

X-EE-XX-KK ユニット(X = C34 のアミノ酸残基; E = Glu; K = Lys)を導入することで、相互作用面と溶媒接触面とに区別化され、gp41 NHR との 6-helical bundle 構造が安定化し、抗 HIV 活性の向上につながるという戦略である。研究グループでは、C34 と同じ CHR の部分ペプチドである T-20 も同様に、 $\alpha$  ヘリックス性の向上により抗 HIV 活性の向上が可能であると考えた。そこで、T-20 に X-EE-XX-KK ユニット(X = T-20 のアミノ酸残基; E = Glu; K = Lys)を適用し、新規誘導体 T-20EK をデザインした。図 1 に示したように、結晶構造から推定される gp41 NHR との相互作用に重要な残基(a,d,e)はウイルス由来の配列を保存し、溶媒接触面に位置する残基(b,c,f,g)を Glu もしくは Lys に置換した。これにより、ヘリックスの内側と外側の機能を分割して予測することが可能となり、T-20 の活性発現メカニズムの解明に寄与することが期待された。

一方、T-20 耐性 HIV 臨床分離株の gp41 において、NHR の Asn43 と CHR の Ser138 の変異が確認され、このうち特に Asn43 が Asp、Ser138 が Ala にそれぞれ変異することで、T-20 に対する耐性が 47 倍上昇することが報告されている(図 2)。また、Kim らによる gp41 の X 線結晶構造解析から、この NHR の 43 位と CHR の 138 位は空間的に近い位置にあると考えられている。以上のことから、研究グループでは、CHR の 138 位が NHR と CHR の相互作用だけでなく、T-20 の抗 HIV 活性にも重要な役割を果たしているのではないかと考え、この部位の構造活性相関について精査した。

### (倫理面への配慮)

該当事項なし

## C. 研究結果

全てのペプチドは、Fmoc 固相合成法により調製し、MAGI assay により抗 HIV 活性を評価した。活性評価の結果、T-20EK は T-20 に比べ約 8 倍強力な抗 HIV 活性を示した(図 1)。また、CD スペクトル測定の結果、T-20EK において  $\alpha$  ヘリックス性の指標として用いられる 222 nm 付近で負の極大を示すスペクトルが観察され、T-20EK の  $\alpha$  ヘリックス性が T-20 に比べ期待通り上昇していることを確認した(図 3)。

6-helical bundle 構造のさらなる安

定化と物性の向上を期待して、T-20EK の N および C 末端領域に Glu もしくは Lys の置換を拡張した T-20EK2-5 をそれぞれ合成し、抗 HIV 活性を評価したところ、T-20EK に比べ、T-20EK2 は 1/5、T-20EK3 は 1/4、T-20EK4,5 は 1/80 程度の活性を示した(表 1)。特に Trp161 を Glu に置換した T-20EK4 および T-20EK5 は著しい活性の低下を示したため、Trp161 が抗 HIV 活性の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、T-20EK の C 末端領域について精査した。T-20 の C 末端疎水性アミノ酸残基は活性発現に必須であることが報告されている。T-20EK には、T-20 の溶媒接触面に Glu-Lys の組み合わせが 8 組導入されているが、C 末端疎水性アミノ酸領域は保存されており、特に Trp の配置は種々の HIV 株においても高度に保存されている。そこで、T-20EK においても C 末端疎水性アミノ酸残基が活性発現に重要であるかを調べるため、それぞれアラニンに置換した誘導体の抗 HIV 活性を評価したところ、T-20EK/W159A, W161A, F162A において 15 倍以上活性の低下が認められた(表 1)。一方、T-20EK/W155A では、1/4 程度の活性の低下にとどまり、155 位の Trp は 6-helical bundle 構造内に位置している可能性が示唆された。これらの結果から、T-20EK の C 末端(159 位、161 位、162 位)の疎水性でかつ立体的にかさ高いアミノ酸残基は T-20 と同様活性発現に必須であり、この領域が

表 1: T-20 誘導体の抗 HIV 活性

Peptides	Sequences	EC <sub>50</sub> (nM)
T-20EK	YTSLI <b>E</b> ELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKKWNWF	1.50±0.19
T-20EK2	YTSK <b>I</b> EELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKKWNWF	7.52±1.40
T-20EK3	YTK <b>K</b> I <b>E</b> ELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKKWNWF	5.99±3.15
T-20EK4	YTSK <b>I</b> EELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKK <b>W</b> EEF	125.37±26.82
T-20EK5	YTK <b>K</b> I <b>E</b> ELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKK <b>W</b> EEF	121.10±64.83
T-20EK32	<b>I</b> EELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKKWNWF	16.84±3.58
T-20EK25	<b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKKWNWF	>1000
T-20EK18	<b>N</b> EELKKLEEWAKKWNWF	>1000
T-20EK11	<b>L</b> EEWAKKWNWF	>1000
T-20EK/F162A	YTSLI <b>E</b> ELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKKWN <b>A</b>	26.84±6.82
T-20EK/W161A	YTSLI <b>E</b> ELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKK <b>W</b> NAF	23.74±8.63
T-20EK/W159A	YTSLI <b>E</b> ELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLEEWAKK <b>A</b> NWF	48.97±8.63
T-20EK/W155A	YTSLI <b>E</b> ELIKK <b>S</b> EEQQK <b>R</b> NEELKKLE <b>E</b> AAK <b>K</b> WNWF	5.82±1.02

表 2: T-20/S138X および T-20EK/S138X の抗 HIV 活性

T-20/S138X		T-20EK/S138X		T-20/S138X		T-20EK/S138X	
T-20/S138X		T-20EK/S138X		T-20/S138X		T-20EK/S138X	
X	EC <sub>50</sub> (nM)	X	EC <sub>50</sub> (nM)	X	EC <sub>50</sub> (nM)	X	EC <sub>50</sub> (nM)
S	14.21±2.59	S	1.82±0.37	D	>1000	D	>1000
A	1.51±0.33	A	0.29±0.03	E	>1000	E	>1000
I	2.05±0.76	I	0.53±0.06	K	>1000	K	>1000
L	2.62±0.41	L	1.84±0.38	E	>1000	E	>1000
M	1.65±0.57	M	0.69±8.58	H	>1000	H	>1000
V	3.57±0.82	V	2.25±0.46	R	>1000	R	>1000
G	17.35±6.53	G	3.08±0.66	F	69.97±34.31	F	58.18±9.46
T	13.32±3.84	T	3.89±0.58	P	>1000	P	>1000
N	293.03±83.20	N	179.19±70.65	Y	268.70±35.86	Y	189.25±46.68
Q	377.10±244.48	Q	225.19±92.51	W	533.97±146.93	W	>1000

表 3: T-20/S138A および T-20EK/S138A の T-20 耐性株に対する抗 HIV 活性

Peptides	EC <sub>50</sub> (nM)	
	DG*	DG/N43D**
T-20	2.25±0.52	43.73±10.71
T20/S138A	0.51±0.07	3.49±0.85
T-20EK	1.03	1.48
T-20EK/S138A	0.28	0.28

DG\*: D36G variant of NL4-3 strain (control)  
 DG/N43D\*\*: D36G/N43G variant of NL4-3 strain (T-20 resistant)  
 N36 (NL4-3) :SDIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVHGKIQLOARIL  
 N36 (DG) :SGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVHGKIQLOARIL  
 N36 (DG/N43D) :SGIVQQNDLLRAIEAQHLLQLTVHGKIQLOARIL

表 4: T-20/S138A および C34/S138A の抗 HIV 活性

X	EC <sub>50</sub> (nM)	
	T-20/S138X	C34/S138X
S	14.21±2.59	2.70±0.38
A	1.51±0.33	0.30±0.09
L	2.62±0.41	0.35±0.07
P	>1000	157.75±20.61
T	13.32±3.84	1.66±0.72
W	533.97±146.93	>1000

C34/S138X  
 WMEWDREINNYTSLIHSLEIEKXNQOQEKNEQELL  
 CHR  
 Ser(138) tgc-gcg (Ala)  
 others: acg (Thr), ccg (Pro)  
 ttg (Leu), tgg (Trp)

6-helical bundle 構造の形成とは異なる様式で活性発現に寄与している可能性が示唆された。

つづいて、T-20 および T-20EK の 138 位をシステインを除く天然アミノ酸で置換した T-20/S138X および T-20EK/S138X を合成し、抗 HIV 活性を評価した。その結果、いずれの誘導体間においても酸性アミノ酸 (Asp, Glu) や塩基性アミノ酸 (Lys, His, Arg) 置換体において大幅な活性の低下が認められたが、Ala や Ile といった電荷を持たない側鎖の比較的小さいアミノ酸で置換した場合において高い抗 HIV 活性を示した (表 2)。中でも、Ala 置換体がどちらのペプチドにおいても最も高い活性を示し、T-20EK/S138A はリード化合物である T-20 に比べ 50 倍以上強力な抗 HIV 活性を示した。さらに、T-20 耐性株 (DG/N43D) に対する抗 HIV 活性を評価したところ、T-20/S138A および T-20EK/S138A は耐性株に対しても強力な抗 HIV 活性を示した (表 3)。

さらに 138 位のアミノ酸置換を C34 に応用した。C34/S138X を合成し、抗 HIV 活性を評価した結果、置換部位において T-20 と同じ傾

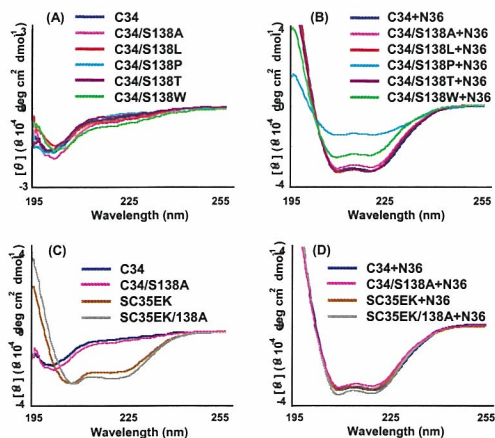


図 5: C34/S138X(A)、C34/S138A-N36 複合体(B)、C34 誘導体(C)、C34 誘導体-N36 複合体(D)の CD スペクトル

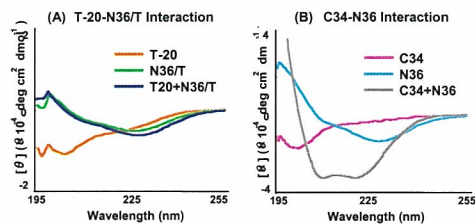


図 4: T-20-N36/T 複合体(A)と C34-N36 複合体(B)の CD スペクトル

向の構造活性相関を示した (表 4)。このため、T-20 耐性獲得のメカニズムに基づく膜融合阻害剤の開発を視野に入れ、これらの 138 位置換体についてさらに詳しく精査した。

抗 HIV 活性と 6-helical bundle 形成能との関係を明らかにするため、複合体の CD スペクトルを測定した。T-20 とそれに相当する NHR である N36/T を用いた場合、α-ヘリックス性の上昇は見られず、6-helical bundle 形成を確認することはできなかった (図 4A)。そこで、6-helical bundle 形成を確認することが可能な C34 誘導体とそれに相当する NHR である N36 を用い、138 位のアミノ酸置換による複合体形成における物理化学的性質の違いについて精査した (図 4B)。

まず、C34/S138X についてそれぞれ単独の CD スペクトルを測定した。その結果、全て類似のランダム構造を取っていることが確認され、138 位のアミノ酸置換は C34 単独の二次

表 5: C34/S138X および SC35EK/S138X ペプチドの抗 HIV 活性と物理化学的性質

Peptides	X	EC <sub>50</sub> (nM)	T <sub>m</sub> (±)
C34	S	2.70±0.38	53.7
C34/S138A	A	0.30±0.09	59.6
C34/S138L	L	0.35±0.07	57.8
C34/S138P	P	157.75±20.61	47.8
C34/S138T	T	1.66±0.72	49.6
C34/S138W	W	>1000	48.6

SC35EK S 0.74±0.21 70.0  
 SC35EK/S138A A 0.39±0.08 76.0  
 C34/S138X WMEWDREINNYTSLIHSLEIEKXNQOQEKNEQELL  
 SC35EK/S138X WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKKEEQKRRNEELKK

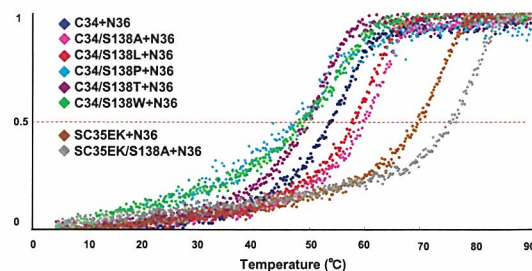


図 6: C34/S138X-N36 複合体および SC35EK/S138X-N36 複合体の CD スペクトルにおける 222nm のシグナルの温度依存性

構造に影響しないことが示唆された(図 5A)。次に、C34/S138X-N36 複合体の CD スペクトルを測定したところ、C34 と同等、もしくはそれ以上の活性を示す Ala, Leu, Thr 置換体からなる複合体はほぼ 100%  $\alpha$  ヘリックス性を示したのに対し、活性の低い Pro, Trp 置換体からなる複合体では C34 に比べ  $\alpha$  ヘリックス性の減弱が認められた(図 5B、表 5)。

続いて、C34/S138X-N36 複合体の安定性を調べるために、4°C から 90°C における  $[\theta_{222}]$  を測定した。4°C における 6-helical bundle 構造を 100% folding、90°C において 100% unfolding とみなし、50% unfolding にあたる温度を  $\alpha$  ヘリックスの相転移温度 ( $T_m$ ) と定義した。測定の結果、抗 HIV 活性と  $T_m$  値は高い相関性を示した(図 6、表 5)。なかでも特に C34/S138A-N36 複合体の  $T_m$  値は C34-N36 複合体より約 6°C 高く、Ser から Ala への変換がより安定な 6-helical bundle 構造の形成に寄与していることが示唆された(表 5)。

同様の傾向は、前述にある SC35EK 誘導体の構造活性相関でも見られ、SC35EK に比べ高い抗 HIV 活性を示した SC35EK/S138A は単独の CD スペクトルにおいて、SC35EK とほぼ同じ  $\alpha$  ヘリックス性を示した(図 5C、5D)。一方で、SC35EK/S138A-N36 複合体の  $T_m$  値は SC35EK-N36 複合体に比べ約 6°C 高く、Ser から Ala への変換がより安定な 6-helical bundle 構造の形成に寄与していることが示唆された(図 6、表 5)。

#### D. 考察

結晶構造から推定される T-20 の溶媒接触面に位置する残基(b,c,f,g)を Glu もしくは Lys に置換した T-20EK では、抗 HIV 活性が上昇したことから、この位置する残基は T-20 の膜融合阻害に直接関与していないことが示唆された。このことは T-20 が C34 と同様に gp41 NHR と安定な 6-helical bundle 構造を形成することで、HIV 感染を阻害している可能性を示唆しており、未だ完全に解明されていない T-20 の阻害メカニズムに対して有益な知見であると考えられる。

また、T-20 耐性 HIV 株に対し、ウイルスの変異に合わせた合成ペプチド T-20/S138A は、再び抗ウイルス活性を示した。このことは、NL4-3 株 NHR の N43D 変異により親和性が低くなった gp41 の NHR と CHR の相互作用を補うために、Ser138 のコドンの一塩基変異に

よって起こりうるアミノ酸変異(Ala, Leu, Pro, Thr, Trp)のうち T-20 耐性 HIV で S138A 変異が選択された可能性を示唆している。加えて、138 位の Ala 置換は CHR 由来ペプチドの種類によらず 6-helical bundle 構造の安定化に寄与することで、活性発現に重要な役割を果たしており、このような T-20 耐性 HIV 臨床分離株で確認された変異アミノ酸部位は膜融合阻害剤を開発する上で重要な構造最適化の標的部位になりうるものと示唆された。

#### E. 結論

研究グループでは、T-20 に  $\alpha$  ヘリックス性の向上を指向した X-EE-XX-KK ユニートを導入することで、強力な抗 HIV 活性を示す T-20EK を見出した。さらに、T-20 耐性 HIV 臨床分離株で確認された gp41 の変異アミノ酸部位に着目し、T-20 および T-20EK の 138 位について構造活性相関研究を行ったところ、それぞれ Ala 置換体が最も高い活性を示し、リード化合物である T-20 に比べ 50 倍以上強力な抗 HIV 活性を示す誘導体 T-20EK/S138A を見出した。また、C34/S138 誘導体と N36 を用いた物理化学的性質の評価により、138 位の構造活性相関の結果は、複合体の 6-helical bundle 構造の安定性と相関していることが示唆された。

## 分担研究項目 2 : 融合阻害剤の設計・合成

### 2-1 : 非ペプチド性膜融合阻害剤の開発を指向したペプチド結合等価体を有するジケトピペラジンミメティクスの合成法の開発 (平成 16 年度)

#### A. 研究目的

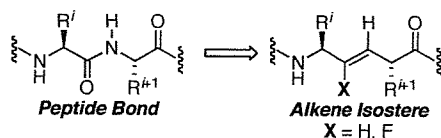


Figure 1: アルケン型ジペプチドイソスターの化学構造

構造変化を最小限に抑えた、ペプチド結合の非水解性等価体 (イソスター) への置換はペプチドリード創薬における重要な課題の一つである。代表的なペプチドイソスターとして、ペプチド結合を二置換アルケンで置換したアルケン型イソスターがある (Figure 1)。アルケン型イソスターはペプチド結合の二重結合性に基づいて考案されており、ペプチド結合に対して高い構造的相同性を有していると考えられる。しかし、このイソスターは、ペプチド結合が本来備えている双極子相互作用および水素結合能が欠如しているという欠点がある。一方、ペプチド結合をフルオロアルケンで置換したフルオロアルケン型ペプチドイソスターは、ペプチド結合に対し高い構造的相同性を有しているのみならず、フッ素原子の存在によりアルケン型のイソスターには欠損している静電的相同性をも併せ持っているものと考えられている。また、このイソスターはアルケン型と同様に、トランス・シスの平衡状態にあるペプチド結合を一方に固定化することが可能であり、ペプチドの機能解析を行う上でも有用なイソスターである。

平成 16 年度の研究項目 1 において、強力かつ特異的なペプチド性 HIV-1/Cell 膜融合阻害剤 SC35EK をリード化合物として、抗 HIV-1 活性を保持したまま分子サイズの低減化 (35 アミノ酸残基から 22 アミノ酸残基) およびオルニチン誘導体、アルケン型イソスター等を用いる部分的非ペプチド化に成功したが、導入したペプチドイソスターは期待した有効性を認めることが出来ず、部分的な活性低下を引き起こした。このため、 $\alpha$ -ヘリックス構造を維持するためのペプチド結合固有の特性として、水素結合能および静電的極性を具備したペプチドイソスターの開発がペプチド性膜

融合阻害剤の非ペプチド化には不可欠であると判断し、フルオロアルケン含有ジペプチドイソスターの立体選択的合成法に関する研究を行った。

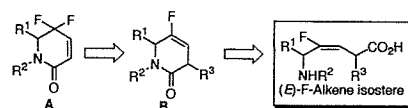


Figure 2. Strategy for synthesis of (E)-fluoroalkene peptide isostere.

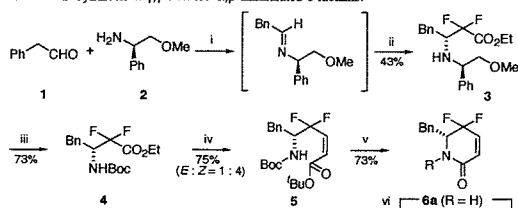
#### B. 研究方法・結果および考察

研究グループでは、以前に  $\gamma,\gamma$ -ジフルオロ- $\alpha,\beta$ -不飽和エステルを基質とする有機銅試薬あるいはヨウ化サマリウムによる還元反応を利用した、トランス型ペプチド結合等価体である (Z)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成法を報告している。しかし、(E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターの効率的な合成法は未だ確立されていない。我々は、(E)-フルオロアルケン含有ジケトピペラジンミメティクスを合成し、そのアミド結合を切断すれば、効率的に (E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターが合成できるのではないかと考えた (Figure 2)。平成 16 年度は、 $\gamma,\gamma$ -ジフルオロ- $\alpha,\beta$ -不飽和ラクタム **A** を基質とする、金属試薬を用いた **B** の合成法について精査した。また、得られた **B** のアミド結合切断法を検討し、生理活性ペプチドへの応用を指向した (E)-フルオロアルケン含有ジペプチドイソスターの合成を行った。

#### B. 研究結果

##### 鍵合成基質 $\gamma,\gamma$ -ジフルオロ- $\alpha,\beta$ -不飽和ラクタムの合成

鍵合成基質である  $\gamma,\gamma$ -ジフルオロ- $\alpha,\beta$ -不飽和ラクタムは Scheme 1 に示す合成経路により合成した。アルデヒド **1** とフェニルグリシノール由来のキラルアミン **2** から得られる光学活性イミンに対し、Wilkinson 触媒存在下、 $\text{Et}_2\text{Zn}$  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、 $\beta$ -アミノエステル **3** 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 Boc 化を同時に行うことで、**4** を良好な収率で得た。さらに、**4** のエステルをアルデヒドに還元後、NaI と DBU を用いた (Z)-選択的 Horner-Wadsworth-Emmons 反応に付すことにより、 $\alpha,\beta$ -不飽和エステルを E : Z = 1 : 4 の比で得た。得られた (Z)型の不飽和エステル **5** の脱保護を行った後、閉環させることで  $\gamma,\gamma$ -ジフルオロ

Scheme 1. Synthesis of  $\gamma,\gamma$ -difluoro- $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\delta$ -lactams.

Reagents: i) molecular sieves 3Å, THF; ii)  $\text{BrCF}_2\text{CO}_2\text{Et}$ ,  $\text{Et}_2\text{Zn}$ ,  $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ , THF, hexane; iii)  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $(\text{Boc})_2\text{O}$ ,  $\text{EtOH}$ ; iv)  $\text{DIBAL-H}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -toluene, then  $(o\text{-MePhO})_2\text{POCH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$ ,  $\text{NaI}$ ,  $\text{DBU}$ ,  $\text{THF}$ ; v) 4 M  $\text{HCl}$ -dioxane, then  $\text{WSCI-HCl}$ ,  $\text{HOAc}$ ,  $\text{DIPÉA}$ ,  $\text{DMF}$ ; vi)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ ,  $\text{DMAP}$ ,  $\text{MeCN}$ ; vii)  $\text{MeI}$ ,  $\text{NaH}$ ,  $\text{THF}$ .

Table 1. Reduction of  $\gamma,\gamma$ -difluoro- $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\delta$ -lactams **6a-c**.

entry	substrate	reagent (equiv., solvent)	condition	product (yield <sup>a</sup> , %)
1	<b>6a</b>	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF: $\text{Et}_2\text{O} = 4:1$ )	$-78^\circ\text{C}$ , 30 min	<b>7a</b> (70)
2	<b>6b</b>	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF: $\text{Et}_2\text{O} = 4:1$ )	$-78^\circ\text{C}$ , 30 min	<b>7b</b> (68)
3	<b>6c</b>	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF: $\text{Et}_2\text{O} = 4:1$ )	$-78^\circ\text{C}$ , 30 min	<b>7c</b> (72)
4	<b>6a</b>	$\text{SmI}_2$ (3 eq., THF)	$0^\circ\text{C}$ , 60 min	<b>6a</b> (14), <b>7a</b> (50)
5	<b>6b</b>	$\text{SmI}_2$ (3 eq., THF)	$0^\circ\text{C}$ , 60 min	<b>7b</b> (60)
6	<b>6a</b>	$\text{SmI}_2$ (3 eq., THF: $\text{MeOH} = 12:1$ )	$0^\circ\text{C}$ , 60 min	<b>7a</b> (82)
7	<b>6b</b>	$\text{SmI}_2$ (3 eq., THF: $\text{MeOH} = 13:1$ )	$0^\circ\text{C}$ , 60 min	<b>7a</b> (97)
8	<b>6c</b>	$\text{SmI}_2$ (3 eq., THF: $\text{MeOH} = 13:1$ )	$0^\circ\text{C}$ , 60 min	<b>7c</b> (77)
9	<b>6a</b>	$\text{SmI}_2$ (3 eq., THF: $t\text{-BuOH} = 15:1$ )	$0^\circ\text{C}$ , 60 min	<b>6a</b> (7), <b>7a</b> (88)
10	<b>6b</b>	$\text{SmI}_2$ (3 eq., THF: $t\text{-BuOH} = 14:1$ )	$0^\circ\text{C}$ , 60 min	<b>6b</b> (34), <b>7a</b> (52)

<sup>a</sup> Isolated yield.

$\alpha,\beta$ -不飽和ラクタム**6a**を合成した。また、アミド窒素を Boc 化、メチル化した *N*-Boc 体 **6b**、*N*-メチル体 **6c** も合成した。

### 金属試薬による還元反応を利用したジケトピペラジンミメティクスの合成法の検討

研究グループではすでに、 $\gamma$ 位に脱離基を有する $\alpha,\beta$ -不飽和エステルに対して有機銅試薬あるいはヨウ化サマリウムを作用させると、還元反応が効率的に進行することを明らかにしている。また、同基質に対する $\alpha$ -アルキル化法として、金属試薬による還元反応の中間体として生じるメタルエノラートを求電子剤で捕捉する手法を報告している。そこで、これらの反応を不飽和ラクタム **6** からのジケトピペラジンミメティクスの合成に応用することとした。

まず、Phe-Gly 型の(*E*)-フルオロアルケンイソスターの前駆体であるジケトピペラジンミメティクス **7** を合成することを目的として、不飽和ラクタム **6** の金属試薬による還元反応について精査した (Table 1)。基質 **6a-c** に対し有機銅試薬 ( $\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ ) を作用させると、脱フッ素化を伴う還元反応が速やかに進行し、**7a-c** が良好な収率で得られた (entries 1–3)。ヨウ化サマリウムを用いた場合、プロトン源非存在下では基質 **6a,b** ともに、還元体が中程度の収率で得られた (entries 4 and 5)。一方、プロトン源として  $\text{MeOH}$ 、*t*- $\text{BuOH}$  存在下でヨウ化サマリウムを作用させると、基質 **6a,b** を用いた場合、**7a,b** が高収率で得られた (entries 6, 8, 9)。しかしながら、*N*-Boc 体 **6b** では、還元反応は進行するものの、同時に Boc 基が切断された化合物が確認された (entries 7 and 10)。

次に、各種アミノ酸側鎖に対応する置換基を有するイソスターの合成を目指し、 $\gamma,\gamma$ -ジフルオロ- $\alpha,\beta$ -不飽和ラクタム **6** の $\alpha$ 位への置換基導入を検討した (Table 2)。基質 **6a** に対し、有機銅試薬 ( $\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ ) による還元を行った後、求電子剤としてヨウ化メチルを作用

させると $\alpha$ -アルキル化が中程度の収率で進行し、シス体 **9a** が優先的に得られた (entry 1)。しかしこの際、アミド窒素がアルキル化された化合物 **8c** が確認された。一方、臭化ベンジルを作用させるとトランス体 **8b** とシス体 **9b** がほぼ同じ割合で得られた (entry 2)。*N*-Boc 体 **6b** に対し、**6a** の場合と同様に、有機銅試薬として  $\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$  を作用させた場合、還元反応は進行するものの、開環体 **11** の生成が確認され、 $\alpha$ -アルキル化は進行しなかった (entry 3)。開環体の生成は有機銅試薬中に平衡状態で存在する  $\text{MeLi}$  に起因するものと考え、 $\text{MeLi}$  が生成していないと考えられる Gilman 試薬を用いて反応を行った。この場合、開環反応は抑制されたが、 $\alpha$ -アルキル体の生成は認められなかった (entries 4 and 5)。*N*-メチル体 **6c** に対し、**6a** の場合と同様に、有機銅試薬 ( $\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ ) による還元を行った後、ヨウ化メチルを作用させると $\alpha$ -アルキル化が進行し、トランス体 **8c** とシス体 **9c** がほぼ同じ割合で得られた (entry 6)。また、臭化ベンジルを作用させた場合では、トランス体 **8d** のみが得られた (entry 7)。一方、鎖状の $\gamma,\gamma$ -ジフルオロ- $\alpha,\beta$ -不飽和エステルへの $\alpha$ -置換基導入において良好な結果が得られている例を参考に、求電子剤としてカルボニル化合物存在下、ヨウ化サマリウムを作用させたが、環状ラクタム **6a,b** において $\alpha$ -置換体はほとんど生成しなかった (entries 8 and 9)。

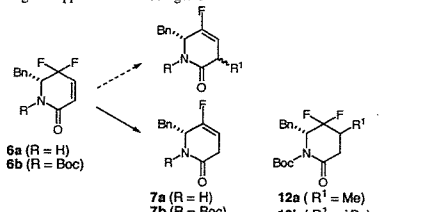
比較的良好な収率で $\alpha$ -アルキル体を得られた *N*-メチル体 **6c** を用い、有機銅試薬と求電子剤による還元的アルキル化反応について、さらに検討を行った (Table 3)。反応溶媒を THF 主体の溶媒から  $\text{Et}_2\text{O}$  のみとするとシス体 **9c** の生成が優先される傾向が見られた (entry 2)。求電子剤としてより反応性が高いと考えられるメチルトリフラートを用いて反応を行ったところ、収率の改善が見られた (entries 3 and 4)。また、有機銅試薬として

$n\text{-Bu}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI}$  を用いて同様に反応を行ったが、有機銅試薬の違いによるジアステレオ選択性の変化は観測されなかった (entries 5 and 6)。一方で、求電子剤として臭化ベンジルを作用させた場合には、メチル化の場合とは異なり、溶媒に関係なくトランス体 **8d** のみが優先的に生成した (entries 7 and 8)。今回メチル化の際に観測された、反応溶媒によるジアステレオ選択性の差異の原因は明確ではないが、一つの可能性としては、溶媒の異なる配位能による中間体メタルエノラート・溶媒複合体の構造の違いが起因するものと考えられる。立体的に嵩高いベンジル基の場合は、エノラートの構造に関係なく、基質の側鎖ベンジル基の立体障害のみによりジアステレオ選択性が決定されるため、トランス体が優先的に生成するものと考えられる。立体選択性発現機構の解明にはさらなる検討が必要である。

### $S_N2'$ 型反応によるジケトピペラジンミメティクス合成の試み

近年、岡田らは、 $\delta$ -ヒドロキシ- $\gamma,\gamma$ -ジフルオロ- $\alpha,\beta$ -不飽和エステルに対し、有機アルミニウム・銅複合試薬を作用させると、フッ素を脱離基とする  $S_N2'$  型反応が進行し、 $\alpha$ -アルキル- $\gamma$ -フルオロ- $\beta,\gamma$ -不飽和エステルが得られることを報告している。そこでこの例にならい、不飽和ラクタム **6** を基質とするジケトピペラジンミメティクスの合成について検討を行った (Table 6)。不飽和ラクタム **6a** に対して  $\text{Me}_3\text{Al}$  による処理を行った後、 $\text{CuI} \cdot \text{LiCl}$  を作用させたところ、 $S_N2'$  型反応は進行せず、還元体 **7a** が低収率で得られた (entry 1)。また、**6b** を基質とした場合も  $S_N2'$  成績体は生成せず、還元体 **7b** と 1,4-付加体 **12a** が得られた (entry 2)。 $i\text{-Bu}_3\text{Al}$  を用いた場合も同様に還元体 **7b** と

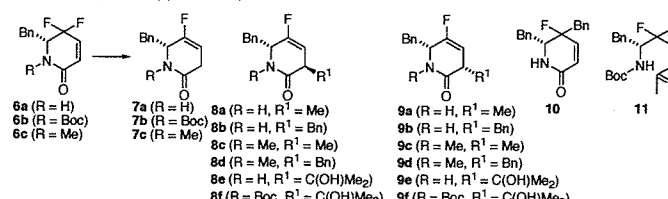
Table 6. Reaction of  $\gamma,\gamma$ -difluoro- $\alpha,\beta$ -unsaturated lactams **6a, b** with organocopper-aluminum reagents.



entry	substrate	reagent <sup>a</sup> (equiv.)	product (yield <sup>b</sup> , %)
1	<b>6a</b>	$\text{Me}_3\text{Al}$ (5 eq.), $\text{CuI} \cdot \text{LiCl}$ (2.5 eq.)	<b>6a</b> (65), <b>7a</b> (6)
2	<b>6b</b>	$\text{Me}_3\text{Al}$ (5 eq.), $\text{CuI} \cdot \text{LiCl}$ (2.5 eq.)	<b>7b</b> (30), <b>12a</b> (15)
3	<b>6b</b>	$i\text{-Bu}_3\text{Al}$ (5 eq.), $\text{CuI} \cdot \text{LiCl}$ (2.5 eq.)	<b>7b</b> (72), <b>12b</b> (14)

<sup>a</sup> Aluminium reagent at 0 °C for 10 min, then 0.5 M  $\text{CuI} \cdot \text{LiCl}$  for 1 hr. <sup>b</sup> Isolated yield.

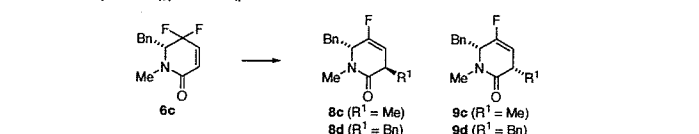
Table 2.  $\alpha$ -Alkylation of  $\gamma,\gamma$ -difluoro- $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\delta$ -lactams **6a-c**.



entry	substrate	reagent (equiv., solvent)	product (yield <sup>a</sup> , %)
1	<b>6a</b>	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF; $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$ ), then MeI (8 eq.)	<b>8c</b> (6), <b>9a</b> (39)
2	<b>6a</b>	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF; $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$ ), then BnBr (8 eq.)	<b>8b</b> (28), <b>9b</b> (27), <b>10</b> (7)
3	<b>6b</b>	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF; $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$ ), then MeI (8 eq.)	<b>11</b> (15)
4	<b>6b</b>	$\text{Me}_2\text{CuLi} \cdot \text{LiI} \cdot 2\text{LiBr}$ (2 eq., THF; $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$ )	<b>7b</b> (82)
5	<b>6b</b>	$\text{Me}_2\text{CuLi} \cdot \text{LiI} \cdot 2\text{LiBr}$ (2 eq., THF; $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$ ), then MeI (8 eq.)	<b>7b</b> (30)
6	<b>6c</b>	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF; $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$ ), then MeI (8 eq.)	<b>8c</b> (29), <b>9c</b> (31)
7	<b>6c</b>	$\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$ (2 eq., THF; $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$ ), then BnBr (8 eq.)	<b>8d</b> (61)
8	<b>6a</b>	$\text{Sml}_2$ (3 eq., THF), acetone (3 eq.)	<b>7a</b> (28), <b>8e+9e</b> (trace)
9	<b>6b</b>	$\text{Sml}_2$ (3 eq., THF), acetone (6 eq.)	<b>7b</b> (15), <b>8f+9f</b> (trace)

<sup>a</sup> Isolated yield.

Table 3.  $\alpha$ -Alkylation of  $\gamma,\gamma$ -difluoro- $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\delta$ -lactam **6c**.



entry	reduction <sup>a</sup>	alkylation ( $\text{R}^1\text{-X}$ )	solvent	yield <sup>b</sup> of <b>8+9</b> (%)	<b>8</b> : <b>9</b>
1	A	MeI (8 eq.)	THF : $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$	60	5 : 5
2	A	MeI (8 eq.)	$\text{Et}_2\text{O}$	61	2 : 8
3	A	MeOTf (8 eq.)	THF : $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$	75	4 : 6
4	A	MeOTf (8 eq.)	$\text{Et}_2\text{O}$	86	2 : 8
5	B	MeI (8 eq.)	THF : $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$	77	5 : 5
6	B	MeI (8 eq.)	$\text{Et}_2\text{O}$	62	2 : 8
7	A	BnBr (8 eq.)	THF : $\text{Et}_2\text{O} = 4 : 1$	61	10 : 0
8	A	BnBr (8 eq.)	$\text{Et}_2\text{O}$	46	10 : 0

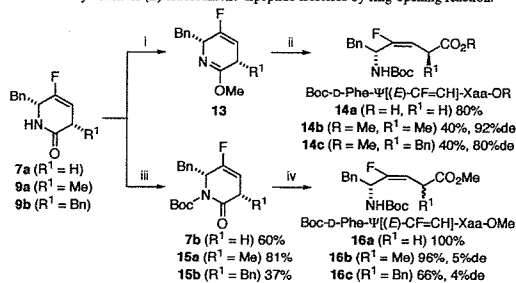
<sup>a</sup> A:  $\text{Me}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI} \cdot 3\text{LiBr}$  (2 eq.) at -78 °C for 30 min; B:  $n\text{-Bu}_3\text{CuLi}_2 \cdot \text{LiI}$  (2 eq.) at -78 °C for 30 min. <sup>b</sup> Isolated yield.

1,4-付加体 **12b** が得られるのみで、期待する  $S_N2'$  型反応は進行しなかった (entry 3)。

### ジケトピペラジンミメティクスから鎖状(E)-フルオロアルケン型イソスターへの誘導

得られたジケトピペラジンミメティクスのアミド結合を切断することにより、鎖状の(E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターへの誘導を試みた (Scheme 2)。ジケトピペラジンミメティクスを  $\text{Me}_3\text{O} \cdot \text{BF}_4$  処理により、ラクチムエーテル **13** とし、酸加水分解の後、Boc 保護することで鎖状の(E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスター **14** を得た。しかし、開環の際に $\alpha$ -アルキル基を有する化合物では 4-10%程度の $\alpha$ 位のエピメリ化が確認された。また、アミド窒素を Boc 化し、メタノール中炭酸ナトリウムで処理することによっても、開環反応が効率的に進行することを明らかにした。この場合も、 $\alpha$ -置換体では $\alpha$ 位のエピメリ化が起こり、ほぼ 1 : 1

Scheme 2. Synthesis of (E)-fluoroalkene dipeptide isosteres by ring-opening reaction.



のジアステレオ混合物が得られた。トランス体 **8a,b** についても同様に開環反応を検討したが、同様に $\alpha$ 位のエピメリ化が確認された。

## E. 結論

有機銅試薬と求電子剤による還元的アルキル化反応を利用した、(E)-フルオロアルケン含有ジケトピペラジンミメティクス of 効率的な合成法を開発した。さらに、得られたジケトピペラジンミメティクスはラクタム環を開環することにより、シス型ペプチド結合に対応する鎖状の(E)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスターへと誘導することが可能であることを示した。

## 2-2: ペプチド性膜融合阻害剤の非ペプチド化を指向したフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法の開発 (平成 17 年度)

### A. 研究目的

高活性 HIV-1 膜融合阻害剤として見いだされた SC35EK, SC29EK および SC22EK の非ペプチド誘導体への構造変換を目的として、共通の Glu-Glu, Lys-Lys ジペプチド構造に対するアルケン型ジペプチドイソスターの導入について検討を行った。平成 16 年度の研究において、Lys-Lys 間のペプチド結合の(E)-CH=CH 型アルケンへの変換により、抗 HIV 活性が低下することを明らかにした。研究グループでは、この活性の低下が、 $\alpha$ ヘリックス構造形成のための水素結合に必要なアミド水素およびカルボニル酸素が失われ、活性発現に必要な二次構造をとることができなくなったことに起因するものと考え、カルボニル酸素に相当するフッ素原子を有する新規(Z)-CF=CH 型アルケン(フルオロアルケン)を含有するペプチドイソスターの立体選択的合成法の開発に取り組んだ(図 1)。

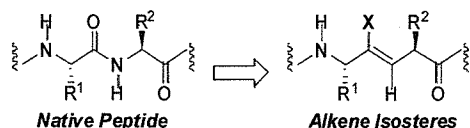


図 1: アルケン型ジペプチドイソスターの化学構造

### B. 研究方法

フルオロアルケン型ジペプチドイソスターを

合成するには、二つの不斉点に挟まれたフルオロアルケン骨格を構築しなければならない。これまでに研究グループでは、有機銅試薬、及びヨウ化サマリウムを用いた一電子還元によるフルオロアルケン骨格の合成法を見いだしている。本研究では、有機銅試薬を用いた一電子還元によるフルオロアルケン骨格の合成法を基盤として、アミノ酸の側鎖に相当する官能基の位置、及び立体選択的導入法について検討を行った(図 2)。

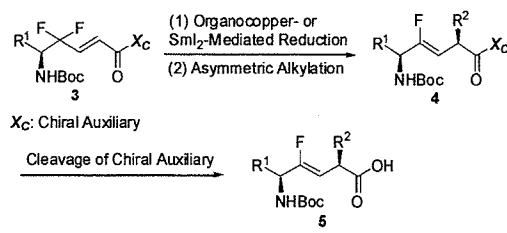


図 2: (Z)-CF=CH 型ジペプチドイソスターの合成経路

### (倫理面への配慮)

該当事項なし

### C. 研究結果

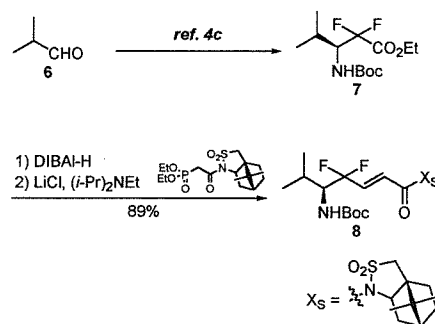


図 3: (Z)-CF=CH 型ジペプチドイソスターの鍵中間体の合成

鍵中間体となるキラル補助基を分子内に有する  $\delta$ -amino- $\gamma,\gamma$ -difluoro- $\alpha,\beta$ -unsaturated sulfonamides **6** は以前報告した合成法を応用して合成した(図 3)。

得られた鍵中間体に対し、一電子還元剤として有機銅試薬を作用させたとところ Gilman 型の場合に定量的に反応が進行することがわかった(図 4)。そこでより簡便な合成法を目指し、有機銅試薬による一電子還元と不斉アルキル化反応を One-Pot 反応で行うこととした。しかしながら、銅エノラートは反応性が低いため求電子剤との反応が遅く非効率的であることから、反応性の良いスズエノラートに変換し、求電子剤と反応させることにした。その結果、種

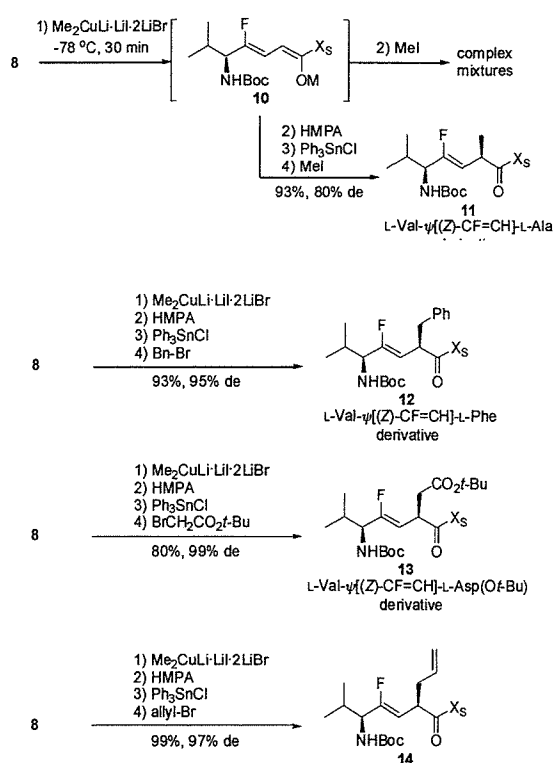


図 4: L-Xaa<sup>1</sup>-ψ[(Z)-CF=CH]-L-Xaa<sup>2</sup> 型ジペプチドイソスターの合成

々のアルキルハライドと効率よく反応し、高立体選択的に L-Xaa<sup>1</sup>-ψ[(Z)-CF=CH]-L-Xaa<sup>2</sup> 型ジペプチドイソスターの合成が可能であることを見いだした。また、本法を応用することにより、フェニルアラニン (Phe) 側鎖となるベンジル基、アスパラギン酸 (Asp) やアスパラギン (Asn) 側鎖へ展開可能なオキシカルボニルメチル基、アルギニン (Arg)、グルタミン酸 (Glu) およびグルタミン (Gln) 側鎖に展開可能なアリル基といった官能基を含む Xaa<sup>2</sup> 側鎖が導入され、高官能性フルオロアルケンジペプチドイソスターの合成が可能となった。

同様の合成経路において、不斉補助基として *R*-sultam を用いることにより、ジアステレオマーに相当する L-Xaa<sup>1</sup>-ψ[(Z)-CF=CH]-D-Xaa<sup>2</sup> 型ジペプチドイソスターが、いくぶん低収率ながら高立体選択的合成が可能であることを明らかにした (図 5)。

#### D. 考察

本研究により、ジペプチドの2つの立体中心について、N 端側を原料アミノ酸により、C 端側をキラル補助基の作用によって導入することが可能であり、同時にフルオロアルケン

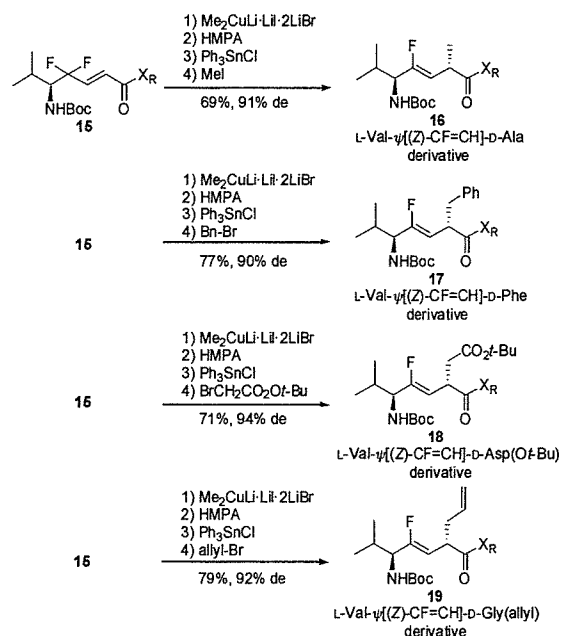


図 5: L-Xaa<sup>1</sup>-ψ[(Z)-CF=CH]-D-Xaa<sup>2</sup> 型ジペプチドイソスターの合成

Z 選択的に構築することが可能であることを明らかにした。高活性化に必須なユニットとされるこれら2つのジペプチド部位を、αヘリックス性を保持しながら非ペプチド化することにより、生体内安定性や薬物動態特性の向上が期待される。

#### E. 結論

以上のように、本研究では、HIV-1 膜融合阻害剤 SC35EK の非ペプチド化を指向した分子設計において、重要な構造ユニットとなるフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立した。従来法では解決できなかった2つの不斉中心を持つイソスターの合成法が確立したことにより、SC35EK の構造活性相関研究への展開が可能となった。



## 2-3 : Lys-Lys 型フルオロアルケンイソスターの立体選択的合成と低分子膜融合阻害剤の構造活性相関研究のためのインドール誘導体の効率的合成法の開発 (平成 18 年度)

### A. 研究目的

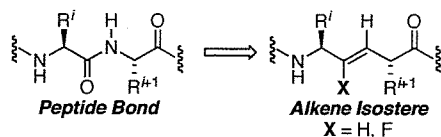


図 1: アルケン型ジペプチドイソスターの化学構造

高活性 HIV-1 膜融合阻害剤として見いだされた SC35EK 誘導体および T-20EK 誘導体について、昨年度に引き続き非ペプチド誘導体への構造変換を目的として、アルケン型ジペプチドイソスターの導入について検討を行った。昨年度の研究では、(E)-CH=CH 型アルケンイソスターに代わる (Z)-CF=CH 型アルケン(フルオロアルケン)イソスターの立体選択的合成法を確立した(図 1)。フルオロアルケン型ジペプチドイソスターは水素結合を形成するペプチド結合のカルボニル酸素に相当するフッ素原子を有しているため、活性発現に必要な  $\alpha$  ヘリックス構造の形成に有利であることが期待される。研究グループでは SC35EK および T-20EK に共通して存在する X-EE-XX-KK モチーフの Lys-Lys に相当するフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成に取り組んだ。

加えて、最近、respiratory syncytial virus (RSV)の膜融合阻害剤がインドールもしくはベンズイミダゾール骨格を有する低分子化合物であることに着目し、松岡・児玉グループとの共同研究によりこれらの骨格を有する化合物 118 種類についてスクリーニングを実施した。その結果、 $EC_{50} = 40\mu\text{M}$  と  $70\mu\text{M}$  [MAGI assay(IIIB)]の抗 HIV 活性を示した化合物の共通骨格がインドールであったことから、これらの関連誘導体への合成展開に向けて、効率的なインドール誘導体合成法の確立に取り組んだ。

### B. 研究方法

これまでに研究グループでは、キラル補助基を分子内に有する鍵中間体への一電子還元/不斉アルキル化の One-Pot 反応において、銅エノラートから反応性の高いスズエノラートへのトランスメタル化を行うことで、2 つの

不斉点に挟まれたフルオロアルケン骨格を高立体選択的に合成する方法を確立している。本研究では、この合成法を応用し Fmoc 固相合成法でペプチドに導入可能な Lys-Lys 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を行った。

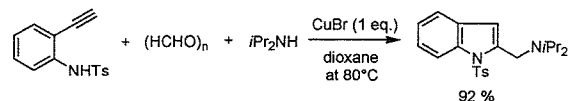


図 2: 2-(アミノメチル)インドール誘導体の合成

一方、研究グループではアレン化合物の合成に関する研究の過程において、エチニルアニン誘導体、パラホルムアルデヒド、ジイソプロピルアミンを臭化銅(I)存在下で反応させると、2-(アミノメチル)インドール誘導体が高収率で得られることを見出した(図 2)。これをもとにして銅触媒を用いた三成分カップリング環化ドミノ反応による原子効率の高い新規 2-(アミノメチル)インドール骨格構築法への展開を検討した。

### (倫理面への配慮)

該当事項なし

### C. 研究結果

1,5-pentanediol **1** からキラル補助基を分子内に有する鍵中間体 **5** を合成した(図 3)。Lys-Lys ジペプチドイソスターをペプチドに導入するには、2 つの Lys 側鎖のアミノ基が適切な保護基によって保護されていなければならない。そこで、このような保護基として、Fmoc 固相合成法でジペプチドイソスターをペプチドに導入後に脱保護可能な SES 基を用いることにした。**4** の TBS 基を脱保護後、保護されたアミノ基を光延反応で導入し、1 つめの Lys 側鎖を構築した。ここで、昨年度確立した一電子還元-不斉アルキル化による One-Pot 反応を応用し、立体選択的にもう 1 つの Lys 側鎖を導入するとともに、フルオロアルケン骨格を構築した。続いて、得られた **6** のフルオロアルケン部位を残したまま、Lys 側鎖に相当する部位の二重結合を Rh-C 存在下で選択的に接触還元した後、キラル補助基を切断し、N 末端側アミノ基を Fmoc 基で保護することで、ペプチド合成に応用可能な **7** を満足のいく収率で得ることができた。

インドール骨格合成法の確立では、まず反応条件について精査した(表 1)。二級アミン成分を低減させるために、トリエチルアミンの存

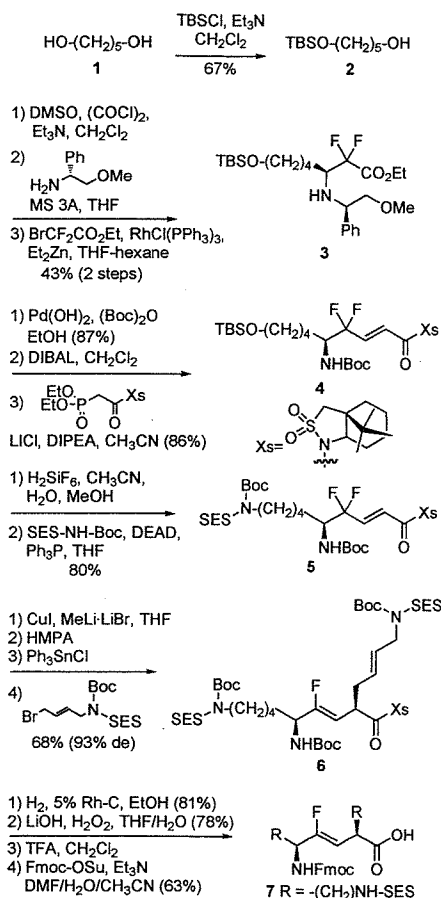


図 3: イソスターを含む Fmoc アミノ酸の合成

在下で反応を行ったところ、71%の収率で目的のインドールを得た (entry 1)。次に臭化銅(I)の量について検討を行ったところ、10 または 1mol%まで減らしても反応は速やかに進行し、反応にトリエチルアミンは必要ないことも明らかとなった (entries 2-4)。しかしながら、パラホルムアルデヒドの量を低減させたところ反応収率はやや低下した (entries 5,6)。

次に様々な二級アミン成分を用いて反応を行った (表 2)。触媒量の臭化銅(I)存在下エチルアニリン、ジイソプロピルアミン **10a**、パラホルムアルデヒドをジオキササン中で反応させたところ、収率 81%で目的のインドール誘導体 **11a** を得た (entry 1)。同様にピペリジン、ピロリジンにおいても反応は効率よく進行した (entries 2, 3)。ジエチルアミンの場合は揮発性が高いため収率が顕著に低下したが (entry 4)、2 当量のジエチルアミンを用いることで目的のインドールが高収率で得られた (entry 5)。また二級アミン成分として、除去可能なアルキル基を含むジベンジルアミン、ジアリルアミンを用いた場合においても反応は効率よく進行し、それぞれ目的のインドール化合物 **11e**、**11f** を与えた (entries 6, 7)。

表 1: 反応条件の最適化

$\text{NHTs} + (\text{HCHO})_n + \text{1.1 eq. 10b} \xrightarrow[\text{80 } ^\circ\text{C}]{\text{dioxane}}$  **11b**

Entry	CuBr (mol%)	(HCHO) <sub>n</sub> (eq.)	Et <sub>3</sub> N (eq.)	Time	Yield (%)
1	100	2	2	15 min	71
2	10	2	2	15 min	84
3	1	2	2	15 min	92
4	1	2	-	15 min	87
5	1	1.5	-	1 h	75
6	1	1.1	-	12 h	70

表 2: さまざまな二級アミンからのインドール合成

$\text{NHTs} + (\text{HCHO})_n + \text{R}_2\text{NH} \xrightarrow[\text{80 } ^\circ\text{C}]{\text{CuBr (1 mol%), dioxane}}$  **11**

Entry	R	Time (min)	Product (%)
1	<i>i</i> -Pr ( <b>10a</b> )	15	<b>11a</b> (81)
2	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ( <b>10b</b> )	15	<b>11b</b> (87)
3	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ( <b>10c</b> )	15	<b>11c</b> (89)
4	Et ( <b>10d</b> )	30	<b>11d</b> (37) + <b>12</b> (53)
5 <sup>b</sup>	Et ( <b>10d</b> )	15	<b>11d</b> (89)
6	Bzl ( <b>10e</b> )	120	<b>11e</b> (78)
7	Allyl ( <b>10f</b> )	30	<b>11f</b> (78)

<sup>a</sup>Unless otherwise stated, reactions were carried out with **8** (0.18 mmol), **9** (2.0eq.), amine **10** (1.1 eq.) and CuBr (1 mol%) in 1,4-dioxane at 80 °C.  
<sup>b</sup>2 equivalents of amine **3d** was used.

表 3: 多様な置換基を有するインドールの合成

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{NHTs} + (\text{HCHO})_n + \text{R}^3, \text{R}^4 \text{N} \xrightarrow[\text{dioxane}]{\text{CuBr (1 mol%)}}$  **11**

Entry	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Conditions	Products (%)
1	Me	H	Bzl	Bzl	80 °C, 3 h then reflux, 1 h	<b>11g</b> (78)
2	H	CO <sub>2</sub> Me	Bzl	Bzl	80 °C, 5 h	<b>11h</b> (79)
3	H	CF <sub>3</sub>	Bzl	Bzl	80 °C, 3 h	<b>11i</b> (61)
4	H	H		<i>n</i> -Bu	80 °C, 3 h then reflux, 1 h	<b>11j</b> (80)
5	H	CO <sub>2</sub> Me		<i>n</i> -Bu	80 °C, 3 h then reflux, 10 h	<b>11k</b> (79)

続いて芳香環に置換基の存在するエチルアニリン誘導体や非対称の二級アミンを基質として反応を行った (表 3)。比較的反応性の低い基質を用いた際には高温や長時間を必要としたが、いずれも良好な収率で目的の反応が進行した。一連の反応を高温で行うと副反応が生じやすい基質においては、カップリングを 80 °Cで行った後に昇温することで目的のドミノ反応が収率よく進行した (entries 1, 4 and 5)。

## D. 考察

フルオロアルケン型イソスターを含む Fmoc アミノ酸 **7** は、一般的なペプチドの固相合成法に応用可能なユニットである。HIV 膜融合阻害剤 SC35EK をはじめとする X-EE-XX-KK モチーフをもつ種々のペプチドに導入することで、αヘリックス構造に与える影響を精査できるとともに、SC35EK および T-20EK の非ペ

プチド化への展開が可能である。

他方で、この新規インドール骨格合成法は、 $R^1$ - $R^4$  の置換基を自由に選択することが可能であることから、多様な化合物のライブラリーが構築可能である。今後、本法を用いたリード化合物の最適化研究を効率的に実施することが可能となった。

## E. 結論

研究グループでは、ペプチド性膜融合阻害剤の候補化合物 SC35EK 誘導体および T-20EK 誘導体の非ペプチド化を目的として、 $\alpha$ ヘリックス構造に不可欠な水素結合形成が期待できるフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立した。

また、低分子膜融合阻害剤の構造活性相関研究を展開するための基盤技術として、ホルムアルデヒド、二級アミン、エチニルアニリンの銅触媒による三成分カップリング、連続する環化反応により様々な官能基を有する新規 2-(アミノメチル)インドール化合物の効率的合成法を確立した。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tamamura, H.; Tsutsumi, H.; Masuno H.; Fujii N. Development of low molecular weight CXCR4 antagonists by exploratory structural tuning of cyclic tetra- and pentapeptide-scaffolds towards the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis. *Curr. Med. Chem.* 14(1), 93-102 (2007).
2. Sasaki, Y.; Shigenaga, A.; Fujii, N.; Otaka, A. Synthesis of (Z)-alkene-containing cis-proline dipeptide mimetics using samarium(II) diiodide (SmI<sub>2</sub>)-mediated reductive alkylation reaction. *Tetrahedron*, 63(9), 2000-2008 (2007).
3. Ueda, S.; Oishi, S.; Wang, Z.; Araki, T.; Tamamura, H.; Cluzeau, J.; Ohno, H.; Kusano, S.; Nakashima, H.; Trent, J. O.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Structure-activity relationships of cyclic peptide-based chemokine receptor CXCR4 antagonists: disclosing the importance of side-chain and backbone functionalities. *J. Med. Chem.* 50(2), 192-198 (2007).
4. Kato-Takagaki, K.; Suzuki, N.; Yokoyama, F.; Takaki, S.; Umezawa, K.; Higo, J.; Mochizuki, M.; Kikkawa, Y.; Oishi, S.; Utani, A.; Nomizu, M. Cyclic peptide analysis of the biologically active loop region in the laminin  $\alpha$ 3 Chain LG4 module demonstrates the importance of peptide conformation on biological activity. *Biochemistry*, 46(7), 1952-1960 (2007).
5. Narumi, T.; Niida, A.; Tomita, K.; Oishi, S.; Otaka, A.; Ohno, H.; Fujii, N. A novel one-pot reaction involving organocopper-mediated reduction/trans-metalation/asymmetric alkylation, leading to the diastereoselective synthesis of functionalized (Z)-fluoroalkene dipeptide isosteres. *Chem. Commun.* (45), 4720-4722 (2006).
6. Baba, M.; Hong, S.-B.; Sharma, N.; Warren, M. B.; Nickerson, M. L.; Iwamatsu, A.; Esposito, D.; Gillette, W. K.; Hopkins, R. F., III; Hartley, J. L.; Furihata, M.; Oishi, S.; Zhen, W.; Burke, T. R., Jr.; Linehan, W. M.; Schmidt, L. S.; Zbar, B. Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(42), 15552-15557 (2006).
7. Otaka, A.; Fujii, N. Development of anti-viral fusion inhibiting peptides. *Kagaku Kogyo*, 57(10), 797-801 (2006).
8. Tomita, K.; Niida, A.; Oishi, S.; Ohno, H.; Cluzeau, J.; Navenot, J.-M.; Wang, Z.; Peiper, S. C.; Fujii, N., Structure-activity relationship study on small peptidic GPR54 agonists. *Bioorg. Med. Chem.* 14(22) 7595-7603 (2006).
9. Tamamura, H.; Tsutsumi, H.; Fujii, N. The chemokine receptor CXCR4 as a therapeutic target for several diseases. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 6(9), 989-995 (2006).
10. Tsuda, M.; Terada, T.; Irie, M.; Katsura, T.; Niida, A.; Tomita, K.; Fujii, N.; Inui, K. Transport characteristics of a novel peptide transporter 1 substrate, antihypertensive drug midodrine, and its amino acid derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318(1), 455-460 (2006).
11. Menu, E.; Asosingh, K.; Indraccolo, S.; De Raeve, H.; Riet, V. I.; Valckenborgh, V. E.; Vande B., V. I.; Fujii, N.; Tamamura, H.; Camp, V. B.; Vanderkerken, K., The involvement of stromal derived factor 1 $\alpha$  in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model. *Haematologica*, 91(5), 605-612 (2006).
12. Kasyanov, A.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Xiong H., HIV-1 gp120 enhances giant depolarizing potentials via chemokine receptor CXCR4 in neonatal rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 23(5), 1120-1128 (2006).
13. Tamamura, H.; Tsutsumi, H.; Masuno, H.; Mizokami, S.; Hiramatsu, K.; Wang, Z.; Trent, J. O.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Development of linear type of low molecular weight CXCR4 antagonists based on T140 analogs. *Org. Biomol. Chem.* 4(12), 2354-2357 (2006).
14. Hanaoka, H.; Mukai, T.; Tamamura, H.; Mori, T.; Ishino, S.; Ogawa, K.; Iida, Y.; Doi, R.; Fujii, N.; Saji, H., Development of a <sup>111</sup>In-labeled peptide derivative targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors. *Nucl. Med. Biol.* 33(4), 489-494 (2006).
15. Sasaki, Y.; Niida, A.; Tsuji, T.; Shigenaga, A.; Fujii, N.; Otaka, A. Stereoselective synthesis of (Z)-alkene-containing proline dipeptide mimetics. *J. Org. Chem.*, 71(13) 4969-4979 (2006).
16. Tamamura, H.; Ojida, A.; Ogawa, T.; Tsutsumi, H.; Masuno, H.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Hamachi, I.; Fujii, N. Identification of a new class of low molecular weight antagonists against the chemokine receptor CXCR4 having the dipicolylamine-zinc(II) complex structure. *J. Med. Chem.* 49(11), 3412-3415 (2006).
17. Niida, A.; Mizumoto, M.; Narumi, T.; Inokuchi, E.; Oishi, S.; Ohno, H.; Otaka, A.; Kitaura, K.; Fujii, N. Synthesis of (Z)-alkene and (E)-fluoroalkene-containing diketopiperazine mimetics utilizing organocopper-mediated reduction-alkylation and diastereoselectivity examination using DFT calculations. *J. Org. Chem.*, 71(11), 4118-4129 (2006).
18. Niida, A.; Tanigaki, H.; Inokuchi, E.; Sasaki, Y.; Oishi, S.; Ohno, H.; Tamamura, H.; Wang, Z.; Peiper, S. C.; Kitaura, K.; Otaka, A.; Fujii, N. Stereoselective synthesis of 3,6-disubstituted-3,6-dihydropyridin-2-ones as potential diketopiperazine mimetics using organocopper-mediated anti-SN2' reactions and their use in the preparation of low-molecule CXCR4 antagonists. *J. Org. Chem.* 71(10), 3942-3951 (2006).
19. Avniel, S.; Arik, Z.; Maly, A.; Sagie, Assa; Basst, H. B.; Yahana, M. D.; Weiss, I. D.; Pal, B.; Wald, O.; Ad-El, D.; Fujii, N.; Arenzana-Seisdedos, F.; Jung, S.; Galun, E.; Gur, E.; Peled, A. Involvement of the CXCL12/ CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns.

- J. Invest. Dermatol.* 126(2), 468-476 (2006).
20. Ohno, H.; Kadoh, Y.; Fujii, N.; Tanaka, T., Potassium carbonate-promoted stereospecific 5-endo-trig cyclization of unactivated allenes in the absence of any transition metals. *Org. Lett.* 8(5), 947-950 (2006).
  21. Niida, A.; Tomita, K.; Mizumoto, M.; Tanigaki, H.; Terada, T.; Oishi, S.; Otaka, A.; Inui, K.; Fujii, N. Unequivocal synthesis of (*Z*)-alkene and (*E*)-fluoroalkene dipeptide isomers to probe structural requirements of the peptide transporter PEPT1. *Org. Lett.* 8(4), 613-616 (2006).
  22. Oishi, S.; Miyamoto, K.; Niida, A.; Yamamoto, M.; Ajito, K.; Tamamura, H.; Otaka, Akira; Kuroda, Y.; Asai, A.; Fujii, N. Application of tri- and tetrasubstituted alkene dipeptide mimetics to conformational studies of cyclic RGD peptides. *Tetrahedron*, 62(7), 1416-1424 (2006).
  23. Dewan, M. Z.; Uchihara, J.; Terashima, K.; Honda, M.; Sata, T.; Ito, M.; Fujii, N.; Uozumi, K.; Tsukasaki, K.; Tomonaga, M.; Kubuki, Y.; Okayama, A.; Toi, M.; Mori, N.; Yamamoto, N. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood*, 107(2), 716-724, (2006).
  24. Ohta, Y.; Itoh, S.; Shigenaga, A.; Shintaku, S.; Fujii, N.; Otaka, A. Cysteine-derived S-protected oxazolidinones: Potential chemical devices for the preparation of peptide thioesters. *Org. Lett.*, 8(3), 467-470 (2006).
  25. Niida, A.; Wang, Z.; Tomita, K.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Navenot, J.-M.; Broach, J. R.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Design and synthesis of down-sized metastatin (45-54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16(1), 134-137 (2006).
  26. Tamamura, H.; Esaka, A.; Ogawa, T.; Araki, T.; Ueda, S.; Wang, Z.; Trent, J.O.; Tsutsumi, H.; Masuno, H.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Peiper, S.C.; Otaka, A.; Fujii, N. Structure-activity relationship studies on CXCR4 antagonists having cyclic pentapeptide scaffolds. *Org. Biomol. Chem.* 3(24), 4392-4394 (2005).
  27. Tamamura, H.; Fujii, N. The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Ther. Targets.* 9(6), 1267-1282 (2005).
  28. Navenot, J.M.; Wang, Z.; Chopin, M.; Fujii, N.; Peiper, S.C. Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. *Cancer Res.* 65(22), 10450-10456 (2005).
  29. Tamamura, H.; Otaka, A.; Fujii, N. Development of anti-HIV agents targeting dynamic supra-molecular mechanism: entry and fusion inhibitors based on CXCR4/CCR5 antagonists and gp41-C34-remodeling peptides. *Curr. HIV Res.* 3(4), 289-301 (2005).
  30. Fujii, N.; Otaka, A.; Tamamura, H. Innovative platform for drug discovery based on chemical proteomics: from knowledge to controlling. *Saibo Kogaku*, 24(11), 1181-1186 (2005).
  31. Niida, A.; Oishi, S.; Sasaki, Y.; Mizumoto, M.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Otaka, A. Facile access to (*Z*)-alkene-containing diketopiperazine mimetics utilizing organo copper-mediated anti-SN2' reactions. *Tetrahedron Lett.* 46(24), 4183-4186 (2005).
  32. Bhonsle, J. B.; Wang, Z.-x.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Peiper, S. C.; Trent, J. O. A simple, automated quasi-4D-QSAR, quasi-multi way PLS approach to develop highly predictive QSAR models for highly flexible CXCR4 inhibitor cyclic pentapeptide ligands using scripted common molecular modeling tools. *QSAR & Comb. Sci.* 24(5), 620-630 (2005).
  33. Niida, A.; Wang, Z.; Tomita, K.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Navenot, J.M.; Broach, J.R.; Peiper, S.C.; Fujii, N. Design and synthesis of downsized metastatin (45-54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16(1), 134-137 (2005).
  34. Ueda, S.; Fujita, M.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Otaka, A. Photolabile protection for one-pot sequential native chemical ligation. *Chembiochem*, 6(11), 1983-1986 (2005).
  35. Retz, M.; Sidhu, S.S.; Lehmann, J.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Basbaum, C. New HIV-drug inhibits in vitro bladder cancer migration and invasion. *Eur. Urol.* 48(6), 1025-1030 (2005).
  36. Zhong, Y.; Yoshinaka, Y.; Takeda, T.; Shimizu, N.; Yoshizaki, S.; Inagaki, Y.; Matsuda, S.; Honda, G.; Fujii, N.; Yamamoto, N. Highly potent anti-HIV-1 activity isolated from fermented *Polygonum tinctorium* Aiton. *Antiviral Res.* 66(2-3), 119-128 (2005).
  37. Burger, M.; Hartmann, T.; Krome, M.; Rawluk, J.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Kipps, T.J.; Burger, J.A. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 106(5), 1824-1830 (2005).
  38. Tamamura, H.; Araki, T.; Ueda, S.; Wang, Z.; Oishi, S.; Esaka, A.; Trent, J.O.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Peiper, S.C.; Otaka, A.; Fujii, N. Identification of novel low molecular weight CXCR4 antagonists by structural tuning of cyclic tetrapeptide scaffolds. *J. Med. Chem.* 48(9), 3280-3289 (2005).
  39. Ichikawa, N.; Kasai, S.; Suzuki, N.; Nishi, N.; Oishi, S.; Fujii, N.; Kadoya, Y.; Hatori, K.; Mizuno, Y.; Nomizu, M.; Arikawa-Hirasawa E. Identification of neurite outgrowth active sites on

- the laminin alpha4 chain G domain. *Biochemistry*, 44(15), 5755-5762 (2005).
40. Hartmann, T.N.; Burger, J.A.; Glodek, A.; Fujii, N.; Burger, M., CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene*. 24(27), 4462-4471 (2005).
  41. Zannettino, A.C.; Farrugia, A.N.; Kortessidis, A.; Manavis, J.; To, L.B.; Martin, S.K.; Diamond, P.; Tamamura, H.; Lapidot, T.; Fujii, N.; Gronthos, S. Elevated serum levels of stromal-derived factor-1alpha are associated with increased osteoclast activity and osteolytic bone disease in multiple myeloma patients. *Cancer Res*. 65(5), 1700-1709 (2005).
  42. Tamamura, H.; Hiramatsu, K.; Ueda, S.; Wang, Z.; Kusano, S.; Terakubo, S.; Trent, J.O.; Peiper, S.C.; Yamamoto, N.; Nakashima, H.; Otaka, A.; Fujii, N., Stereoselective synthesis of [L-Arg-L/D-3-(2-naphthyl)alanine]-type (E)-alkene dipeptide isosteres and its application to the synthesis and biological evaluation of pseudo-peptide analogues of the CXCR4 antagonist FC131. *J. Med. Chem.* 48(2), 380-391 (2005).
  43. Percherancier, Y.; Berchiche, Y.A.; Slight, I.; Volkmer-Engert, R.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Bouvier, M.; Heveker, N., Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* 280(11), 9895-9903 (2005).
  44. Nameki, D.; Kodama, E.; Ikeuchi, M.; Mabuchi, N.; Otaka, A.; Tamamura, H.; Ohno, M.; Fujii, N.; Matsuoka, M., Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev- responsive element functions. *J. Virol.* 79(2), 764-770 (2005).
  45. Piovan, E.; Tosello, V.; Indraccolo, S.; Cabrelle, A.; Baesso, I.; Trentin, L.; Zamarchi, R.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Semenzato, G.; Chieco-Bianchi, L.; Amadori, A. Chemokine receptor expression in EBV-associated lymphoproliferation in hu/SCID mice: implications for CXCL12/CXCR4 axis in lymphoma generation. *Blood*, 105(3), 931-939 (2005).
  46. Allen, C.D.; Ansel, K.M.; Low, C.; Lesley, R.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Cyster, J.G. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* 5(9), 943-952 (2004).
  47. Otaka, A.; Ueda, S.; Tomita, K.; Yano, Y.; Tamamura, H.; Matsuzaki, K.; Fujii, N. Facile synthesis of membrane-embedded peptides utilizing lipid bilayer-assisted chemical ligation. *Chem. Commun.* 7(15), 1722-1723 (2004).
  48. Yokoyama F, Suzuki N, Haruki M, Nishi N, Oishi S, Fujii N, Utani A, Kleinman HK, Nomizu M. Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha 4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides. *Biochemistry*, 43(42), 13590-13597 (2004).
  49. Tamamura, H.; Fujii, N. Two orthogonal approaches to overcome multi-drug resistant HIV-1s: development of protease inhibitors and entry inhibitors based on CXCR4 antagonists. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 4(2), 103-110 (2004).
  50. Yamamoto, N.; Yang, R.; Yoshinaka, Y.; Amari, S.; Nakano, T.; Cinatl, J.; Rabenau, H.; Doerr, H.W.; Hunsmann, G.; Otaka, A.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Yamamoto, N. HIV protease inhibitor, nelfinavir, inhibits replication of SARS-associated coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318(3), 719-725 (2004).
  51. Tamamura, H.; Fujisawa, M.; Hiramatsu, K.; Mizumoto, M.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Otaka, A.; Fujii, N., Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett.* 569(1-3), 99-104 (2004).
  52. Peng, H.; Huang, Y.; Rose, J.; Erichsen, D.; Herek, S.; Fujii, N.; Tamamura, H.; Zheng, J. Stromal cell-derived factor 1 mediated CXCR4 signaling in rat and human cortical neural progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* 76(1), 35-50 (2004).
  53. Takenaga, M.; Tamamura, H.; Hiramatsu, K.; Nakamura, N.; Yamaguchi, Y.; Kitagawa, A.; Kawai, S.; Nakashima, H.; Fujii, N.; Igarashi, R. A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppressed murine pulmonary metastasis of murine melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320(1), 226-232 (2004).
  54. Otaka, A.; Mitsuyama, E.; Watanabe, J.; Watanabe, H.; Fujii, N. Synthesis of fluorine-containing bioisosteres corresponding to phosphoamino acids and dipeptide units. *Biopolymers*, 76(2), 140-149 (2004).
  55. Otaka, A.; Watanabe, J.; Yukimasa, A.; Sasaki, Y.; Watanabe, H.; Kinoshita, T.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Fujii, N. SmI<sub>2</sub>-mediated reduction of  $\alpha,\alpha$ -difluoro- $\alpha,\beta$ -enoates and its application to the synthesis of (Z)-fluoroalkene-type dipeptide isosteres. *J. Org. Chem.*, 69(5), 1634-1645 (2004).
  56. Mori, T.; Doi, R.; Koizumi, M.; Toyoda, E.; Ito, D.; Kami, K.; Masui, T.; Fujimoto, K.; Tamamura, H.; Hiramatsu, K.; Fujii, N.; Imamura, M. CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.* 3(1), 29-37 (2004).
  57. Ohno, H.; Takemoto, Y.; Fujii, N.; Tanaka, T.; Ibuka, T. Stereodivergent synthesis of chiral 2-alkenylaziridines: palladium(0)-catalyzed 2,3-cis-selective aziridination and base-mediated 2,3-trans-selective aziridination. *Chem. Pharm. Bull.* 52(1), 111-119 (2004).
  58. Yanada, R.; Koh, Y.; Nashimori, N.; Matsumura, A.; Obika, S.; Mitsuya, H.; Fujii, N.; Takemoto, Y., Indium-mediated atom-transfer

and reductive radical cyclizations of iodoalkynes: synthesis and biological evaluation of HIV-protease inhibitors. *J. Org. Chem.*, 69(7), 2417-2422 (2004).

59. Tamamura, H.; Mizumoto, M.; Hiramatsu, K.; Kusano, S.; Terakubo, S.; Yamamoto, N.; Trent, J.O.; Wang, Z.; Peiper, S.C.; Nakashima, H.; Otaka, A.; Fujii, N. Topochemical exploration of potent compounds using retro-enantiomer libraries of cyclic pentapeptides. *Org. Biomol. Chem.* 2(8), 1255-1257, (2004).
60. Masui, T.; Doi, R.; Mori, T.; Toyoda, E.; Koizumi, M.; Kami, K.; Ito, D.; Peiper, S.C.; Broach, J.R.; Oishi, S.; Niida, A.; Fujii, N.; Imamura, M. Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315(1), 85-92 (2004)

## 2. 学会発表

1. Otaka, N. Yamamoto, E. Kodama, H. Tamamura, M. Matsuoka, N. Yamamoto, N. Fujii, A General Strategy for Development of Anti-Virus Peptides Based on X-EE-XX-KK Concept for the Alpha-helical Env Sequence: Practice in AIDS and SARS, 3<sup>rd</sup> International and 28<sup>th</sup> European Peptide Symposium (Sep 5-10, 2004, Prague, Czech Republic)
2. H. Tamamura, K Hiramatsu, T. Araki, S. Mizokami, S. Oishi, S. Ueda, Z. Wang, S.C. Peiper, J.O. Trent, Low Molecular Weight CXCR4 Antagonists Based on T140 Analogs That Were Identified as Triple-Functional Agents Having Inhibitory Activities against HIV Infection, Cancer, Metastasis and Rheumatoid Arthritis, 3<sup>rd</sup> International and 28<sup>th</sup> European Peptide Symposium (Sep 5-10, 2004, Prague, Czech Republic)
3. N. Fujii, Medicinal Chemistry beyond Genomics and Proteomics, Pharmaceutical Sciences World Congress(PSWC2004) (May 30-June 4, 2004, Kyoto, Japan)
4. N. Fujii, Peptide-lead Drug Templates for Genome-lead Drug Discovery, 6<sup>th</sup> Australia-Japan Symposium on Drug Design and Development (June 27-30, 2004, Sydney, Australia)
5. Otaka, S. Ueda, N. Fujii, Synthetic Studies on Membrane Proteins Using Lipid Bilayer-assisted Membrane Peptide Ligation, Akabori Conference (April 20-22, 2004, Awaji, Japan)
6. N. Fujii, A. Otaka, H. Tamamura, S. Oishi, T. Araki, A. Niida, Peptide-lead Conformationally Restricted Templates for Genome-lead Drug Discovery, Akabori Conference (April 20-22, 2004, Awaji, Japan)
7. Satoshi Ueda, Akira Otaka, Hirokazu Tamamura and Nobutaka Fujii. Development of New Photoremovable Protecting Group and its Application toward Chemical Synthesis of 7TM-GPCR. 19<sup>th</sup> American Peptide Symposium (2005.6, San Diego, U.S.A.)
8. Ayumu Niida, Shinya Oishi, Makiko Mizumoto, Yoshikazu Sasaki, Kenji Tomita, Hirokazu Tamamura, Akira Otaka, Tomohiro Terada, Ken-ichi Inui and Nobutaka Fujii. Unequivocal synthesis of (Z)-alkene or (E)-fluoroalkene dipeptide isosteres via DKP mimetics to probe structural requirements of peptide transporter. 19<sup>th</sup> American Peptide Symposium (2005.6, San Diego, U.S.A.)
9. Yoshikazu Sasaki, Ayumu Niida, Takashi Tsuji, Akira Shigenaga, Nobutaka Fujii and Akira Otaka. Synthesis of (Z)-alkene-containing Pro dipeptide isosteres corresponding to *cis*-prolyl peptides. The 11<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development (2006.5, Jeju Island, Korea)
10. Nobutaka Fujii. From genome to lead: medicinal chemistry beyond XXX-omics researches. The 11<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development (2006.5, Jeju Island, Korea)
11. Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Zi-xuan Wang, Takanobu Araki, Hirokazu Tamamura, Hiroaki Ohno, Hideki Nakashima, Stephen C. Peiper and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship studies on cyclic peptide-based CXCR4 antagonists. ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (2006.7, Kyoto, Japan)
12. Kenji Tomita, Ayumu Niida, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Miki Akamatsu and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship study on GPR54 agonists. ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (2006. 7, Kyoto, Japan)
13. Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Ayumu

- Niida, Yasuyo Kodera, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno and Nobutaka Fujii. Development of synthetic methodology toward (*Z*)-fluoroalkene dipeptide isosteres based on the concept of organometallic-mediated C-F bond cleavage. ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (2006.7, Kyoto, Japan)
14. S. Ueda, S. Oishi, Z-X. Wang, H. Ohno, S. C. Peiper, N. Fujii. Structure-activity relationship studies on cyclic peptide-based CXCR4 antagonists: Side-chain and backbone modifications. 232<sup>nd</sup> American Chemical Society National Meeting & Exposition (2006.9.10 San Francisco, U.S.A.)
  15. Yoshikazu Sasaki, Takashi Tsuji, Ayumu Niida, Akira Shigenaga, Nobutaka Fujii and Akira Otaka. Regio- and stereoselective synthesis of (*Z*)-alkene *cis*-Xaa-Pro dipeptide mimetics with organocopper-mediated *anti*-S<sub>N</sub>2' reactions. 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium (2006. 9. Gdansk, Poland)
  16. Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Ayumu Niida, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii. Diastereoselective synthesis of (*Z*)-fluoroalkene dipeptide isosteres based on organocopper-mediated reduction/direct alkylation via transmetalation. 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium (2006.9, Gdansk, Poland)
  17. Shinya Oishi, Kenji Tomita, Ayumu Niida, Miki Akamatsu, Toshihiko Masui, Ryuichiro Doi, Jean-Marc Navenot, Zixang Wang, Stephen C. Peiper, Nobutaka Fujii. Discovery of novel low-molecular-weight GPR54 agonists. 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium (2006.9, Gdansk, Poland)
  18. Hiroaki Ohno, Tetsuaki Tanaka, Nobutaka Fujii, From amino acids to peptide isosteres and heterocycles: implications to vinylaziridines and amino allene chemistry. 11<sup>th</sup> Akabori conference (2006.9, Regensburg, Germany)
  19. Kenji Tomita, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Miki Akamatsu and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship studies on GPR54 agonists. The International Conference of 43<sup>rd</sup> Japanese Peptide Symposium and 4<sup>th</sup> Peptide Engineering Meeting (2006. 11, Yokohama, Japan)
  20. Michinori Tanaka, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno and Nobutaka Fujii. A novel oxazolidine linker for the synthesis of peptide aldehydes. The International Conference of 43<sup>rd</sup> Japanese Peptide Symposium and 4<sup>th</sup> Peptide Engineering Meeting (2006. 11, Yokohama, Japan)
  21. Toshiaki Watanabe, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii and Hiroaki Ohno. Palladium-catalyzed synthesis of carbazole by tandem *N*-arylation and C-H activation. The 10<sup>th</sup> International KYOTO Conference on New Aspects of Organic Chemistry (2006. 11, Kyoto, Japan)
  22. Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Eriko Inokuchi, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno and Nobutaka Fujii. Allylic hydrodefluorination under palladium catalysis for the synthesis of fluoroalkene dipeptide isosteres The 10<sup>th</sup> International KYOTO Conference on New Aspects of Organic Chemistry. (2006. 11, Kyoto, Japan)
  23. Nobutaka Fujii. From amino acids to peptide isosteres: Implication to genome-lead drug discovery. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Biomolecules and Related Compounds. (2006.11, Kyoto, Japan)
  24. Kenji Tomita, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Miki Akamatsu and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship studies on N-terminal acyl groups of pentapeptidic GPR54 agonists. The 3<sup>rd</sup> Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists (2006. 11, Seoul, Korea)
  25. Hiroki Nishikawa, Eiichi Kodama, Saori Itho, Keiko Kajiwara, Kazuki Izumi, Shinya Oishi, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii. New peptide design for HIV-1 fusion inhibitors against T-20-resistant HIV-1 variants. The 3<sup>rd</sup> Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists (2006. 11, Seoul, Korea)
  26. Nobutaka Fujii, Hiroaki Ohno, Shinya Oishi. From knowledge to controlling: implications of peptide-lead drug templates for genome-lead discovery. RIKEN International Symposium on Chemical



- Biology (2007.1, Hakone, Japan)
27. Kenji Tomita. Structure-activity relationship Study on GPR54 agonists. 2006-07 21<sup>st</sup> COE program-Knowledge Information Infra-structure for Genome Science (2007. 1, Kyoto, Japan)
  28. Tetsuo Narumi. Unprecedented, ECO-benign, Palladium-catalyzed fluoroalkene synthesis: relevance to fluoroalkene peptidomimetics. 2006-07 21<sup>st</sup> COE program-Knowledge Information Infrastructure for Genome Science (2007. 1, Kyoto, Japan)
  29. Kenji Tomita, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Miki Akamatsu and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship study on GPR54 agonist as novel anti-metastatic agent. First JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics (2007. 3, Nagoya, Japan)
  30. Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Zi-xuan Wang, Hiroaki Ohno, Stephen C. Peiper and Nobutaka Fujii. Development of cyclic pentapeptide-based CXCR4 antagonists for the treatment of CXCR4-mediated diseases. First JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics (2007. 3, Nagoya, Japan)
  31. Nobutaka Fujii, Shinya Oishi, Satoshi Ueda. CXCR4 antagonists: Relevance to small cell lung cancer chemotherapy. First JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics (2007. 3, Nagoya, Japan)
  32. Tetsuo Narumi, Eriko Inokuchi, Kenji Tomita, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno and Nobutaka Fujii. Unprecedented palladium-mediated carbon-fluorine bond cleavage: relevance to the synthesis of fluoroalkene dipeptidomimetics. American Chemical Society 233<sup>rd</sup> National Meeting & Exposition (2007, 3, Chicago, IL USA)
- 2004-255819、WO 06/025536 A; 発明者: 藤井信孝、大高 章、山本直樹、山本典生; 出願人: 京都大学、東京医科歯科大学; 出願日: 2004年9月2日
2. CXCR4 antagonists for wound healing and re-epithelialization; 出願番号: US2005-684160; 発明者: Amnon Peled、Nobutaka Fujii; 出願人: Hadasit Medical Research Services and Development Ltd, Kyoto University; 出願日: 2005年5月25日
  3. GPR54アゴニスト活性を有する化合物: 出願番号: 特願2006-122305; 発明者: 藤井信孝、大石真也、富田健嗣、新居田歩; 出願人: 京都大学; 出願日: 2006年4月26日
  4. N36結合ペプチドの製造方法; 出願番号: 特願2006-204827; 発明者: 堤、石田、久田、水本、秦、藤井、松岡、児玉、大石; 出願人: 月桂冠株式会社; 出願日: 2006年7月27日
  5. 抗FIV剤; 出願番号: 特願2006-242428; 発明者: 辻本元、藤井信孝; 出願人: 国立大学法人京都大学、国立大学法人東京大学; 出願日: 2006年9月7日
  6. 抗HIV剤; 出願番号: 特願2006-290241; 発明者: 藤井信孝; 大石真也; 松岡雅雄; 児玉栄一; 出願人: 国立大学法人京都大学; 出願日: 2006年10月25日

## 2. 実用新案登録

該当事項なし

## 3. その他

該当事項なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. 抗SARSウイルス剤: 出願番号: 特願

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄  
 分担研究者：京都大学ウイルス研究所 児玉 栄一

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

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
Kajiwara K, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> .	A novel colorimetric assay for CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency viruses.	Antivir Chem Chemother	17	215-223	2006
Saita Y, <u>Kodama E</u> , Orita M, Kondo M, Miyazaki T, Sudo K, Kajiwara K, <u>Matsuoka M</u> , Shimizu Y.	Structural Basis for the Interaction of CCR5 with a Small Molecule, Functionally Selective CCR5 Agonist.	J Immunol	177	3116-3122	2006
Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, Kawakami H, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Ikeda S, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Shinkai H.	Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics.	J Med Chem	49	1506-1508	2006
Ohruai H, Kohgo S, Hayakawa H, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Nakata T, Mitsuya H.	2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma.	Nucleic Acids Symp Series	50	1-2	2006
Nameki D, <u>Kodama E</u> , Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, <u>Matsuoka M</u> .	Mutations conferring resistance to HIV-1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev responsive element functions.	J Virol	79	764-770	2005
Fan J, <u>Kodama E-I</u> , Koh Y, Nakao M, <u>Matsuoka M</u> .	Halogenated thymidine analogs restore the expression of silenced genes without demethylation.	Cancer Res	65	6927-6933	2005
Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H,	Studies of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 2: synthesis and structure-activity relationships of 2-cyano and	Bioorg Med Chem	13	949-961	2005

Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Shintani M, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M.	2-hydroxy thiazolidenebenzenesulfonamide derivatives.				
Futaki S, Nakase I, Suzuki T, Nameki D, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Sugiura Y.	RNase S complex bearing arginine-rich peptide and anti-HIV activity.	J Mol Recognit	18	169-174	2005
Kitano K, Kohgo S, Yamada K, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Mitsuya H, Ohru H.	Attempt to reduce cytotoxicity by synthesizing the L-enantiomer of 4'-C-ethynyl-2'-deoxypurine nucleosides as antiviral agents against HIV and HBV.	Antivir Chem Chemother	14	161-167	2004
Kohgo S, Yamada K, Kitano K, Iwai Y, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Mitsuya H, Ohru H.	Design, efficient synthesis, and anti-HIV activity of 4'-C-cyano- and 4'-C-ethynyl-2'-deoxy purine nucleosides.	Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids	23	671-690	2004
Hachiya A, Gatanaga H, <u>Kodama E</u> , Ikeuchi M, <u>Matsuoka M</u> , Harada S, Mitsuya H, Kimura S, Oka S.	Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients.	Virology	327	215-224	2004
Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Nakahara H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M.	Studies of nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 1: Design and synthesis of thiazolidenebenzenesulfonamides.	Bioorg Med Chem	12	6171-6182	2004
Hayakawa H, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, <u>Kodama E</u> , Mitsuya H, Ohru H.	Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1.	Antivir Chem Chemother	15	169-187	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄  
 分担研究者：京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝  
 分担研究者：京都大学大学院薬学研究科 大石 真也

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
W.B. Zhang, Z.X. Wang, J.L. Murphy, N. Fujii, J. Broach & S.C. Peiper,	Functional expression of CXCR4 in <i>S. cerevisiae</i> : development of tools for mechanistic and pharmacologic studies	P.M. Murphy & R. Horuk	<i>Chemokine Roles in Immunoregulation and Disease</i>	Springer		2004	125-152

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
Tamamura, H.; Tsutsumi, H.; Masuno H.; Fujii N.	Development of low molecular weight CXCR4 antagonists by exploratory structural tuning of cyclic tetra- and pentapeptide- scaffolds towards the treatment of HIV infection, Cancer Metastasis and Rheumatoid arthritis.	<i>Curr. Med. Chem.</i>	14(1)	93-102	2007
Sasaki, Y.; Shigenaga, A.; Fujii, N.; Otaka, A.	Synthesis of (Z)-alkene-containing cis-proline dipeptide mimetics using samarium(II) diiodide (SmI <sub>2</sub> )-mediated reductive alkylation reaction.	<i>Tetrahedron</i>	63(9)	2000-2008	2007
Ueda, S.; Oishi, S.; Wang, Z.; Araki, T.; Tamamura, H.; Cluzeau, J.; Ohno, H.; Kusano, S.; Nakashima, H.; Trent, J. O.; Peiper, S. C.; Fujii, N.	Structure-activity relationships of cyclic Peptide-based chemokine receptor CXCR4 antagonists: disclosing the importance of side-chain and backbone functionalities.	<i>J. Med. Chem.</i>	50(2)	192-198	2007
Kato-Takagaki, K; Suzuki, N.; Yokoyama, F.; Takaki, S.; Umezawa, K.; Higo, J.; Mochizuki, M.; Kikkawa, Y.; Oishi, S.; Utani, A.; Nomizu, M.	Cyclic peptide analysis of the biologically active loop region in the laminin $\alpha$ 3 Chain LG4 module demonstrates the importance of peptide conformation on biological activity.	<i>Biochemistry</i>	46(7)	1952-1960	2007
Narumi, T.; Niida, A.; Tomita, K.; Oishi, S.; Otaka, A.; Ohno, H.; Fujii, N.	A novel one-pot reaction involving organocopper-mediated reduction/transmetalation/asymmetric alkylation, leading to the diastereoselective synthesis of functionalized (Z)-fluoroalkene dipeptide isosteres.	<i>Chem. Commun.</i>	(45)	4720-4722	2006
Baba, M.; Hong, S.-B.; Sharma, N.; Warren, M. B.; Nickerson, M. L.; Iwamatsu, A.; Esposito, D.; Gillette, W. K.; Hopkins, R. F., III; Hartley, J. L.; Furihata, M.; Oishi, S.; Zhen, W.; Burke, T. R., Jr.; Linehan, W. M.; Schmidt, L. S.; Zbar, B.	Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i>	103 (42)	15552 -15557	2006
Otaka, A.; Fujii, N.	Development of anti-viral fusion inhibiting peptides.	<i>Kagaku Kogyo</i>	57(10)	797-801	2006