

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510233

研究課題名（和文）薬剤耐性 HIV 克服を目指した抗 HIV 薬の創製研究

研究課題名（英文）Study on betulin and betulinic acid derivatives aimed at developing anti-HIV agents effective against resistant virus

研究代表者

柏田 良樹 (KASHIWADA YOSHIKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：30169429

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 HIV 成熟阻害作用をメカニズムとし、強力な抗 HIV 活性を示す bevirimat 及びベツリン誘導体等を発見したことに基づき、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。ベツリンに逆転写阻害分子である AZT を縮合させた一連の化合物及び bevirimat と抗 HIV 活性を示すベツリン誘導体を L-leucine を介して縮合した分子を合成し、抗 HIV 活性評価を行った。数種の化合物に bevirimat より強い抗 HIV 活性が認められた。

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, as well as conjugates of 28-leucinyl-bevirimat and acyl-betulin derivatives were prepared and evaluated their anti-HIV activity. Several derivatives showed more potent anti-HIV activity than bevirimat.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：AIDS；薬剤耐性；トリテルペン；ベツリン

## 1. 研究開始当初の背景

AIDS は、政府による「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」においても重点がおかれる疾病領域であり、人間が克服すべき重大疾病である。しかし、「治療満足度別に見た新薬の開発状況」において AIDS 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。

AIDS 治療においても他の感染症と同様、薬剤耐性を獲得した HIV の出現とそれ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とから、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。

本研代表者は、天然物より見いだした betulinic acid をリードとした抗 HIV 薬創製研究により発見した、現在臨床試験中の Bevirimat は、HIV-capsid protein 形成を阻害する HIV 成熟阻害剤に分類される初めての化合物である。既知抗 HIV 薬とは全く異なるターゲットに作用することから、薬剤耐性 HIV に対しても有効で、米国における Phase II が完了し、Myriad Pharmaceutical が次の段階の臨床試験を計画している。また、FDA より優先審査指定も受け、早期に医薬品となることが期待されている。

また、Beverimat 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. 1)

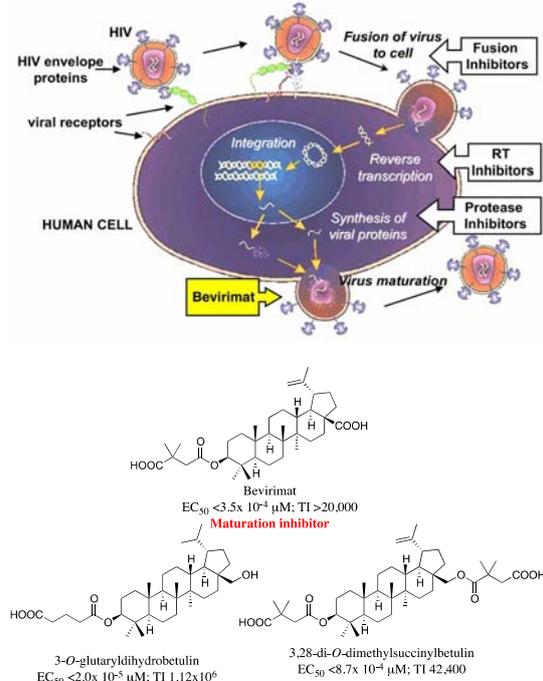


Fig.1. Beverimat and its target on HIV life cycle, and potent anti-HIV betulin derivatives

## 2. 研究の目的

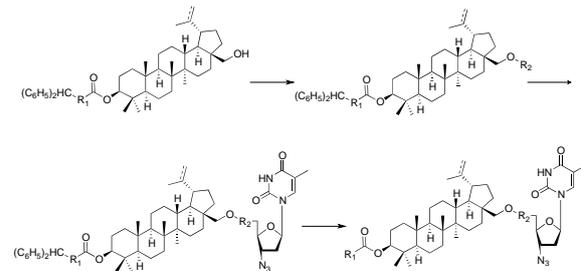
上に述べた新奇メカニズムを有する抗 HIV 活性トリテルペン誘導体の発見及びこれまでの検討で得たトリテルペン誘導体の検討に基づき、抗 HIV 薬の有望なリード化合物である betulinic acid 及び betulin, dihydrobetulin の化学的修飾を行う。

3位を化学修飾したトリテルペン誘導体の 28位に適切な acyl 基を導入し、AIDS 治療薬として使用されている AZT などの逆転写阻害剤を導入した化合物をデザインした。これらの

化合物は AZT を遊離することにより、成熟阻害作用と逆転写酵素阻害作用を示す化合物が遊離することにより、マルチメカニズムな新規抗 HIV 活性化合物が得られることが期待される。適切なスペーサーを介して両分子が結合した化合物の創製を検討する。また、bevirimat の 28 位に L-leucine を縮合させた化合物は HIV 成熟阻害作用と Fusion 阻害作用を示す multi-function な誘導体であることから、L-leucine を介し、bevirimat と betulin 誘導体の合成を行う。これらの誘導体について抗 HIV 活性評価を行う。

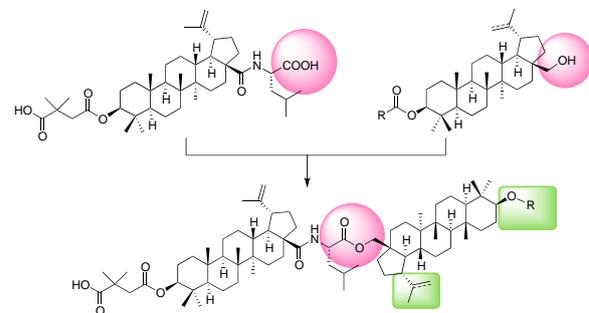
## 3. 研究の方法

(1) これまでの研究によって強力な抗 HIV 活性が認められた種々の 3-O-acyl-betulin 及び dihydrobetulin の acyl 部分のカルボン酸を diphenylmethyl ester で保護し、28 位に種々の dicarboxylic acid を導入した。さらに 28 位の acyl 基と AZT をエステル結合で縮合後、diphenylmethyl ester を脱保護して一連の目的化合物を得た。(Scheme 1)



Scheme 1. Preparation of diacyl-(dihydro)-betulin and AZT conjugates

(2) ベツリン酸の 28 位にアミド結合を介して L-leucine を縮合した化合物に 1-allyl-2,2-dimethylsuccinate を導入した。別に各種カルボン酸部分を保護した acyl 基を 3 位に導入した 3-O-acyl-betulin 及び dihydrobetulin 誘導体を調製した。両者を縮合後、脱保護を行い、一連の化合物を得た。(Scheme 2)



Scheme 2. Preparation of bevirimat and acylbetulin conjugates

上記(1)及び(2)により得られた化合物につ

いて研究協力者である，ノースカロライナ大学 K. H. Lee 教授及びデューク大学 C. H. Chen 教授へ抗 HIV 活性評価を依頼する。

#### 4. 研究成果

(1) 3, 28-di-*O*-acylbetulin 誘導体と AZT を縮合させた誘導体 14 種を合成し (Fig. 2), 抗 HIV 活性評価を行った (Table 1)。

BL-AZT-1~7 に強い抗 HIV 活性 ( $EC_{50}$  0.040 ~ 0.098  $\mu$ M; TI 71~158) が認められ，これらは bevirimat の活性 ( $EC_{50}$  0.096  $\mu$ M; >52) よりも強い又は同定度活性であった。これらの化合物は 3 位に 3,3-dimethylsuccinyl 基を有していた。一方，28 位に導入した 4 種 acyl 基による抗 HIV 活性に違いは認められなかった。

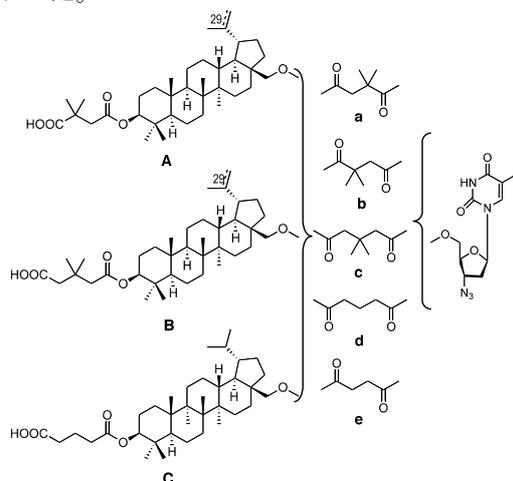


Fig. 2. Structures of betulin-AZT conjugates

Table 1. Anti-HIV activity of betulin-AZT conjugates against HIV-1<sub>NL4-3</sub> infected MT-4 Cells

Compound			IC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	TI
BL-AZT-1	A	a	$\Delta^{29}$ 7.0	<b>0.098</b>	71
BL-AZT-2	A	b	$\Delta^{29}$ 5.4	<b>0.040</b>	135
BL-AZT-3	A	c	$\Delta^{29}$ 8.1	<b>0.063</b>	129
BL-AZT-4	A	d	$\Delta^{29}$ 8.7	<b>0.060</b>	145
BL-AZT-5	A	e	$\Delta^{29}$ 7.1	<b>0.045</b>	158
BL-AZT-6	A	a	9.0	<b>0.087</b>	103
BL-AZT-7	A	b	7.7	<b>0.056</b>	138
BL-AZT-8	A	c	9.0	0.29	31
BL-AZT-9	B	c	$\Delta^{29}$ 7.7	0.18	43
BL-AZT-10	B	c	9.8	0.36	27
BL-AZT-11	C	a	7.2	0.26	28
BL-AZT-12	C	b	8.0	0.073	110
BL-AZT-13	C	c	9.0	0.093	97
BL-AZT-14	C	d	8.5	1.21	7
Bevirimat			> 5	0.096	> 52
AZT			> 37.4	0.027	> 1,358

$EC_{50}$  and  $IC_{50}$  are concentration ( $\mu$ M) that inhibit HIV-1<sub>NL4-3</sub> replication and mock-infected MT-4 cell growth by 50%, respectively;  $TI=IC_{50}/EC_{50}$ ;

しかし，これらの誘導体の抗 HIV 活性は AZT のそれ ( $EC_{50}$  0.027  $\mu$ M; TI >1,358) よりも弱かった。AZT は ribose 部分のリン酸化により逆転写酵素阻害を示すことから，評価を行

っている系において AZT が遊離されず，期待する活性が得られていないことが推定された。

この結果に基づき，AZT がより遊離されやすい誘導体として，betulin の 28 位に導入した acyl 基にさらに L-alanine を amido 結合させた誘導体と AZT を縮合させた化合物をデザインし，それらの合成を行っている。

3-*O*-dimethylsuccinyl 誘導体を基本構造とする数種の目的化合物の合成は達成しており，その他の関連誘導体の合成を行っているところである。今後関連の誘導体合成を行い，抗 HIV 活性評価を行う予定である。

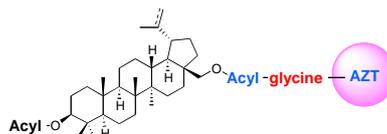


Fig. 3 General structure of another series of betulin-AZT conjugates

(2) Bevirimat 28-L-leucine amide と各種 3-*O*-acyl-betulin 及び-dihydrobetulin を EDC の存在下で縮合を行うと，2 種の異性体が生成した。これは，L-leucine 部分のラセミ化が起こったために生成したものと推定された。異性体の構造はベツリン酸の 28 位に L-leucine 及び D-leucine を縮合した誘導体と生成した異性体の CD スペクトルを比較したところ，良い対応を示したことから，それぞれの異性体の立体を帰属した。

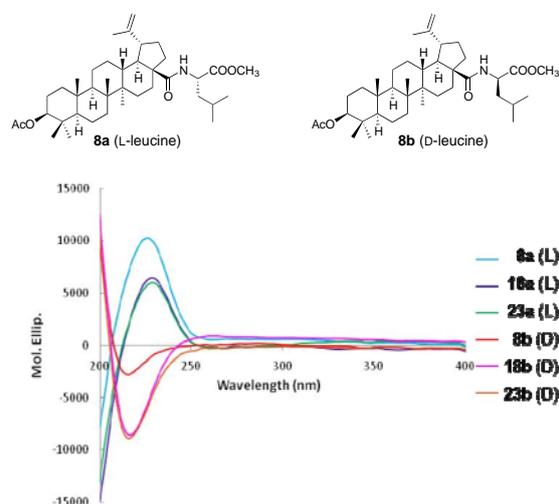


Fig. 3 CD spectra of reference compounds (8a, 8b) and conjugated isomers (18a, 18b, 23a, 23b)

調製した誘導体について抗 HIV 活性評価を行った。誘導体のうち，23a 及び 24a が弱い抗 HIV 活性 (それぞれ  $EC_{50}$  1.01, 6.0  $\mu$ M) を示したのみであった。またこれらの leucine

部分の異性体である **23b** 及び **24b** は殆ど抗 HIV 活性を示さず、また TI も小さかったことから leucine の立体は活性に関与していることが示唆された。

また、合成中間体の 3-*O*-dimethylsuccinyl-28-leucinyl-betulinic acid の方が抗 HIV 活性を示したことから、leucine のカルボン酸部分の修飾は抗 HIV 活性には適当ではなく、両分子が解離するような分子のデザインが必要であることが示唆された。

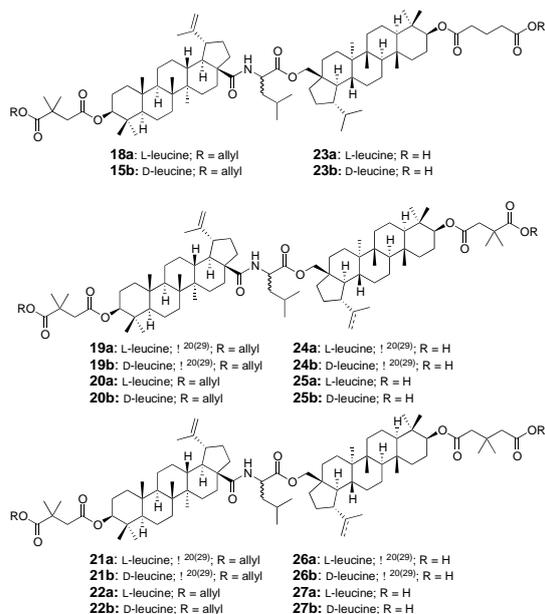


Fig. 4. Structures of 28-leucinyl-bevirimat and 3-*O*-acyl-(dihydro)betulin conjugate

## 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Juan Xiong, Yoshiki Kashiwada, Chin-Ho Chen, Keduo Qian, Susan L. Morris-Natschke, Kuo-Hsiung Lee, and Yoshihisa Takaishi. Conjugates of Betulin Derivatives with AZT as Potent Anti-HIV Agents. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有, 18(17), 2010, 6451–6469.

[学会発表] (計 1 件)

柏田良樹, CONJUGATES OF BEVIRIMAT WITH BETURIN DERIVATIVES AS ANTI-HIV AGENTS. 2011.8.1, 2011 AMERICAN SOCIETY OF PHARMACOGNOSY ANNUAL MEETING, Paradise Point (アメリカ サンディエゴ).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柏田 良樹 (KASHIWADA YOSHIKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：30169429

### (2) 研究分担者

高石 喜久 (TAKAISHI YOSHIHISA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60035558

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (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