

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

多剤耐性 HIV 型プロテアーゼ阻害剤の合成と非ペプチド化に関する研究

分担研究者 竹本 佳司 京都大学大学院薬学研究科教授

要旨

AID 治療法として、逆転写酵素阻害剤と Saquinavir、Nelfinavir、Amprenavir、Ritonavir に代表されるプロテアーゼ阻害剤を同時に用いる多剤併用療法（HAART）の有効性が報告されて以来、臨床でもその応用が試みられ確実に良好な成果をもたらしている。このような背景のもと、国内外で盛んにプロテアーゼ阻害剤の探索が行われ、数多くの新規プロテアーゼ阻害剤が開発された。しかし、今なお耐性株の出現と生体内の安定性を共にクリアーしうる阻害剤は開発されていない。本研究は多剤耐性 HIV 株にも有効かつ生体内での安定性を共に向上させた阻害剤の開発を目指し、標的酵素と多点で相互作用可能な親性基の探索と既存のプロテアーゼ阻害剤への導入を行うことにより、その構造活性相関を調べることを目的とする。

本研究事業においては多剤耐性克服型プロテアーゼ阻害剤の開発を目的として、下記の二つの重点項目について研究を遂行した。

- I. 主鎖にアミド結合を持たず P 2 部位に脂溶性の高いヘテロ環状化合物を有する HIV プロテアーゼ阻害剤の探索と活性評価ならびに大量合成可能な環境重視型プロセス合成法の確立
- II. 立体配座を固定化した環状構造を有する新規創薬テンプレートの簡便な合成手法の開発とファーマコホアーとして非常に重要な役割を担っているグアニジン基の新しい導入反応の開発

その結果、1) 既存の阻害剤に匹敵する活性を有する P 2 部位に 2 環性ヘキサヒドロフロピラン構造を組み込んだ HIV プロテアーゼ阻害剤の不斉合成に成功し、その活性発現に重要な部分構造を明らかにした。2) 上記で最良の結果を与えた 2 環性ヘキサヒドロフロピラン構造以外のヘテロ環状化合物の簡便合成法を確立することが出来た。3) プロテアーゼ阻害剤の非ペプチド化を指向して、多種多様の誘導体合成に応用可能な多官能性環状創薬テンプレートの新規合成法を開発し、グアニジン基の簡便な導入法も確立した。

I. ヘテロ環状化合物を有する HIV プロテアーゼ阻害剤の合成と活性評価

1. 研究目的

まず、多剤耐性 HIV 株に有効な非ペプチド性化合物の探索を行うため、前回の報告を

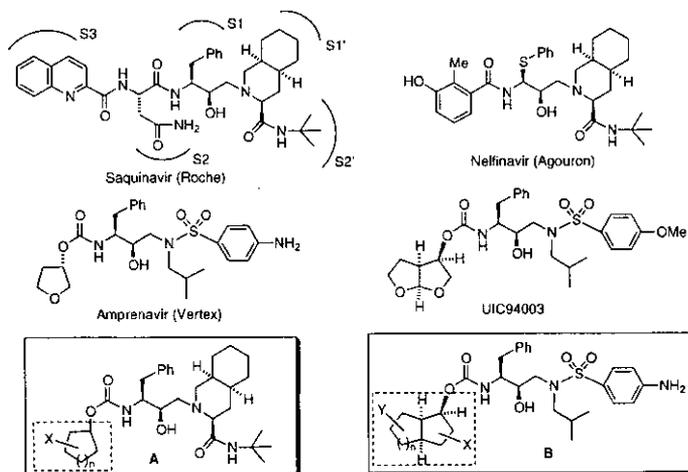


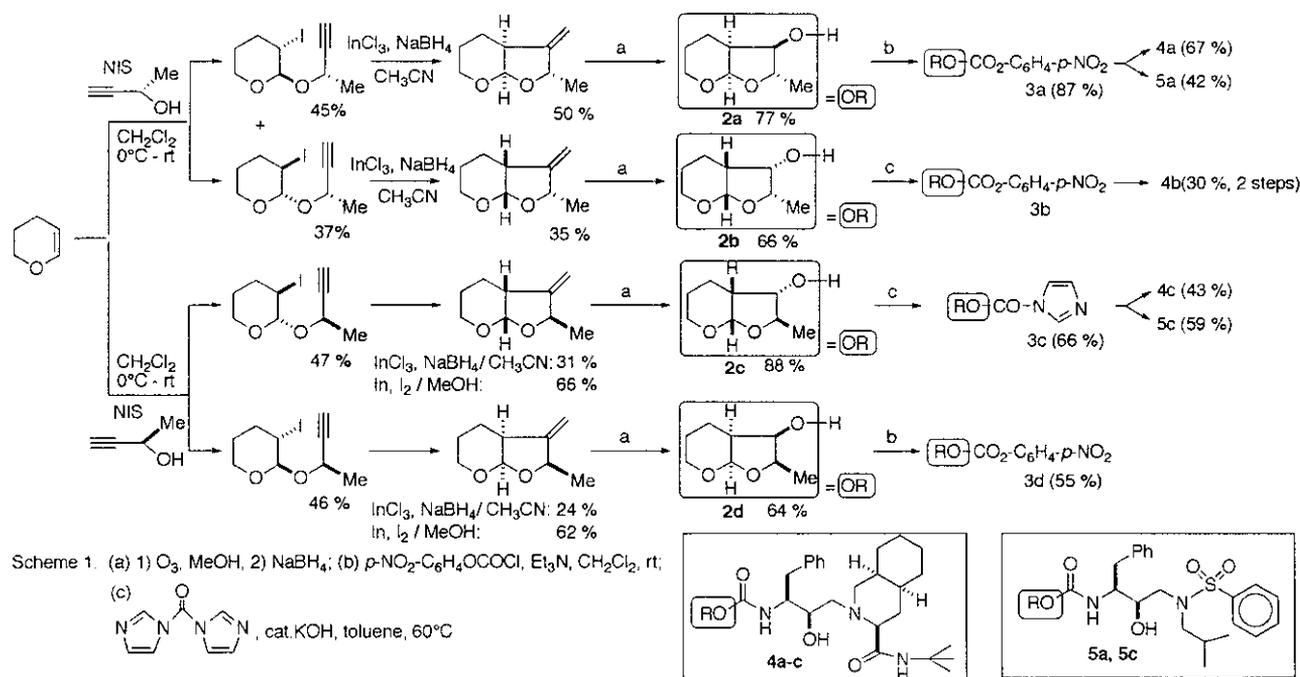
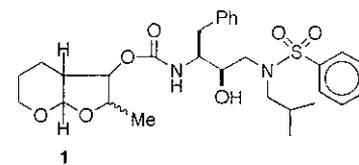
Figure 1. Structure-Based Design of Nonpeptidic P2 Ligands for HIV Protease Inhibitors

基にして P2 部位に脂溶性の高い光学活性二環性構造を有する種々の HIV 型プロテアーゼ阻害剤を合成し、化合物の立体構造が活性評価に及ぼす影響について考察する。さらに多剤耐性 HIV 株に有効な非ペプチド性化合物の探索を行うため、新たなヘテロ環化合物の合成も行いプロテアーゼ阻害活性評価の試料とする。

## 2. 研究方法および研究成果

### 1) 光学活性ヘキサヒドロフロピラン骨格を有する抗 HIV プロテアーゼ阻害剤の簡便な合成法

これまでに合成した化合物の抗 HIV 活性、細胞毒性の測定により、化合物 **1** は代表的な HIV プロテアーゼ阻害剤 saquinavir に匹敵する抗 HIV 活性を有することが判明した。しかしながら化合物 **1** の2つのジアステレオマーの混合物を活性評価試料としたため、今回は合成可能な4種の光学活性体を下に示したルートで選択的に不斉合成した。テトラヒドロピランから誘導したハロアセタール体の還元的ラジカル環化反応については、昨年、馬場らにより報告された  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{NaBH}_4$  の組み合わせによる方法を用い、収率の低い反応に関しては、我々の開発した  $\text{In}$ ,  $\text{I}_2$  の組み合わせを用い比較検討した。その結果、目的の reductive-5-exo-環化体は  $\text{In}$ ,  $\text{I}_2$  による組み合わせで良好な結果を得ることができた。得られたオレフィン体をオゾン酸化後  $\text{NaBH}_4$  による還元的処理を行いアルコール体 **2a-d** に変換した。これら環状アルコール体 **2a-d** をおのおの活性エステル(**3a-d**)に変換後、デカヒドロイソキノリン誘導体 **4a-c** とスルホンアミド誘導体 **5a, 5c** に導いた(Scheme 1)。



### 2) 光学活性ヘキサヒドロフロピラン化合物の活性評価

合成した5種類の化合物 **4a-c**, **5a**, **5c** について抗 HIV 活性、細胞毒性を測定した。前回の結果ではスルホンアミド誘導体の方が全体的に活性が強い傾向が見られた。今回5種類の光学活性体を活性測定に用いたところ、前回の結果とは

Table 1. Anti-HIV Activity and Cytotoxicity of Our Compounds

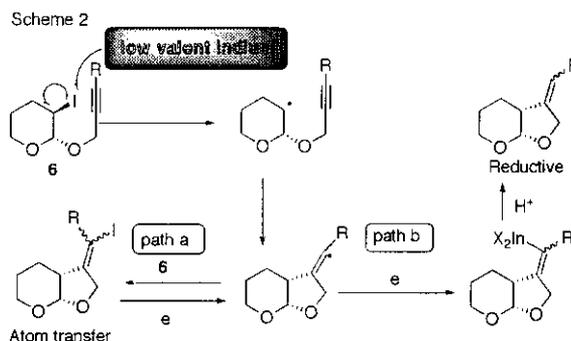
Compound	IC <sub>50</sub> (nM)	CC <sub>50</sub> (mM)	SI (CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
<b>4a</b>	39	36.4	933
<b>4b</b>	6	32.9	5483
<b>4c</b>	5	27.8	5560
<b>5a</b>	26	30.3	1165
<b>5c</b>	30	40.0	1333
<b>1</b>	8	20.7	2600

異なりデカヒドロイソキノリン誘導体の方が活性が強く、なかでも化合物 **4b**, **4c** は HIV プロテアーゼ阻害剤

saquinavir を凌駕する抗 HIV 活性を有することが判明した(Table 1)。しかしながら前回と今回の結果からは光学活性体由来の立体的相違に基づく構造活性相関を導き出すことができず、現在抗 HIV 活性未測定 of **4d**, **5b**, **5d** を合成中である。

### 3) $\text{In}$ , $\text{I}_2$ によるラジカル環化反応の反応機構の推定

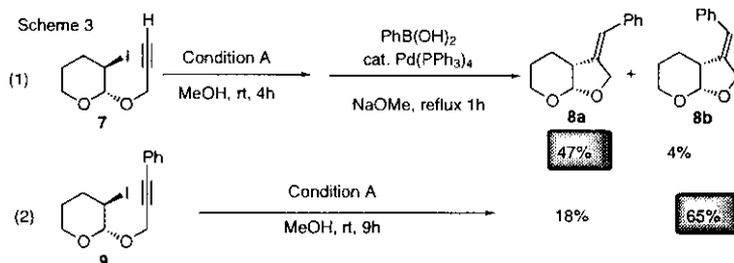
次に我々の開発した  $\text{In}$ ,  $\text{I}_2$  によるラジカル環化反応の反応機構を推定した (Scheme 2)。まず低原子価インジウムが基質 **6** に一電子与えラジカル中間体が生成し、次いで環化が起こりビニルラジカル閉環体を生成する。次に十分な還元剤がなければ、他の基質 **6** からヨウ素を引き抜きアトムトランスファー閉環体が (path a)、十分な還元剤または R がフェニル基であれば、さらに還元されビニルアニオンになり、還元体が生成する (path b) と推定される。



### 4) $\text{In}$ , $\text{I}_2$ を用いる新規ラジカル環化反応の応用

上記反応の応用として基質 **7** を Condition A ( $\text{In}=1$  equiv,  $\text{I}_2=0.5$  equiv) で反応後、フェニルボロン酸と反応

させることにより one-pot-Suzuki-Miyaura カップリング体 **8a** を主成績体として得た (式 1)。また基質 **9** を Condition A により反応させると **8b** が主成績体として得られた (式 2) ことから、良好な選択性でオレフィンの *Z,E* 体の作り分けに成功した。



### 5) 種々のヘテロ環状化合物の合成

種々のヘテロ環状化合物合成に上記ラジカル環化反応を適用したところ、フェニル置換体 **10** ではフェニル基の効果により Condition A ( $\text{In}=1$  equiv,  $\text{I}_2=0.5$  equiv) でも還元体が得られたが (Table 2, Run 1)、基質 **11-13** では Condition A, B ( $\text{In}=2$  equiv,  $\text{I}_2=1$  equiv) を使い分けることでヨード体と還元体を作り分けることができた (Runs 2-4)。

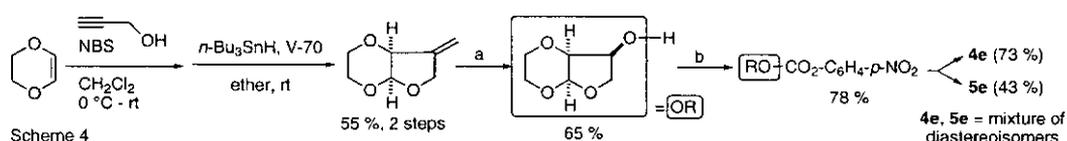
Table 2. Radical Cyclizations of Iodoalkynes under Condition A or B

Run	Starting material	Time (h)	Condition	Solv.	Product	Yield (%), (E/Z ratio)	
						Atom-transfer	Reductive
1		30	A	MeOH	<b>10'</b>	0	57 (2:1)
2		18	A	MeOH	<b>11'</b>	67	0
		48	B	DMF		(1:1.3)	86
3		18	A	MeOH	<b>12'</b>	70	8
		18	B	DMF		(1:1.5)	82
4		24	A	DMF	<b>13'</b>	41	0
		48	B	DMF		0	21 (1.25:1)

さらにより強力な活性発現を

期待して二環性化合物の環内に3つめのヘテロ原子として酸素を有する化合物 **4e**, **5e** を合成した。この化合物

の場合、上述した化合物と異なりヨードアセタ

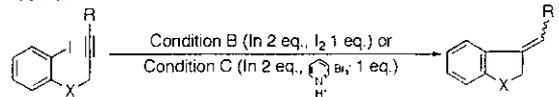


ール体が得られずプロモアセタール化したため In, I<sub>2</sub> による環化反応は進行せず、Bu<sub>3</sub>SnH を用いて環化し、次いで Scheme 1 (see reagents)と同様の操作で目的化合物 **4e**, **5e** を良好な収率で得ることができた(Scheme 3)。現在、抗 HIV 活性を測定中である。

6) インジウムによるラジカル閉環反応の芳香族ハロアルキンへの適用

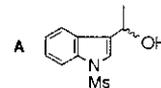
前述の Condition B を芳香族ハロアルキンにも適用したが、ラジカル閉環反応は進行しなかった (Table 3, Run 1)。そこで種々条件を検討し、反応溶媒を DMF に変えることで低収率ながら還元型-5-エキソ閉環体を得た (Run 2)。さらにヨウ素のかわり臭素によるインジウムの活性化を試みるため、扱いやすい臭化水素酸ピリジニウムペルブロミドを用いたところ (Condition C)、成績体の収率が向上した (Run 3)。また、窒素が保護されていない場合は反応は進行せず原料を回収したが (Run 4)、窒素上にメタンスルホニル基の様な電子吸引性基を有する場合ラジカル閉環反応はスムーズに進行した (Run 5)。一方、末端の置換基 R がメチル基の場合、反応はスムーズに進行したが、シリカゲルカラムクロマト処理の間に酸化を伴う芳香化が起こり成績体 A として単離した (Run 6)。これらの結果から芳香族ハロアルキンの環化反応に適用可能な Condition C を見出した。

Table 3.



Run	X	R	Time (h)	Condition	Solv. (1 M)	Yield (%)
1	O	H	33	B	MeOH	0
2	O	H	33	B	DMF	39
3	O	H	48	C	DMF	71
4	NH	H	33	C	DMF	0
5	NMs	H	6	C	DMF	85
6	NMs	Me	5	C	DMF	65 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Reaction product was gradually converted to A through work up.



7) ハロアルケン骨格を有する化合物のラジカル閉環反応への応用

In, I<sub>2</sub> によるラジカル環化反応がハロアルキン以外の基質にも適用可能なら、供給可能な試料の範囲を広げることができる。そこでハロアルケンの環化反応に適用したところ、ハロアルキンの場合と大きく異なり、中間体



として高極性の化合物が生成し、ついで X<sup>-</sup>を有するものの共存下、開放形で反応させると R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H の場合、R<sup>3</sup> にはヨウ素が入り、R<sup>1</sup> や R<sup>2</sup> に置換基があると R<sup>3</sup> には空気中の酸素由来と推定される水酸基が入るという興味ある結果が得られた。インジウムによる反応では初めての結果であり、現在のところ中間に indate (indium ate complex)を経由したものと推定している。今後、詳細について検討を加える予定である。

3. 結論および考察

本研究では、現在 AIDS の治療に使用されている HIV プロテアーゼ阻害剤である Saquinavir に匹敵する強力な HIV-プロテアーゼ阻害剤を見出し、その活性発現に P2 部位の二環性ヘキサヒドロプロピランの絶対構造が重要な役割を担うことを明らかにした。しかしながら前回の報告を考えあわせると、予想した化合物 **5a** に高活性が見られなかったことから、さらに系統だった光学活性体合成の必要性が残される。In, I<sub>2</sub> あるいは臭化水素酸ピリジニウムペルブロミドによるラジカル環化反応が種々のヘテロ環状化合物合成や芳香族化合物合成に適用可能なことを示した。合成した環状化合物はオレフィンのハイドロボレーションにより得られる水酸基の付け根の炭素に置換基を有する化合物に誘導可能であり、またハロアルケンの環化成績体もデカヒドロイソキノリン誘導體やスルホンアミド誘導體との結合が可能であり、これまでの HIV プロテアーゼ阻害剤とは置換位置が異なり、置換基が活性に及ぼす影響について考察可能な試料となり得る。

## II. 環状構造を有する新規創薬テンプレートの簡便な合成手法の開発とグアニジン基の新規導入反応の開発

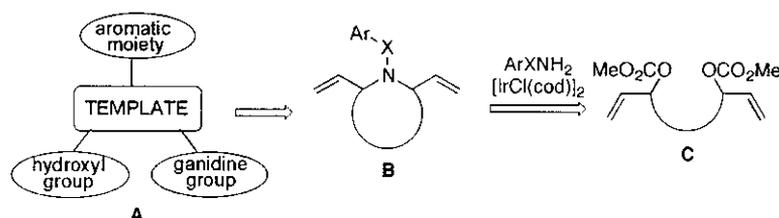
### 1. 研究目的

次に、立体配座を固定化した環状構造を有する新規創薬テンプレートとして、三方向に異なる官能基を導入できるテンプレートの簡便な合成法を開発する。さらに、官能基の一つであるファーマコホアーとして非常に重要な役割を担っているグアニジン基を導入するための新しい反応を開発し、水酸基、グアニジン基、芳香環部の三成分を三方向に配置したモデル化合物の合成に用いる。

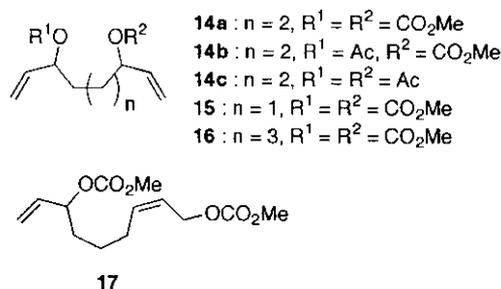
### 2. 研究方法および研究成果

#### 1) 新規創薬テンプレートとなる含窒素環状化合物の新規合成法の開発

はじめに、多官能性環状化合物 **A** の合成を目指し、その創薬テンプレート部となる母核分子の合成法を検討した。近年、遷移金属触媒を用いたアリル位アミノ化反応が活発に研究されているが、アリル位アミノ化反応を用いた環状化合物

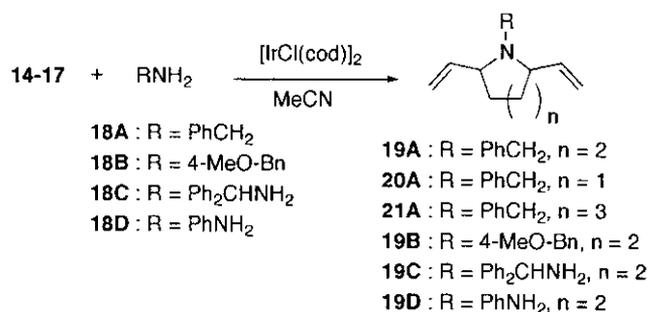


物の合成はほとんど研究されていない。そこで、テンプレート部となる含窒素環状化合物 **B** の新規合成法の開発を目指し、分子内に二ヶ所の反応点を有する基質 **C** の連続アリル位アミノ化反応を検討した。一般に、アリル位アミノ化反応においては、アミノ化の位置選択性が問題となる。最近、Takeuchi らは、イリジウム触媒を用いた場合に、アリル位アミノ化反応が内部側で位置選択的に進行し、分岐状の生成物が得られることを報告している。そこで、今回はイリジウム触媒を用いて本連続アリル位アミノ化反応を検討することにした。



本反応に用いる基質として化合物 **14-17** を調製し、その反応性

Table 4. Tandem cyclization of **14-17** with amines



- 14A** : R = PhCH<sub>2</sub>
- 14B** : R = 4-MeO-Bn
- 14C** : R = Ph<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>
- 14D** : R = PhNH<sub>2</sub>
- 19A** : R = PhCH<sub>2</sub>, n = 2
- 20A** : R = PhCH<sub>2</sub>, n = 1
- 21A** : R = PhCH<sub>2</sub>, n = 3
- 19B** : R = 4-MeO-Bn, n = 2
- 19C** : R = Ph<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>, n = 2
- 19D** : R = PhNH<sub>2</sub>, n = 2

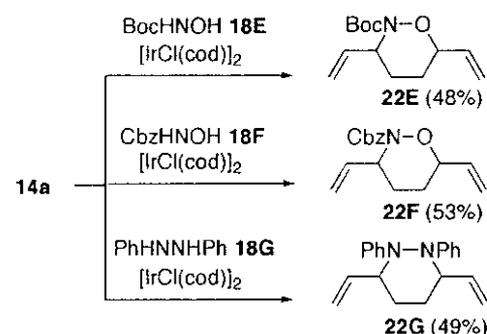
entry	substrate	amine	T (°C)	time (h)	product	yield (%)	cis : trans
1	<b>14a</b>	<b>18A</b>	20	2	<b>19A</b>	84	1.6 : 1
2	<b>14b</b>	<b>18A</b>	20	24	<b>19A</b>	18	1.5 : 1
3	<b>14b</b>	<b>18A</b>	80	7	<b>19A</b>	50	1.3 : 1
4	<b>14c</b>	<b>18A</b>	80	21	<b>19A</b>	49	1.1 : 1
5	<b>17</b>	<b>18A</b>	20	5	<b>19A</b>	75	2.0 : 1
6	<b>15</b>	<b>18A</b>	20	2	<b>20A</b>	64	1.1 : 1
7	<b>16</b>	<b>18A</b>	50	2	<b>21A</b>	42	1 : 1
8	<b>14a</b>	<b>18B</b>	50	2	<b>19B</b>	66	1.2 : 1
9	<b>14a</b>	<b>18C</b>	20	24	<b>19C</b>	42	1.2 : 1
10	<b>14a</b>	<b>18C</b>	50	2	<b>19C</b>	60	1.2 : 1
11	<b>14a</b>	<b>18D</b>	20	4	<b>19D</b>	47	1.2 : 1

を調べた。はじめに、基質としてジカーボネート **14a** を用いて、ベンジルアミン **18A** とのイリジウム触媒による連続アリル位アミノ化反応を行った。数種類の溶媒を検討したところ、反応は MeCN 中で最も効果的に進行し、目的の生成物 **19A** が高収率で得られることが判明した (Table 1, entry 1)。生成物 **19A** が得られたのは、分子間アミノ化反応とそれに続く分子内アミノ化反応が共に位置選択的に進行したことを示している。現段階で、生成物のシス-トランス選択性を制御することには成功していないが、これら異性体は容易に分離できることから、共に創薬テンプレートとして利用できる。

次に、基質による反応性の違いを検討した

(entries 2-5)。ジカーボネート体 **14a** の場合、反応は室温 2 時間で完結したのに対し、アセテートカーボネート体 **14b** やジアセテート体 **14c** の場合には、加熱する必要がある、アセテート誘導体により反応性が低下することが判明した。さらに、末端オレフィン部と内部オレフィン部を有するジカーボネート体 **17** の反応を検討した。ジカーボネート体 **17** の場合にも、反応性の低下が見られたが、2 回のアミノ化反応は位置選択的に進行して、目的の生成物 **19A** が得られた。また、用いる基質の違いにより、多少のシストランス選択性の変化は見られたが、現段階では、選択性の改善には至っていない。次に、本反応で合成できる環の大きさを調べた。ジカーボネート体 **15** の反応を検討したところ、5 員環生成物 **20A** が得られた (entry 6)。さらに、ジカーボネート体 **16** を用いて 7 員環形成反応を検討したところ、目的の生成物 **21A** が得られた (entry 7)。このように、本反応は、5 から 7 員環の含窒素複素環化合物の合成に利用できることが判明した。次に、アミンについて検討した (entries 8-11)。4-メトキシベンジルアミン **18B** やかさ高いジフェニルメチルアミン **18C** を用いた場合にも、目的の生成物 **19B** や **19C** が得られた。さらに、求核性の低いアニリン **18D** との反応においても、目的の生成物 **19D** が得られた。

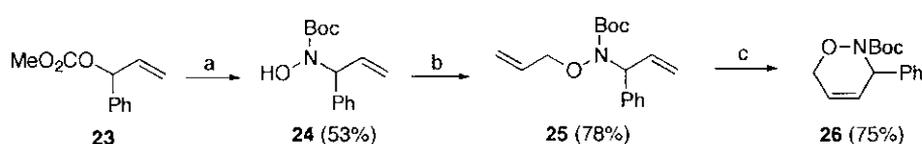
次に、求核剤として *N*-置換ヒドロキシルアミンを用いた反応を検討した。環状化合物の合成として、*N*-置換ヒドロキシルアミンを用いる反応においては、ヒドロキシルアミンの窒素原子と酸素原子が共に求核剤として、働くことが必要である (Scheme 6)。Murahashi らは、Pd を用いた *N*-置換ヒドロキシルアミンの付加反応を検討し、*N*-置換ヒドロキシルアミンの窒素原子が付加した化合物が得られることを報告している。一般に、酸素原子が求核剤となる反応は珍しく、Trost が報告しているフェノール類の反応が主な反応例である。そのため、*N*-置換ヒドロキシルアミンの酸素原子が求核剤として働くかどうか興味を持たれる。イリジウム触媒を用いて、ジカーボネート体 **14a** と *N*-Boc ヒドロキシルアミン **18E** の反応を検討した。その結果、目的の連続反応が進行し、閉環体 **22E** が 48% の収率で得られた。さらに、*N*-Cbz ヒドロキシルアミン **18F** を用いた場合にも、同様に目的の **22F** が得られた。比較として、*N*-ベンジルヒドロキシルアミンとの反応を検討したところ、閉環体の生成は確認できなかった。このように、ヒドロキシルアミンの窒素原子上に電子吸引基がある場合には、ヒドロキシルアミンの窒素原子と酸素原子が共に求核性を示し、目的の環化反応が進行することが判明した。電子吸引基を有するヒドロキシルアミンの酸素原子が求核性を示す理由として、一つの可能性ではあるが、ジカーボネート体 **14a**



Scheme 6.

から生成したメトキサイドが *N*-Boc ヒドロキシルアミン **18E** や *N*-Cbz ヒドロキシルアミン **18F** と反応して、アニオンを生成している可能性が考えられる。さらに、ヒドラジン **18G** を用いた連続反応を検討したところ、反応は速やかに進行し、閉環体 **22G** が 49% の収率で得られた。

さらに、*N*-置換ヒドロキシルアミンの反応性を利用して、分子間で 2 回のアリル化反応を行い、ヒドロキシルアミンの窒素原子と酸素原子が共に置換された生成物 **25** を合成した (Scheme 7)。続いて、オレフィンメタセシス反応を行うことにより、新規テンプレートと



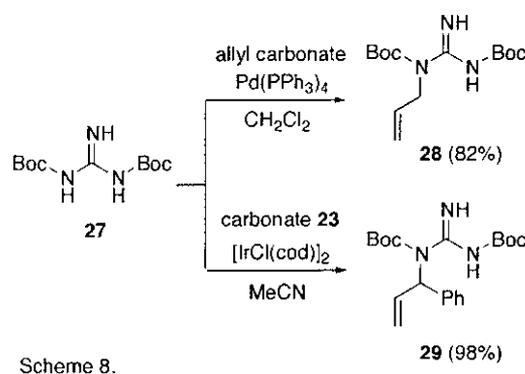
Scheme 7. (a) BocHNOH **18E**,  $[\text{IrCl}(\text{cod})_2]$ ; (b) allyl carbonate,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ; (c) Grubbs' catalyst.

なる閉環体 **26** を合成した。

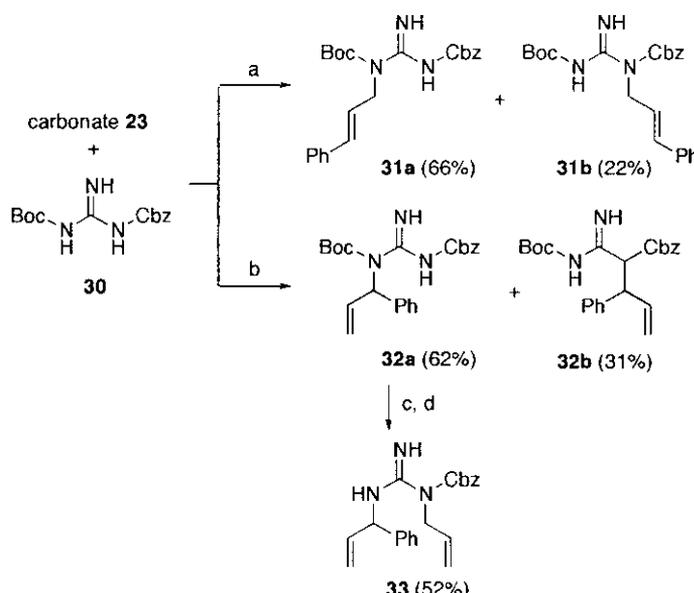
以上のように、創薬テンプレートの母核分子として、含窒素環状化合物、含窒素-酸素環状化合物、含窒素-窒素環状化合物の合成に成功した。

### 2) グアニジン基の新規導入反応の開発

次に、ファーマコホアーとして非常に重要な役割を担っているグアニジン基を導入するための新しい反応の開発に着手した。そこで、グアニジン誘導体を求核剤として用いるアリル位アミノ化反応を検討した (Scheme 8)。様々なグアニジン誘導体を用いて検討した結果、グアニジンの二つの窒素原子が電子吸引基で置換されたグアニジン誘導体が高い反応性を有することが判明した。パラジウム触媒存在下、ジボック体 **27** とアリルカーボネートの反応を検討したところ、アリル体 **28** が 82% の収率で得られた。さらに、イリジウム触媒存在下、ジボック体 **27** とアリルカーボネート

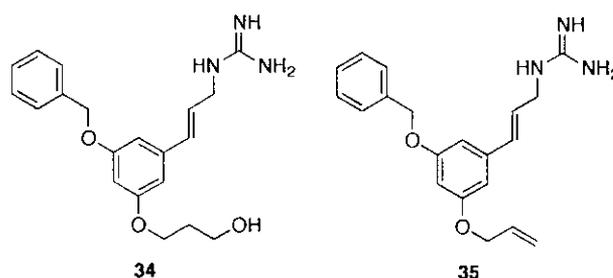


と **23** の反応を検討したところ、アリル体 **29** が 98% の収率で得られた。このように、イリジウム触媒を用いるとアミノ化反応が内部側で位置選択的に進行することが判明した。次に、グアニジンの二つの窒素原子が異なる電子吸引基で置換されたグアニジン **30** を用いて、反応を検討した (Scheme 9)。パラジウム触媒存在下、アリルカーボネート **23** との反応を行ったところ、反応は位置選択的に進行し、末端側で反応した生成物 **31a** と **31b** が得られた。一方、イリジウム触媒を用いると反応は内部側で位置選択的に進行し、分岐状生成物 **32a** と **32b** が得られた。さらに、分岐状生成物 **32a** は、TFA による脱保護と続くアリル化反応により、化合物 **33** を与え、さらなる官能基化が可能であることが明らかとなった。



### 3) 水酸基、グアニジン基、芳香環部の三成分を三方向に配置したモデル化合物の合成

本グアニジン基導入反応を利用した HIV 活性物質の探索研究として、水酸基、グアニジン基、芳香環部の三成分を三方向に配置したモデル化合物 **34** を合成した (Scheme 9)。活性を比較するため、グアニジン基、芳香環部の二成分を二方向に配置した化合物 **35** も同時に合成した。化合物 **34** の合成に関しては、化合物 **36** の二つの水酸基をベンジル基とアリル基に変換して化合物 **37** とした後、9-BBN によるヒドロホウ素化-酸化反応、水酸基の TBS 化、



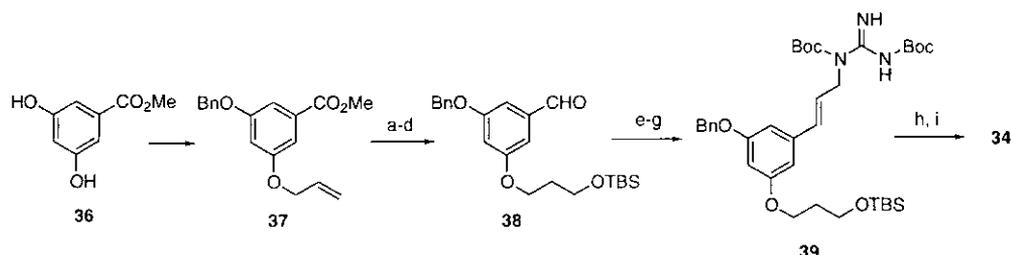
エステル部の DIBAL 還元、水酸基の IBX 酸化を行い、アルデヒド体 **38** を合成した。続いて、ビニル化、カーボネート化を経て、カーボネート体を合成し、パラジウム触媒存在下、ジボックグアニジン **27** との反応を行い、グアニジン体 **39** を合成した。最後に、脱保護を行い、目的とする水酸基、グアニジン基、芳香環部の三成分を三方向に配置した化合物

**34** の合成に成功した。

### 3. 結論および考察

プロテアーゼ

阻害剤の非ペプ



Scheme 10. (a) 9-BBN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (b) TBSCl; (c) DIBAL; (d) IBX; (e) CH<sub>2</sub>=CHMgBr; (f) CO<sub>2</sub>CCl; (g) **14**, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>; (h) TBAF; (i) TFA.

チド化を指向した研究により、多種多様の誘導体合成に応用可能な多官能性環状創薬テンプレートの新規合成法を開発し、グアニジン基の簡便な導入法も確立した。現在、合成した化合物の薬理活性試験を行っているところである。

## 研究発表

### 1. 論文発表

1. M. Anzai, R. Yanada, N. Fujii, H. Ohno, T. Iwaka, Y. Takemoto: Asymmetric synthesis of  $\beta^{2,3}$ -amino acids by InI-Pd(0)-promoted metalation and addition of chiral 2-vinylaziridines, *Tetrahedron*, **58**, 5231-5239 (2002).
2. R. Yanada, Y. Takemoto: OsO<sub>4</sub>-catalyzed dihydroxylation of olefins in ionic liquid [emim]BF<sub>4</sub>: a recoverable and reusable osmium, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 6849-6852 (2002).
3. R. Yanada, N. Nishimori, A. Matsumura, N. Fujii, Y. Takemoto: Indium-mediated atom-transfer cyclizations and reductive cyclizations, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 4585-4588 (2002).
4. T. Matsushita, H. Ashida, T. Kimachi, Y. Takemoto: Synthetic study on CP-263,114 (phomoidride B) by SET-mediated fragmentation, *Chem. Commun.*, 814-815 (2002).
5. M. Nakoji, T. Kanayama, T. Okino, Y. Takemoto: Pd-Catalyzed Asymmetric Allylic Alkylation of Glycine Iminoester Using a Chiral Phase-Transfer Catalyst, *J. Org. Chem.*, **67**, 7418-7423 (2002).
6. H. Ohno, K. Miyamura, T. Tanaka, S. Oishi, A. Toda, Y. Takemoto, N. Fujii, T. Iwaka: Synthesis of allenes from allylic alcohol derivatives bearing a bromine atom using a palladium(0)/diethylzinc system, *J. Org. Chem.*, **67**, 1359-1367 (2002).
7. H. Miyake, K. Yoshida, A. Matsumura, M. Yamauchi, Y. Takemoto: *O*-Allylic Substitution of Hydroxylamine Derivatives Having an *N*-Electron-Withdrawing Substituent, *Synlett*, 567-569 (2003).

### 2. 学会発表

- ① 海江田啓、柳田玲子、竹本佳司：インジウム(0)を用いた立体選択的アリル化反応と Manzacidin A 合成研究への応用：日本薬学会第 122 年会（千葉）平成 14 年 3 月 26-28 日
- ② 西森信明、松村明、柳田玲子、竹本佳司：インジウム(0)を用いた触媒的ラジカル環化反応：第 28 回有機反応懇談会（京都）平成 14 年 8 月 3 日
- ③ 宮部豪人、吉田和正、村松明、竹本佳司：イリジウムを用いたアリル位アミノ化反応に基づく含窒素複素環化合物の合成：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
- ④ 柳田玲子、西森信明、松村明、小比賀真吾、藤井信孝、竹本佳司：インジウム(0)を用いる新規原子移動型ラジカル環化反応及び還元型環化反応による複素環化合物の合成：第 32 回複素環化学討論会（徳島）平成 14 年 12 月 4-6 日
- ⑤ 西森信明、柳田玲子、松村明、小比賀真吾、竹本佳司、藤井信孝：インジウム(0)を用いた新規ラジカル閉環反応の開発：有機合成若手セミナー（神戸）平成 14 年 12 月 10 日

### 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（イオン性液体酸化オスミウム：竹本佳司、柳田玲子、特願 2002-217728 号、平成 14 年 7 月 26 日）

## HIV-1 侵入動的超分子機構を標的とする耐性克服型化学療法剤の開発

分担研究テーマ： **合成品の抗 HIV 活性の評価及び作用機序研究**

所 属 聖マリアンナ医科大学医学部

分担研究者 中島 秀喜

(研究協力者：武永美津子、五十嵐理慧)

### 研究要旨

T 細胞指向性 (T-tropic、X4) HIV-1 感染におけるコレセプターである CXCR4 に作用する合成ペプチド T140 類似体を皮下投与可能にすることと生体内安定性を高める目的で徐放化製剤を作成し、その抗 HIV 活性を検討した。マウスおよびラットに皮下投与した後に経時的に採血を行い、その血清中に存在する抗 HIV 活性を MTT 法で評価した場合、非徐放化のものに比べて徐放化製剤は抗ウイルス活性がピークに達するまでに時間がかかる反面、その活性持続時間が延長することがわかった。また、マウスを用いた実験的メラノーマ細胞の肺転移の抑制効果を検討した結果、非徐放化 CXCR4 アンタゴニストペプチドには転移抑制効果はみられなかったが、徐放化した TE14011-PE では有意に肺臓表面に確認される転移性メラノーマ細胞コロニー数の減少がみられた。

### A. 研究目的

我々は昨年度迄の研究で X4HIV-1 感染のコレセプターの CXCR4 に作用して HIV 感染を阻止する低分子合成ペプチド T134 および T140 の抗ウイルス活性評価とその作用機序の検討を行った。本年度は、T140 誘導体 (TE14011) について叙放化 DDS 製剤 (TE14011-PLA) を作成し、その抗 HIV 活性を検討した。さらに、徐放化 T140 化合物の抗腫瘍薬としての可能性を、実験的肺癌転移モデル系を用いて評価したので報告する。

### B. 研究方法

1) 試験薬剤：T140 類似化合物の DDS 化製剤を PLA50 (和光純薬) を用いて作成した。癌の肺転移抑制作用を検討した、TE14011 (MW ; 2460. 71) の DDS 化製剤 (TE14011-PLA) は、TE14011 として製剤中に 5w/w%含有となるように作成した。

2) 抗 HIV 活性試験：抗 HIV 活性は、HIV 感染 MT-4 細胞に見られる細胞傷害の試験薬

剤による阻止率を MTT 法にて評価した。また、生体内での薬剤の活性持続時間を検討することを目的として、試験薬剤を ICR マウスに 3mg/匹相当量を皮下投与し、経時的に眼底静脈から採血し、血清中に残存する抗 HIV 活性を、同様に MTT 法で評価した。また、同様の試験をラット 1mg/匹相当量を皮下投与し、経時的に採血した時の血清中の抗 HIV 活性も検討した。

3) メラノーマ細胞の肺転移抑制作用：雄性マウス (C57/BL6、6W 齢、平均体重 20g) を用いて TE14011 または TE14011-PLA を 3mg/匹相当量を皮下注射した。投与 30 分後に、B16-BL6 メラノーマ細胞 ( $1 \times 10^4$ /0.2ml) を尾静脈から接種した。メラノーマ細胞接種 2 週間後に肺を摘出し、肺臓表面に見られる癌コロニー数を、実態顕微鏡を用いて計数した。

### C. 研究成果

1) 抗 HIV 活性：TE14011 と、その DDS 化製剤を ICR マウスに 3mg/匹皮下投与したときの、投与後 1 h、6 h、24 h、48 h、72 h 後に採血を行い、血清中にみられた抗 HIV 活性を、血清の希釈倍数で評価した。

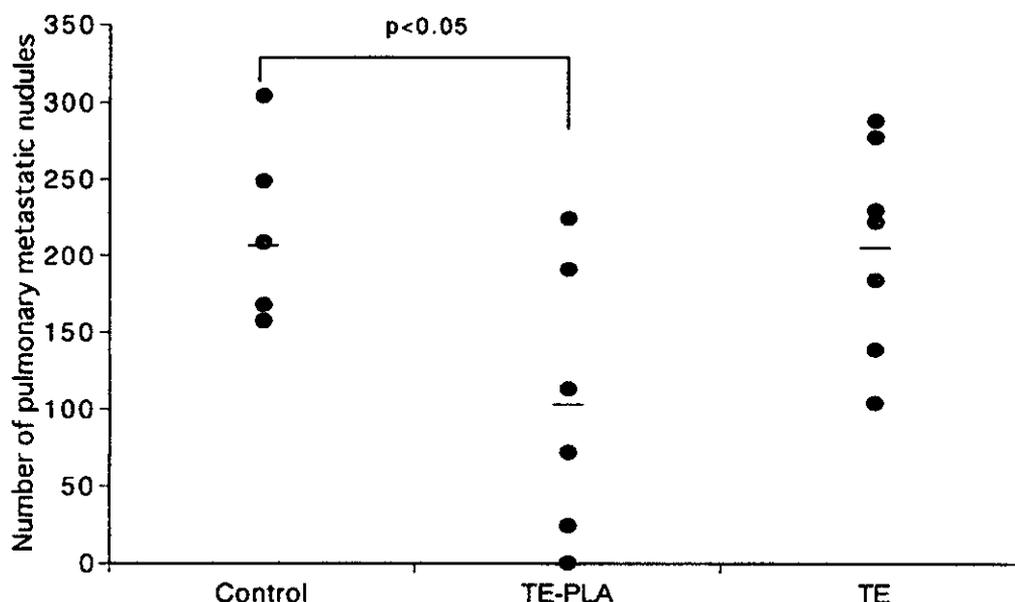
試験物質	抗 HIV 活性				
	1 h	6 h	24 h	48 h	72 h
TE14011	x 526	x 158	x 81	x 58	x 43
TE14011-HA	x 227	x 250	—	x 54	x 40
TE14011-CS	x 87	x 227	x 147	x 123	x 79

表にみられるように、TE14011 は投与後 1 時間で血清中の抗 HIV 活性がピークに達し、以後時間を追う毎に活性は減弱している。これに対して徐放化した TE14011-HA および TE14011-CS では、投与後 6 時間後に血清中の抗 HIV 活性はピークとなり、特に TE14011-CS では 48 時間後でも高い抗ウイルス活性が残存していることが認められた。同様の実験をラットでも行ったが、徐放化したものの方が、血清中にみられる抗 HIV 活性のピークに達するまでの時間が遅く、活性の持続が長いことがわかった。

2) メラノーマ細胞の肺転移抑制作用：B16-BL6 メラノーマ細胞投与後の肺臓表面のコロニー数は、薬剤非投与のコントロール群では  $207.3 \pm 54.0$  (mean  $\pm$  SD) であった。これに対して、DDS 化製剤である TE14011-PLA (TE14011 として 3mg) をメラノーマ細胞投与前に皮下注射した場合の肺臓表面にみられたコロニー数は  $103.9 \pm 81.0$  ( $p < 0.05$  vs

コントロール群) であり、有意な肺転移抑制効果が認められた。しかしながら、DDS 化していない TE14011 単独の投与では、コロニー数は  $206.2 \pm 63.2$  であり、コントロール群と比べて有意な抑制作用はみられなかった。

#### Effect of TE14011 on Experimental Pulmonary Metastasis



#### D. 考察

我々はこれまでに、X4HIV-1 感染のコレセプターである CXCR4 のアンタゴニストとして作用することで抗ウイルス活性を示す合成ペプチド T134 および T140 の活性評価を行ってきた。さらに、T134 同様に CXCR4 に作用する AMD3100 と抗 CXCR4 モノクローナル抗体や SDF-1 の細胞膜との結合への影響を検討してきた。今年度は、T140 の誘導体である TE14011 の臨床的応用を考えて、その徐放化 DDS 製剤を作成し、これをマウスやラットに皮下投与した時の血清中にみられる有効抗 HIV 活性を経時的に検討してみた。その結果、TE14011 の皮下投与では、急激に血清中に抗 HIV 活性の上昇がみられるものの、単回投与ではその抗ウイルス活性は短時間に減少していった。しかしながら、これを徐放化した場合では、その血清中にみられる抗 HIV 活性が持続することがわかった。このことは、我々がこれまで行ってきた CXCR4 アンタゴニスト作用をもつ抗 HIV ペプチドであっても、徐放製剤化することで皮下注射で投与可能となり、その投与回数を減らしても抗ウイルス活性の持続が期待できることを示すものである。

さらに、今回作製した DDS 化製剤 (TE14011-PLA) の投与は、実験的メラノーマの肺転移を有意に抑制した。CXCR4 アンタゴニストが癌転移抑制作用を示すことは、すでに

いくつかの報告がなされている。特に、ヒトメラノーマ細胞では CXCR4 の発現が見られることが知られており、強力な CXCR4 アンタゴニストである TE14011 がメラノーマ細胞に直接作用した結果として癌転移を抑えた可能性が考えられる。現在、B16-BL6 メラノーマ細胞、および B16-BL6 メラノーマ接種担癌那薄の肺臓表面に CXCR4 がどの程度存在するかを検討中である。一方、TE14011 単独の投与では癌転移の有意な抑制作用は認められなかった。今回行ったような血行性転移の実験系に限っても、肺臓表面に見られる転移コロニーの形成までには、血流中での循環、肺毛細血管内皮への接着、血管外への漏出、標的器官内での浸潤など、多くの過程を経ているはずである。それ故に、徐放化製剤の方が体内での有効な活性の持続時間が延長しているために、このような結果が得られたのかもしれない。今後、これらの製剤を投与した時の体内動態の詳細な検討を行うことで、この点を明確に解明していきたい。

#### E. 結論

CXCR4 アンタゴニストである TE14011 の徐放化製剤を作製し、これをマウスやラットに皮下投与したときの、血清中にみられる抗 HIV 活性を検討した。その結果、非徐放化のものに比べて、徐放化製剤の方が血清中にみられる抗 HIV 活性が持続することがわかった。また、TE14011 徐放化製剤は、実験的メラノーマ細胞の肺転移モデル系で、有意に癌転移を抑制することがわかった。

#### F. 発表論文

1. **Shinataki, Y., Motohashi, N., Tani, S., Sunaga, K., Sakagami, H., Satoh, K., Nakashima, H., Kanamoto, T., Wolfard, K. and Molnar, J. :**  
**Antioxidative activity of *Allium victorialis* L. extracts.,**  
*Anticancer Res.,* **21;** 3331-3340, 2001.
2. Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Oishi, S., Habashita, H., Kanamoto, T., Gotoh, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., Otaka, A. and Fujii, N.:  
**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.,**  
*Bioorganic Med. Chemist.,* **10;** 1417-1426, 2002.
3. Tamamura, H., Hiramatsu, K., Miyamoto, K., Omagari, A., Oishi, S., Nakashima, H., Yamamoto, N., Kuroda, Y., Nakagawa, T., Otaka, A.

- and Fujii, N.:
- Synthesis and evaluation of pseudopeptide analogues of a specific CXCR4 inhibitor, T140 : the insertion of an (E)-alkene dipeptide isostere into the  $\beta$ II'-turn moiety.,**  
*Bioorganic Med. Chemist. Lett.*, **12**; 923-928, 2002.
4. Miyamoto, M., Sakagami, H., Minagawa, K., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Satoh, K., Komatsu, N., Fujimaki, M., Nakashima, H., Gupta, M., Sarma, D.N.K. and Mitra, S.K.:
- Tumor-specificity and radical scavenging activity of poly-herbal formula.,**  
*Anticancer Res.*, **22**; 1217-1224, 2002.
5. Mihara, S., Unten, S., Kakuta, H., Satoh, K., Negpro, T., Nakashima, H., Komatsu, N., Fujimaki, M., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Minagawa, K., Suzuki, F., Satoh, T. and Sakagami, H.:
- Diverse biological activities of fermented pine seed shell extract.,**  
*Anticancer Res.*, **22**; 1569-1574, 2002.
6. Motohashi, N., Shirataki, Y., Kawase, M., Tani, S., Sakagami, H., Satoh, K., Kurihara, T., Nakashima, H., Mucsi, I., Varga, A. and Molnar, J.:
- Cancer prevention and therapy with kiwifruit in Chinese folklore medicine: a study of kiwifruit extracts.,**  
*J. Ethnopharmacol.*, **81**; 357-364, 2002.
7. Inagawa, T., Nakashima, H., Karwowski, B., Guga, P., Stec, W. J., Takeuchi, T. and Takaku, H.:
- Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model.,**  
*FEBS Lett.*, **528**; 48-52, 2002.
8. Nemoto, Y., Satoh, K., Toriizuka, K., Hirai, Y., Tobe, T., Sakagami, H., Nakashima, H., and Ida, Y.:
- Cytotoxic and radical scavenging activity of blended herbal extracts.,**  
*in vivo*, **16**; 327-332. 2002.
9. Hatsukari, I., Hitosugi, N., Ohno, R., Nakamura, S., Mizutani, S., Nagasaka, H., Matsumoto, I., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Niitsu, H.,

Kawase, M., Negoro, T., Satoh, K., Nakashima, H., and Sakagami, H. :  
**Partial purification of cytotoxic substances from Moxa extract.**  
*Anticancer Res.*, **22**; 2777-2782, 2002.

10. Miyamoto, M., Hashimoto, K., Minagawa, K., Satoh, K., Komatsu, N., Fujimaki, M., Nakashima, H., Yokote, Y., Akahane, K., Gupta, M., Sarma, D.N.K., Mitra, S.K. and Sakagami, H. :  
**Effect of poly-herbal formula on NO production by LPS-stimulated mouse macrophage-like cells.**  
*Anticancer Res.*, **22**; 3293-3302, 2002.

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Tamamura, K. Hiramatsu, K. Miyamaoto, A. Omagari, S. Oishi, H. Nakashima, N. Yamamoto, K. Kuroda, T. Nakagawa, A. Otaka, N. Fujii	Synthesis and Evaluation of Pseudopeptide Analogs of a Specific CXCR4 Inhibitor, T140: The Insertion of an ( <i>E</i> )-Alkene Dipeptide Isostere into the $\beta$ II'-Turn Moiety	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>	12	923-928	2002
H. Ohno, K. Miyaura, T. Tanaka, S. Oishi, A. Toda, Y. Takemoto, N. Fujii, T. Ibuka	Synthesis of allenes from allylic alcohol derivatives bearing a bromine atom using a palladium(0)/diethylzinc system.	<i>J. Org. Chem.</i>	67	1359-1367	2002
H. Tamamura, T. Hori, A. Otaka, N. Fujii	Efficient stereoselective synthesis of peptidomimetics containing hydroxyethylamine dipeptide isosteres utilizing the aza-Payne rearrangement and <i>O,N</i> -acyl transfer reactions.	<i>J. Chem. Soc., Perkin Trans I</i>		577-580	2002
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	A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals T140 is an inverse agonist and AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists	<i>J. Biol. Chem.</i>	277	24515-24521	2002
S. Oishi, T. Kamano, A. Niida, Y. Odagaki, H. Tamamura, A. Otaka, N. Hamanaka, N. Fujii	Diastereoselective Synthesis of $\psi[(E)\text{-CH=CMe}]$ - and $\psi[(Z)\text{-CH=CMe}]$ -Type Dipeptide Isosteres by Organocopper-Mediated <i>anti</i> - $\text{S}_{\text{N}}2'$ Reaction.	<i>Org. Lett.</i>	4	1051-1054	2002

S. Oishi, A. Niida, T. Kamano, Y. Odagaki, H. Tamamura, A. Otaka, N. Hamanaka N. Fujii	Diastereoselective Synthesis of $\psi[(E)\text{-CMe=CH}]$ - and $\psi[(E)\text{-CMe=CMe}]$ -Type Dipeptide Isosteres Based on Organocopper-Mediated <i>anti</i> -SN2' Reaction.	<i>Org. Lett</i>	4	1055-1058	2002
M. Anzai, R. Yanada, N. Fujii, H. Ohno, T. Ibuka, Y. Takemoto	Asymmetric Synthesis of $\beta$ 2,3-amino acids by InI-Pd(0)-promoted metalation and addition of chiral 2-vinylaziridines.	<i>Tetrahedron</i>	58	5231-5239	2002
R. Yanada, N. Nishimori, A. Matsumura, N. Fujii, Y. Takemoto	Indium-mediated Atom-transfer Cyclization and Reductive Cyclization.	<i>Tetrahedron Lett.</i>	43	4585-4588	2002
A. Otaka, M. Nakamura, E. Kodama, S. Uchiyama, S. Nakamura, H. Nakano, H. Tamamura, Y. Kobayashi, M. Matsuoka, N. Fujii	Artificial Remodeling of gp41-C34 Peptide Leads Effective HIV Fusion Inhibitor with Anti-HIV Activity.	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i>	41	2937-2940	2002
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	G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4.	<i>Nature Immunology</i>	3	687-694	2002
R. Hosotani, Y. Miyamoto, K. Fujimoto, R. Doi, A. Otaka, N. Fujii, M. Imamura	Trojan p16 peptide suppresses pancreatic cancer growth and prolongs survival in mice.	<i>Clin. Cancer Res.</i>	8	1271-1276	2002

S. Oishi, A. Niida, T. Kamano, Y. Miwa, T. Taga, Y. Odagaki, N. Hamanaka, M. Yamamoto, K. Akaji, H. Tamamura, A. Otaka, N. Fujii	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.	<i>J.Chem. Soc., Perkin Trans</i>		1786-1793	2002
A. Otaka, F. Katagiri, T. Kinoshita, Y. Odagaki, S. Oishi, H. Tamamura, N. Hamanaka, N. Fujii	Regio- and Stereoselective Synthesis of ( <i>E</i> )-Alkene <i>trans</i> -Xaa-Pro Dipeptide mimetics Utilizing Organocopper-Mediated <i>anti</i> -SN <sub>2</sub> ' reactions.	<i>J. Org. Chem.</i>	67	6152-6161	2002
S. Oishi, T. Kamano, A. Niida, Y. Odagaki, N. Hamanaka, M. Yamamoto, K. Ajito, H. Tamamura, A. Otaka, N. Fujii	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.	<i>J. Org. Chem.</i>	67	6162-6173	2002
J.U. Lee, R. Hosotani, M. Wada, R. Doi, T. Koshiba, K. Fujimoto, Y. Miyamoto, S. Tsuji, S. Nakajima, M. Hirohashi, T. Uehara, Y. Arano, N. Fujii, M. Imamura	Antiproliferative activity induced by the somatostatin analogue, TT-232 in human pancreatic cancer cells.	<i>Eur J. Cancer</i>	38	1526-1534	2002
S. M. Owen, D. Rudolph, D. Schols, N. Fujii, N. Yamamota, R. B. Lall	Susceptibility of Diverse Primary HIV Isolates with Varying Co-receptor Specificity's to the CXCR4 Antagonistic Compounds.	<i>J. Med. Virol.</i>	68	147-155	2002

H. Tamamura, A. Omagari, K. Hiramatsu, S. Oishi, H. Habashita, T. Kanamoto, K. Gotoh, N. Yamamoto, H. Nakashima, A. Otaka, N. Fujii	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.	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	10	1417-1426	2002
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	Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo $\alpha v \beta 3$ integrin related tumor imaging.	<i>Nucl. Med. Biol.</i>	30	1-9	2003
N. Fujii, H. Nakashima, H. Tamamura	The Therapeutic Potential of CXCR4 Antagonists in the Treatment of HIV	<i>Expert Opinion on Investigational Drugs</i>	12	186-195	2003
H. Tamamura, Y. Koh, S. Ueda, Y. Sasaki, T. Yamasaki, M. Aoki, K. Maeda, Y. Watai, H. Arikuni, A. Otaka, H. Mitsuya, N. Fujii	Reduction of Peptide Character of HIV Protease Inhibitors that Exhibit Nanomolar Potency against Multi-drug Resistant HIV-1 Strains.	<i>J. Med. Chem.</i>		In press	2003

20021244

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.75- P.78の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。