

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590139

研究課題名(和文) 生理活性天然物をシード化合物とした新規抗生物質の創薬研究

研究課題名(英文) Design, Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Pleuromutilin Derivatives

研究代表者

広川 美視 (HIROKAWA, YOSHIMI)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号：40454582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：既存の抗菌剤に耐性を示す耐性菌の出現が増加傾向にあり、耐性菌罹患による死亡例が報告されるようになってきている。そこで、多剤耐性菌に有効な新規抗菌薬の創製を目指し、担子菌から見いだされたジテルペノイドであるリューロムチリンをシード化合物として、独自のアイデアのもと分子設計を行い、その合成並びに抗菌活性評価を行った。その結果、注射剤として開発可能な程の高い水溶性を持つ化合物を見だし、かつ、黄色ブドウ球菌感受性菌(FDA209P)および耐性菌(KMP9)共に強い抗菌活性を持つ化合物の創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：It is increasing the emergence of drug-resistant bacterial strains that are resistant to marketed antibacterial agents, and increasingly has been reported that death caused by drug-resistant strains. Thus, with the aim of producing new antibacterial agents which have effective for multiple-drug-resistant bacteria, I have achieved study on the synthesis of unique compound which have been designed based on the diterpenoid pleuromutilin, was isolated from basidiomycete species, and have evaluated their antibacterial activities. As a consequence, I found compounds that show equal potent antibacterial activities against *S. aureus* FDA209P and *S. aureus* KMP9, and also have excellent water-soluble that can be developed as an injection.

研究分野：創薬研究、医薬品分子設計、有機化学

キーワード：抗生物質 多剤耐性菌 リューロムチリン

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性菌を起因菌とする院内感染患者の死亡例や、インフルエンザ罹患者が発症する肺炎による死亡例が報告されるようになってきている。その対策の一つとして、交差耐性のない新しい機序を持つ新規抗菌薬の開発が望まれているが、近年、新規抗菌剤の上市がほとんどないことに加え、既存の抗菌薬の不適正使用による多剤耐性菌の発現が増加しているという悪循環に陥っている。最近、抗菌剤の適正使用により、多剤耐性菌の発現を抑制しようとする気運が高まっている。一方、新しい抗菌剤を開発するための一つのアプローチとして、過去に発見されたにも関わらず医薬品としてまだ開発されていない化合物を見直そうとする動きがある。その中で、1951年に担子菌より見出された非常に興味深い5-6-8員環縮環構造を持つ三環系ジテルペノイドのリューロムチリンが候補として上がってきた。この化合物は、これまで多くの研究者により研究されているが、光学活性体の全合成に成功した例はない。またその生理活性は、グラム陽性菌やマイコプラズマに対し *in vitro* において中程度の抗菌力を持つが、*in vivo* 活性が弱い化合物である。しかし、既存の抗菌剤との構造的相違から新しい作用機序を持ち、差別化が可能な抗菌剤として創製可能な候補化合物として期待されている。その構造的特徴は以下の2点に集約できる。ジテルペノイドという非常に脂溶性が高い化合物であること、酸素官能基が3つ存在するのみであるが、そのうち2つの酸素官能基は活性に必須であるため、構造変換可能部位が限られていること、である。

2. 研究の目的

リューロムチリン誘導体は、これまで多くの研究者により数々の誘導体が合成されてきた。しかし、それら多くのリューロムチリン誘導体は、その脂溶性の高さに起因する様々な問題(代謝や安定性など)によりヒトの感染症治療薬としての開発に成功しておらず、貼付剤として上市された医薬品が一つ存在するのみである。そこで、新規抗生物質創製に向けリューロムチリン誘導体の合成研究に着手した。リューロムチリン系の化合物が、リボソームとの相互作用を介して作用が発現するということをヒントに核酸塩基を導入した新規化合物をデザインし、[[1-[3-[2-アミノ-6-(ピペラジン-1-イル)-9H-プリン-9-イル]プロパノイル]ピペリジン-4-イル]チオ]酢酸ムチリン 14-エステル2塩酸塩(1)を合成したところ、リューロムチリン誘導体において克服が困難とされていた水への高い溶解性を持たせることに成功した。また、グラム陽性菌に対し強い抗菌活性を有していることも分かった。そこで、多剤耐性菌に対して感受性菌と同等の強い抗菌活性を持ち、かつ *in vivo* 抗

菌活性においても治療効果が期待できる優れた化合物を見だし、新規抗生物質の創製を目指すことを目標とする。

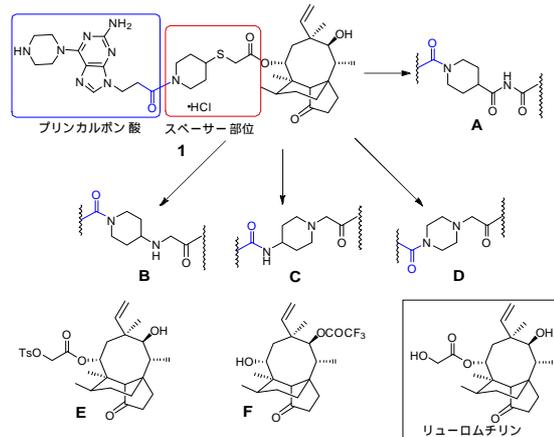
3. 研究の方法

(1) リューロムチリン誘導体の合成

Spacer部位の変換

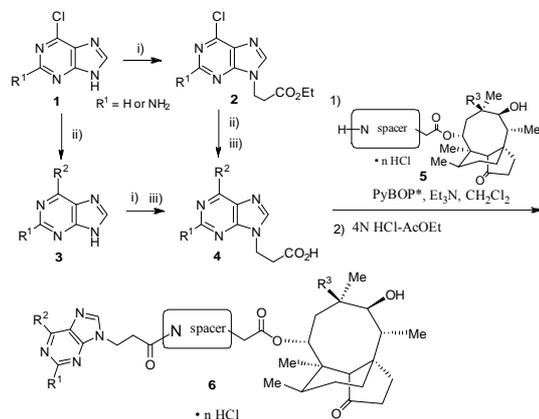
リューロムチリンは、微生物産生物質であるので市販品を購入している。

化合物1からの構造変換としてSpacer部位の変換を図1に示すように行った。



(図1)

まず、ピペリジニルチオエーテル部位を変換するために、N-Boc-ピペリジニル-4-アミン、N-Boc-4-アミノピペリジン、N-Boc-4-ピペラジンとリューロムチリンのトシル化体Eと反応させ、続く酸条件下脱Boc化を行い、高収率でB~Dへ誘導する中間体5を合成した(図2)。Aへ誘導する中間体5は、N-Cbz-ピペリジン-4-カルボン酸から2工程で合成したカルボニルイソシアナートと化合物Fとの反応後、2つの保護基を脱保護して合成した。プリンカルボン酸は、図2に示すように6-クロロプリンおよび2-アミノ-6-クロロプリンから、3工程で得られたプリンカルボン酸4と中間体5とを縮合剤を用いて縮合し、続いて、得られた化合物を塩酸塩6とすることで目的とする誘導体を合成した。ここで、導入する各種アミン



* Benzotriazole-1-ylxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
i) BrCH₂CH₂COOEt, K₂CO₃, DMF, ii) 各種アミン, #P₂NEt, #PrOH, iii) NaOH, EtOH-H₂O

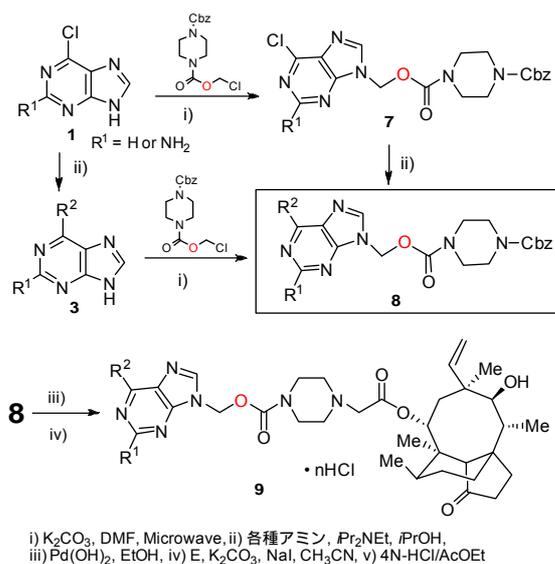
(図2)

は、市販品もしくは市販品から数工程を経て合成した化合物である。

結合様式の変換

次にカルボン酸部とスペーサー部位との結合様式をアミド結合からカルバメート結合に変換した誘導体の合成に着手した。図3に示すように、6-クロロプリンまたは、2-アミノ-6-クロロプリンから、化合物3または7を経由して化合物8の合成を行った。化合物7及び8のようなアリールメチルカルバメート結合を持つ化合物の合成において、汎用されるアルキル化条件や、導入順序を変更して中間体8の合成を検討したが、満足する収率で目的中間体8を得ることができなかった。種々条件を検討したところ、マイクロウェーブ条件下においてほぼ定量的に反応が進行し高収率で目的中間体8を得ることができた。しかし、化合物1から化合物7へは、位置選択的なアルキル側鎖の導入ができず、2位置換体と7位置換体がR¹ = Hの時は約1 : 2、R¹ = NH₂の時は約1 : 7の比率となった。重要中間体8は、接触還元により脱Cbz化した後得られたアミン誘導体を、化合物Eと反応し、さらに酸条件下脱保護して最終目的化合物9へと誘導した。最終生成物9はすべて塩酸塩の固体として得ている。

さらに、プリン環以外の複素環の影響について検討するために、イミダゾール環、ピリミジン環やプリン等価体と考えられている5-アミノ-1H-イミダゾール-4-カルボキサミドを導入した誘導体の合成も行った。



(図3)

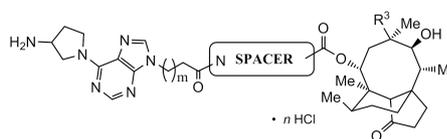
(2) 抗菌活性評価

合成した誘導体6及び9の*in vitro*抗菌活性の測定は、微量液体希釈法により黄色ブドウ球菌感受性菌 (*S. aureus* FDA209P) 及び黄色ブドウ球菌多剤耐性菌 (*S. aureus* KMP9) について最小発育阻害濃度(MIC)を測定した。

測定に使用する各試料は、生理食塩水または、ミリQ水で溶解した。感受性菌並びに多剤耐性菌に強い抗菌活性を示す化合物について、臨床分離株であるMSSA1株に感染させたカイクに、試料をiv投与した際の治療効果試験を外部機関に依頼して*in vivo*抗菌活性を評価した。また、一部の新規合成化合物の*in vivo*抗菌活性評価は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* Smith) 感染マウスを用いて、その活性を評価した。

4. 研究成果

化合物1のプリンカルボン酸に導入している脂肪族ヘテロ環をピペラジンから3-アミノピロリジンに変換した化合物6aの*in vitro*活性および*in vivo*活性が化合物1より向上していることが判明したので、スペーサー部位を変換した化合物の構造活性相関研究を行うにあたって、プリンカルボン酸に導入するヘテロ環を3-アミノピロリジンに固定して行った。その結果、図4に示すように、黄色ブドウ球菌感受性菌に対し化合物6aより強い*in vitro*抗菌活性を示す化合物は得られなかったが、化合物6aより強い*in vivo*抗菌活性を示す化合物6f、6l、6nを見出した。



Compound	R ³	m	n	MIC ^a (mg/mL)		MSSA ^b ED ₅₀ ¹ in mice (mg/kg, iv)	ED ₅₀ / MIC ratio
				MSSA ^b	MRSA ^c		
6a	vinyl	1	1	0.063	0.125	1.47	23
6b	vinyl	0	1	0.125	0.25	1.39	11
6c	vinyl	2	1	0.063	0.125	1.51	24
6d	vinyl	3	1	0.125	0.25	1.85	15
6e	ethyl	1	1	1	4	1.88	0.94
6f	ethyl	0	1	1	4	1.01	1
6g	ethyl	2	1	0.5	2	2.95	5.9
6h	vinyl	1	2	0.5	2	1.75	3.5
6i	vinyl	0	2	0.5	2	2.11	4.2
6j	vinyl	2	2	1	4	3.08	3.1
6k	vinyl	1	1	2	8	2.14	1.1
6l	vinyl	0	1	1	4	1.10	1.1
6m	vinyl	2	1	2	4	>3.13	
6n	vinyl	1	2	0.25	1	0.80	3.2
6o	vinyl	0	2	1	4	2.69	2.7
6p	vinyl	2	2	0.25	1	1.65	6.6
6q ^e	vinyl	1	2	0.5	2	1.72	3.4
1	vinyl	1	2	0.25	0.5	1.86	7.4

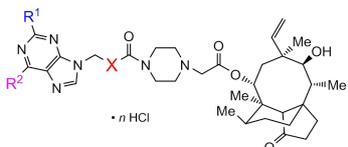
^aMinimum inhibitory concentration (MIC): lowest concentration of compound that inhibits visible growth of the organism. ^bMSSA, methicillin-susceptible *S. aureus* Smith. ^cMRSA, *S. aureus* KMP9. ^dThe efficacy criterion, ED₅₀, was calculated as the dose at which mice survival rate was 50%. Mice were inoculated intraperitoneally. Medication was given intravenously once, 1 h after inoculation.

^e3-(2-amino-6-piperidinyl(purin-9-yl)propanoic acid was introduced.

(図4)

また、新規合成化合物のうち、スペーサー部位がピペリジニルチオエーテル以外の化

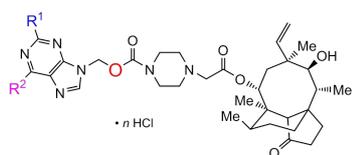
化合物 **6e** - **6q** は、*in vitro* 抗菌活性との比較から、ED₅₀/MIC 値が 0.94 ~ 6.6 と体内動態が良好な化合物であると推定された。強い *in vivo* 抗菌活性を示す 3 化合物のうち、化合物 **6f**、**6l** では、*in vitro* において感受性菌に対する抗菌活性が中程度であり、また、感受性菌に比較して多剤耐性菌への抗菌力が弱いことから、さらなる活性向上を目指す化合物として、スパーサー部位にピペラジン環を持つ化合物 **6n** を選択した。そこで、プリンカルボン酸との結合様式をアミド結合からカルバメート結合へと変換した化合物 **9a** - **b** を合成し、その抗菌活性を調べた (図 5)。



Com pound	R ²	R ¹	X	MIC ^a (μg/mL)			MSSA1 ^d ED ₅₀ ^e in silkworm (mg/kg, iv)	ED ₅₀ / MIC ratio
				MSSA ^b	MRSA ^c	MSSA1 ^d		
6n		H	CH ₂	0.062	2	0.25	4.1 (0.80) ^f	16 (3.2) ^f
9a		H	O	0.016	0.125	0.039	2	51
6r		NH ₂	CH ₂	0.125	2	0.25	7.3 (1.72) ^f	29 (3.4) ^f
9b		NH ₂	O	0.031	0.25	0.25	2.9	12
	MINO ^g			0.063	4	0.4 ^j	3.9 ^j	9.8 ^j
	VCM ^h			0.5	0.5	1 ^j	0.3 ^j	0.3 ^j
	LZD ⁱ			1	2	4 ^j	9 ^j	2.3 ^j

^a Minimum inhibitory concentration (MIC): lowest concentration of compound that inhibits visible growth of the organism. ^b MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus* FDA 209P. ^c MRSA, *S. aureus* KMP9. ^d MSSA1, Clinically isolated *S. aureus* strain. ^e The efficacy criterion, ED₅₀, was calculated as the dose at which silkworm survival rate was 50%. Silkworm were inoculated intravenously. Medication was given intravenously once. ^f The value in Mice inoculated *S. aureus* Smith. Medication was given intravenously once, 1 h after inoculation. ^g MINO; Minocycline. ^h VCM; Vancomycin. ⁱ LZD; Linezolid. ^j The value of Hamamoto, H. et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004, 46, 774.

(図 5)



Com pound	R ²	R ¹	n	MIC ^a (μg/mL)			MSSA1 ^d ED ₅₀ ^e in silkworm (mg/kg, iv)	ED ₅₀ / MIC ratio
				MSSA ^b	MRSA ^c	MSSA1 ^d		
9a		H	2	0.016	0.125	0.039	2	51
9c		H	2	0.063	0.125	0.039	2.6	67
9d		H	2	0.016	0.063			
9e		H	2	0.016	0.125	0.13	3.5	27
9f		H	2	0.031	0.25	0.078	2.9	37
9g		H	2	0.031	0.125			
9h		H	2	0.031	0.125	0.25	8.5	34
9i		H	2	0.016	0.25	0.25	11	44
9j		NH ₂	2	0.031	0.25	0.25	6.9	28
9k		NH ₂	2	0.063	2	0.5	12	24
9b		NH ₂	2	0.031	0.25	0.25	2.9	12
9l		NH ₂	2	0.063	0.5	0.5	15	30

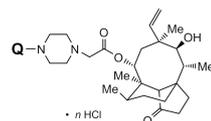
^{a-c} See 図 5.

(図 6)

アミド結合を持つ化合物 **6n**、**6q** に比較し、カルバメート結合を持つ化合物 **9a**、**9b** は、感受性菌では、約 4 倍抗菌活性が向上しており、多剤耐性菌にいたっては、抗菌活性が約 10 倍向上していた。また、臨床から分離された黄色ブドウ球菌感染カイクによる *in vivo* 抗菌活性に関しては、アミドタイプの化合物よりカルバメートタイプの化合物の活性が強く、化合物 **9b** に関しては、ED₅₀/MIC 値が 12 と良好な体内動態を示した。このカイクを用いた評価系で測定された既存の抗菌薬の活性と比較すると、既存の抗菌薬より *in vitro* 抗菌活性が強く、*in vivo* 抗菌活性は同等であるが、体内動態の指標となる ED₅₀/MIC は若干低下していた。一般に、医薬品として開発するためには、ED₅₀/MIC 値が 10 以下であることが望ましいとされている。そこで、新規性があり、多剤耐性菌に強い活性を持ち、且つ、さらなる活性の向上に向けた構造展開を図るため、カルバメート結合を結合様式として選択し、プリンカルボン酸に導入するアミンを種々変換した (図 6)。

化合物 **9a**、**9b** に匹敵する強い抗菌活性を示し、また、強力な治療効果が期待できる化合物 **9c**、**9e**、**9f** を見出した。しかし、体内動態を示す指標である ED₅₀/MIC 値に関しては、**9b** を超える化合物は見出せなかった。

次にプリン環を他の芳香族複素環に変換した化合物 **10** ~ **14** の抗菌活性を調べた (図 7)。



Com pound	Q	n	MIC ^a (μg/mL)			MSSA1 ^d ED ₅₀ ^e in silkworm (mg/kg, iv)	ED ₅₀ / MIC ratio
			MSSA ^b	MRSA ^c	MSSA1 ^d		
10		2	2	32			
11		2	0.25	4			
12		2	0.25	4			
13		1	0.063	0.25	0.16	2.1	13
14		2	0.25	8			

^{a-c} See 図 5

(図 7)

黄色ブドウ球菌感受性菌に対しては、ほぼすべての化合物が高い抗菌活性を示しているが、多剤耐性菌に対する抗菌活性はかなり減弱していた。脂肪族ヘテロ環は導入されていないが、プリン環の等価体と考えられている化合物 **13** が、唯一、多剤耐性菌に対して高い活性を保持していた。この化合物 **13** は、*in vivo* 抗菌活性においても優れた活性がみられ、ED₅₀/MIC 値も 13 と比較的良好な体内動態を示すことが分かった。しかし、この化合物への置換基の導入は困難なため、このタイプの単環複素環を持つ化合物の構造活性相関研究は、今後の検討課題といえる。

今回得た数々の知見から、黄色ブドウ球菌

感受性菌および多剤耐性菌に対して強い *in vitro* 抗菌活性を示し、また、優れた治療効果が期待できる化合物として **9a**、**9b** を見出したことから、当初の目的は達成できたと考える。但し、結合様式をカルバメートにすることで新規性を期待したが、カルバメート結合を持つリューロムチリン誘導体が特許のクレームの範囲内に入っていたことがわかり、特許取得には至らなかったことは残念である。しかし、リューロムチリン誘導体の水溶性に関しては、注射剤として開発可能なほど十分に担保されており、医薬品として開発可能な魅力的な化合物であること、さらなる構造変換により体内動態に優れた化合物を見出せる可能性があること、また、新規性のある化合物を見出しさらなる構造変換が可能であることなど、今後の研究課題としてさらに発展できると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2件)

Y. HIROKAWA, N. MAEZAKI, M. KITAMURA
Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Pleuromutilin Derivatives 53th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
Sep. 10-13, 2013, DENVER, COLORADO, USA

広川美視, 北村麻理愛, 前崎直容

新規リューロムチリン誘導体の合成とその構造活性相関 第31回メディシナルケミストリーシンポジウム
2013年11月20日 11月22日, アステールプラザ(広島県・広島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

広川 美視 (HIROKAWA YOSHIMI)
大阪大谷大学・薬学部・准教授
研究者番号: 40454582