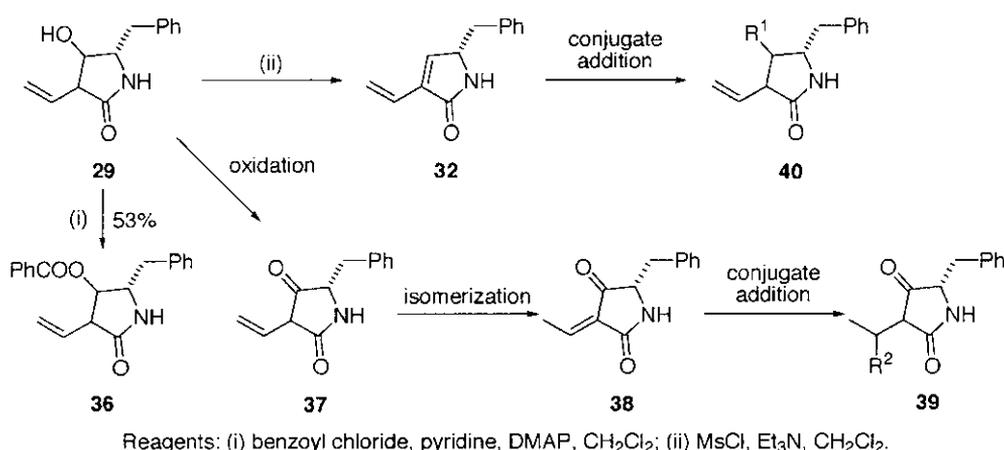


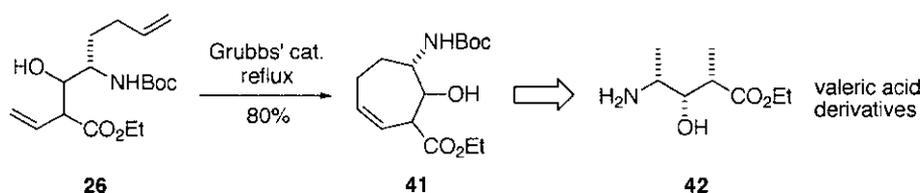
次に、今回合成した γ -ラクタムの創薬テンプレートとしての有用性を示すべく、さらに多様な化合物への誘導の可能性について検討を行うこととした (Scheme 9)。まず、塩化ベンゾイルによる水酸基のアシル化を試みたところ、中程度の収率でベンゾイル化体 **36** が得られた。このことより、水酸基のアシル化による化合物の変換が可能であると考えられる。さらに、**29** の水酸基を酸化することにより得られる **37** は活性水素を有しているため、塩基処理によりアルケンを異性化させることで α,β -不飽和カルボニル化合物 **38** とした後、共役付加反応に付すことにより **39** のタイプの化合物の合成が可能であると考えられる。また上述のジエン体 **32** に対する共役付加反応により **40** のタイプの化合物への誘導も期待できる。しかし、これらの反応については目的物を得るには至らず反応条件等の改善の余地が残るものとなった。

Scheme 9



一方、 α -アミノアルデヒドのアルドール付加体は鎖状 γ -アミノ酸に相当するので、その側鎖を結合させることで環状側鎖を有する γ -アミノ酸を得られると考えた。そこで、**26** を Grubbs らによって開発された第二世代のルテニウム触媒を利用した閉環メタセシス反応に付したところ⁹⁾、ジクロロメタン中、還流下におくことで7員環を有する保護 γ -アミノ酸 **41** を80%収率で得た (Scheme 10)。ここで得られた **41** は、プレオマイシンのリンカードメインを構成するアミノ酸の一つである吉草酸誘導体 **42** の類縁体であり¹⁰⁾、環状構造によりその構造固定化が可能である。

Scheme 10



【結論】

本研究では γ -acetoxy- α,β -enoate を基質として、プロトン源または求電子剤としてカルボニル化合物存在下 SmI_2 を作用させることにより L-Phe-Xaa 型 EADI の合成が可能であることを明らかにした。また、 γ -acetoxy- α,β -enoate から SmI_2 による還元により生成するエノラート体とアミノアルデヒドとのアルドール反応を利用することにより、

多様な環状アミノ酸類縁体の合成が可能であることを明らかにした。本研究は 1-ヒドロキシアシル基を α 位に有するジペプチドイソスターの合成及び官能基を有する環状化合物の合成に有用な知見を与えるものと考えられる。

【実験の部】

L-Phe-Gly 型 EADI 8 の合成

アルゴン雰囲気下、enoate **7** (50.0 mg, 0.128 mmol) の無水 THF-MeOH 溶液 (2 : 1, 2.25 mL) に、0 °C で SmI₂ の 0.1 M THF 溶液 (3.84 mL, 0.384 mmol) を滴下し、5 分間攪拌した。飽和 NH₄Cl 水溶液を 0 °C で加えた後、30 分間攪拌し Et₂O で抽出した。有機層を飽和 NH₄Cl 水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO₄ で乾燥、減圧濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (hexane - AcOEt = 6 : 1) で精製し、還元成績体 **8** (38.6 mg, 収率 90.6%) を白色結晶として得た。**8**: mp 65-66 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -6.25 (c 0.959, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.39 (s, 9 H), 2.83 (d, J = 6.4 Hz, 2 H), 3.02 (d, J = 6.6 Hz, 2 H), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 2 H), 4.35-4.54 (br, 2 H), 5.54 (dd, J = 15.6, 5.1 Hz, 1 H), 5.64 (dt, J = 15.6, 6.6 Hz, 1 H), 7.13-7.32 (m, 5 H); Anal. Calcd for C₁₉H₂₈NO₄: C, 68.44; H, 8.16; N, 4.20. Found C, 68.72; H, 8.16; N, 3.97.

EADI 9 (1 : 1 のジアステレオマーの混合物) の物理恒数及びスペクトルデータ:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.08 (s, 1.5 H), 1.12 (s, 3 H), 1.20 (s, 1.5 H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 1.5 H), 1.27 (t, J = 6.9 Hz, 1.5 H), 1.41 (s, 9 H), 2.7-3.0 (m, 2 H), 2.95 (d, J = 9.2 Hz, 0.5 H), 2.96 (d, J = 9.6 Hz, 0.5 H), 3.20 (br, 1 H), 4.10-4.20 (m, 2 H), 4.41 (br, 1 H), 4.52 (br, 1 H), 5.57 (dd, J = 15.5, 5.8 Hz, 1 H), 5.65 (ddd, J = 15.8, 9.5, 1.0 Hz, 0.5 H), 5.67 (ddd, J = 15.5, 9.5, 1.1 Hz, 0.5 H), 7.14-7.29 (m, 5 H); LRMS (FAB), m/z 392 (MH⁺, base peak), 336, 318, 274, 257, 242, 217, 186, 183, 154, 142, 91, 57, 55; HRMS (FAB), m/z calcd for C₂₂H₃₄NO₅ (MH⁺) 392.2436, found: 392.2441.

L-Phe-Ser 型 EADI 12 の合成 (1 : 1 のジアステレオマーの混合物)

アルゴン雰囲気下、2,6-diphenylphenol (378 mg, 1.54 mmol) の無水 CH₂Cl₂ 溶液 (3.5 mL) に Me₃Al の 0.98 M hexane 溶液 (0.784 mL, 0.768 mmol) を室温に加え、1 時間攪拌した後、*s*-trioxane (23.1 mg, 0.256 mmol) の無水 CH₂Cl₂ 溶液 (0.5 mL) を 0 °C で加え 1 時間攪拌した。enoate **7** (50.0 mg, 0.128 mmol) の無水 THF 溶液 (1 mL) を 0 °C で加えた後、SmI₂ の 0.1 M THF 溶液 (3.84 mL, 0.384 mmol) を 0 °C で加え、30 分間攪拌した。飽和 NH₄Cl 水溶液を 0 °C で加えた後、30 分間攪拌し Et₂O で抽出した。有機層を飽和 NH₄Cl 水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO₄ で乾燥、減圧濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (hexane - AcOEt = 3 : 1) で精製し、 α -ヒドロキシメチル体 **12** (29.5 mg, 収率 64%) をジアステレオマーの混合物として得た。**12**: ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 1.5 Hz), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 1.5 H), 1.40 (s, 4.5 H), 1.41 (s, 4.5 H), 2.72-2.96 (m, 2 H), 3.14-3.27 (m, 1 H), 3.53-3.70 (m, 1 H), 3.70-3.85 (m, 1 H), 4.09-4.21 (m, 2 H), 4.26-4.43 (br, 1 H), 4.43-4.58 (br, 1 H), 5.42-5.66 (m, 2 H), 7.12-7.34 (m, 5 H); LRMS (CI), m/z 364 (MH⁺, base peak), 350, 348, 308, 264, 247, 217, 107, 74, 72, 61; HRMS (CI), m/z calcd for C₂₀H₃₀NO₅ (MH⁺) 364.2123, found: 364.2130.

γラクタム 29 の合成 (4 種のジアステレオマーの混合物)

アルドール付加体 **24** (457 mg, 1.26 mmol) に 0 °C で 4 M HCl/dioxane (4.5 mL) を加え、室温で 1 時間攪拌した。飽和 NaHCO₃ 水溶液を 0 °C で反応液が塩基性になるまで加えた後、10 分間攪拌し AcOEt で抽出した。有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO₄ で乾燥、減圧濃縮した。残渣を CH₂Cl₂ (45 mL) に溶かし 0 °C で AcOH (144 μL, 2.52 mmol) を加え、室温で 20 時間攪拌した。CH₂Cl₂ を減圧濃縮し、残渣に 0 °C で AcOEt、飽和 NaHCO₃ を加えた後、10 分間攪拌し AcOEt で抽出した。有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO₄ で乾燥、減圧濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (hexane - AcOEt = 1 : 3) で精製し、γラクタム **29** (241 mg, 収率 88%) をジアステレオマーの混合物として得た。**29** (4 種のジアステレオマーのうちの 1 つ) : mp 131-133 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -168 (c 0.292, CHCl₃); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.98-2.06 (br, 1 H), 2.90 (dd, *J* = 13.6, 8.7 Hz, 1 H), 3.06 (dd, *J* = 13.6, 6.2 Hz, 1 H), 3.23-3.27 (m, 1 H), 3.86 (ddd, *J* = 8.7, 6.2, 3.7 Hz, 1 H), 4.35-4.39 (m, 1 H), 5.42 (d, *J* = 17.5 Hz, 1 H), 5.51 (d, *J* = 10.6 Hz, 1 H), 5.64 (s, 1 H), 5.95 (ddd, *J* = 17.5, 10.5, 7.1 Hz, 1 H), 7.23-7.35 (m, 5H); LRMS (FAB), *m/z* 218 (MH⁺), 157, 154, 136, 120, 107 (base peak), 91, 55; HRMS (FAB), *m/z* calcd for C₁₃H₁₆NO₂ (MH⁺) 218.1180, found: 218.1171.

【参考文献】

1. (a) Otaka, A.; Watanabe, H.; Mitsuyama, E.; Yukimasa, A.; Tamamura, H.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 285-287; (b) Otaka, A.; Watanabe, H.; Yukimasa, A.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5443-5446.
2. Girard, P.; Namy, J. L.; Kagan, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2693-2698.
3. (a) Fukuzawa, S.; Seki, K.; Tatsuzawa, M.; Mutoh, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1482-1483; (b) Miller, R. S.; Sealy, J. M.; Shabangi, M.; Kuhlman, M. L.; Fuchs, J. R.; Flowers, R. A., II; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7718-7722.
4. Maruoka, K.; Concepcion, A. B.; Murase, N.; Oishi, M.; Hirayama, N.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3943-3949.
5. Xu, M.-H.; Wang, W.; Xia, L.-J.; Lin, G.-Q. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3953-3962.
6. Schwartz, R. E.; Helms, G. L.; Bolessa, E. A.; Willson, K. E.; Giacobbe, R. A.; Tkacz, J. S.; Bills, G. F.; Liesch, J. M.; Zink, D. L.; Curotto, J. E.; Pramanik, B.; Onishi, J. C. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1675-1686.
7. (a) Pearson, W. H. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3527-3530; (b) Marcó, I. E.; Chesney, A. *Synlett* **1992**, 275-278.
8. (a) Weidler, M.; Rether, J.; Anke, T.; Erkel, G. *FEBS Lett.* **2000**, *484*, 1-6; (b) Johansson, M.; Kopcke, B.; Anke, H.; Sterner, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2158-2160.
9. (a) Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953-956; (b) Arisawa, M.; Theeraladanon, C.; Nishida, A.; Nakagawa, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8029-8033.
10. Rishel, M. J.; Hecht, S. M. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2867-2869.

III-IV. SmI_2 を利用したフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成

T140 誘導体の非ペプチド化研究の一環として SmI_2 の 1 電子還元剤としての反応性を活用した (Z)-fluoroalkene 型イソスターの新規合成法について光学活性体の合成法も含めて詳細に検討した。

ペプチドリード医薬品の開発に際し、体内で容易に分解を受けるペプチド結合の安定化は大きな課題の一つである。ペプチドが有する生理活性を保持したまま、ペプチド結合を安定化する手法として、ペプチド結合の非水解性イソスターによる置換が挙げられる。代表的なペプチドイソスターとして、ペプチド結合を E 型アルケンで置換した、(E)-アルケン型ペプチドイソスター¹⁾が考案されているが、このイソスターは、ペプチド結合に対し高い構造的相同性を有する優れたペプチドミメティックである一方で、電気的相同性、すなわち、ペプチド結合が本来有している双極子相互作用および水素結合能が欠失しているという欠点があった。これに対し、ペプチド結合を Z 型フルオロアルケンで置換したフルオロアルケン型イソスター²⁾((Z)-F-Alkene isostere, Figure 1)は、ペプチド結合に対し高い構造的相同性を有しているだけでなく、フッ素の存在により、双極子相互作用および水素結合能も併せ持つと考えられている³⁾。従って、フルオロアルケン型イソスターは、(E)-アルケン型ペプチドイソスターの欠点を克服したイソスターとして、今後医薬品への応用が期待される有用なペプチドミメティックである。

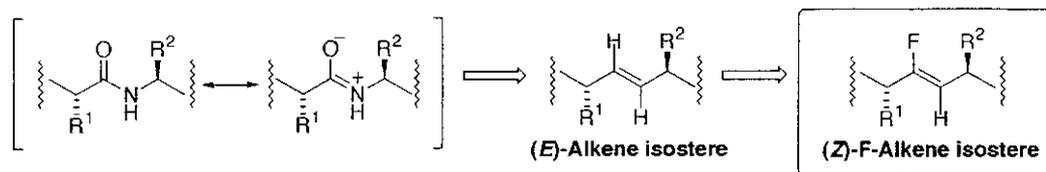


Figure 1. Structures of (E)-Alkene and (Z)-F-Alkene Isosteres.

我々は、これまでに有機銅試薬による γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステル⁴⁾の還元反応を利用したフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成法を開発しており、さらに、この還元反応が single electron transfer (SET) を介して進行することを明らかにしている (Figure 2)⁴⁾。本研究では、 SmI_2 還元⁵⁾の反応機構に着目し、代表的な一電子還元剤である SmI_2 がフルオロアルケン型ジ

ペプチドイソスターの合成に利用可能ではないかと考えた。すなわち、 SmI_2 を γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステルに作用させることで有機銅試薬と同様の還元反応が進行すると予測した。そこで、 SmI_2 を用いたフルオロアルケン型ジペプチド

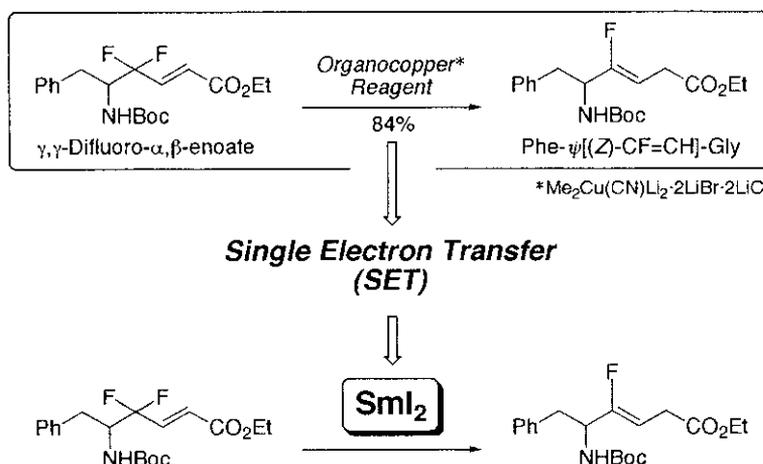


Figure 2. Application of SmI_2 -mediated Reduction to Synthesis of F-Alkene Isostere.

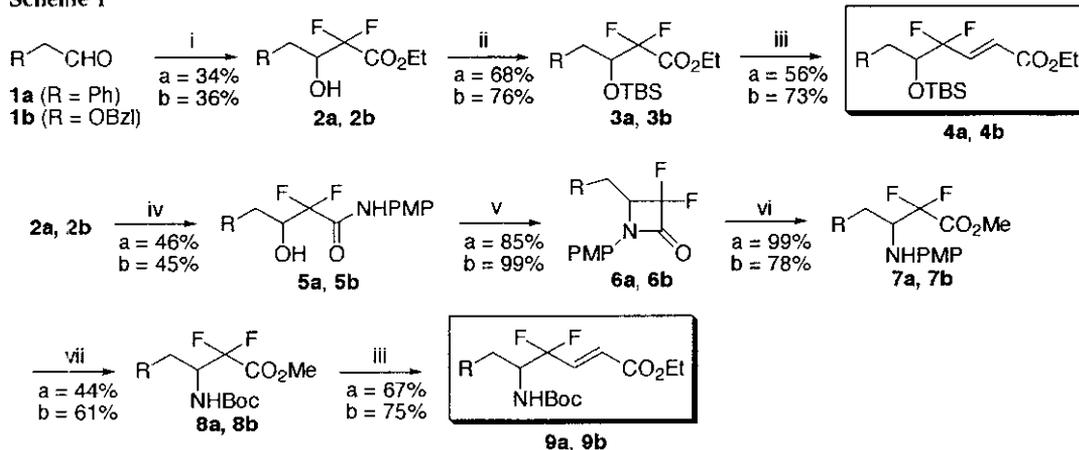
イソスターの合成について検討することとした。

【方法・結果】

1. γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステルの SmI_2 による還元反応についての検討

まず、 SmI_2 による還元反応の基質となる 4 種の γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステル **4a,b**, **9a,b** を合成した(Scheme 1)。アルデヒド **1a,b** をそれぞれ出発原料とし、Reformatsky 反応を行い、 β -ヒドロキシエステル **2a,b** を得た。続いて **2a,b** を TBS 化し、DIBAL-H 還元続く Horner-Emmons 反応に付すことにより α,β -不飽和エステル **4a,b** を得た。一方、**2a,b** のエステル部分をアミドに変換後、分子内光延反応を利用した、水酸基のアミノ基への変換、CAN による PMP (*p*-methoxyphenyl)基の脱保護とこれに続く Boc 化、Horner-Emmons 反応と一連の反応を行い、 α,β -不飽和エステル **9a,b** を得た。

Scheme 1



Reagents: (i) $\text{BrZnCF}_2\text{CO}_2\text{Et}$, THF; (ii) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 ; (iii) DIBAL-H, CH_2Cl_2 -toluene, then $(\text{EtO})_2\text{P(O)CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, LiCl, DIPEA, MeCN; (iv) NaOH, THF- H_2O , then BOP-Cl, *p*-anisidine, DIPEA, CH_2Cl_2 ; (v) Ph_3P , DEAD, THF; (vi) NaOH, THF- H_2O , then H_2SO_4 , MeOH; (vii) CAN, MeCN- H_2O , then $(\text{Boc})_2\text{O}$, THF.

続いて、これらの γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステルの SmI_2 による還元反応について精査し、フルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成への適応性について検討した。同時に、有機銅試薬による還元反応との比較検討も行った。まず基質として δ -シリルオキシ- α,β -不飽和エステル **4a,b** を用いて検討を行った(Table 1)。有機銅試薬を作用させたところ、シリルオキシ基が脱離したジエン体 **11a,b** が副生し、目的の還元体 **10a,b** は低収率でしか得られなかった(Entries 1, 2)。一方、 SmI_2 を作用させたところ、予想に反し、目的の還元体をほとんど得ることができなかった(Entry 3)。低収率の原因として、生成する中間体が不安定であることが予想されたため、プロトン源を添加し中間体を捕捉することを考えた。そこでプロトン源について検討を加えたところ、EtOH を用いた場合には 1,4-還元体 **12a,b** が副生したものの(Entries 4, 5)、*tert*-BuOH を用いると目的の還元体が定量的に得られることを明らかにした(Entries 6, 7)。また、プロトン源は過剰量加える必要はなく、*tert*-BuOH が化学量論量であっても、定量的に反応が進行することを確認した(Entries 8, 9)。*tert*-BuOD を用いた場合には、 α 位に D が導入された還元体 **10b(D)** が生成した(Entry 10)。

次に、基質としてイソスターの前駆体である δ -アミノ- α,β -不飽和エステル **9a,b** を用いて、同様に検討を行った(Table 2)。有機銅試薬または SmI_2 を作用させたところ、両者の条

件とも高収率で、目的の還元体であるイソスター**13a,b**を与えた(Entries 1-4)。なお、 SmI_2 を利用した場合の方が、有機銅試薬を用いた場合より若干高収率で目的物を与えることが分かった。以上の結果から、 γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステルを SmI_2 -*tert*-BuOH 系の還元反応に付すことにより、Xaa-Gly 型のフルオロアルケン型ジペプチドイソスターが定量的に得られることが明らかとなった。

Table 1. Comparative Studies on Cu(I)- and Sm(II)-mediated Reductions for **4a** and **4b**

Entry	Substrate	Reagent (equiv., solvent)	Condition	Products ^a
1	4a	$\text{Me}_2\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2^b$ (4 eq., THF : Et_2O = 4 : 1)	-78 °C, 10 min	10a (59), 11a (10)
2	4b	$\text{Me}_2\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2^b$ (4 eq., THF : Et_2O = 4 : 1)	-78 °C, 10 min	10b (36), 11b (31)
3	4b	SmI_2 (6 eq., THF)	0 °C, 60 min	10b (17) ^c
4	4a	SmI_2 (6 eq., THF : EtOH = 7.7 : 0.5)	0 °C, 60 min	10a (67), 12a (25) ^d
5	4b	SmI_2 (6 eq., THF : EtOH = 7.3 : 0.5)	0 °C, 60 min	10b (78), 12b (15)
6	4a	SmI_2 (6 eq., THF : <i>tert</i> -BuOH = 7.7 : 0.5)	0 °C, 60 min	10a (92)
7	4b	SmI_2 (6 eq., THF : <i>tert</i> -BuOH = 7.3 : 0.5)	0 °C, 60 min	10b (90)
8	4a	SmI_2 (6 eq., THF + 1.5 eq. <i>tert</i> -BuOH)	0 °C, 60 min	10a (94)
9	4b	SmI_2 (6 eq., THF + 1.5 eq. <i>tert</i> -BuOH)	0 °C, 60 min	10b (86)
10	4b	SmI_2 (6 eq., THF : <i>tert</i> -BuOD = 7.3 : 0.5)	0 °C, 60 min	10b(D) (86)

^aIsolated yields (%). ^bIn the presence of Li salts (LiCl and LiBr). ^cNo starting material. ^dThe ratio of **10a** and **12a** was determined by ¹H NMR.

Table 2. Comparative Studies on Cu(I)- and Sm(II)-mediated Reductions for **9a** and **9b**

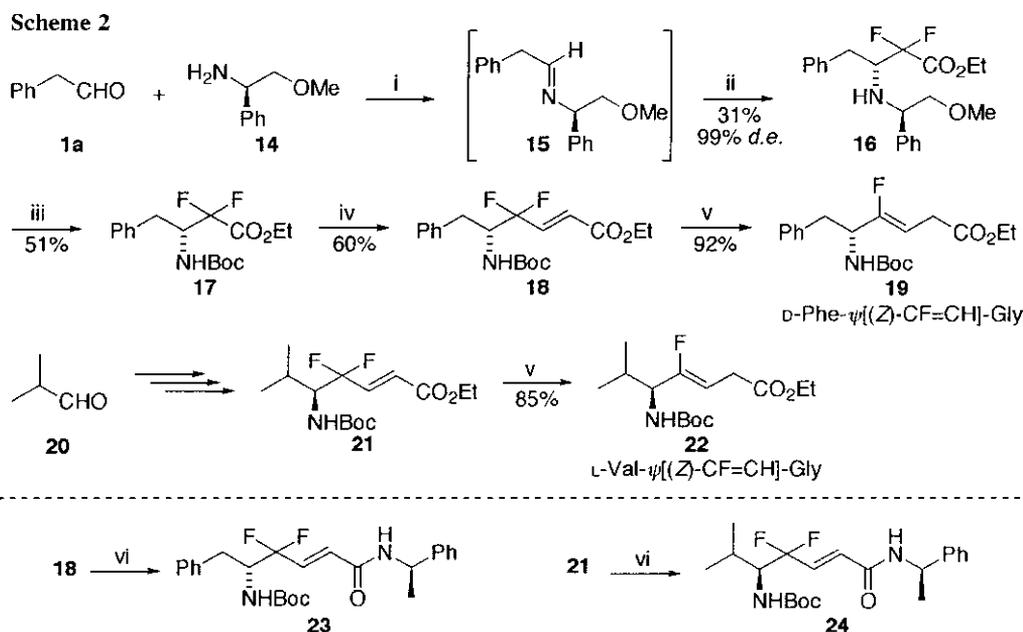
Entry	Substrate	Reagent (equiv., solvent)	Condition	Product ^a
1	9a	$\text{Me}_2\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2^b$ (4 eq., THF : Et_2O = 4 : 1)	-78 °C, 10 min	13a (84)
2	9b	$\text{Me}_2\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2^b$ (4 eq., THF : Et_2O = 4 : 1)	-78 °C, 10 min	13b (89)
3	9a	SmI_2 (6 eq., THF : <i>tert</i> -BuOH = 7.7 : 0.5)	0 °C, 60 min	13a (92)
4	9b	SmI_2 (6 eq., THF : <i>tert</i> -BuOH = 7.3 : 0.5)	0 °C, 60 min	13b (94)

^aIsolated yields (%). ^bIn the presence of Li salts (LiCl and LiBr).

2. 光学活性 Xaa-Gly 型フルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成

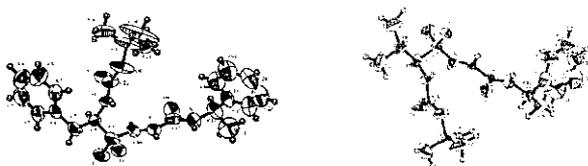
次に、光学活性 Xaa-Gly 型フルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成について検討することとした(Scheme 2)。不斉中心の構築は、光学活性イミンに対する不斉付加反応⁹⁾を利用した。すなわち、アルデヒド **1a** とフェニルグリシン由来のキラルアミン **14** から得られるイミン **15** に対し、Wilkinson 触媒存在下、 Et_2Zn とプロモジフルオロアセテートを作用させることにより、 β -アミノエステル **16** をジアステレオ選択的に合成した。続いて、 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ 存在下、水素化分解による不斉補助基の除去とこれに続く Boc 化により **17**

とし、Horner-Emmons 反応により、 α,β -不飽和エステル **18** を得た。 α,β -不飽和エステル **18** の立体配置は、**18** をけん化し、(*R*)-メチルベンジルアミンと縮合して得られた化合物 **23** の X 線結晶構造解析により決定した(Figure 3)。*tert*-BuOH 存在下、**18** を SmI_2 による還元反応に付すことにより光学活性 *D*-Phe-Gly 型イソスター **19** が高収率で得られた。本合成法



Reagents: (i) MS3A, THF; (ii) $\text{BrCF}_2\text{CO}_2\text{Et}$, Et_2Zn , $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$, THF; (iii) $\text{Pd}(\text{OH})_2$, H_2 , EtOH, then $(\text{Boc})_2\text{O}$, THF; (iv) DIBAL-H, CH_2Cl_2 -toluene, then $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, LiCl, DIPEA, MeCN; (v) SmI_2 , *tert*-BuOH, THF; (vi) 1M LiOH aq., THF, then (*R*)-methylbenzylamine, WSCDI, HOBT, DIPEA, THF.

の一般性を調べるため、Val-Gly 型イソスターの合成についても検討を行った。出発原料としてイソブチルアルデヒドを用いることにより、イソスターの前駆体 **21** を合成した。続いて、**21** を *tert*-BuOH 存在下、 SmI_2 による還元反応に付すことにより光学活性 *L*-Val-Gly 型イソスター **22** を得ることができた。しかしながら前駆体 **21** の立体配置を **18** と同様にキラルアミンを用いて決定したところ、**18** とは異なる立体配置であることが分かった。2つの異なる立体配置の化合物が得られたことは、出発原料であるアルデヒドとアミン **14** から得られるイミンの立体構造の違いに起因するのではないかと考えられる(Figure 4)。イミン **15** からは、亜鉛試薬が存在する条件下、亜鉛配位体 **25a** あるいは **25b** が形成される。ここで熱力学的あるいは速度論的要因のいずれであるかは不明であるが、**25a** が反応中間体となり *Si* 面からの求核攻撃が起こり、観察されたような選択性が発現しているものと考えられる。一方、イソブチルアルデヒド由来イミン **26** では、**26b** が熱力学的に安定となり、*Re* 面からの攻撃を受けると考えられる。



23 **24**
Figure 3. Crystal Structures of **23** and **24**

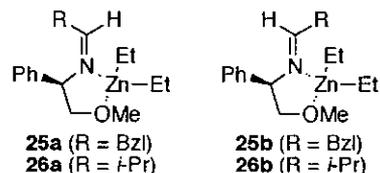
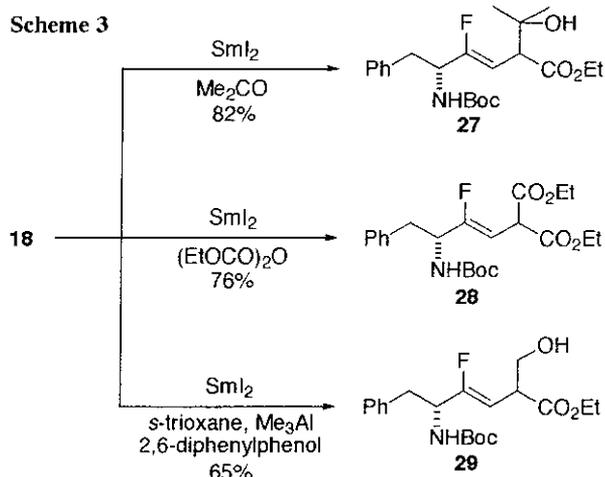


Figure 4. Plausible Transition State

3. α 位への置換基導入についての検討

Xaa-Gly 型に限らず、様々なアミノ酸側鎖に対応するイソスターの合成を目的として、 α 位への置換基導入について検討することとした。プロトンソースに代え、アルキルハライド、およびカルボニル化合物のような求電子剤存在下、 SmI_2 を作用させることで、 α 位への置換基導入を試みた。しかしながら各種アルキルハライド (BnBr , $i\text{-PrCl}$, $i\text{-PrBr}$) 存在下では、目的とする α 置換体は全く得られなかった。一方、

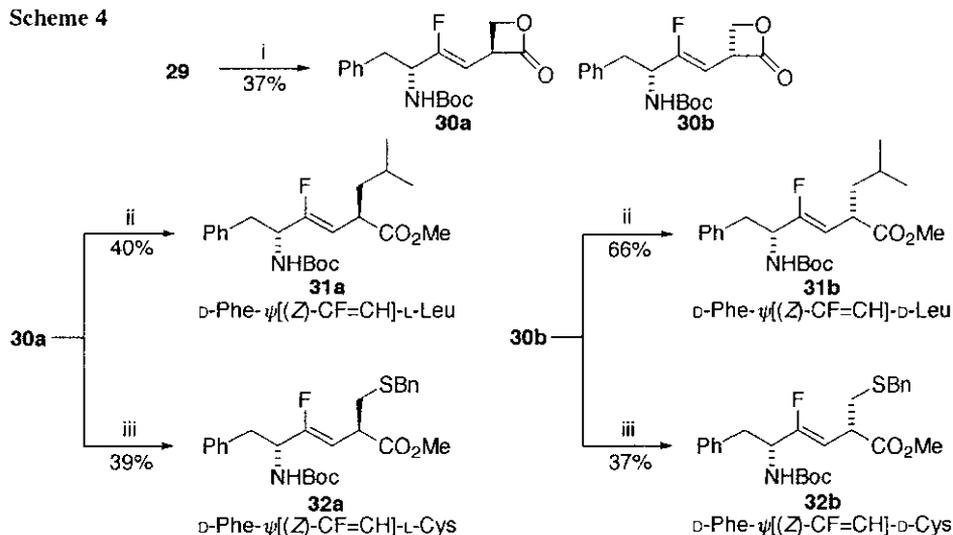
Scheme 3



カルボニル化合物存在下では、効率よく α 置換体を得ることができた(Scheme 3)。アセトン存在下では、アセトンがアルドール付加した化合物 **27** が収率良く得られ、ジエチルジカーボネート存在下ではジエステル体 **28** が得られた。 Me_3Al と 2,6-ジフェニルフェノールの複合体存在下、トリオキサンから反応系内でホルムアルデヒドを発生させるという手法を利用することにより⁶⁾、ヒドロキシメチル基が導入された化合物 **29** を得た。

続いて、 α 位置換基の多様性をさらに増やすため、 β -ヒドロキシエステル **29** の水酸基の官能基変換について検討した(Scheme 4)。 β -ヒドロキシエステル **29** をけん化した後、分子内光延反応に付すことにより、 β -ラクトンへと変換し、ジアステレオマーである **30a,b** をフラッシュカラムクロマトグラフィーにより分離した。続いてラクトン **30a,b** それぞれに対し、ソフトな求核剤によるラクトン環の開環反応を試みた⁷⁾。ラクトンを求核剤で処理することで生成したカルボン酸を TMSCHN_2 によってメチルエステルへと変換した後に化合物を単離した。求核剤としてイソプロピル Grignard 試薬由来の有機銅試薬を用いたところ、Phe-Leu 型イソスター**31a,b** を中程度の収率で得た。また、ベンジルメルカプタンを求核剤として用いることにより、Phe-Cys 型イソスター**32a,b** を合成した。得られた

Scheme 4

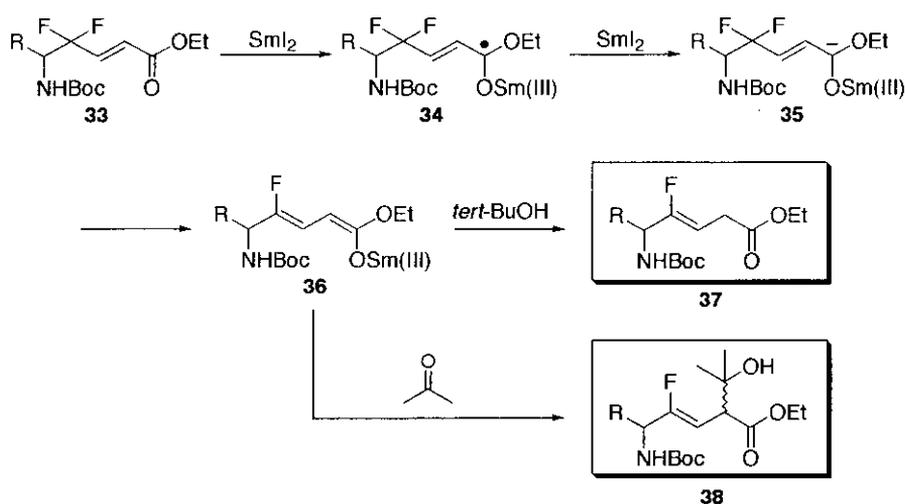


Reagents: (i) 1M LiOH aq., THF, then Ph_3P , DEAD, THF; (ii) $i\text{-PrMgCl}$, $\text{CuBr}\cdot\text{SMe}_2$, Me_2S , THF, then TMSCHN_2 , MeOH, benzene; (iii) BnSH , DMF, then TMSCHN_2 , MeOH, benzene.

イソスターの α 位の絶対配置は、当研究室で以前に報告した α -アルキル β,γ -不飽和エステルの立体配置決定法⁸⁾により決定した。すなわち、CDスペクトル上 210 nm ~ 220 nm 付近において、**31a**, **32a** は負のコットン効果が得られたため(D,L)型、**31b**, **32b** は正のコットン効果が得られたため、(D,D)型であると判断した。

SmI_2 による還元反応の推定反応機構を Scheme 5 に示した。まず、 Sm(II) から不飽和エステル **33** へ一電子移動が起こり、ラジカル中間体 **34** が生成する。さらに、 Sm(II) から中間体 **34** への一電子移動によりアニオン中間体 **35** が生成した後、フッ素が脱離し Sm(III) ジエノラート **36** が生成する。ここで、プロトンソース存在下であれば、還元体 **37** が生成し、カルボニル化合物のような求電子剤存在下であれば、 α -アルキル化体が生成するものと考えられる。

Scheme 5



【結論】

γ,γ -ジフルオロ- α,β -不飽和エステルの SmI_2 による還元反応について精査し、*tert*-BuOH 存在下では、定量的に Xaa-Gly 型フルオロアルケン型ジペプチドイソスターが得られ、カルボニル化合物のような求電子剤存在下では、 α 位に置換基を有するイソスターが得られることを明らかにした。また、光学活性イミンに対する不斉付加反応を利用し、光学活性 Xaa-Gly (or Leu, Cys) 型フルオロアルケンイソスターの合成に成功した。本研究成果は、種々の含フッ素ペプチドミメティックの合成に有用な知見を与えるものと判断する。

【実験の部】

SmI_2 を用いた Xaa-Gly 型フルオロアルケンイソスター合成の一般法

アルゴン雰囲気下、Sm (300 mg, 2.0 mmol)の無水 THF 懸濁液 (5 mL)に、 CH_2I_2 (80 μl , 1.0 mmol)の無水 THF 溶液 (5 mL)を室温で滴下し、1 時間攪拌した。アルゴン雰囲気下、 α,β -不飽和エステル **9b** (40 mg, 0.100 mmol)の THF-*tert*-BuOH 溶液 (3:1, 2 mL)に、上記の SmI_2 の THF 溶液 (0.1 M, 6.0 mL, 0.600 mmol)を 0 °C で滴下した。1 時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え Et_2O で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水 MgSO_4 で乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し化合物 **13b** (36 mg, 収率 94%)を無色の油状物質として得た。**13b**: $^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CDCl_3)

δ 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 3.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.55-3.66 (m, 2H), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.43 (br, 1H), 4.54 (s, 2H), 5.05 (br, 1H), 5.12 (dt, $J = 36.3, 7.0$ Hz, 1H), 7.28-7.39 (m, 5H). LRMS (FAB) m/z , 382 (MH^+ , base peak), 326, 282, 280, 218, 204, 160, 91, 57. HRMS (FAB) m/z , calcd for $C_{20}H_{29}FNO_5$ (MH^+): 382.2030; found: 382.2039.

D-Phe-Gly 型フルオロアルケンイソスター 19 のスペクトルデータおよび物理恒数

19: mp 60-61 °C; $[\alpha]^{20}_D -8.8$ ($c = 0.80$, $CHCl_3$); 1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$) δ 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 2.94 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.09 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.48 (br, 1H), 4.67 (br, 1H), 4.88 (dt, $J = 36.3, 7.1$ Hz, 1H), 7.15-7.33 (m, 5H). Anal. Calcd for $C_{19}H_{26}FNO_4$: C, 64.94; H, 7.46; N, 3.99. Found: C, 64.69; H, 7.40; N, 3.77.

L-Val-Gly 型フルオロアルケンイソスター 22 のスペクトルデータおよび物理恒数

22: $[\alpha]^{21}_D -30.5$ ($c = 1.02$, $CHCl_3$); 1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$) δ 0.94 (d, $J = 2.0$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 2.0$ Hz, 3H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.83-1.98 (m, 1H), 3.09-3.17 (m, 2H), 3.90-4.07 (m, 1H), 4.14 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.72 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.98 (dt, $J = 36.6, 7.1$ Hz, 1H). LRMS (FAB) m/z , 304 (MH^+ , base peak), 248, 204, 187, 160, 139, 57. HRMS (FAB) m/z , calcd for $C_{15}H_{27}FNO_4$ (MH^+): 304.1924; found: 304.1935.

D-Phe-Ser 型フルオロアルケンイソスター 29 の合成

アルゴン雰囲気下、室温で 2,6-diphenylphenol (800 mg, 3.25 mmol)の無水 CH_2Cl_2 溶液 (8 mL)に Me_3Al の hexane 溶液 (1.02 M, 1.59 mL, 1.62 mmol)を滴下した。1 時間攪拌した後、反応溶液に、*s*-trioxane (48 mg, 0.541 mmol)の無水 CH_2Cl_2 溶液 (2 mL)を 0 °C で滴下した。一時間後、 α,β -不飽和エステル **18** (100 mg, 0.271 mmol)の THF 溶液 (2 mL)と上記と同様の方法で調製した SmI_2 の THF 溶液 (0.1 M, 8.1 mL, 0.812 mmol)を順次、0 °C で加えた。1 時間後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え Et_2O で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水 $MgSO_4$ で乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し化合物 **29** (67 mg, 収率 65%)のジアステレオマー混合物を無色の油状物質として得た。**29**: 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 1.5H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 1.5H), 1.40 (s, 4.5H), 1.42 (s, 4.5H), 2.86-3.00 (m, 2H), 3.52-3.63 (m, 2H), 3.65-3.68 (m, 0.5H), 3.71-3.76 (m, 0.5H), 4.08-4.20 (m, 2H), 4.46 (br, 1H), 4.63-4.76 (br, 1H), 4.70 (dd, $J = 37.0, 9.3$ Hz, 0.5H), 4.76 (dd, $J = 36.4, 9.6$ Hz, 0.5H), 7.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.21-7.32 (m, 3H). LRMS (FAB) m/z , 382 (MH^+ , base peak), 326, 282, 245, 235, 206, 190, 160, 144, 120, 91, 57. HRMS (FAB) m/z , calcd for $C_{20}H_{29}FNO_5$ (MH^+): 382.2030; found: 382.2023.

D-Phe-*L*-Leu 型フルオロアルケンイソスター 31a のスペクトルデータおよび物理恒数

31a: $[\alpha]^{25}_D -17.5$ ($c = 0.46$, $CHCl_3$); $\Delta\epsilon = -2.34$ (214 nm, isooctane); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H), 1.26-1.54 (m, 3H), 1.40 (s, 9H), 2.92 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.50 (br, 1H), 3.60 (s, 3H), 4.45 (br, 1H), 4.63 (dd, $J = 36.3, 10.1$ Hz, 1H), 4.65 (br, 1H), 7.13-7.30 (m, 5H). LRMS (FAB) m/z , 394 (MH^+ , base peak), 392, 338, 294, 277, 246, 202, 197, 91, 57. HRMS (FAB) m/z , calcd for $C_{22}H_{33}FNO_4$ (MH^+): 394.2393; found: 394.2403.

D-Phe-*D*-Leu 型フルオロアルケンイソスター 31b のスペクトルデータおよび物理恒数

数

31b: $[\alpha]_D^{23} +33.4$ ($c = 0.69$, CHCl_3); $\Delta\epsilon = +3.01$ (217 nm, isooctane); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (t, $J = 5.6$ Hz, 6H), 1.15-1.30 (m, 3H), 1.41 (s, 9H), 2.88 (dd, $J = 13.7, 8.1$ Hz, 1H), 2.95 (br, 1H), 3.43-3.51 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 4.46 (br, 1H), 4.60 (dd, $J = 36.2, 10.1$ Hz, 1H), 4.70 (br, 1H), 7.13-7.30 (m, 5H). LRMS (FAB) m/z , 394 (MH^+ , base peak), 392, 338, 294, 277, 246, 202, 197, 91, 57. HRMS (FAB) m/z , calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{FNO}_4$ (MH^+): 394.2393; found: 394.2387.

D-Phe-L-Cys 型フルオロアルケンイソスター **32a** のスペクトルデータおよび物理恒数

32a: $[\alpha]_D^{25} +10.9$ ($c = 0.092$, CHCl_3); $\Delta\epsilon = -2.69$ (209 nm, isooctane); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.39 (s, 9H), 2.45 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H), 2.67 (dd, $J = 13.2, 8.3$ Hz, 1H), 2.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.55-3.76 (m, 3H), 3.64 (s, 3H), 4.47 (br, 1H), 4.62 (br, 1H), 4.64 (dd, $J = 35.4, 10.0$ Hz, 1H), 7.10-7.32 (m, 10H). LRMS (FAB) m/z , 474 (MH^+ , base peak), 396, 374, 357, 326, 282, 247, 213, 181, 137, 91, 57. HRMS (FAB) m/z , calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{FNO}_4\text{S}$ (MH^+): 474.2114; found: 474.2109.

D-Phe-D-Cys 型フルオロアルケンイソスター **32b** のスペクトルデータおよび物理恒数

32b: $[\alpha]_D^{25} +68.5$ ($c = 0.15$, CHCl_3); $\Delta\epsilon = +1.31$ (217 nm, isooctane); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.40 (s, 9H), 2.33 (dd, $J = 13.4, 6.1$ Hz, 1H), 2.52-2.61 (m, 1H) 2.87-2.94 (m, 2H), 3.59-3.70 (m, 3H), 3.68 (s, 3H), 4.45 (br, 1H), 4.64 (dd, $J = 35.5, 9.9$ Hz, 1H), 4.68 (br, 1H), 6.99-7.34 (m, 10H). LRMS (FAB) m/z , 474 (MH^+ , base peak), 396, 374, 357, 326, 282, 247, 213, 181, 137, 91, 57. HRMS (FAB) m/z , calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{FNO}_4\text{S}$ (MH^+): 474.2114; found: 474.2121.

【参考文献】

- (a) Ibuka, T.; Habashita, H.; Otaka, A.; Fujii, N.; Oguchi, Y.; Uehara, T.; Yamamoto, Y. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4370-4382. (b) Kessler, H.; Kranz, M. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5359-5362.
- (a) Allmendinger, T.; Furet, P.; Hungerbuhler, E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7297-7300. (b) Allmendinger, T.; Felder, E.; Hungerbuhler, E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7301-7304. (c) Boros, L. G.; De Corte, B.; Gimi, R. H.; Welch, J. T.; Wu, Y.; Handschumacher, R. E. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6033-6036. (d) Bartlett, P. A.; Otake, A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3107-3111. (e) Welch, J. T.; Lin, J. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 6033-6036.
- (a) Abraham, R. J.; Ellison, S. L. R.; Schonholzer, P.; Thomas, W. A. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2101-2110. (b) Wipf, P.; Henninger, T. C.; Geib, S. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6088-6089.
- (a) Otaka, A.; Watanabe, H.; Mitsuyama, E.; Yukimasa, A.; Tamamura, H.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 285-287. (b) Otaka, A.; Watanabe, H.; Yukimasa, A.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5443-5446.
- Honda, T.; Wakabayashi, H.; Kanai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 307-308.
- Maruoka, K.; Concepcion, A. B.; Murase, N.; Oishi, M.; Hirayama, N.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3943-3949.
- (a) Arnold, L. D.; Kalantar, T. H.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7105-7109. (b) Arnold, L. D.; Drover, J. C. G.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4649-4659.
- Ibuka, T.; Habashita, H.; Funakoshi, S.; Fujii, N. *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1*, 389-394.

IV. 多剤耐性株に有効な HIV プロテアーゼ阻害剤の同定とこれを基にした完全非ペプチド性阻害剤の創出

現在、HIV 感染症及びエイズの臨床において逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を 2 剤及び 3 剤組み合わせて用いる多剤併用療法 (HAART) が導入され、治療効果の向上に大きな成果をあげている。しかし、HAART によってすべての問題が解決されたわけではなく、多剤耐性株の出現等の問題が残されている。また、プロテアーゼ阻害剤は、その多くがペプチド性化合物であるため細胞膜の透過性が低く、临床上では大量の投与を必要とし、副作用の発現や高価な治療費といった問題も深刻である。そこで、我々はまず、既存の HIV プロテアーゼ阻害剤の構造ユニットを基にした combinatorial design により、多剤耐性株にも有効な新規プロテアーゼ阻害剤を創出しようとした。さらに、得られた阻害剤を基に分子変換を行い、完全に非ペプチド化し、高い細胞膜透過性と生体内安定性を有するプロテアーゼ阻害剤への誘導を試みた。

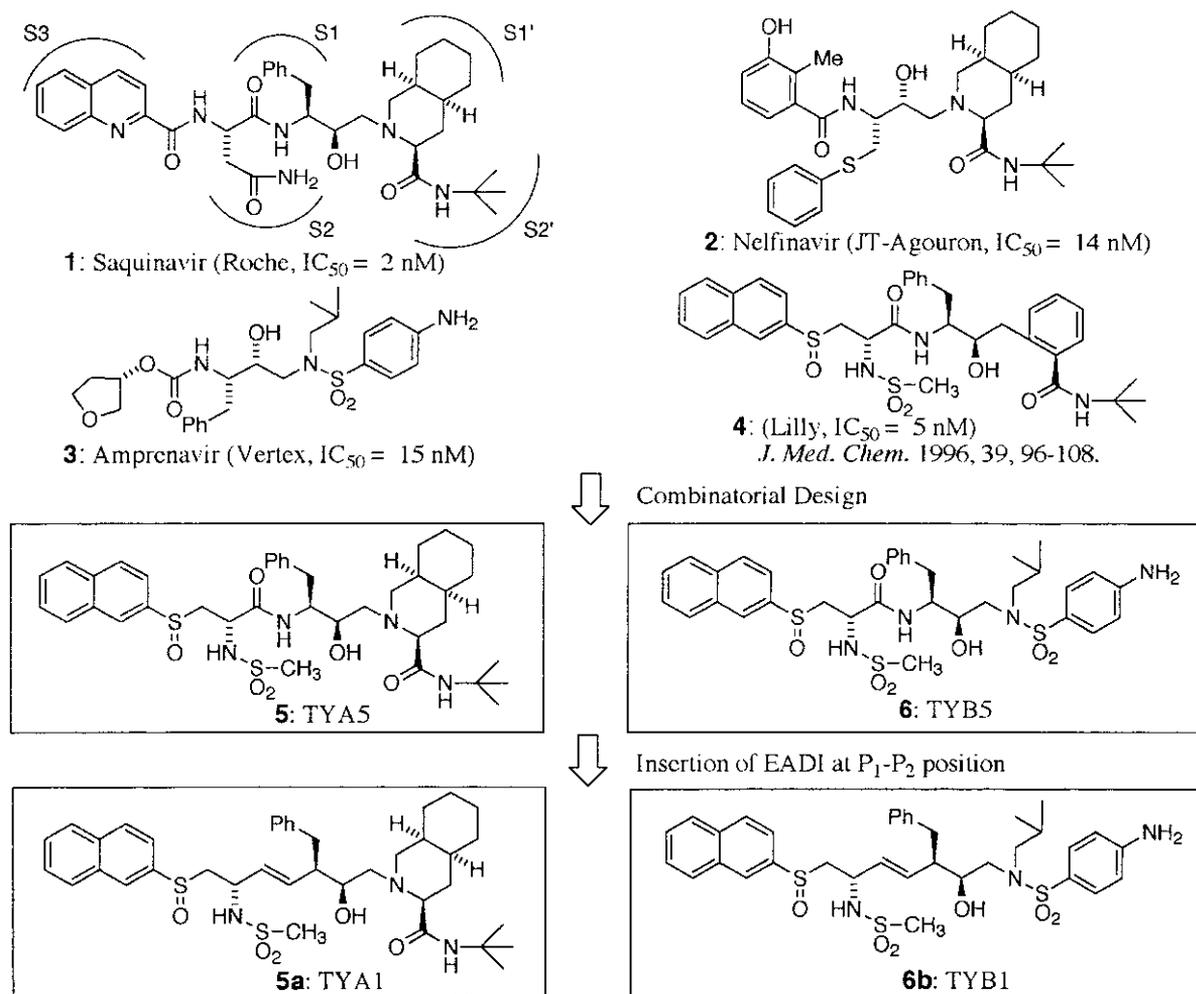


Figure 1. Design of Novel Compounds Based on Reported HIV Prptase Inhibitors and Nonpeptidylation of These Compounds by Conversion of P₁-P₂ Amide Bond to (*E*)-Alkene

多剤耐性株に有効な HIV プロテアーゼ阻害剤の発見

現在臨床で使用されている HIV プロテアーゼ阻害剤等の構造情報をもとに、P₁-P₂部位として Saquinavir 1、Nelfinavir 2 のデカヒドロイソキノリン型リガンド、Amprenavir 3 のスルホンアミド型リガンド、そして、P₂-P₃ 部位として Lilly 社が報告している化合物 4 の D-(2-naphthyl)cysteine 誘導体に

特に着目し、combinatorial design により化合物 TYA5 **5**、TYB5 **6** を分子設計した (Figure 1)。化合物 **5**、**6** は、アミノ酸を出発原料として文献既知の方法により得られた。なお **5**、**6** は、スルホキシドの不斉による diastereomer 混合物となっている。これらの化合物 TYA5 **5**、TYB5 **6** は、強力なプロテアーゼ阻害活性のみならず、MT-2 細胞に対しても強い抗 HIV 活性を示した (Table 1)。また、多剤耐性臨床分離株に対しても、強い抗 HIV 活性を示した (Table 2)。さらに、in vitro 耐性誘導実験においても既存の Saquinavir や Amprenavir に比較して、著しい耐性発現の遅延が観察された。

完全非ペプチド性阻害剤の創出

上記の阻害剤 TYA5 **5** と TYB5 **6** の P₁-P₂ 部位のペプチド結合を (E)-alkene で置換した化合物 TYA1 **5a**、TYB1 **6a** を合成した。D-セリンを出発原料として、我々の研究室で開発した D-アミノ酸-L-アミノ酸タイプの (E)-alkene dipeptide isostere (EADI) の合成法を活用して、**5a** およびその 2*R* isomer **5b**、**6a** およびその 2*R* isomer **6b** をスルホキシドの不斉による diastereomer 混合物として得た。これらの EADI 含有化合物の抗 HIV 活性を評価したところ、TYA1 **5a** は著しい活性の低下を認めしたが、TYB1 **6a** は顕著な抗 HIV 活性を有していることが判明した。TYB1 **6a** の抗 HIV 活性およびプロテアーゼ阻害活性はともに、もとの化合物 TYB5 **6** の 3分の1に低下していたが、アルパルチルプロテアーゼのペプチド性基質遷移状態模倣型阻害剤からピュアノンペプチド型阻害剤の開発研究における一つの方法論を提案できたと考えている。

考察

現在エイズの臨床で使用されている HIV プロテアーゼ阻害剤に匹敵する活性を有し、多剤耐性株に対しても有効性を示す新規阻害剤 TYA5 と TYB5 を見い出した。また、耐性変異株誘導実験では、Saquinavir や Amprenavir に比べて TYA5 あるいは TYB5 による耐性発現の顕著な遅延が観察された。すなわち、既存の HIV プロテアーゼ阻害剤の構造ユニットを基にした combinatorial design によって、もとの阻害剤が有効性を示さなくなった多剤耐性株にも有効で、かつ、耐性変異株の出現を遅延する新規プロテアーゼ阻害剤を創出することができた。これにより、TYA5 と TYB5 は耐性 HIV に対する次世代の治療薬の候補となる可能性が示唆された。さらに、TYB5 に含まれる唯一のペプチド結合を (E)-alkene で置換した化合物 TYB1 は、TYB5 よりも活性が下がっていたものの顕著な抗 HIV 活性を有しており、今後さらなる分子変換を行うことにより高活性非ペプチド性プロテアーゼ阻害剤の創製に有用なリード化合物になると思われる。

Table 1. Anti-HIV Activity, Cytotoxicity and HIV Protease Inhibitory Activity of the Synthetic Compounds

Compound (No.)	IC ₅₀ (nM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	SI ^c	K _i (nM) ^d
TYA1 (5a)	> 1,000	N. T.		N.T.
TYA2 (5b)	> 1,000	N. T.		N.T.
TYA5 (5)	9.5 ± 0.3	3.9 ± 0.19	410	0.12
TYB1 (6a)	160 ± 40	9.3	58	0.38
TYB2 (6b)	> 1,000	N. T.		N.T.
TYB5 (6)	66 ± 2	33 ± 12	500	0.10
AZT	27 ± 9	> 100		N.T.
Saquinavir	17 ± 3	11 ± 3	650	0.19
Amprenavir	36 ± 11	> 100		N.T.
Crixivan	N.T. ^d	N.T.		0.28

^aIC₅₀ values are based on the inhibition of HIV-induced cytopathogenicity in MT-2 cells. ^bCC₅₀ values are based on the reduction of the viability of mock-infected MT-2 cells.

^cSelectivity index (SI) is shown as CC₅₀/IC₅₀. ^dN.T.: not tested.

^eK_i values are based on HIV-1 protease inhibitory activity.

Table 2. Anti-HIV Activity of TYA5 and TYB5 against HIV-1 Clinical Isolates

Compound	wild type HIV _{104pre}	IC ₅₀ (nM) (fold change) ^a		
		MDR		
		HIV _{TM}	HIV _{MM}	HIV _{JSL}
TYA5 (5)	15 ± 2	34 ± 4 (2X)	32 ± 4 (2X)	220 ± 40 (15X)
TYB5 (6)	31 ± 3	43 ± 6 (1X)	36 ± 8 (1X)	25 ± 6 (1X)
AZT	2.5 ± 0.7	43 (17X)	37 (15X)	64 (26X)
Saquinavir	19 ± 4	230 ± 20 (12X)	320 ± 2 (17X)	550 (29X)
Amprenavir	20 ± 3	480 (24X)	530 (27X)	800 (40X)

^aIC₅₀ values are based on the inhibition of HIV p24 antigen expression in PBMC.

D. 考察

これまでに、T140 リードの高活性低分子誘導体の発見および SC34EK の創出と X 線結晶解析等、所期の計画を大幅に上回る研究成果を挙げており、研究を実用化に結びつける可能性は高いと判断している。HAART 療法の革新は世界のエイズ患者に大きな福音を与えるものであり、波及効果は絶大である。さらに、CXCR4 拮抗剤はエイズ治療のみならず抗リウマチ剤、慢性骨髄性 B-細胞白血病治療薬、各種の癌の浸潤転移抑制剤としての応用が期待されている。また CXCR4 拮抗剤の特許出願件数は現時点で我々のものも含めて 10 件以下と限られており、本研究事業の国際的優位性は明確である (Fig. 1)。一方 Ed. Berger から提起された CXCR4 を標的とした医薬品開発の安全性に対する疑問は未だに明確にされておらず (Fig. 2)、また最近になって T. Lapidot (Weizmann Inst., Israel) らとの共同研究により T140 誘導体が血液幹細胞の骨髄へのホーミングを抑制することからその効率的採取にも有効に使える可能性が出てきたが、一方では長期連続投与による副作用も懸念される (Fig. 3)。実験小動物を用いた in vivo 試験、毒性試験、安全性試験での詳細な検討を早期に進める必要性を痛感している。これらの試験に供するためには大量の化合物の合成を必要とすることから、今後は合成プロセスを含めた検討も重要であるが、本研究事業の枠内で対応するには限界があり、製薬企業との綿密な連携体制の構築も含めた創薬展開を行う計画である。

また本年度の研究の反省点として、各化合物の in vivo 試験が化合物の量的調製と研究協力者との研究連携上の問題もあって予定通り進めることが困難であった。CXCR4 拮抗剤に関しては各種固形癌の転移抑制試験により顕著な in vivo 有効性を確認することができたが、抗 HIV としての in vivo 有効性に関しては結果を取りまとめるのに十分な系統的研究が実施できなかった。

HIV 第二受容体を標的とする医薬品の開発競争は熾烈である。感染初期に優勢な R5-HIV-1 が利用

Fig. 1. 低分子ケモカイン受容体拮抗剤の特許出願状況

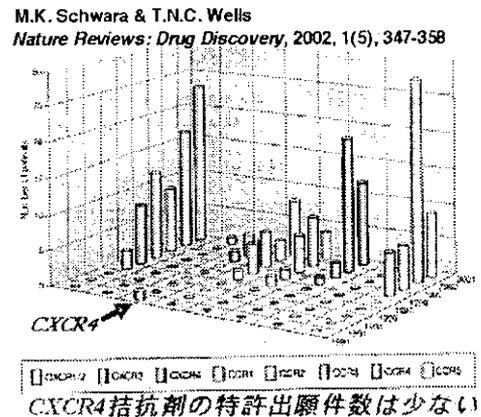
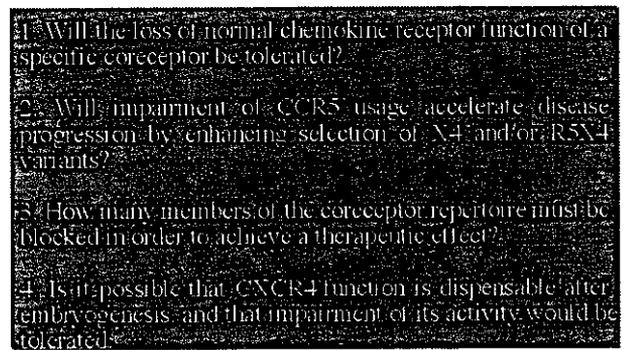


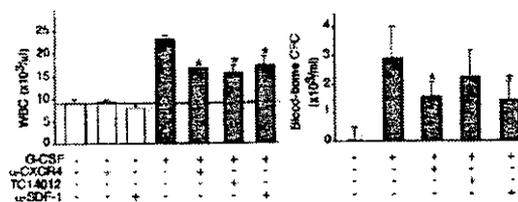
Fig. 2. Major Questions about Coreceptor-Based Therapeutic Strategies



E.A. Berger, P.M. Murphy and J.M. Farber, *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 657-700 (1999)

CXCR4標的とする薬物は安全か？

Fig. 3. TC14012はG-CSF刺激による血液幹細胞の移動を阻害する



I. Petit, N. Fujii, T. Lapidot, et al.,
Nat. Immun., 2002, 3, 687-694

T140 deriv.は血液肝細胞の効率的採取に臨床応用できる

する CCR5 を標的とする数多くの拮抗剤が相次いで報告されており、昨年メルク社も骨格の異なる一連の化合物を論文発表している。Ist runner の SCH-C(Schering Plough 社) は phase II 試験で副作用により開発が中止されている。また最近この低分子化合物に対する耐性出現に関連して R5-HIV が R5-拮抗剤の結合した CCR5 を認識して侵入するとい興味有る知見が報告されている。すなわちエイズ化学療法剤の開発において、一概に低分子化合物を志向する方針は耐性克服の観点からは疑問が残る。一方、後期 AIDS 患者において X4-HIV-1 が利用する CXCR4 に対する有効な拮抗剤の報告例は少なく、現時点では、我々の T140 関連化合物を含めて AMD3100(AnorMed)、KRH1120(山本、呉羽、三共)のみである。このうち AMD3100 は Phase II 臨床試験で心臓に対する副作用により開発が中止されている。有効性に関しても相反する結果が報告されており、疑問が残る。T20(Pentafuside) は Roche 社により多剤耐性型 HIV 株を標的として臨床応用が始まっているが、T20 自身の難溶解性、耐性臨床株の出現、高治療費等の問題点の克服が課題である。

本研究事業は、強力かつ特異的な CXCR4 拮抗剤および gp41 標的型膜融合阻害剤の 2 種類の独自の基盤分子を設定し、HIV 感染初期過程の分子機構解析に基づいて、多剤耐性克服型エイズ化学療法剤の開発を目指す点に大きな特徴を有する。さらに、独自の有機合成技術と最近新たに開発した“環状ペプチドをリエゾンとするユニバーサル創薬テンプレート”を駆使してペプチドリード医薬品の適合化研究を実施する点にもう一つの大きな特色を有する。

E. 結論

本研究はペプチド・蛋白質化学、有機金属化学、医薬品化学、ウイルス学、生化学の学術基盤をもとに、我々が独自に見出した HIV 感染初期過程を防御する 2 種類の基盤分子、すなわち HIV 第二受容体 (CXCR4) 拮抗剤 (T22、T140) および gp41 標的膜融合阻害剤 (SC34EK) をリード化合物として設定して、臨床上の大きな問題となっている多剤耐性型 HIV を克服できる真に有効な化学療法剤の開発を指向した研究を実施した。また本研究の遂行に当たって、“ペプチドリード医薬品の理論的かつ実践的な開発戦略研究”により見出した独創的な合成基盤技術を実践的活用とその検証を行い、下記の研究成果を挙げることができた。

- 1) T140 と CXCR4 の立体構造の docking analysis を基に、T140 の低分子化研究を推進し、化学構造の異なる一連の低分子リード化合物群 (R-penta, RRnNal, BIP) を創出した。
- 2) CXCR4(119Asn-Ser)-構成的活性変異体を活用して、低分子リード化合物群のうちから環状ペプチド構造を有する R-penta の pharmacophore の空間的スクリーニングを実施し、T140 に匹敵する活性プロフィールを有する FC131 を見出した。
- 3) 前年度の TC14012 に比して一段と優れた薬物動態と抗 HIV 活性を有する一連の N-アシル化誘導体を見出した。このうち 4F-Benzoyl-TE14011 の大量合成法を確立し、CDC(Atlanta)にて hu-Scid Mouse を用いる in vivo 試験を実施する予定である。
- 4) gp41-C34 を基盤分子としたデ・ノボ分子設計により見出した強力かつ特異的 gp41 標的型 HIV-Cell 膜融合阻害剤 SC34(EK)の量的合成を実施し、hu-SCID mouse in vivo アッセイ系でそ

の有効性を確認した。また結晶解析から得られた N-36 分子との 6-ヘリカルバンドル構造の interface での分子認識構造をもとに一連の新規誘導体の分子設計・合成を実施した。

- 5) 上記 SC34(EK)のデ・ノボ分子設計概念を活用して gp41-標的型 Clustering Inhibitor の分子設計・合成を行い。マイクロモルオーダーの活性を有する数種の化合物を見出した。
- 6) 既存の HIV プロテアーゼ阻害剤の各ファルマコフォアの組み合わせから多剤耐性 HIV-1 臨床分離株に対して有効性の高い TY5 および TYB5 を見だし、これらの薬物が耐性誘導実験においても Saquinavir や Amprenavir と比較して耐性株の発現が著しく遅いことを明らかにした。また TY-B5 は P1-P2 部位のペプチド結合を(E)-アルケン型ジペプチドイソスターに置換しても顕著な酵素阻害活性および抗 HIV 活性を保持することを明らかにして、ペプチド性基質遷移状態模倣型阻害剤からピュアノンペプチド型阻害剤を開発することに成功した。
- 7) 二環性異項環化合物の独自の効率的合成法を応用して、2 環性ヘテロ環を有する強力な HIV プロテアーゼ阻害活性を有する一連の化合物を見出した。このうち TK-11 等数種の化合物は多剤耐性臨床分離株にも極めて高い有効性を示すことを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Synthesis and Evaluation of Pseudopeptide Analogs of a Specific CXCR4 Inhibitor, T140: The Insertion of an (E)-Alkene Dipeptide Isostere into the β II'-Turn Moiety.
H. Tamamura, K. Hiramatsu, K. Miyamaoto, A. Omagari, S. Oishi, H. Nakashima, N. Yamamoto, K. Kuroda, T. Nakagawa, A. Otaka & N. Fujii
Bioorg. Med. Chem. Lett., **12**, 923-928 (2002)
2. Synthesis of allenes from allylic alcohol derivatives bearing a bromine atom using a palladium(0)/diethylzinc system.
H. Ohno, K. Miyaura, T. Tanaka, S. Oishi, A. Toda, Y. Takemoto, N. Fujii & T. Ibuka
J. Org. Chem., **67**, 1359-1367 (2002)
3. Efficient stereoselective synthesis of peptidomimetics containing hydroxyethylamine dipeptide isosteres utilizing the aza-Payne rearrangement and *O,N*-acyl transfer reactions.
H. Tamamura, T. Hori, A. Otaka & N. Fujii
J. Chem. Soc., Perkin Trans I, **2002**, 577-580
4. A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals T140 is an inverse agonist and AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists.
W.-bo Zhang, J.-M. Navenot, H. Bodduluri, H. Tamamura, K. Hiramatsu, A. Omagari, G. Pei, J. P. Manfredi, N. Fujii, J. Broach, S. C. Peiper
J. Biol. Chem., **277**, 24515-24521 (2002)
5. Diastereoselective Synthesis of $\psi[(E)\text{-CH=CMe}]$ - and $\psi[(Z)\text{-CH=CMe}]$ -Type Dipeptide Isosteres by Organocopper-Mediated *anti*-SN2' Reaction.
S. Oishi, T. Kamano, A. Niida, Y. Odagaki, H. Tamamura, A. Otaka, N. Hamanaka, & N. Fujii
Org. Lett., **4**(7), 1051-1054, 2002
6. Diastereoselective Synthesis of $\psi[(E)\text{-CMe=CH}]$ - and $\psi[(E)\text{-CMe=CMe}]$ -Type Dipeptide Isosteres Based on Organocopper-Mediated *anti*-SN2' Reaction.
S. Oishi, A. Niida, T. Kamano, Y. Odagaki, H. Tamamura, A. Otaka, N. Hamanaka & N. Fujii

- Org. Lett.*, **4**(7), 1055-1058, 2002
7. Asymmetric Synthesis of $\beta^{2,3}$ -amino acids by InI-Pd(0)-promoted metalation and addition of chiral 2-vinylaziridines.
M. Anzai, R. Yanada, N. Fujii, H. Ohno, T. Ibuka & Y. Takemoto
Tetrahedron, **58**, 5231-5239 (2002)
 8. Indium-mediated Atom-transfer Cyclization and Reductive Cyclization.
R. Yanada, N. Nisihmori, A. Matsumura, N. Fujii & Y. Takemoto
Tetrahedron Lett., **43**, 4584-4588 (2002)
 9. Artificial Remodeling of gp41-C34 Peptide Leads Effective HIV Fusion Inhibitor with Anti-HIV Activity.
A. Otaka, Nakamura, E. Kodama, S. Uchiyama, S. Nakamura, H. Nakano, H. Tamamura, Y. Kobayashi, M. Matsuoka & N. Fujii
Angew. Chem. Int. Ed. **41**, 2938-2940 (2002)
 10. Trojan p16 peptide suppresses pancreatic cancer growth and prolongs survival in mice.
R. Hosotani, Y. Miyamoto, K. Fujimoto, R. Doi, A. Otaka, N. Fujii & M. Imamura,
Clin. Cancer Res., **8**, 1271-1276 (2002).
 11. Regio- and stereoselective ring-opening of chiral 1,3-oxazolidin-2-one derivatives by organocopper reagents provides novel access to di-, tri- and tetra-substituted alkene dipeptide isosteres.
S. Oishi, A. Niida, T. Kamano, Y. Miwa, T. Taga, Y. Odagaki, N. Hamanaka, M. Yamamoto, K. Akaji, H. Tamamura, A. Otaka & N. Fujii
J.Chem. Soc., Perkin Trans I, **2002**,1786-1793
 12. Regio- and Stereoselective Synthesis of (*E*)-Alkene *trans*-Xaa-Pro Dipeptide mimetics Utilizing Organocopper-Mediated *anti*-SN2' reactions.
A. Otaka, F. Katagiri, T. Kinoshita, Y. Odagaki, S. Oishi, H. Tamamura, N. Hamanaka & N. Fujii
J. Org. Chem., **67**, 6152-6161 (2002).
 13. Diastereoselective Synthesis of New $\Psi[(E)\text{-CH=CH}]$ - and $\Psi[(Z)\text{-CH=CH}]$ -type Alkene Dipeptide Isosteres by Organocopper Reagents and Application to Conformationally Restricted Cyclic RGD Peptidomimetics.
S. Oishi, T. Kamano, A. Niida, Y. Odagaki, N. Hamanaka, M. Yamamoto, K. Ajito, H. Tamamura, A. Otaka, & N. Fujii
J. Org. Chem., **67**, 6162-6173 (2002).
 14. Antiproliferative activity induced by the somatostatin analogue, TT-232 in human pancreatic cancer cells.
J.U. Lee, R. Hosotani, M. Wada, R. Doi, T. Koshiha, K. Fujimoto, Y. Miyamoto, S. Tsuji, S. Nakajima, M. Hirohashi, T. Uehara, Y. Arano, N. Fujii & M. Imamura
Eur J. Cancer, **11**, 1526-1534 (2002)
 15. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4.
I. Petit, M. S.-Kravitz, A. Nagler, M. Lahav, A. Peled, L. Habler, T. Ponomaryov, R. Taichman, F. A.-Seisdedos, N. Fujii, J. Sandbank, D. Zipori & T. Lapidot
Nature Immunology, **3**, 687-694 (2002)
 16. Susceptibility of Diverse Primary HIV Isolates with Varying Co-receptor Specificity's to the CXCR4 Antagonistic Compounds.
S. M. Owen, D. Rudolph, D. Schols, N. Fujii, N. Yamamoto & R. B. Lall

- J. Med. Virol.*, **68**, 147-155 (2002)
17. Certification of the Critical Importance of L-3-(2-Naphthyl)alanine at Position 3 of a Specific CXCR4 Inhibitor, T140, Leads to an Exploratory Performance of Its Downsizing Study.
H. Tamamura, A. Omagari, K. Hiramatsu, S. Oishi, H. Habashita, T. Kanamoto, K. Gotoh, N. Yamamoto, H. Nakashima, A. Otaka & N. Fujii
Bioorg. Med. Chem., **10**, 1417-1426 (2002)
 18. Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo $\alpha v \beta 3$ integrin related tumor imaging.
M. Ogawa, K. Hatano, S. Oishi, Y. Kawasumi, N. Fujii, M. Kawaguchi, R. Doi, M. Imamura, M. Yamamoto, K. Ajito, T. Mukaie, H. Saji & K. Ito,
Nucl. Med. Biol. **30**(1), 1-9 (2003).
 19. The Therapeutic Potential of CXCR4 Antagonists in the Treatment of HIV.
N. Fujii, H. Nakashima & H. Tamamura
Expert Opinion on Investigational Drugs, **12**(2), 186-195 (2003)
 20. Reduction of Peptide Character of HIV Protease Inhibitors that Exhibit Nanomolar Potency against Multi-drug Resistant HIV-1 Strains.
H. Tamamura, Y. Koh, S. Ueda, Y. Sasaki, T. Yamasaki, m. Aoki, k. Maeda, Y. Watai, H. Arikuni, A. Otaka, H. Mitsuya & N. Fujii
J. Med. Chem., in press (2003)

2. 学会発表

1. 根本浩二、玉村啓和、大石真也、大高章、藤井信孝： β -アジリジノ- α, β -不飽和エステルの酸触媒開環反応とその応用：日本薬学会第122年会（千葉）平成14年3月26-28日
2. 新居田歩、大石真也、鎌野高恵、玉村啓和、大高章、藤井信孝：キラルオキサゾリジノン誘導体を基質とする有機銅試薬による立体選択的多置換型アルケンの構築とジペプチドイソスターへの応用：日本薬学会第122年会（千葉）平成14年3月26-28日
3. 中村美紀、大高章、児玉栄一、松岡雅雄、内山進、中村昇太、中野博明、小林祐次、玉村啓和、藤井信孝：HIV感染初期過程に関わる6-helical bundle構造を標的とした高活性膜融合阻害剤(SC34)の創出とその応用研究：日本薬学会第122年会（千葉）平成14年3月26-28日
4. H. Tamamura, K. Hiramatsu, A. Omagari, S. Oishi, H. Nakashima, A. Otaka & N. Fujii: Development of Selective Antagonists against an HIV Second Receptor, CXCR4: Fifth Australia/Japan Symposium on Drug Design and Development, Nara, Mar 13-16, 2002.
5. H. Tamamura, K. Hiramatsu, A. Omagari, S. Oishi, H. Nakashima, S.C. Peiper, A. Otaka & N. Fujii: Development of Selective CXCR4 Inhibitors with Strong Anti-HIV Activity: 224th American Chemical Society National Meeting, Boston, Aug 18-22, 2002.
6. H. Tamamura, A. Otaka, K. Hiramatsu, M. Nakamura, H. Nakashima, N. Yamamoto, E. Kodama, M. Matsuoka, Y. Kobayashi & N. Fujii: Development of Two-types of Anti-HIV Agents Targeting a Dynamic Supra-molecular Mechanism in HIV-cell Fusion: The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Aug 24-27, 2002.
7. N. Fujii, A. Otaka, H. Tamamura & S. Oishi: Two-types of HIV-cell Fusion Inhibitors Targeting Multi-drug-resistant HIV: The 16th French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry, Nimes, France, Sep 29-Oct 2, 2002.
8. 大高章、中村美紀、児玉栄一、中村昇太、中野博明、内山進、玉村啓和、松岡雅雄、小林祐

- 次、藤井信孝：HIV 感染における動的分子複合体構造を基盤とした HIV ペプチドの開発：第 39 回ペプチド討論会（神戸）平成 14 年 10 月 16-18 日
9. 根本浩二、玉村啓和、溝上智子、大石真也、大高章、藤井信孝： α,β -不飽和エステルを有する β -アジリジン環の酸触媒による開環反応とその応用：第 39 回ペプチド討論会（神戸）平成 14 年 10 月 16-18 日
 10. 玉村啓和、加藤輝和、堀忠員、大高章、藤井信孝：aza-Payne 転位反応と O,N-acyl 転位反応を用いたヒドロキシエチルアミン型ジペプチドイソスター含有ペプチドミメティックスの新規立体選択的合成法：第 39 回ペプチド討論会（神戸）平成 14 年 10 月 16-18 日
 11. 平松健一、玉村啓和、中島秀喜、宮本和英、黒田義弘、大高章、藤井信孝：CXCR4 アンタゴニスト T140 誘導体の生体内安定化を目的とした合成と構造活性相関：第 39 回ペプチド討論会（神戸）平成 14 年 10 月 16-18 日
 12. 大高章、佐々木義一、片桐文彦、大石真也、玉村啓和、藤井信孝：有機銅試薬を利用した trans-アルケン型 Xaa-Pro ペプチドミメティックの合成研究：第 39 回ペプチド討論会（神戸）平成 14 年 10 月 16-18 日
 13. 平松健一、玉村啓和、大高章、藤井信孝、中島秀喜：生体内安定化を目的とした CXCR4 阻害剤 T140 誘導体の合成と構造活性相関：第 52 回 日本薬学会近畿支部総会・大会（大阪）平成 14 年 10 月 19 日
 14. 根本浩二、玉村啓和、溝上智子、大石真也、大高章、藤井信孝：酸触媒によるアジリジンの開環反応とその応用：第 52 回 日本薬学会近畿支部総会・大会（大阪）平成 14 年 10 月 19 日
 15. 渡辺順子、大高章、玉村啓和、藤井信孝：SmI2 を利用したフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成：第 52 回 日本薬学会近畿支部総会・大会（大阪）平成 14 年 10 月 19 日
 16. 大石真也、新居田歩、鎌野高恵、玉村啓和、大高章、藤井信孝：多置換アルケン型ジペプチドイソスターを利用した環状 RGD ペプチドの構造活性相関研究：第 52 回 日本薬学会近畿支部総会・大会（大阪）平成 14 年 10 月 19 日
 17. 大高章、中村美紀、玉村啓和、藤井信孝、児玉栄一、松岡雅雄、中村昇太、中野博明、内山進、小林祐次： α -helix 形成モチーフ導入型 HIV-1 細胞膜融合阻害剤の創製：第 28 回反応と合成の進歩シンポジウム（東京）平成 14 年 11 月 5-6 日
 18. 大高章、佐々木義一、片桐文彦、大石真也、玉村啓和、藤井信孝：有機銅試薬を利用したアルケン型 Xaa-Pro ジペプチドイソスターの立体選択的合成：第 28 回反応と合成の進歩シンポジウム（東京）平成 14 年 11 月 5-6 日
 19. 玉村啓和、根本浩二、大石真也、山下正樹、大高章、藤井信孝：酸触媒によるアジリジンの開環反応と高官能性(E)-アルケンジペプチドイソスターの完全立体制御型合成—(Xaa, L-Glu), (Xaa, D-Glu)タイプイソスターの合成：第 28 回反応と合成の進歩シンポジウム（東京）平成 14 年 11 月 5-6 日
 20. 玉村啓和、加藤輝和、堀忠員、大高章、藤井信孝：hydroxyethylamine 型ジペプチドイソスター含有ペプチドミメティックスの新規立体選択的合成：第 28 回反応と合成の進歩シンポジウム（東京）平成 14 年 11 月 5-6 日
 21. 大石真也、新居田歩、鎌野高恵、玉村啓和、大高章、藤井信孝：三置換・四置換アルケン型ジペプチドイソスターの合成と環状 RGD ペプチドへの応用：第 30 回 構造活性相関シンポジウム（豊橋）平成 14 年 11 月 12-13 日
 22. 荒木威亘、平松健一、大石真也、玉村啓和、大高章、藤井信孝、草野秀一、寺久保繁美、中島秀喜、Z. Wang、S.C. Peiper：立体配座固定ペプチドリード創薬テンプレートの研究 (Part I)

- 新規 Focused Orthogonal Library を活用した高活性 CXCR4 アンタゴニスト T140 の低分子化：
第 22 回メディシナルケミストリーシンポジウム（静岡）平成 14 年 11 月 27-29 日
23. 大石真也、新居田歩、鎌野高恵、味戸慶一、浜中信行、玉村啓和、大高章、藤井信孝：立体配座固定ペプチドリード創薬テンプレートの研究 (Part 2) 多置換アルケン型ジペプチドイソスターによる環状 RGD ペプチドの立体配座及び活性制御：第 22 回メディシナルケミストリーシンポジウム（静岡）平成 14 年 11 月 27-29 日
 24. 藤井信孝、山崎 智徳、こう 康博、青木 学、前田 賢次、吉村 和久、谷口 泉、中田 浩智、原田 恵嘉、宮川 寿一、渡井 順子、有國 尚、満屋 裕明、大高 章、玉村 啓和：多剤耐性株に有効な HIV プロテアーゼ阻害剤の同定とこれを基にした完全非ペプチド性阻害剤の創出：第 22 回メディシナルケミストリーシンポジウム（静岡）平成 14 年 11 月 27-29 日
 25. N. Fujii, A. Otaka, H. Tamamura & S. Oishi: Important Role of Peptide Chemistry to Overcome Multi-Drug-Resistant HIV-1: The 9th Akabori Conference, Kloster Seeon, Germany, Sep 9- 12, 2002.
 26. A. Otaka, S. Oishi, H. Tamamura & N. Fujii: Synthesis of Alkene Dipeptide Isosteres Using Organocopper Reagents: The 9th Akabori Conference, Kloster Seeon, Germany, Sep 9- 12, 2002.
 27. A. Otaka, M. Nakamura, E. Kodama, S. Uchiyama, H. Tamamura, Y. Kobayashi, M. Matsuoka & N. Fujii: Artificial Remodeling of gp41-C34 Peptide Leads to Effective HIV Fusion Inhibitor with High anti-HIV Activity: The 27th European Peptide Symposium, Sorrento, Italy, Aug 31 – Sep 7, 2002.
 28. S. Oishi, T. Kamano, A. Niida, H. Tamamura, A. Otaka & N. Fujii: Organocopper-mediated Stereoselective Synthesis of Multi-substituted Alkene Dipeptide Isosteres and Application to Cyclic RGD Peptides: The 27th European Peptide Symposium, Sorrento, Italy, Aug 31 – Sep 7, 2002.
 29. A. Otaka, S. Oishi, H. Tamamura & N. Fujii: Organocopper-mediated Synthesis of Alkene Dipeptide Isosteres: International Symposium on Modern Organocopper Chemistry, Dortmund, Germany, Oct 10-14, 2002.

知的財産権の出願・登録状況：

下記の 2 件の特許申請を行った。

1.

発明の名称：抗 HIV 剤

出願人：藤井信孝

発明人：大高 章、松岡雅雄

国内出願：2001年9月27日

国際出願：2002年9月27日

国際出願番号：PCT/JP02/10119

2.

発明の名称：新規 CXCR4 アンタゴニスト

出願人：藤井信孝、中島秀喜、Stephen C. Peiper, (株) オーフアンリンク

発明人：藤井信孝、中島秀喜、Stephen C. Peiper

国内出願：2002年10月24日

国内出願番号：特願 2002-309656