis LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, Stefanou I, Sypsa V, Miriagou V, Nepka M, Georgiadou S, Markogiannakis A, Goukos D, Skoutelis A. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2322-2328.
42. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, Losito AR, Bartoletti M, Del Bono V, Corcione S, Maiuro G, Tedeschi S, Celani L, Cardellino CS, Spanu T, Marchese A, Ambretti S, Cauda R, Viscoli C, Viale P. 2015. Infections caused by KPC-

- producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 70:2133-2143.
43. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. 2012. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 55:943-950.
 44. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Doi Y. 2012. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2108-2113.
 45. Gutiérrez-Gutiérrez B, Salamanca E, de Cueto M, Hsueh PR, Viale P, Paño-Pardo JR, Venditti M, Tumbarello M, Daikos G, Cantón R, Doi Y, Tuon FF, Karaikos I, Pérez-Nadales E, Schwaber MJ, Azap ÖK, Souli M, Roilides E, Pournaras S, Akova M, Pérez F, Bermejo J, Oliver A, Almela M, Lowman W, Almirante B, Bonomo RA, Carmeli Y, Paterson DL, Pascual A, Rodríguez-Baño J. 2017. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (INCREMENT): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 17:726-734.
 46. Anderson MS, H G Bull, Galloway SM, Kelly TM, Mohan S, Radika K, Raetz CR. 1993. UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase of *Escherichia coli*. The first step of endotoxin biosynthesis is thermodynamically unfavorable. *J Biol Chem* 268:19858-19865.
 47. Cohen F, Aggen JB, Andrews LD, Assar Z, Boggs J, Choi T, Dozzo P, Easterday AN, Haglund CM, Hildebrandt DJ, Holt MC, Joly K, Jubb A, Kamal Z, Kane TR, Konradi AW, Krause KM, Linsell MS, Machajewski TD, Miroshnikova O, Moser HE, Nieto V, Phan T, Plato C, Serio AW, Seroogy J, Shakhmin A, Stein AJ, Sun AD, Sviridov S, Wang Z, Wlasichuk K, Yang W, Zhou

- X, Zhu H, Cirz RT. 2019. Optimization of LpxC Inhibitors for Antibacterial Activity and Cardiovascular Safety. *ChemMedChem* 14:1560-1572.
48. Muri EMF, Nieto MJ, Sindelar RD, Williamson JS. 2002. Hydroxamic acids as pharmacological agents. *Curr Med Chem* 9:1631-1653.
49. Fujita K, Takata I, Yoshida I, Okumura H, Otake K, Takashima H, and Sugiyama H. 2022. TP0586532, a Non-Hydroxamic Acid LpxC Inhibitor, has *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities against Enterobacteriaceae. *J Antibiot (Tokyo)* 75:98-107.
50. Ushiyama F, Takashima H, Matsuda Y, Ogata Y, Sasamoto N, Kurimoto-Tsuruta R, Ueki K, Tanaka-Yamamoto N, Endo M, Mima M, Fujita K, Takata I, Tsuji S, Yamashita H, Okumura H, Otake K, Sugiyama H. 2021. Lead optimization of 2-hydroxymethyl imidazoles as non-hydroxamate LpxC inhibitors: Discovery of TP0586532. *Bioorg Med Chem* 30:115964.
51. Bidne KL, Dickson MJ, Ross JW, Baumgard LH, Keating AF. 2018. Disruption of female reproductive function by endotoxins. *Reproduction*. 155:R169-R181.
52. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2019.
53. Lee YS, Jang KA, Cha JD. 2012. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. *J Biomed Biotechnol* 2012:618081.
54. Diep JK, Jacobs DM, Sharma R, Covelli J, Bowers DR, Russo TA, Rao GG. 2017. Polymyxin B in Combination with Rifampin and Meropenem against Polymyxin B-Resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 61: e02121-16.
55. García-Quintanilla M, Carretero-Ledesma M, Moreno-Martínez P, Martín-Peña R, Pachón J, McConnell MJ. 2015. Lipopolysaccharide loss produces partial colistin dependence and collateral sensitivity to azithromycin, rifampicin and vancomycin in *Acinetobacter baumannii*.

Int J Antimicrob Agents 46:696-702.

56. Chusri S, Villanueva I, Voravuthikunchai SP, Davies J. 2009. Enhancing antibiotic activity: a strategy to control *Acinetobacter* infections. *J Antimicrob Chemother* 64:1203-1211.
57. Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouveleki LS. 2012. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 10:1393-1404.
58. Bax RP, Bastain W, Featherstone A, Wilkinson DM, Hutchison M, Haworth SJ. 1989. The pharmacokinetics of meropenem in volunteers. *J Antimicrob Chemother* 24 Suppl A:311-320.
59. Nutman A, Lellouche J, Temkin E, Daikos G, Skiada A, Durante-Mangoni E, Dishon-Benattar Y, Bitterman R, Yahav D, Daitch V, Bernardo M, Iossa D, Zusman O, Friberg LE, Mouton JW, Theuretzbacher U, Leibovici L, Paul M, Carmeli Y, AIDA Study Group. 2020. Colistin plus meropenem for carbapenem-resistant Gram-negative infections: in vitro synergism is not associated with better clinical outcomes. *Clin Microbiol Infect* 26:1185-1191.
60. Bremmer DN, Bauer KA, Pouch SM, Thomas K, Smith D, Goff DA, Pancholi P, Balada-Llasat JM. 2016. Correlation of Checkerboard Synergy Testing with Time-Kill Analysis and Clinical Outcomes of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Respiratory Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6892-6895.
61. Fujita K, Takata I, Yoshida I, Honma Y, Okumura H, Otake K, Takashima H, Sugiyama H. 2022. Pharmacodynamic target assessment and prediction of clinically effective dosing regimen of TP0586532, a novel non-hydroxamate LpxC inhibitor, using a murine lung infection model. *J Infect Chemother* 28:635-642.
62. Eichenberger EM, Thaden JT. 2019. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)* 8:37.
63. Baroud M, Dandache I, Araj GF, Wakim R, Kanj S, Kanafani Z, Khairallah M, Sabra A, Shehab

- M, Dbaibo G, Matar GM. 2013. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents*. 41:75-79.
64. Zhou Y, Joubran C, Miller-Vedam L, Isabella V, Nayar A, Tentarelli S, Miller A. 2015. Thinking outside the "bug": a unique assay to measure intracellular drug penetration in gram-negative bacteria. *Anal Chem*. 87:3579-3584.
65. Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56:395-411.
66. Fujita K, Takata I, Yoshida I, Takashima H, Sugiyama H. 2022. TP0586532, a non-hydroxamate LpxC inhibitor, reduces LPS release and IL-6 production both in vitro and in vivo. *J Antibiot (Tokyo)* 75:136-145.
67. van Duin D, Doi Y. 2017. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 8:460-469.
68. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi P. 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 360:588-598.
69. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasasmita C, Simões EA, Rudan I, Weber MW, Campbell H. 2010. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375:1545-1555.
70. Hansen CL, Chaves SS, Demont C, Viboud C. 2022. Mortality Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the US, 1999-2018. *JAMA Netw Open*. 5:e220527.

71. Welliver RC. 2003. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr.* 143:S112-S117.
72. Falsey AR, Walsh EE. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 13:371-384.
73. Walsh, E. E., and Hall, C. B. (2015). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Respiratory Syncytial Virus (RSV), 1948–1960.*e3.
74. Agoti CN, Phan MVT, Munywoki PK, Githinji G, Medley GF, Cane PA, Kellam P, Cotten M, Nokes DJ. 2019. Genomic analysis of respiratory syncytial virus infections in households and utility in inferring who infects the infant. *Sci Rep.* 9:10076.
75. Chu HY, Kuypers J, Renaud C, Wald A, Martin E, Fairchok M, Magaret A, Sarancino M, Englund JA. 2013. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus transmission in childcare. *J Clin Virol.* 57:343-350.
76. Homaira N, Rawlinson W, Snelling TL, Jaffe A. 2014. Effectiveness of Palivizumab in Preventing RSV Hospitalization in High Risk Children: A Real-World Perspective. *Int J Pediatr* 2014:571609.
77. Wegner S, Vann JJ, Liu G, Byrns P, Cypra C, Campbell W, Stiles A. 2004. Direct cost analyses of palivizumab treatment in a cohort of at-risk children: evidence from the North Carolina Medicaid Program. *Pediatrics* 114:1612-1619.
78. Guerguerian AM, Gauthier M, Lebel MH, Farrell CA, Lacroix J. 1999. Ribavirin in ventilated respiratory syncytial virus bronchiolitis. A randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 160:829-834.
79. Chung DH, Moore BP, Matharu DS, Golden JE, Maddox C, Rasmussen L, Sosa MI, Ananthan S, White EL, Jia F, Jonsson CB, Severson WE. 2013. A cell based high-throughput screening approach for the discovery of new inhibitors of respiratory syncytial virus. *Virol J.* 10:19.

80. レベトールカプセル インタビューフォーム.
81. Smith EC, Popa A, Chang A, Masante C, Dutch RE. 2009. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS J* 276:7217-7227.
82. Battles MB, McLellan JS. 2019. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nat Rev Microbiol.* 17:233-245.
83. Merz DC, Scheid A, Choppin PW. 1980. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *J Exp Med* 151:275-288.
84. Martín OG, Dopazo MJ, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Breña P, Martínez I, García-Barreno B. 1994. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol.* 68:5448-5459.
85. Cianci C, Yu KL, Combrink K, Sin N, Pearce B, Wang A, Civiello R, Voss S, Luo G, Kadow K, Genovesi EV, Venables B, Gulgeze H, Trehan A, James J, Lamb L, Medina I, Roach J, Yang Z, Zadjura L, Colonno R, Clark J, Meanwell N, Krystal M. 2004. Orally active fusion inhibitor of respiratory syncytial virus. *Antimicrob Agents Chemother* 48:413-422.
86. Douglas JL, Panis ML, Ho E, Lin KY, Krawczyk SH, Grant DM, Cai R, Swaminathan S, Cihlar T. 2003. Inhibition of respiratory syncytial virus fusion by the small molecule VP-14637 via specific interactions with F protein. *J Virol* 77:5054-5064.
87. DeVincenzo JP, Whitley RJ, Mackman RL, Scaglioni-Weinlich C, Harrison L, Farrell E, McBride S, Lambkin-Williams R, Jordan R, Xin Y, Ramanathan S, O'Riordan T, Lewis SA, Li X, Toback SL, Lin SL, Chien JW. 2014. Oral GS-5806 activity in a respiratory syncytial virus challenge study. *N Engl J Med* 371:711-722.
88. Stevens M, Rusch S, DeVincenzo J, Kim YI, Harrison L, Meals EA, Boyers A, Fok-Seang J, Huntjens D, Lounis N, Mari N K, Remmerie B, Roymans D, Koul A, Verloes R. 2018. Antiviral

- Activity of Oral JNJ-53718678 in Healthy Adult Volunteers Challenged With Respiratory Syncytial Virus: A Placebo-Controlled Study. *J Infect Dis* 218:748-756.
89. DeVincenzo J, Tait D, Efthimiou J, Mori J, Kim YI, Thomas E, Wilson L, Harland R, Mathews N, Cockerill S, Powell K, Littler E. 11 Nov 2019. A Randomized, Placebo-Controlled, Respiratory Syncytial Virus Human Challenge Study of the Antiviral Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of RV521, an Inhibitor of the RSV-F Protein. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01884-19.
90. Shanghai Ark Biopharmaceutical Co., Ltd. Ark Biopharmaceutical Announces NMPA Acceptance and Priority Review of New Drug Application for Ziresovir for Treatment of RSV Infection. Press release. Dec. 9th, 2022.
91. Melero JA, Mas V. 2015. The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. *Virus Res* 209:128-135.
92. Zheng X, Gao L, Wang L, Liang C, Wang B, Liu Y, Feng S, Zhang B, Zhou M, Yu X, Xiang K, Chen L, Guo T, Shen HC, Zou G, Wu JZ, Yun H. 2019. Discovery of Ziresovir as a Potent, Selective, and Orally Bioavailable Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Inhibitor. *J Med Chem*. 62:6003-6014.
93. Huang LM, Schibler A, Huang YC, Tai A, Chi H, Chieng CH, Wang JL, Goldbart A, Tang SP, Huang YC, George S, Alabaz D, Bentur L, Su SC, de Bruyne J, Karadag B, Gu F, Zou G, Toovey S, DeVincenzo JP, Wu JZ. 2023. Safety and efficacy of AK0529 in respiratory syncytial virus-infected infant patients: A phase 2 proof-of-concept trial. *Influenza Other Respir Viruses*. 17:e13176.
94. Mackman RL, Sangi M, Sperandio D, Parrish JP, Eisenberg E, Perron M, Hui H, Zhang L, Siegel D, Yang H, Saunders O, Booramra C, Lee G, Samuel D, Babaoglu K, Carey A, Gilbert BE, Piedra PA, Strickley R, Iwata Q, Hayes J, Stray K, Kinkade A, Theodore D, Jordan R, Desai

- M, Cihlar T. 2015. Discovery of an oral respiratory syncytial virus (RSV) fusion inhibitor (GS-5806) and clinical proof of concept in a human RSV challenge study. *J Med Chem.* 58:1630-1643.
95. Yamaguchi-Sasaki T, Tokura S, Ogata Y, Kawaguchi T, Sugaya Y, Takahashi R, Iwakiri K, Abe-Kumasaka T, Yoshida I, Arikawa K, Sugiyama H, Kanuma K. 2020. Discovery of a Potent Dual Inhibitor of Wild-Type and Mutant Respiratory Syncytial Virus Fusion Proteins. *ACS Med Chem Lett* 11:1145-1151.
96. Perron M, Stray K, Kinkade A, Theodore D, Lee G, Eisenberg E, Sangi M, Gilbert BE, Jordan R, Piedra PA, Toms GL, Mackman R, Cihlar T. 2015. GS-5806 Inhibits a Broad Range of Respiratory Syncytial Virus Clinical Isolates by Blocking the Virus-Cell Fusion Process. *Antimicrob Agents Chemother* 60:1264-1273.
97. Yamaguchi-Sasaki T, Tamura Y, Ogata Y, Kawaguchi T, Kurosaka J, Sugaya Y, Iwakiri K, Busujima T, Takahashi R, Ueda-Yonemoto N, Tanigawa E, Abe-Kumasaka T, Sugiyama H, Kanuma K. 2020. Design and Synthesis of 2-(1-Alkylaminoalkyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as New Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 68:345-362
98. Obach RS. 1999. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos.* 27:1350-1359.
99. Hallifax D, Houston JB. 2006. Binding of drugs to hepatic microsomes: comment and assessment of current prediction methodology with recommendation for improvement. *Drug Metab Dispos* 34:724-6; author reply 727.
100. Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, Dennehy MK, Zhan J, Gunduz M, Harriman SP, Berellini G, Rajlic IL, Obach RS. 2013. Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction

- based on in vivo animal pharmacokinetic data, part 1: volume of distribution at steady state. *J Clin Pharmacol* 53:167-177.
101. Tang H, Hussain A, Leal M, Mayersohn M, Fluhler E. 2007. Interspecies prediction of human drug clearance based on scaling data from one or two animal species. *Drug Metab Dispos* 35:1886-1893.
102. Srinivasakumar N, Ogra PL, Flanagan TD. 1991. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEP-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J Virol* 65:4063-4069.
103. Krusat T, Streckert HJ. 1997. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch Virol* 142:1247-1254.
104. Yan D, Lee S, Thakkar VD, Luo M, Moore ML, Plemper RK. 2014. Cross-resistance mechanism of respiratory syncytial virus against structurally diverse entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3441-E3449.
105. Battles MB, Langedijk JP, Furmanova-Hollenstein P, Chaiwatpongsakorn S, Costello HM, Kwanten L, Vranckx L, Vink P, Jaensch S, Jonckers TH, Koul A, Arnoult E, Peeples ME, Roymans D, McLellan JS. 2016. Molecular mechanism of respiratory syncytial virus fusion inhibitors. *Nat Chem Biol* 12:87-93.
106. Andries K, Moeremans M, Gevers T, Willebrords R, Sommen C, Lacrampe J, Janssens F, Wyde PR. 2003. Substituted benzimidazoles with nanomolar activity against respiratory syncytial virus. *Antiviral Res* 60:209-219.
107. Roymans D, De Bondt HL, Arnoult E, Geluykens P, Gevers T, Van Ginderen M, Verheyen N, Kim H, Willebrords R, Bonfanti JF, Bruinzeel W, Cummings MD, van Vlijmen H, Andries K. 2010. Binding of a potent small-molecule inhibitor of six-helix bundle formation requires interactions with both heptad-repeats of the RSV fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*

107:308-313.

108. Morton CJ, Cameron R, Lawrence LJ, Lin B, Lowe M, Luttick A, Mason A, McKimm-Breschkin J, Parker MW, Ryan J, Smout M, Sullivan J, Tucker SP, Young PR. 2003. Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay. *Virology* 311:275-288.
109. Lundin A, Bergström T, Bendrioua L, Kann N, Adamiak B, Trybala E. 2010. Two novel fusion inhibitors of human respiratory syncytial virus. *Antiviral Res* 88:317-324.
110. Douglas JL, Panis ML, Ho E, Lin KY, Krawczyk SH, Grant DM, Cai R, Swaminathan S, Chen X, Cihlar T. 2005. Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2460-2466.
111. Collins PL, Fearn R, Graham BS. 2013. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 372:3-38.
112. Chemaly RF, Dadwal SS, Bergeron A, Ljungman P, Kim YJ, Cheng GS, Pipavath SN, Limaye AP, Blanchard E, Winston DJ, Stiff PJ, Zuckerman T, Lachance S, Rahav G, Small CB, Mullane KM, Patron RL, Lee DG, Hirsch HH, Waghmare A, McKeivitt M, Jordan R, Guo Y, German P, Porter DP, Gossage DL, Watkins TR, Marty FM, Chien JW, Boeckh M. 2020. A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of presatovir for the treatment of respiratory syncytial virus upper respiratory tract infection in hematopoietic-cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 71:2777-2786.
113. Cockerill GS, Angell RM, Bedernjak A, Chuckowree I, Fraser I, Gascon-Simorte J, Gilman MSA, Good JAD, Harland R, Johnson SM, Ludes-Meyers JH, Littler E, Lumley J, Lunn G, Mathews N, McLellan JS, Paradowski M, Peeples ME, Scott C, Tait D, Taylor G, Thom M, Thomas E, Barber CV, Ward SE, Watterson D, Williams G, Young P, Powell K. 2021.

- Discovery of Sisunatovir (RV521), an Inhibitor of Respiratory Syncytial Virus Fusion. *J Med Chem.* 64:3658-3676.
114. McLellan JS, Ray WC, Peeples ME. 2013. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 372:83-104.
115. Stray K, Perron M, Porter DP, Anderson F, Lewis SA, Perry J, Miller M, Cihlar T, DeVincenzo J, Chien JW, Jordan R. 2020. Drug Resistance Assessment Following Administration of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor Presatovir to Participants Experimentally Infected With RSV. *J Infect Dis.* 222:1468-1477.
116. Openshaw PJM, Tregoning JS. 2005. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 18:541-55.
117. Shen C, Zhang Z, Xie T, Ji J, Xu J, Lin L, Yan J, Kang A, Dai Q, Dong Y, Shan J, Wang S, Zhao X. 2020. Rhein Suppresses Lung Inflammatory Injury Induced by Human Respiratory Syncytial Virus Through Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation via NF- κ B Pathway in Mice. *Front Pharmacol* 10:1600.
118. Fukao K, Noshi T, Yamamoto A, Kitano M, Ando Y, Noda T, Baba K, Matsumoto K, Higuchi N, Ikeda M, Shishido T, Akira A. 2019. Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection. *J Antimicrob Chemother.* 74:654-662.
119. ClinicalTrials.gov. NCT04231968.
120. Shanghai Ark Biopharmaceutical Co., Ltd. Ark Biopharmaceutical Announces Positive Results of Phase 3 Study with Ziresovir in Infants and Children Hospitalized with Respiratory Syncytial Virus Infection. Press release. Apr. 7th, 2022.
121. McKimm-Breschkin JL, Jiang S, Hui DS, Beigel JH, Govorkova EA, Lee N. 2018. Prevention and treatment of respiratory viral infections: Presentations on antivirals, traditional therapies

and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference. *Antiviral Res* 149:118-142.

122. Huntjens DRH, Ouwerkerk-Mahadevan S, Brochot A, Rusch S, Stevens M, Verloes R. 2017. Population Pharmacokinetic Modeling of JNJ-53718678, a Novel Fusion Inhibitor for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus: Results from a Phase I, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled First-in-Human Study in Healthy Adult Subjects. *Clin Pharmacokinet* 56:1331-1342.

謝辞

本論文の作成にあたり、御指導と御鞭撻を賜りました北里大学大学薬学部 分子薬理学教室 教授 中原努先生に謹んで厚く御礼申し上げます。また、本論文の審査にあたり、御助言を賜りました北里大学薬学部 微生物薬品製造学教室 教授 大城太一先生、北里大学薬学部 薬剤学教室 教授 前田和哉先生、北里大学薬学部 生化学教室 教授 奥脇暢先生に厚く御礼申し上げます。

本論文作成の機会を与えて頂きました大正製薬株式会社 社長 上原茂氏、ロドニーW. スティーブンス博士、研究本部 副本部長 野田昌邦博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行および本論文の作成にあたり、御指導と御鞭撻を賜りました大正製薬株式会社 学術センター 杉山寛行博士、薬効薬理研究室 室長 小島直季博士、シニアスペシャリスト室 高橋禎介博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、御指導と御協力を頂きました大正製薬株式会社 医薬事業企画部 高田威一郎博士、同 菅谷豊博士、医薬安全管理部 本間佑介博士、研究資源管理部 グループマネージャー 吉永光周氏、高橋記代子博士、舟山夏穂氏、稲谷祥子氏、高島一博士、菊井愛氏、相田友紀氏、村上智子氏、牛山文仁博士に厚く御礼申し上げます。また、本論文の作成にあたり、御支援を頂きました大正製薬株式会社 研究本部 医薬研究センター長 西村友裕氏、医薬事業企画部 副部長 佐藤麻理子博士、同 グループマネージャー 天田英明博士に厚く御礼申し上げます。

これまでの研究活動において、多くの諸先輩、同僚の皆様には、様々な御指導と御協力を頂きました。お世話になりながらも、御名前を言上することが出来なかった多くの方々に、厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行および本論文の作成にあたり、支援してくれた家族に感謝致します。