

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07998

研究課題名(和文)トリテルペンを創薬テンプレートとしたデュアルメカニズムの抗HIV薬創製研究

研究課題名(英文) Development of anti-HIV agents with dual mechanisms of actions based on triterpenoids as drug discovery templates

研究代表者

柏田 良樹 (KASHIWADA, Yoshiki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：30169429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ベツリン酸をリードとした抗HIV薬の創製研究により発見された、強力な抗HIV活性を示すHIV成熟阻害作用をメカニズムとするbevirimat及びベツリン誘導体をテンプレートとし、耐性HIVにも効果を示すベツリン酸及びベツリン誘導体創製を目的に研究を行った。ベツリンと逆転写阻害分子であるAZTをつなぐリンカーがエステラーゼで切断されることを期待して化合物、及びbevirimatとAZTの5'以外で縮合したハイブリッド化合物をデザイン、合成し、抗HIV活性評価を行った結果、強力な抗HIV活性を見出した。本結果にもとづき、さらに関連誘導体の合成と抗HIV活性評価を展開している。

研究成果の概要(英文)：Based on our finding of a first-in-class drug candidate as a viral maturation inhibitor, bevirimat [3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-betulinic acid], and potent anti-HIV active 3-O-acyl-(dihydro)betulin derivatives (e.g. 3-O-glutarydihydrobetulin and 3,28-di-O-dimethylsuccinylbetulin), a series of conjugates of 3,28-di-O-acylbetulin derivatives and HIV-reverse transcriptase inhibitor, AZT, with a linker moiety containing glycine, were prepared and evaluated their anti-HIV activity. Several derivatives showed more potent anti-HIV activity than bevirimat. In addition, preliminary study for preparing conjugate of betulinic acid derivative and AZT, where 5'-position of AZT is not involved, resulted in the finding of quite potential anti-HIV agents. Further study is in progress.

研究分野：Natural Product Chemistry

キーワード：HIV 薬剤耐性 トリテルペン ベツリン酸

### 1. 研究開始当初の背景

エイズは、疾病・障害対策研究分野においても重点がおかれる疾病領域である。しかし、「治療満足度別に見た新薬の開発状況」においては、エイズ治療薬は低い数値を示しており、治療効果の高い医薬品開発が求められている。

他の感染症治療薬と同様に、エイズ療法においても薬剤耐性を獲得した HIV の出現とともに、薬剤耐性 HIV による新規感染者の増加が報告されており、先進諸国では薬剤耐性 HIV による新たな感染拡大が危惧されている。このような現状から、薬剤耐性 HIV に対しても有効な新規構造や新奇メカニズムを有する薬物が緊急に求められている。

本研究グループは、ベツリン酸をリードとした抗 HIV 薬の創製研究により発見された、強力な抗 HIV 活性を示す bevirimat [3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-betulinic acid] を発見した。Beverimat は、HIV 成熟阻害をメカニズムとする first-in-class の化合物で、既存抗 HIV 薬とは全く異なるターゲットに作用することから、他の薬剤に耐性を獲得した HIV に対しても有効である。(Fig. 1) 米国において Phase IIb まで臨床試験が行われた。しかしながら、資金的問題から臨床試験が中断しており、再開が期待される。

また、bevirimat の構造活性相関研究として betulinic acid と同一骨格を有するシラカバ樹皮主成分の betulin をリードとした抗 HIV 薬創製研究を展開し、*in vitro* の試験において Beverimat よりも強力な抗 HIV 活性を示す 3-O-glutaryldihydrobetulin を含む各種 betulin 誘導体を発見している。(Fig. 2)

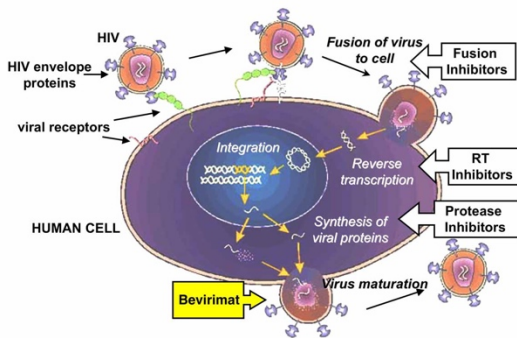


Fig.1. Target of bevirimat on HIV life cycle

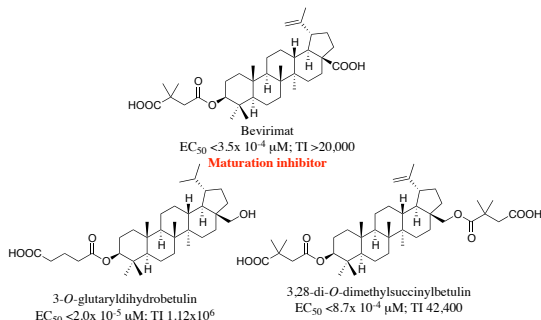


Fig. 2. Structures of bevirimat and related potent anti-HIV betulin derivatives

### 2. 研究の目的

上記研究の展開として、一つの分子から2種の異なるメカニズムを有する抗 HIV 分子が放出されることを期待し、3-O-acyl-betulin 誘導体の 28 位にリンカーを介して AZT を結合させたハイブリッド化合物をデザイン・合成し、抗 HIV 活性を評価したところ、bevirimat とよりも良好な抗 HIV 活性を示す化合物が発見された。しかし、そのメカニズムの検討により、conjugate からは AZT が遊離されていないことが推定された。

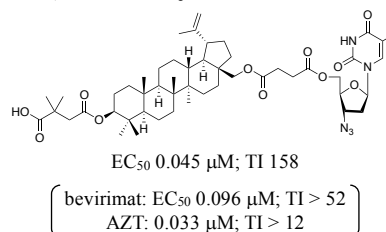


Fig. 3. Structure and anti-HIV activity obtained compound in the previous study

上記本研究の発展として、リンカー部分の構造や結合様式を変更したハイブリッド分子デザインし、より強力な抗 HIV 活性を有するとともに、マルチメカニズムな抗 HIV 分子の創製を目指して本研究を遂行する。

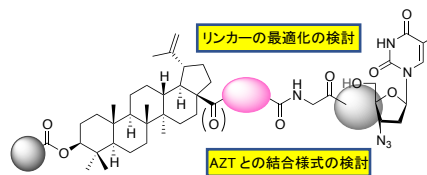


Fig. 4. General structure of target conjugate

### 3. 研究の方法

前述の研究で得られた化合物において、良好な抗 HIV 活性を示すものの、AZT が遊離されないという問題点を解決することを目的に、1) エステラーゼで加水分解されることを期待してリンカーにアミノ酸を組み込む、2) AZT が遊離されなくても AZT の 5'位がリン酸化されることが可能なように、betulin, または betulinic acid 誘導体とを 5'位以外で結合させた conjugate を得るという考えから、以下の3タイプの conjugate を設計した。

**Type 1:** Glycine を組み込んだリンカーを介して betulin 誘導体と AZT の conjugate

**Type 2:** Glycine を組み込んだリンカーを介して AZT のアジド基と betulin 誘導体を縮合させた conjugate

**Type 3:** AZT のピリミジン環にリンカーを導入し、betulin, 又は betulinic acid 誘導体と縮合させた conjugate

これらの3タイプの conjugate を目的化合物として、それぞれの化合物を合成し、それらの抗 HIV 活性を評価した。

#### 4. 研究成果

上記 **Type 1~3** の conjugate を合成し、抗 HIV 活性は、研究協力者に依頼して評価を行った。

##### (1) Type 1

合成した 8 種の conjugate の抗 HIV 活性評価の結果は Table 1 に示す通りであった。以前の研究で得た化合物よりも、リンカーに glycine を組み込み事により、選択性が良好な抗 HIV 化合物が見出された。

Table 1. Anti-HIV activity<sup>a</sup> for compounds of Type 1

Compound	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	TI <sup>d</sup>
1-1	0.045	>20	>454
1-2	0.39	>20	>50.0
1-3	0.061	16	262
1-4	1.7	>19	>11
1-5	0.057	>21	>364
1-6	2.7	>19	>7.1
1-7	0.068	19	277
1-8	0.22	>20	>91
AZT	0.033	>0.37	>12
bevirimat	0.096	>5	>52

<sup>a</sup>Data are mean ± SE from three experiments.

<sup>b</sup>Concentration (μM) that inhibits HIV-1<sub>NL4-3</sub> replication by 50%.

<sup>c</sup>Concentration (μM) which is toxic to 50% of HIV-1<sub>NL4-3</sub> infected MT-4 lymphocytes

<sup>d</sup>TI = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>

##### (2) Type 2

合成した 6 種 conjugate の抗 HIV 活性評価の結果は Table 2 に示す通りであった。類似の化合物の合成とそれらの抗 HIV 活性が検討されているが、同程度の活性であり、期待する抗 HIV 活性は認められなかった。

Table 2. Anti-HIV activity<sup>a</sup> for compounds of Type 2

Compound	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	TI <sup>d</sup>
2-1	0.54	8.81	16.4
2-2	0.50	6.9	13.9
2-3	0.85	>10	>12.2
2-4	0.48	>10	>0.2
2-5	0.09	>10	>119.0
2-6	0.12	>10	>83.3
AZT	0.02	>0.37	>16.1
bevirimat	0.029	>1.7	>58.8

<sup>a</sup>Data are mean ± SE from three experiments.

<sup>b</sup>Concentration (μM) that inhibits HIV-1<sub>NL4-3</sub> replication by 50%.

<sup>c</sup>Concentration (μM) which is toxic to 50% of HIV-1<sub>NL4-3</sub> infected MT-4 lymphocytes

<sup>d</sup>TI = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>

##### (3) Type 3

合成した conjugate 9 種の抗 HIV 活性評価の結果は Table 3 に示す通りであった。

化合物 **3-9** が、EC<sub>50</sub> 0.0077 μM, TI >1388.9 と、AZT、及び bevirimat と比較して強力な抗 HIV 活性で、かつ高い選択性を示した。また、**3-8** も、EC<sub>50</sub> 0.077 μM, TI >476.2 と、比較的良好的な抗 HIV 活性を示した。本結果

から、**Type 3** の conjugate は抗 HIV 活性 betulinic acid 誘導体-AZT conjugate のリードとして期待される。

Table 3. Anti-HIV activity<sup>a</sup> for compounds of Type 3

Compound	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>c</sup>	TI <sup>d</sup>
3-1	0.077	10.4	135
3-2	0.20	10.0	51
3-3	0.30	>10	>38
3-4	0.049	7.1	143
3-5	0.080	>10	>147
3-6	0.15	>10	>71
3-7	1.7	>10	>14
3-8	0.022	>10	>476.2
3-9	0.0077	>10	>1388.9
AZT	0.077	10.4	135
bevirimat	0.20	10.0	51

<sup>a</sup>Data are mean ± SE from three experiments.

<sup>b</sup>Concentration (μM) that inhibits HIV-1<sub>NL4-3</sub> replication by 50%.

<sup>c</sup>Concentration (μM) which is toxic to 50% of HIV-1<sub>NL4-3</sub> infected MT-4 lymphocytes

<sup>d</sup>TI = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>

今回、**Type 1~3** の縮合様式の conjugate を設計し、それぞれの誘導体を合成するとともに、得られた化合物の抗 HIV 活性を評価した。これらのうち、AZT のピリミジン環にリンカーを導入し、betulin、又は betulinic acid 誘導体と縮合させた conjugate が良好な抗 HIV 活性を示した。特に化合物 **3-9** は、EC<sub>50</sub> 0.0077 μM, TI >1388.9 と強力な抗 HIV 活性を示した。また、**3-8** も、比較的良好的な活性を示した。

なお、化合物 **3-8**、**3-9** は、betulinic acid 誘導体との conjugate であり、それ以外は betulin 誘導体の conjugate であった。このことから、本 type の誘導体においては、betulinic acid 誘導体がより良好な抗 HIV 活性を示すことが予想される。

今回の研究では、preliminary な検討しか行うことができなかったが、化合物 **3-8**、**3-9** の構造をもとに、関連誘導体の合成を展開するとともに、それらの抗 HIV 活性評価を行うことにより、さらに強い活性の化合物が発見されるとともに、構造活性相関に関する知見も得ることが期待され、さらに研究を継続している。

また、米国の研究協力者により、化合物 **3-8**、**3-9** の抗 HIV-RT に対する活性の検討がおこなわれている。

#### 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 1 件)

Wada, S.; Tanaka, N.; Chen, C.-H.; Morris-Natsche, S.; Lee, K.-H.; Kashiwada, Y.; Anti-HIV natural products (28): preparation of conjugate for 3-O-acyl betulin derivative and AZT as anti-HIV agents. 2016.7.24. 9<sup>th</sup> Joint

Natural Products Conference, Copenhagen,  
Denmark.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏田 良樹 (KASHIWADA, YOSHIKI)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・  
教授

研究者番号：30169429

(2) 研究分担者

田中 直伸 (TANAKA, NAONOBU)  
徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生  
物資源産業学域)・准教授

研究者番号：40455598

(4) 研究協力者

LEE KUO-HSIUNG

ノースカロライナ大学チャペルヒル校・  
エシエルマン薬学部・教授

Qian Keduo

ノースカロライナ大学チャペルヒル校・  
エシエルマン薬学部・助教

CHEN CHIN-HO

デューク大学・医学部・教授