

薬剤耐性株の対する新規薬剤に共通のユニバーサルな合成法として利用することが可能である。

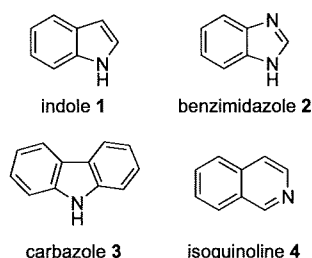
## E. 結論

研究グループでは、ペプチド性 HIV 膜融合阻害剤の大腸菌による発現プロセスとその後の化学的処理を組み合わせた新しい生産プロセスを確立した。現状において大腸菌でのタンパク質発現量に改善の余地があるものの、分泌発現をはじめとするさらなる条件検討、および、アフィニティクロマトグラフィーに代わる新たな精製法との組み合わせにより、ペプチド性膜融合阻害剤原末を安価に供給可能になることが期待される。

## 分担研究項目 2 : 低分子抗 HIV 剤の開発研究

### 2-1. カルバゾールおよびイソキノリン誘導体の効率的合成法の開発研究

#### A. 研究目的



研究グループでは、インドール **1** もしくはベンズイミダゾール **2** 骨格を有する化合物のスクリーニングを実施し、中程度の抗 HIV 活性を示すインドール誘導体を見出した。これらの関連誘導体の合成展開に向けて、インドール **1** と類似の分子骨格を有する複素環であるカルバゾール **3** およびイソキノリン誘導体 **4** の効率的多品目合成法の確立を行った。

#### B. 研究方法

パラジウム触媒を用いた C-H 活性化は、通常不活性な C-H 結合を直接活性化することができるため、原子効率の高い有効な手段として近年盛んに研究が行われている。また、2 価パラジウムによる酸化的ビアリールカップリングは二つの C-H 結合を活性化し、新たに C-C 結合を形成することが

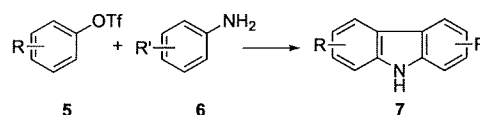
できる極めて優れた反応である。そこで、パラジウム触媒による N-アリール化と C-H 活性化を連続的に行うことにより、カルバゾール骨格を効率よく構築できるものと考え、本研究に着手した。

一方、研究グループでは、前年度の研究によりエチルアニリン誘導体、パラホルムアルデヒド、ジイソプロピルアミンを触媒量の CuBr 存在下で反応させると、2-(アミノメチル)インドール誘導体を得られることを明らかにした。本法をイソキノリン骨格合成へと展開し、2-エチルベンズアルデヒドからイミン誘導体を経てイソキノリン骨格を合成する条件について、詳細に検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

該当事項なし

Table 1. Reactions of aryl triflates with substituted anilines.<sup>a</sup>



Entry	Triflate (R)	Aniline (R')	Temp. (°C)	t (h)	Yield 7 (%) <sup>b</sup>
1	H	H	100	10	69
2	H	H	100	18	67 <sup>c</sup>
3	4-Me	H	100	8	46
4	3-Me	H	100	7.5	62
5	4-CO <sub>2</sub> Me	H	120	30	64 <sup>d</sup>
6	H	4-CF <sub>3</sub>	100	6	72 <sup>e</sup>
7	2-Me	4-CO <sub>2</sub> Me	120	24	56
8	3-Me	4-CO <sub>2</sub> Me	100	11	>99
9	4-Me	4-CO <sub>2</sub> Me	80	24	78

<sup>a</sup> Reaction conditions: aryl triflate **5** (1.0 equiv), aniline **6** (1.1 equiv), Pd(OAc)<sub>2</sub> (10 mol%), ligand (15 mol%), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.2 equiv), toluene, 100 °C, then O<sub>2</sub> (1 atm), AcOH. <sup>b</sup> Yields of isolated products. <sup>c</sup> Air was used in place of O<sub>2</sub>. <sup>d</sup> Diphenyl amine was obtained in 28% yield. <sup>e</sup> Diphenyl amine was obtained in 23% yield.

#### C. 研究結果

酸化的ビアリールカップリングでは、化学量論量のパラジウムが必要になるが、適当な酸化剤を加えることにより触媒回転が可能になることが知られている。まず、酸化的ビアリールカップリングを触媒的に行うために触媒量、酸化剤、溶媒の検討を行った。ジフェニルアミンの反応における各種条件を検討したところ、酢酸中、酸化剤として酸素、触媒量 10 mol% 用いた場合に最も高い収率でカルバゾールが得られた。

つづいて、アニリンとフェニルトリフラートを用いたカルバゾールの一挙合成を検討した (Table 1)。Buchwald-Hartwig クロス

Table 2. Synthesis of isoquinolines.

Entry	Substrate	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sub>2</sub> NH (10)	Product (yield)
1	8a	H	H	( <i>i</i> -Pr) <sub>2</sub> NH (10a)	11a (83)
2	8a	H	H	piperidine (10b)	11b (88)
3	8a	H	H	(allyl) <sub>2</sub> NH (10c)	11c (60)
4	8b	F	H	( <i>i</i> -Pr) <sub>2</sub> NH (10a)	11d (83)
5	8c	H	OMe	( <i>i</i> -Pr) <sub>2</sub> NH (10a)	11e (84)

カップリング条件下、*N*-アリール化を行った後に、酢酸を加え酸素雰囲気下においてC-H活性化を行ったところ、目的のカルバゾールが69%の収率で得られた (entry 1)。

3位に電子供与性基としてメチル基を有するトリフラートは4位のものより高い収率を与えた (entries 3, 4)。また、3位にメチル基を有するトリフラートを用いた場合、立体障害を避けるように環化が進行した2-メチルカルバゾールのみを選択的に与えた (entry 4)。4位に電子吸引性基としてエステル基やトリフルオロメチル基を有するトリフラートやアニリンでは共に中程度の収率で目的物を与えた (entries 5, 6)。2, 3または4位にメチル基を有するトリフラートと4位にエステル基を有するアニリンとの反応では (entries 7-9)、3位にメチル基を有するトリフラートが最も高い収率を与えた (entry 8)。一方で、2位にメチル基を導入すると反応部位が一箇所に限定されるため、反応性が著しく低下した (entry 7)。いずれの場合においても *N*-アリール化の過程はほぼ定量的に進行し、C-H活性化の過程における置換基効果が収率に大きな影響を与えることが明らかとなった。

イソキノリン骨格の合成では、ヨウ化銅触媒存在下、2-エチニルベンズアルデヒド **8**、パラホルムアルデヒド **9**、及び二級アミン **10** の三成分反応終了後に *t*-BuNH<sub>2</sub> を加えて加熱することで、四成分反応連結反応により目的のイソキノリン誘導体 **11** が効率よく得られた (Table 2)。二級アミン **10** として、ジイソプロピルアミン **10a**、ジアリルアミン **10b** のような鎖状二級アミンの他、ピペリジン **10b** のような環状アミンも本反応に適用可能であり、また、ベンズアルデヒド上の置換基として、フッ素、メト

キシ基等が選択可能である。

## D. 考察

カルバゾール骨格は縮環型のインドール誘導体として、イソキノリン骨格はインドール類縁体として、それぞれ低分子膜融合阻害剤への応用が期待される含窒素複素環である。今回研究グループが開発したカルバゾール骨格構築法では、2つの安価なコンポーネントをもとに多様なカルバゾール誘導体を1反応で化学合成可能であることから、迅速な構造活性相関研究への対応が可能である。一方、4成分をもとにイソキノリン環を一挙に構築する方法では、R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R 部位を自由に選択可能であり、多様な化合物のライブラリーが構築可能である。これらにより、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

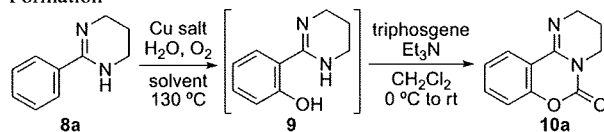
研究グループでは、低分子膜融合阻害剤の構造活性相関研究を展開するための基盤技術として、*N*-アリール化-C-H活性化からなるワンポット反応を行うことにより、様々な置換基を有するカルバゾール誘導体の効率的合成法の開発に成功した。また、2-エチニルベンズアルデヒド、ホルムアルデヒド、二級アミン、*t*-BuNH<sub>2</sub> の銅触媒による四成分環化反応により様々な官能基を有する新規イソキノリン骨格の効率的合成法を確立した。

## 2-2. ピリミドベンゾチアジン誘導体の効率的合成法の開発研究

### A. 研究目的

研究グループでは、新規抗 HIV 活性化化合物の探索を目的としたランダムスクリーニングを行い、pyrimidobenzothiazin-6-imine 骨格を有する PD 404182 が抗 HIV 活性を示すことを見出した。本化合物は、グラム陰性菌のリポポリサッカライド (LPS) の主要物質である 2-ケト-3-デオキシオクトン酸 (KDO) の合成初期段階において、ホスホエノールピルビン酸とアラビノース 5 リン酸の縮合を触媒する KDO 8-P 合成酵素を阻害することにより抗菌活性を示し、多剤耐性菌に有効な新規化合物探索における有用なリード化合物であると報告されてい

**Table 1.** Optimization of Reaction Conditions for C-O Bond Formation<sup>a</sup>



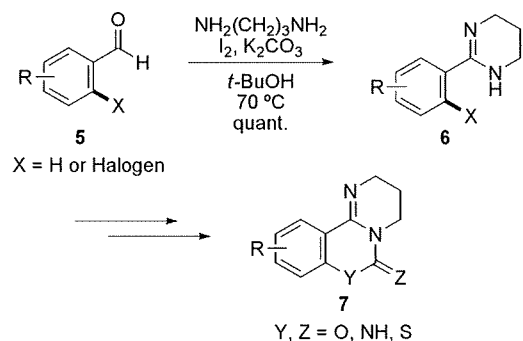
entry	Cu salt (equiv)	solvent	time (min)	yield (%) <sup>b</sup>
1	CuO (1.0)	DMF	20	N.r. <sup>e</sup>
2	Cu(OH) <sub>2</sub> (1.0)	DMF	20	N.r. <sup>e</sup>
3	Cu(OTf) <sub>2</sub> (1.0)	DMF	20	N.r. <sup>e</sup>
4	Cu(tfa) <sub>2</sub> (1.0)	DMF	20	N.r. <sup>e</sup>
5	Cu(OAc) <sub>2</sub> (1.0)	DMF	20	61
6	Cu(OAc) <sub>2</sub> (1.0)	MeCN	60	11
7	Cu(OAc) <sub>2</sub> (1.0)	dioxane	60	11
8	Cu(OAc) <sub>2</sub> (0.2)	DMF	60	30
9	Cu(OAc) <sub>2</sub> (2.0)	DMF	15	27
10 <sup>c</sup>	Cu(OAc) <sub>2</sub> (1.0)	DMF	20	70
11 <sup>c,d</sup>	Cu(OAc) <sub>2</sub> (1.0)	DMF	20	56

<sup>a</sup> After completion of C-O bond formation (monitored by TLC), the reaction mixture was evaporated and treated with triphosgene (1.05 equiv) and Et<sub>3</sub>N (4.0 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at 0 °C to rt for 1 h. <sup>b</sup> Isolated yields. <sup>c</sup> After completion of C-O bond formation (monitored by TLC), the reaction mixture was treated with TMEDA (4.0 equiv) at 130 °C for 1 min. In this case, TMEDA (additional 4.0 equiv) was used for the next step instead of Et<sub>3</sub>N. <sup>d</sup> Reaction was carried out under air. <sup>e</sup> No reaction. Abbreviation: TMEDA = *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine.

る。PD 404182 の合成は一例のみ報告例があるものの、各工程が低収率であることなどの問題点を有するため、抗 HIV 剤としての構造最適化に用いることができる効率的な合成法とは言い難い。そこで本研究では、構造活性相関研究を視野に入れた PD 404182 及びその類縁体の効率的合成法の開発を行った。

### B-C. 研究方法・研究結果

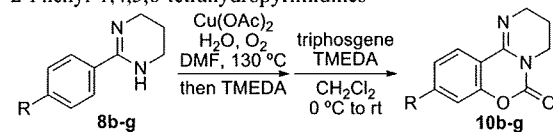
**Scheme 1.** Synthetic Plan for PD 404182 Derivatives



PD 404182 の合成計画を Scheme 1 に示す。東郷らにより報告されている酸化のアミジン化反応を用いて、ベンズアルデヒド **5** を 2-phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine (以下、2-PTHP) 誘導体 **6** に変換後、官能基化反応に付すことで、PD 404182 と同様の多環式複素環骨格 **7** が得られると考えた。

### C-H 官能基化反応による PD 404182 誘導

**Table 2.** Cu-catalyzed C-O Bond Formation of 4-Substituted 2-Phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidines<sup>a</sup>



entry	substrate (R)	product	yield (%) <sup>b</sup>
1	<b>8b</b> (OMe)	<b>10b</b>	64 (53)
2	<b>8c</b> (Me)	<b>10c</b>	61 (54)
3	<b>8d</b> (Br)	<b>10d</b>	45 (37)
4	<b>8e</b> (CO <sub>2</sub> Me)	<b>10e</b>	46 (43)
5	<b>8f</b> (CF <sub>3</sub> )	<b>10f</b>	43 (38)
6	<b>8g</b> (NO <sub>2</sub> )	<b>10g</b>	19 (16)

<sup>a</sup> These reactions were carried out using the optimized procedure (Table 1, entry 10). <sup>b</sup> Isolated yields. Yields in parentheses indicate those of the reactions without TMEDA treatment (as shown in Table 1, entry 5).

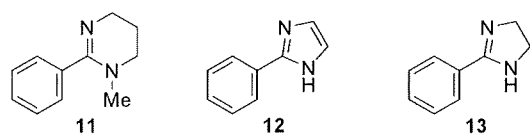
### 体合成法の開発

C-H 官能基化反応は、結合生成部位における官能基化段階を省き、短工程で目的の構造を得るための有力な手法である。まず、2-PTHP **8a** の C-H 官能基化反応による誘導体合成法の開発を行った。

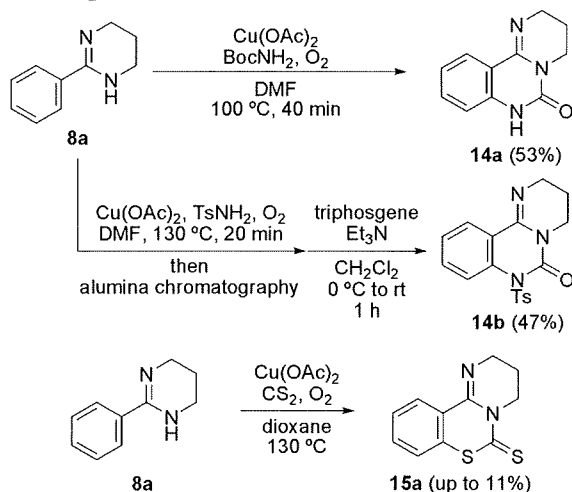
水 (1.0 当量) 存在下、CuO、Cu(OH)<sub>2</sub>、Cu(OTf)<sub>2</sub>、または Cu(tfa)<sub>2</sub> (1.0 当量) を用いて、DMF 中で 2-PTHP **8a** を酸素雰囲気下 130 °C で反応させたが、目的の反応は進行しなかった (Table 1, entries 1–4)。一方、Yu らの報告<sup>7)</sup>と同様に Cu(OAc)<sub>2</sub> を用いた場合、オルトヒドロキシ体 **9** の生成が確認できた。しかしながら、目的物である **9** は高い塩基性を有しており単離が困難であった。そこで、原料の消失を TLC で確認後、溶媒を減圧下留去し、ジクロロメタン中でトリホスゲン (1.05 当量) 及びトリエチルアミン (4.0 当量) で処理したところ、環化体 **10a** を 61% の収率で得た (entry 5)。次に銅塩を Cu(OAc)<sub>2</sub> に固定して、溶媒の検討を行った。DMF の代わりにアセトニトリルもしくはジオキサンを用いた場合には、収率が大幅に低下した (entries 6 and 7)。Cu(OAc)<sub>2</sub> の量を 0.2 当量に減らしたところ、触媒効率が低く、収率は 30% に低下した (entry 8)。次に、2.0 当量の Cu(OAc)<sub>2</sub> を加えると、期待に反して収率はさらに低下した (entry 9)。この結果から、オルト置換体 **9** が銅触媒と複合体を形成したために収率が低下した可能性があると考え、反応条件のさらなる最適化を行った。

二座のリガンドである *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TMEDA) を 1 当量添加して反応を行ったところ、目的の酸化 C-H 活性化反応は完全に抑制され

Figure 1. Various Amidine Analogues



Scheme 2. C-N Bond Formation with BocNH<sub>2</sub>, TsNH<sub>2</sub> and CS<sub>2</sub>



た。次にカルボニル化反応の際に使用する塩基をトリエチルアミンから TMEDA に変更したが、収率は変化しなかった。一方で、1 当量の Cu(OAc)<sub>2</sub> を用いて C-O 結合形成反応を行った後、4 当量の TMEDA を加えて 130 °C で 1 分攪拌し、引き続き TMEDA を塩基としてカルボニル化反応を試みたところ、収率が 70% に向上した (entry 10)。空気雰囲気下での反応では、収率の低下が認められた (entry 11)。

最適条件 (Table 1, entry 10) を用いて、フェニル基の 4 位にさまざまな置換基を有する基質に対する反応を検討した。Table 2 に示すように、メトキシ基 (entry 1)、メチル基 (entry 2) のような電子供与性基を持つ基質 **8b**, **8c** では、それぞれ 64%、61% の収率で対応する生成物が得られた。アリールブロミド部位を有する基質 **8d** においても 45% の収率で目的物が得られた (entry 3)。電子求引性基として、メトキシカルボニル基 (entry 4)、トリフルオロメチル基 (entry 5) を有する基質 **8e**, **8f** では中程度の収率で目的物を得ることができた。一方で、ニトロ基のような強い電子求引性基では大幅に収率が低下した (entry 6)。すべての反応において TMEDA による後処理を行わない条件 (Table 1, entry 5) においては、収率が低下した。

次に、配位性置換基として機能する環状

Table 3. Optimization of Reaction Conditions Using CS<sub>2</sub><sup>a</sup>

entry	X	base (equiv)	solvent	time (h)	yield (%) <sup>b</sup>
1	Br	NaH (5)	DMF	6	75
2	Br	NaH (5)	THF	4	trace
3	Br	NaH (5)	MeCN	4	trace
4	Br	NaH (2)	DMF	12	88
5	Br	none	DMF	12	12
6	Br	Et <sub>3</sub> N (2)	DMF	12	trace
7	Br	KH (2)	DMF	6	trace
8	Br	NaOt-Bu (2)	DMF	6	27
9	F	NaH (2)	DMF	12	86

<sup>a</sup> All reactions were carried out at 80 °C using 2 or 5 equiv of CS<sub>2</sub> (the equal equivalents to the base). <sup>b</sup> Isolated yields.

アミジン部分の構造について検討した (Figure 1)。2-PTHP の窒素原子をメチル化した基質 **11** および 2-フェニルイミダゾール **12** で反応を行ったが、反応は進行しなかった。また興味深いことに、五員環アミジンである 2-フェニルイミダゾリン **13** でも反応は進行しなかった。

続いて、C-N 結合形成反応の検討を行った (Scheme 2)。検討の結果、アミジン **8a**、1.0 当量の Cu(OAc)<sub>2</sub>、及び、3 当量の *tert*-ブチルカーバメートの DMF 溶液を 100 °C で 40 分間反応させると、*tert*-ブトキシドの脱離を伴う環化反応が進行し、保護アニリン誘導体 **14a** が 53% の収率で直接得られた。また、窒素源として *p*-トルエンスルホンアミドを用いた場合にも目的のアミド化が進行し、アルミナカラムにより副生成物を除去した後にトリホスゲン処理を行うと、保護体 **14b** を 47% の収率で得ることができた。続いて、様々な硫黄化合物 (チオール、ジスルフィド、金属スルフィド、二硫化炭素など) を用いて C-S 結合形成反応の検討を行ったところ、二硫化炭素を用いた場合にのみ C-S 結合形成反応が進行し、環化体 **15a** が得られた。しかしながら、本反応の最適化を試みたところ、11% と低収率であった。

### 芳香族求核置換 (S<sub>N</sub>Ar) 反応による PD 404182 誘導体合成法の開発

まず、オルト位にブロモ基を有する 2-PTHP を用いて、二硫化炭素とのカップリング反応の条件検討を行った。様々な金属触媒、塩基、溶媒などの反応条件の検討を行ったところ、反応は遷移金属触媒を用

**Table 4.** Reaction of Substituted 2-(2-Halophenyl)-1,4,5,6-tetrahydropyrimidines<sup>a</sup>

entry	substrate	product	yield (%) <sup>b</sup>	entry	substrate	product	yield (%) <sup>b</sup>
1			95	7			18
2			88	8			71
3			76	9			quant.
4			– <sup>c</sup> (73) <sup>d</sup>				
5			17				
6			– <sup>c</sup> (57) <sup>d</sup>				

<sup>a</sup> Unless otherwise stated, reactions were carried out with CS<sub>2</sub> (2.0 equiv) and NaH (2.0 equiv) in DMF at 80 °C for 12 h. <sup>b</sup> Isolated yields. <sup>c</sup> A complex mixture formed. <sup>d</sup> Yields in parentheses indicate those of the reactions at rt.

**Table 5.** Reaction with Isothiocyanates or Isocyanates<sup>a</sup>

entry	substrate	R-NCX	product	yield (%) <sup>b</sup>	entry	substrate	R-NCX	product	yield (%) <sup>b</sup>
1				82	5 <sup>c</sup>		<i>t</i> -BuNCO		54
2		BnNCS		97					18 <sup>e</sup>
3 <sup>c</sup>		<i>t</i> -BuNCS		62 <sup>d,e</sup>	6		PhNCO		quant.
4		BnNCO		quant.	7		<i>t</i> -BuNCS		49 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Unless otherwise stated, reactions were carried out with R-NCX (2.0 equiv) and NaH (2.0 equiv) in DMF at rt for 2–3 h. <sup>b</sup> Isolated yields. <sup>c</sup> These reactions were carried out at 80 °C. <sup>d</sup> A trace amount of regioisomeric *N*-arylation product was also formed. <sup>e</sup> Isolated as single isomer.

いなくとも進行し、基質 **16aa** を DMF 中、水素化ナトリウム (5 当量) と二硫化炭素 (5 当量) により反応させた場合に、環化体 **15a** が良好な収率で得られた (Table 3, entry 1)。溶媒を THF やアセトニトリルに変更したところ、目的物 **15a** は痕跡量しか得られなかった (entries 2 and 3)。二硫化炭素と水素化ナトリウムの量を 2 当量に減らしても反応は効率よく進行し、12 時間の反応により目的物 **15a** が 88% の収率で得られた (entry 4)。一方、水素化ナトリウムを加えなかった場合は、収率が 12% に低下した (entry 5)。検討を行った範囲において、塩基としては水素化ナトリウムのみが有効であり、トリエチルアミン、水素化カリウ

ム、ナトリウム *t*-ブトキシドはいずれも良い結果を与えなかった (entries 6–8)。フッ素体 **16ab** を用いて、最適条件下 (entry 4) で反応を行ったところ、86% の収率で **15a** が得られた (entry 9)。

次に、ベンゼン環に置換基を導入した基質に対する反応を検討した (Table 4)。4 位にメトキシ基、メチル基、及びフッ素基を有する基質 **16b–d** の反応は効率よく進行し、対応する環化生成物 **15b–d** を高収率で与えた (entries 1–3)。4 位にニトロ基を有する **16e** を用いて通常の条件下で反応を行うと複雑な混合物を与えたが、室温で反応を行うと 73% の収率で目的の **15e** が得られた (entry 4)。5 位のメトキシ基は収

率を大きく低下させたが (entry 5)、これはブロモベンゼン部位の電子密度が上昇することで反応性が低下したためと考えられる。5-ニトロ体 **16g** は、4 位置換体と同様に室温下の反応により目的物を与えた (entry 6)。ピリジン誘導体 **17**, **19** では窒素原子の位置により反応性が大きく異なり、2-ブロモピリジン誘導体 **19** は 3-ブロモ体 **17** よりも反応性が高かった (entries 7 and 8)。ナフタレン骨格を持つ基質 **21** を用いたところ、反応は効率よく進行した (entry 9)。

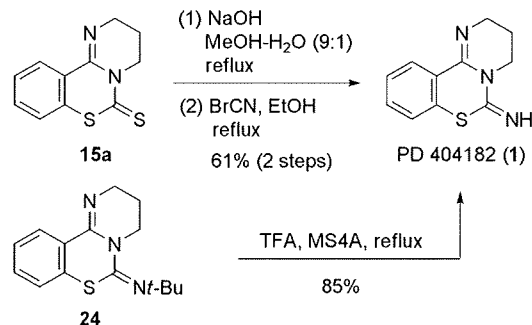
次に、二硫化炭素の代わりにイソチオシアネートやイソシアネートを用いて検討した (Table 5)。まず、**16aa**, **16ab** を基質として用いて、ベンジルイソチオシアネートと反応させたところ、どちらも反応は室温下で効率的に進行し、*N*-アリアル化体 **23** がそれぞれ 82%と 97%の収率で得られた (entries 1 and 2)。一方、*tert*-ブチルイソチオシアネートを用いたところ、選択性が逆転し、*S*-アリアル化体 **24** が単一の異性体として得られた (entry 3)。これらの結果は、イソチオシアネート窒素上の置換基を変えるだけで目的物を位置選択的に作り分けられることを示唆している。次にベンジルイソチオシアネートを用いたところ *N*-アリアル化体 **25** が定量的に得られた (entry 4)。興味深いことに、*tert*-ブチルイソチオシアネートを用いたところ、より込み合った部位における反応により生成する *N*-アリアル化体 **26** が *O*-アリアル化体 **27** よりも優先して生成した (entry 5)。フェニルイソチオシアネートを用いた際にも、*N*-アリアル化体 **28** のみが選択的に得られた (entry 6)。これらの結果は、窒素原子が酸素原子よりも高い求核性を有することに起因していると考えられる。五員環のアミジン構造を持つ 2-フェニルイミダゾリン誘導体 **29** を基質として用いると、やや収率は低下したものの目的物の反応は効率よく進行した (entry 7)。

次に、PD 404182 (**1**) の合成を行った (Scheme 3)。化合物 **15a** を加水分解したのち、臭化シアンを作用させると **1** が 61%の収率で容易に得られた。また **1** は、化合物 **24** をモレキュラーシーブス 4Å 存在下、トリフルオロ酢酸中で加熱還流することによっても得られた。

#### (倫理面への配慮)

該当事項なし

Scheme 3. Synthesis of PD 404182



#### D. 考察

C-H 官能基化反応の反応機構は未だに明確ではないが、一電子移動、もしくは求電子置換反応を伴う、二つの機構が考えられる。基質が電子求引性の置換基を有する場合に反応性が下がったことは、カチオン性中間体を経由するこれらの反応機構に矛盾しない。また、本反応のオルト位選択性は配位性置換基に結合した求核種の分子内移動が関与していることを示唆している。

一方、芳香族求核置換反応は、アミジン部位のヘテロクムレンへの求核付加、続く分子内での  $S_NAr$  反応によって進行していると考えられる。一方、本反応が強力な活性化基を有していない芳香環においても比較的温和な条件で進行していることから、二分子のヘテロクムレンがアミジン官能基に付加して中間体が生成し、アミジン官能基がより強い電子求引性基として機能して芳香族求核置換反応を促進している可能性も考えられる。また、本反応の求核種の位置選択性は官能基の求核性と立体的な嵩高さのバランスにより制御されていると考えられる。

#### E. 結論

本研究では、2-phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine から 2 つの経路により PD404182 誘導体を得る方法を確立した。前者は、ベンゼン環上にハロゲン置換基を有しない原料からの直接的な酸化反応により複素環構造を構築できるという点で、原料の化学構造における制限が小さい。一方、後者の方法では、芳香族求核置換反応により多様なヘテロ原子を導入可能であり、特徴的なヘテロ原子の配置による多様な複素環骨格が得られる。本法は、PD404182 をリードとする抗 HIV 剤の構造活性相関研究に有用な反応であり、骨格上のヘテロ原子の配置

および置換基の最適化の検討を効率的に行うことが可能となった。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sasaki Y., Fujii N., Otaka A. Development of copper-mediated allylation of  $\gamma$ -activated- $\alpha,\beta$ -unsaturated lactam toward peptide mimetic synthesis. *Tetrahedron Lett.* 48(18) 3221-3224 (2007)
2. Watanabe T., Ueda S., Inuki S., Oishi S., Fujii N., Ohno H. One-pot synthesis of carbazoles by palladium-catalyzed N-arylation and oxidative coupling. *Chem. Commun.* 43, 4516-4518 (2007)
3. Watanabe T., Oishi S., Fujii N., Ohno H. Gold-catalyzed hydroarylation of allenes: a highly regioselective carbon-carbon bond formation producing six-membered rings. *Org. Lett.* 9(23) 4821-4824 (2007)
4. Ohno H., Iuchi M., Fujii N., Tanaka T. Zipper-mode double C-H activation: palladium-catalyzed direct construction of highly-fused heterocyclic systems. *Org. Lett.* 9(23) 4813-4815 (2007)
5. Tamamura H., Tanaka T., Tsutsumi H., Nemoto K., Mizokami S., Ohashi N., Oishi S., Fujii N. Versatile use of acid-catalyzed ring-opening of  $\beta$ -aziridinyl- $\alpha,\beta$  enoates to stereoselective synthesis of peptidomimetics. *Tetrahedron* 63(37) 9243-9254 (2007)
6. Narumi T., Tomita K., Inokuchi E., Kobayashi K., Oishi S., Ohno H., Fujii N. Facile synthesis of fluoroalkenes by palladium-catalyzed reductive defluorination of allylic gem-difluorides. *Org. Lett.* 9(17) 3465-3468 (2007)
7. Ohno H., Aso A., Kadoh Y., Fujii N., Tanaka T. Heck-type cyclization of oxime ethers: stereoselective carbon-carbon bond formation with aryl halides to produce heterocyclic oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46(33) 6325-6328 (2007)
8. Kubonishi S., Kikuchi T., Yamaguchi S., Tamamura H., Fujii N., Watanabe T., Arenzana-Seisdedos F., Ikeda K., Matsui T., Tanimoto M., Katayama Y. Rapid hematopoietic progenitor mobilization by sulfated colominic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355(4) 970-975 (2007).
9. Cluzeau J., Oishi S., Ohno H., Wang Z., Evans B., Peiper S.C., Fujii N. Design and synthesis of all diastereomers of cyclic pseudo-dipeptides as mimics of cyclic CXCR4 pentapeptide antagonists. *Org. Biomol. Chem.* 5(12) 1915-1923 (2007)
10. Ohno H., Mizutani T., Kadoh Y., Aso A., Miyamura K., Fujii N., Tanaka T. A highly regio- and stereoselective formation of bicyclo[4.2.0]oct-5-ene derivatives through thermal intramolecular [2 + 2] cycloaddition of allenes. *J. Org. Chem.* 72(12) 4378-4389 (2007)
11. Ohno H., Ohta Y., Oishi S., Fujii N. Direct synthesis of 2-(aminomethyl) indoles through copper(I)-catalyzed domino three-component coupling and cyclization reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46(13) 2295-2298 (2007)
12. Hamaguchi H., Kosaka S., Ohno H., Fujii N., Tanaka T. Bromoallenes as allyl dication equivalents in the presence or absence of palladium(0): direct construction of bicyclic sulfamides containing five- to eight-membered rings by tandem cyclization of bromoallenes. *Chem-Eur. J.* 13(6) 1692-1708 (2007)
13. Tsutsumi H., Tamamura H., Fujii N. Inhibitors of the chemokine receptor CXCR4: chemotherapy of AIDS, metastatic cancer, leukemia and rheumatoid arthritis. *Lett. Drug Design Discov.* 4(1) 20-26 (2007)
14. 大石真也、藤井信孝 ペプチドをリードとした創薬. 蛋白質 核酸 酵素 増刊ケミカルバイオロジー, 長野哲雄・長田裕之・菊地和也・上杉志成編集, 52, 1696-1701 (2007)
15. 大石真也、藤井信孝 ケミカルバイオロジーを基盤とするペプチド創薬. 遺伝子医学 MOOK8 ペプチドと創薬, 寒川賢治・南野直人編集, 87-91 (2007)
16. Ujike M., Nishikawa H., Otaka A., Yamamoto N., Yamamoto N., Matsuoka M.,

- Kodama E., Fujii N., Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block protease-mediated direct entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus but not entry via the endosomal pathway. *J. Virol.* 82(1) 588-592 (2008)
17. Oishi S., Ito S., Nishikawa H., Watanabe K., Tanaka M., Ohno H., Izumi K., Sakagami Y., Kodama E., Matsuoka M., Fujii N., Design of a novel HIV-1 fusion inhibitor that displays a minimal interface for binding affinity. *J. Med. Chem.* 51(3) 388-391 (2008)
  18. Oishi S., Masuda R., Evans B., Ueda S., Goto Y., Ohno H., Hirasawa A., Tsujimoto G., Wang Z., Peiper S.C., Naito T., Kodama E., Matsuoka M., Fujii N. Synthesis and application of fluorescein- and biotin-labeled molecular probes for chemokine receptor CXCR4. *ChemBioChem.* 9(7) 1154-1158 (2008)
  19. Ohta Y., Oishi S., Fujii N., Ohno H. Facile synthesis of 3-(aminomethyl)isoquinolines by copper-catalysed domino four-component coupling and cyclisation. *Chem. Commun.* (7) 835-837 (2008).
  20. Ohno H., Okano A., Kosaka S., Tsukamoto K., Ohata M., Ishihara K., Maeda H., Tanaka T., Fujii N. Direct construction of bicyclic heterocycles by palladium-catalyzed domino cyclization of propargyl bromides. *Org. Lett.* 10(6) 1171-1174 (2008)
  21. Liapi A., Pritchett J., Jones O., Fujii N., Parnavelas J.G., Nadarajah B. Stromal-derived factor 1 signalling regulates radial and tangential migration in the developing cerebral cortex. *Dev. Neurosci.* 30(1-3) 117-131 (2008)
  22. Kasiyanov A., Fujii N., Tamamura H., Xiong H. Modulation of network-driven, GABA-mediated giant depolarizing potentials by SDF-1 $\alpha$  in the developing hippocampus. *Dev. Neurosci.* 30(4) 285-292 (2008)
  23. Driessen W.H., Fujii N., Tamamura H., Sullivan S.M. Development of peptide-targeted lipoplexes to CXCR4-expressing rat glioma cells and rat proliferating endothelial cells. *Mol. Ther.* 16(3) 516-524 (2008)
  24. Narumi T., Tomita K., Inokuchi E., Kobayashi K., Oishi S., Ohno H., Fujii N. Diastereoselective synthesis of highly functionalized fluoroalkene dipeptide isosteres and its application to Fmoc-based solid phase synthesis of a cyclic pentapeptide mimetic. *Tetrahedron*, 64(19) 4332-4346 (2008)
  25. Inokuchi E., Narumi T., Niida A., Kobayashi K., Tomita K., Oishi S., Ohno H., Fujii N. Efficient synthesis of trifluoromethyl and related trisubstituted alkene dipeptide isosteres by palladium-catalyzed carbonylation of amino acid-derived allylic carbonates. *J. Org. Chem.* 73(10) 3942-3945 (2008)
  26. Nakata H., Steinberg S.M., Koh Y., Maeda K., Takaoka Y., Tamamura H., Fujii N., Mitsuya H. Potent synergistic anti-HIV effects using combinations of a CCR5. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52(6) 2111-2119 (2008)
  27. Nishikawa H., Kodama E., Sakakibara A., Fukudome A., Izumi K., Oishi S., Fujii N., Matsuoka M. Novel screening systems for HIV-1 fusion mediated by two extra-virion heptad repeats of gp41. *Antivir. Res.* 80(1) 71-76 (2008)
  28. Ueda S., Kato M., Inuki S., Ohno H., Evans B., Wang Z., Peiper S.C., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Nagasawa H., Oishi S., Fujii N. Identification of novel nonpeptide CXCR4 antagonists by ligand-based design approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18(14) 4124-4129 (2008)
  29. Mikami S., Nakase H., Yamamoto S., Takeda Y., Yoshino T., Kasahara K., Ueno S., Uza N., Oishi S., Fujii N., Nagasawa T., Chiba T. Blockade of CXCL12/CXCR4 axis ameliorates murine experimental colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327(2) 383-392 (2008)
  30. Nishikawa H., Oishi S., Fujita M., Watanabe K., Tokiwa R., Ohno H., Kodama E., Izumi K., Kajiwara K., Naitoh T., Matsuoka M., Otaka A., Fujii N.



- Identification of minimal sequence for HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 16(20) 9184-9187 (2008)
31. Tanaka T., Tsutsumi H., Nomura W., Tanabe Y., Ohashi N., Esaka A., Ochiai C., Sato J., Itotani K., Murakami T., Ohba K., Yamamoto N., Fujii N., Tamamura H. Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6(23) 4374-4377 (2008)
  32. Tamamura H., Tsutsumi H., Nomura W., Tanaka T., Fujii N. A future perspective on the development of chemokine receptor CXCR4 antagonists. *Expert Opin. Drug Discov.* 3(10) 1155-1166 (2008)
  33. Oishi S., Narumi T., Ohno H., Otaka A., Fujii N. Synthesis of highly functionalized alkene dipeptide isosteres and its application to the structure-activity relationship study on bioactive peptides. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* 66(9) 846-857 (2008)
  34. Nishikawa H., Nakamura S., Kodama E., Ito S., Kajiwara K., Izumi K., Sakagami Y., Oishi S., Ohkubo T., Kobayashi Y., Otaka A., Fujii N., Matsuoka M. Electrostatically constrained  $\alpha$ -helical peptide inhibitors replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41(4) 891-899 (2009)
  35. Mizukoshi F., Baba F., Goto Y., Setoguchi A., Fujino Y., Ohno K., Oishi S., Koder Y., Fujii N., Tsujimoto H. Antiviral activity of membrane fusion inhibitors that target gp40 of the feline immunodeficiency virus envelope protein. *J. Vet. Med. Sci.* 71(1) 121-124 (2009)
  36. Izumi K., Kodama E., Shimura K., Sakagami Y., Watanabe K., Ito S., Watabe T., Terakawa Y., Nishikawa H., Sarafianos S. G., Kitaura K., Oishi S., Fujii N., Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors of HIV-1 strains resistant to T-20. *J. Biol. Chem.* 284(8) 4914-4920 (2009)
  37. Naito T., Izumi K., Kodama E., Sakagami Y., Kajiwara K., Nishikawa H., Watanabe K., Sarafianos S.G., Oishi S., Fujii N., Matsuoka M. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced  $\alpha$ -helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(3) 1013-1018 (2009)
  38. Diamond P., Labrinidis A., Martin S.K., Farrugia A.N., Gronthos S., To L.B., Fujii N., O'Loughlin P.D., Evdokiou A., Zannettino A.C.W. Targeted disruption of the CXCL12/CXCR4 axis inhibits osteolysis in a murine model of myeloma-associated bone loss. *J. Bone Miner. Res.* 24(7) 1150-1161 (2009)
  39. Mizukoshi F., Baba K., Goto-Koshino Y., Setoguchi-Mukai A., Fujino Y., Ohno K., Tamamura H., Oishi S., Fujii N., Tsujimoto H. Inhibitory effect of newly developed CXC-chemokine receptor 4 antagonists on the infection with feline immunodeficiency virus. *Vet. Microbiol.* 136(1-2) 155-159 (2009)
  40. Kitaori T., Ito H., Schwarz E.M., Tsutsumi R., Yoshitomi H., Oishi S., Nakano M., Fujii N., Nagasawa T., Nakamura T. SDF-1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair. *Arthritis Rheum.* 60(3) 813-823 (2009)
  41. Hyunsuk S., Oishi S., Fujii N. Chemokine receptor CXCR4 as a therapeutic target for neuroectodermal tumors. *Semin. Cancer Biol.* 19(2) 123-134 (2009)
  42. Watabe T., Terakawa Y., Watanabe K., Ohno H., Nakano H., Nakatsu T., Kato H., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Kitaura K., Oishi S., Fujii N. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. *J. Mol. Biol.* 392(3) 657-665 (2009)
  43. Mizuhara T., Inuki S., Oishi S., Fujii N., Ohno H. Cu(II)-mediated oxidative intermolecular ortho C-H functionalisation using tetrahydropyrimidine as the directing group. *Chem. Commun.* (23) 3413-3415 (2009)
  44. Oishi S., Koder Y., Nishikawa H., Kamitani H., Watabe T., Ohno H., Tochikura T., Shimane K., Kodama E.,

- Matsuoka M., Mizukoshi F., Tsujimoto H., Fujii N. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. *Bioorg. Med. Chem.* 17(14) 4916-4920 (2009)
45. Oishi S., Kamitani H., Kodera Y., Watanabe K., Kobayashi K., Narumi T., Tomita K., Ohno H., Naito T., Kodama E., Matsuoka M., Fujii N. Peptide bond mimicry by (E)-alkene and (Z)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. *Org. Biomol. Chem.* 7(14) 2872-2877 (2009)
46. Evans B.J., Wang Z., Broach J.R., Oishi S., Fujii N., Peiper S.C. Expression of CXCR4, a G-protein-coupled receptor for CXCL12 in yeast identification of new-generation inverse agonists. *Methods Enzymol.* 460, 399-412 (2009)
47. Tanaka T., Nomura W., Narumi T., Esaka A., Oishi S., Ohashi N., Itotani K., Evans B.J., Wang Z.X., Peiper S.C., Fujii N., Tamamura H. Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids. *Org. Biomol. Chem.* 7(18) 3805-3809 (2009).
48. Tanaka M., Kajiwara K., Tokiwa R., Watanabe K., Ohno H., Tsutsumi H., Hata Y., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Oishi S., Fujii N. Bioorganic synthesis of end-capped anti-HIV peptides by simultaneous cyanocysteine-mediated cleavages of recombinant proteins. *Bioorg. Med. Chem.* 17(21) 7487-7492 (2009)
49. Kajiwara K., Watanabe K., Tokiwa R., Kurose T., Ohno H., Tsutsumi H., Hata Y., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Oishi S., Fujii N. Bioorganic synthesis of a recombinant HIV-1 fusion inhibitor, SC35EK, with an N-terminal pyroglutamate capping group from recombinant protein. *Bioorg. Med. Chem.* 17(23) 7964-7970 (2009)
50. Narumi T., Hayashi R., Tomita K., Kobayashi K., Tanahara N., Ohno H., Naito T., Kodama E., Matsuoka M., Oishi S., Fujii N. Synthesis and biological evaluation of selective CXCR4 antagonists containing alkene dipeptide isosteres. *Org. Biomol. Chem.* 8(3) 616-621 (2010)
51. Mizuhara T., Oishi S., Fujii N., Ohno H. Efficient synthesis of pyrimido[1,2-c][1,3] benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles by  $S_NAr$ -type C-S, C-N, or C-O bond formation with heterocumulenes. *J. Org. Chem.* 75(1) 265-268 (2010)
52. Nishizawa K., Nishiyama H., Ohishi S., Tanahara N., Kotani H., Mikami Y., Toda Y., Evans B.J., Peiper S.C., Saito R., Watanabe J., Fujii N., Ogawa O. Fluorescent imaging of high grade bladder cancer using a specific antagonist for chemokine receptor CXCR4. *Int. J. Cancer.* in press.
53. Melchionna R., Di Carlo A., De Mori R., Cappuzzello C., Barberi L., Musarò A., Cencioni C., Fujii N., Tamamura H., Crescenzi M., Capogrossi M.C., Napolitano M., Germani A. Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. *Muscle Nerve.* in press.

## 2. 学会発表

- 富田健嗣、鳴海哲夫、新居田歩、大石真也、大野浩章、藤井信孝 シスアミド等価体としての(Z)-アルケンおよび(E)-フルオロアルケンジペプチドイソスターの合成とその応用 日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(京都) 2007年5月9日
- 田中理紀、伊藤紗織、大石真也、西川裕樹、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大野浩章、藤井信孝 EK-コンセプトを利用した高活性 HIV 膜融合阻害剤の創製研究 日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(京都) 2007年5月9日
- 西川裕樹、小寺泰代、田中理紀、水越文徳、辻本元、児玉栄一、松岡雅雄、大石真也、大野浩章、藤井信孝 ネコ免疫不全ウイルス(FIV)膜融合阻害剤の創製研究 日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(京都) 2007年5月10日

- 日
4. ○渡部敏明、上田 聡、大石真也、藤井信孝、大野浩章 Pd 触媒を用いたタンデム型 N-アリアル化-C-H 活性化によるカルバゾールの合成と反応機構の考察 第 5 回次世代を担う有機化学シンポジウム (東京) 2007 年 5 月 26 日
  5. ○ Toshiaki Watanabe, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Hiroaki Ohno, Synthesis and application of carbazoles by palladium-catalyzed tandem N-arylation and oxidative C-H activation Eighth Tetrahedron Symposium (Berlin) 2007 年 6 月 28 日
  6. ○Tomita K., Narumi T., Niida A., Oishi S., Ohno H., Fujii N. Synthesis and application of (Z)-alkene- and (E)-fluoroalkene-dipeptide isosteres as *cis*-amide equivalents. 20th American Peptide Symposium (Montreal) 2007 年 6 月 29 日
  7. ○Oishi S., Ito S., Nishikawa H., Tanaka M., Ohno H., Otaka A., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Fujii N. Development of a novel fusion inhibitor against T-20-resistant HIV-1. 20th American Peptide Symposium (Montreal) 2007 年 6 月 29 日
  8. Toshiaki Watanabe, ○Shinsuke Inuki, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, One-pot Synthesis of carbazoles by palladium-catalyzed N-arylation and oxidative coupling. 6th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (Istanbul) 2007 年 7 月 11 日
  9. ○Yusuke Ohta, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, and Hiroaki Ohno, Construction of 2-(Aminomethyl)indole Motif by Cu-catalyzed Multi-component Reaction. 14th IUPAC Symposium on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis (Nara) 2007 年 8 月 3 日
  10. ○Toshiaki Watanabe, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Hiroaki Ohno, Synthesis and application of carbazoles by palladium-catalyzed tandem N-arylation and oxidative C-H activation. 14th IUPAC Symposium on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis (Nara) 2007 年 8 月 3 日
  11. ○Eriko Inokuchi, Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Ayumu Niida, Kazuya Kobayashi, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, Pd-Catalyzed Carbonylation of CF<sub>3</sub>-containing Allylic Carbonate: Application to the Synthesis of (Z)-Trifluoromethylalkene Dipeptide Isosteres. 14th IUPAC Symposium on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis (Nara) 2007 年 8 月 3 日
  12. ○Tetsuo Narumi, Yasuyo Koderu, Kenji Tomita, Eriko Inokuchi, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, Diastereoselective Synthesis of Functionalized (Z)-Fluoroalkene Dipeptide Isosteres: Lys-Lys and Glu-Glu type FADIs. 234th ACS meeting & exposition (Boston) 2007 年 8 月 20 日
  13. ○Y. Ohta, S. Oishi, N. Fujii, H. Ohno, Construction of 2-(Aminomethyl)indole Motif by Cu-catalyzed Multi-component Reaction. 234th ACS meeting & exposition (Boston) 2007 年 8 月 22 日
  14. ○Nobutaka Fujii, Shinya Oishi, Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Hiroaki Ohno Nobutaka Fujii From Amino Acids to Peptide Isosteres: Implication to genome-lead drug discovery using peptide-lead drug templates World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (Beijing) 2007 年 9 月 6 日
  15. ○Nobutaka Fujii. CXCR4-chemokine receptor: implication to problematic multifactorial diseases. ELKIN LECTURE SERIES at Emory University (Atlanta) 2007 年 9 月 14 日
  16. ○Hiroki Nishikawa, Yasuyo Koderu, Shinya Oishi, Michinori Tanaka, Tadafumi Tochikura, Kazumi Kajiwara, Hiroaki Ohno, Fuminori Mizukoshi, Hajime Tsujimoto, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Nobutaka Fujii, Development of novel FIV membrane fusion inhibitors. Virus Molecular Interactions: Therapeutic Targets (Oxford) 2007 年 9 月 17 日

17. ○Shinya Oishi, Saori Ito, Hiroki Nishikawa, Michinori Tanaka, Hiroaki Ohno, Akira Otaka, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, and Nobutaka Fujii, Design and synthesis of novel HIV fusion inhibitors. *Virus Molecular Interactions: Therapeutic Targets* (Oxford) 2007年9月17日
18. ○藤井信孝 情報から制御へ：ゲノム情報収斂型創薬科学 21COE 公開シンポジウム (京都) 2007年9月20日
19. ○鳴海哲夫、富田健嗣、井ノ口恵利子、小林和也、大石真也、大野浩章、藤井信孝 有機金属による炭素-フッ素結合切断を伴うフルオロアルケン骨格の合成：多価官能基を有するフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの高立体選択的合成への展開 第 57 回日本薬学会近畿支部大会 (大阪) 2007年10月27日
20. ○井ノ口恵利子、鳴海哲夫、新居田歩、大石真也、大野浩章、藤井信孝 パラジウム触媒によるカルボニル化反応を用いたトリフルオロメチルアルケン型ジペプチドイソスター及び類縁体の新規合成法の開発 第 57 回日本薬学会近畿支部大会 (大阪) 2007年10月27日
21. ○加藤学、上田聡、井貫晋輔、大石真也、大野浩章、藤井信孝 インドールを母核とした新規ケモカインレセプター CXCR4 アンタゴニストの創製研究 第 57 回日本薬学会近畿支部大会 (大阪) 2007年10月27日
22. ○井ノ口恵利子、鳴海哲夫、新居田歩、大石真也、大野浩章、藤井信孝 パラジウム触媒カルボニル化反応を用いたトリフルオロメチルアルケンジペプチドイソスター及び類縁体の新規合成法の開発 第 33 回反応と合成の進歩シンポジウム (長崎) 2007年11月5日
23. ○大野浩章、太田悠介、大石真也、藤井信孝、井内睦美、田中徹明 連続結合形成反応による縮環型芳香族化合物の一挙合成法の開発 第 33 回反応と合成の進歩シンポジウム (長崎) 2007年11月6日
24. ○岡野晃典、大野浩章、藤井信孝、小坂昇平、大畑実代、石原小太郎、田中徹明、塚本効司 パラジウム触媒を用いたプロパルギルブロミドの連続的閉環反応による二環性複素環の一挙構築 第 33 回反応と合成の進歩シンポジウム (長崎) 2007年11月7日
25. ○鳴海哲夫、富田健嗣、井ノ口恵利子、小林和也、大石真也、大野浩章、藤井信孝 ペプチド結合ミメティックスとしてのフルオロアルケン骨格の展望 第 44 回ペプチド討論会 (富山) 2007年11月7日
26. ○渡辺健太郎、伊藤紗織、西川裕樹、田中理紀、大石真也、大野浩章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 ヘリックス誘起モチーフを導入した抗 HIV ペプチドのデザインと合成 第 44 回ペプチド討論会 (富山) 2007年11月7日
27. ○井ノ口恵利子、鳴海哲夫、新居田歩、富田健嗣、大石真也、大野浩章、藤井信孝 パラジウム触媒カルボニル化反応を用いたトリフルオロメチルアルケンジペプチドイソスター及び類縁体の新規合成法の開発 第 27 回有機合成若手セミナー (京都) 2007年11月15日
28. ○富田健嗣、鳴海哲夫、新居田歩、大石真也、大野浩章、藤井信孝 シス型アミド結合等価体としての Z 型アルケンおよび E 型フルオロアルケンジペプチドイソスターの合成と応用 第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム (相模大野) 2007年11月28日
29. ○加藤学、上田聡、井貫晋輔、大石真也、大野浩章、Barry Evans、Zi-xuan Wang、Stephen C. Peiper、藤井信孝 新規非ペプチド性ケモカイン受容体 CXCR4 アンタゴニストの創製研究 第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム (相模大野) 2007年11月28日
30. ○大石真也 ペプチド・蛋白質化学を基盤とする新興・再興感染症治療薬の創製 第 5 回バイオメディカル研究会 (大阪) 2008年2月13日
31. ○増田亮、大石真也、上田聡、Barry Evans、Stephen C. Peiper、平澤明、辻本豪三、大野浩章、藤井信孝 CXCR4 受容体アンタゴニストの蛍光標識体の創製と応用 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会 (東京) 2008年5月19日

32. ○大石真也、加藤学、上田聡、井貫晋輔、大野浩章、Barry Evans、Zi-xuan Wang、Stephen C. Peiper、藤井信孝 環状ペプチドをリードとする非ペプチド性 CXCR4 拮抗剤の開発 日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会(東京) 2008年5月19日
33. ○田中智博、野村渉、堤浩、田部泰章、大橋南美、糸谷恭子、大石真也、藤井信孝、B Evans、Z Wang、SC Peiper、玉村啓和 新規ファルマコフォアを有するケモカインレセプターCXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究 日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会(東京) 2008年5月20日
34. ○大石真也 ペプチド結合とペプチドミメティクス 第41回若手ペプチド夏の勉強会(京都) 2008年8月3日
35. ○増田亮 CXCR4 受容体アンタゴニストの蛍光標識体の創製と応用 第41回若手ペプチド夏の勉強会(京都) 2008年8月4日
36. ○Nobutaka Fujii CXCR4 Antagonists: Relevance to Cancer Chemotherapy XXth International Symposium on Medicinal Chemistry (ウイーン) 2008年9月3日
37. ○小林数也、鳴海哲夫、大石真也、大野浩章、藤井信孝 求核的 CF<sub>3</sub> 化反応による立体選択的トリフルオロメチルアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究 第58回日本薬学会近畿支部総会(神戸) 2008年10月25日
38. ○増田亮、大石真也、棚原憲子、上田聡、Barry Evans、Stephen C. Peiper、平澤明、辻本豪三、大野浩章、藤井信孝、ケモカイン受容体 CXCR4 に対する 蛍光標識リガンドの創製と応用 第58回日本薬学会近畿支部総会(神戸) 2008年10月25日
39. ○渡辺健太郎、大石真也、伊藤沙織、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大野浩章、藤井信孝 薬剤耐性株に対する HIV 膜融合阻害剤の開発を指向した評価系の構築と応用 第58回日本薬学会近畿支部総会(神戸) 2008年10月25日
40. ○小林数也、鳴海哲夫、大石真也、大野浩章、藤井信孝 求核的 CF<sub>3</sub> 化反応による立体選択的トリフルオロメチルアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究 第45回ペプチド討論会(東京) 2008年10月29日
41. ○梶原一美、常盤礼、渡辺健太郎、大野浩章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大石信也、藤井信孝 エンドキャップ抗 HIV-1 ペプチド SC35EK の合成 第45回ペプチド討論会(東京) 2008年10月29日
42. ○田中理紀、渡辺健太郎、大野浩章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大石真也、藤井信孝 Template-Assisted Peptide Aldehyde Ligation を用いた新規 HIV-1 膜融合阻害剤の創製 第45回ペプチド討論会(東京) 2008年10月30日
43. ○渡辺健太郎、伊東沙織、大野浩章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大石真也、藤井信孝 HIV 膜融合阻害剤におけるヘリックス誘起モチーフの構造活性相関研究 第45回ペプチド討論会(東京) 2008年10月30日
44. ○渡部毅、大石真也、渡辺健太郎、中野博明、中津亨、大野浩章、加藤博章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 薬剤耐性 N43D 変異体に対する HIV-1 融合阻害剤の X 線結晶学的研究 第45回ペプチド討論会(東京) 2008年10月30日
45. ○神谷博貴、小寺泰代、鳴海哲夫、大野浩章、大石真也、藤井信孝 ジアステレオ選択的フルオロアルケンイソスター合成及び HIV 膜融合阻害剤への応用 第45回ペプチド討論会(東京) 2008年10月30日
46. ○田中智博、堤浩、野村渉、田部泰章、大橋南美、江坂藍、落合千裕、佐藤淳、糸谷恭子、村上努、大庭賢二、山本直樹、藤井信孝、玉村啓和 環状ペプチド骨格を有する CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究: 新規ファルマコフォアの同定 第45回ペプチド討論会(東京) 2008年10月30日
47. ○富田健嗣、大石真也、大野浩章、藤井信孝 ジペプチドイソスターの分岐型合成による酵素耐性 GPR54 アゴニストの創出 第34回反応と合成の進歩シンポジウム(京都) 2008年11月04日
48. ○富田健嗣、大石真也、大野浩章、藤井信孝 多様なジペプチドイソスター

- の分岐的合成と応用 第28回有機合成若手セミナー(大阪)2008年11月12日
49. ○富田健嗣、大石真也、大野浩章、藤井信孝 多様なジペプチドイソスターの分岐的合成とGPR54アゴニストへの応用 第27回メディスナルケミストリーシンポジウム(大阪)2008年11月26日
50. ○増田亮、大石真也、上田聡、大野浩章、Barry Evans、Stephen C. Peiper、平澤明、辻本豪三、藤井信孝 CXCR4受容体アンタゴニストの蛍光標識体の創出と応用 ケミカルバイオロジーシンポジウム(京都)2008年12月15日
51. ○渡辺健太郎、伊藤沙織、大野浩章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大石真也、藤井信孝 HIV膜融合阻害剤におけるヘリックス誘起モチーフの構造活性相関研究 ケミカルバイオロジーシンポジウム(京都)2008年12月15日
52. ○神谷博貴、小寺泰代、鳴海哲夫、大野浩章、大石真也、藤井信孝 ジアステレオ選択的フルオロアルケンイソスター合成及びHIV膜融合阻害剤への応用 ケミカルバイオロジーシンポジウム(京都)2008年12月15日
53. ○林亮子、大石真也、富田健嗣、鳴海哲夫、大野浩章、内藤武志、児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 'アルケン型ジペプチドイソスターの合成とケモカイン受容体CXCR4拮抗剤の構造活性相関研究への応用'日本ケミカルバイオロジー研究会第4回年会(神戸)2009年5月18日
54. ○Kajiwara, K., Tokiwa, R., Tanaka, M., Watanabe, K., Ohno, H., Izumi, K., Kodama, E., Matsuoka, M., Oishi, S., Fujii, N. Bioorganic Synthesis of End-capped HIV-1 Fusion Inhibitor SC35EK, 8th Australian Peptide Conference (Couran Cove Island) 2009年8月12日
55. ○水原司、井貫晋輔、大石真也、藤井信孝、大野浩章 銅触媒によるテトラヒドロピリミジンを配位性置換基とした酸化的分子間オルトC-H官能基化反応 第59回日本薬学会近畿支部大会(東大阪)2009年10月24日
56. ○林亮子、大石真也、棚原憲子、富田健嗣、鳴海哲夫、大野浩章、内藤武志、児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 アルケン型ジペプチドイソスターの合成とケモカイン受容体CXCR4拮抗剤の構造活性相関研究への応用 第59回日本薬学会近畿支部大会(東大阪)2009年10月24日
57. ○棚原憲子、大石真也、増田亮、児玉栄一、佐藤賢文、松岡雅雄、平澤明、辻本豪三、大野浩章、藤井信孝 ケモカイン受容体CXCR4選択的蛍光プローブを活用した化合物評価系の構築 第59回日本薬学会近畿支部大会(東大阪)2009年10月24日
58. ○梶原一美、常盤礼、田中理紀、渡辺健太郎、大野浩章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大石真也、藤井信孝 抗HIV活性ペプチドSC35EKの生物有機化学的合成 第46回ペプチド討論会(北九州)2009年11月5日
59. ○棚原憲子、大石真也、増田亮、児玉栄一、佐藤賢文、松岡雅雄、平澤明、辻本豪三、大野浩章、藤井信孝ケモカイン受容体CXCR4選択的蛍光プローブを活用した新規化合物評価系の構築 第46回ペプチド討論会(北九州)2009年11月4日
60. ○寺川幸宏、渡部毅、渡辺健太郎、大野浩章、泉和樹、大石真也、藤井信孝、北浦和夫 HIV-1膜融合阻害ペプチドにおけるgp41/S138A置換効果のMM/PBSA解析第37回構造活性相関シンポジウム(東京)2009年11月12日
61. ○Kajiwara, K., Tokiwa, R., Tanaka, M., Watanabe, K., Ohno, H., Izumi, K., Kodama, E., Matsuoka, M., Oishi, S., Fujii, N. Bioorganic Synthesis of End-capped HIV-1 Fusion Inhibitors. The 11<sup>th</sup> International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry(京都)2009年11月12日
62. ○水原司、井貫晋輔、大石真也、藤井信孝、大野浩章 銅触媒によるテトラヒドロピリミジンを配位性置換基とした酸化的分子間オルトC-H官能基化反応 第35回反応と合成の進歩シンポジウム(金沢)2009年11月17日
63. ○林亮子、大石真也、棚原憲子、富田健嗣、鳴海哲夫、大野浩章、内藤武志、

児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 アルケン型ジペプチドイソスターの合成とケモカイン受容体 CXCR4 拮抗剤の構造活性相関研究への応用 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム (東京) 2009 年 11 月 25 日

64. 大石真也 ウイルスの変異に学ぶ抗 HIV 活性ペプチドのデザイン 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム (東京) 2009 年 11 月 26 日
65. ○大石真也、梶原一美、田中理紀、大野浩章、藤井信孝 薬剤耐性株に有効な抗 HIV 活性ペプチドの創製と発現生産プロセスの開発 日本薬学会第 130 年会 (岡山) 2010 年 3 月 28 日
66. ○坂東弘樹、堤浩子、梶原一美、大石真也、松岡雅雄、藤井信孝、秦洋二 麹菌 *A. oryzae* による人工デザイン抗 HIV ペプチドの効率的分泌発現 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) 2010 年 3 月 28 日

日本：出願 (2010 年 2 月 16 日；発明者：坂東弘樹、堤浩子、秦洋二、梶原一美、藤井信孝、松岡雅雄、大石真也；出願者：月桂冠株式会社、科学技術振興機構)

6. 特願 2010-046273: 酵母を用いた抗 HIV ペプチドの生産方法

日本：出願 (2010 年 3 月 3 日；発明者：梶原一美、田中智子、秦洋二、堤浩子、藤井信孝、松岡雅雄、大石真也；出願者：科学技術振興機構、月桂冠株式会社)

## 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. PCT/JP2006/326069: 新規 CXCR4 拮抗剤及びその用途  
日本：特許証発行 (特許第 4122441 号：2008 年 5 月 16 日)  
欧州：移行手続き完了 (06 843 451.3：2008 年 6 月 26 日)  
米国：移行手続き完了 (No.12/087, 160：2008 年 6 月 27 日)
2. 特願 2002-283411：抗 HIV 剤  
日本：特許証発行 (特許第 4332618 号：2009 年 7 月 3 日)
3. PCT/JP2007/070807：抗 HIV 剤  
日本：移行手続き完了 (特願 2008-541019：2009 年 4 月 14 日)
4. 特願 2009-164647: 修飾ペプチド及びその製造方法  
日本：出願 (2009 年 7 月 13 日；発明者：藤井信孝、松岡雅雄、児玉栄一、大石真也、田中理紀、秦洋二、堤浩子、梶原一美、常盤礼；出願者：科学技術振興機構、京都大学、月桂冠株式会社)
5. 特願 2010-030875: 麹菌を用いた抗 HIV ペプチドの生産方法

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤の開発に関する研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄  
研究分担者：東北大学病院・内科感染症科 児玉 栄一

研究要旨

多剤耐性 HIV 感染症を克服するために HIV の細胞侵入過程を標的とした薬剤の開発を 3 年間にわたり行った。初年度はウイルス侵入過程を詳細に調べるために、レセプターごとのアンタゴニズムを測定しうるアッセイ系を確立し、有望な小分子融合阻害剤 SC29EK の抗 HIV 活性を明らかとした。次年度は耐性変異をペプチドデザインに応用し、融合阻害剤耐性 HIV に効果を示すペプチドの作製に成功した。また、このペプチドに対する耐性ウイルスを誘導した。最終年度では、ポルフィリン誘導体が R5 および X4 ウイルスの V3 loop に結合し、そのレセプター結合を阻害することによって抗 HIV 効果を示すことを明らかにした。一部の化合物は経口吸収性もあることから今後誘導体のさらなる合成・検討が望まれる。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のエンベロープタンパクである gp120 と gp41 はウイルスの宿主細胞への吸着・侵入において重要な役割を果たしている。gp120 は細胞表面上の CD4 レセプター、続いて CXCR4 や CCR5 等のコレセプターと結合することにより構造変化を起こし、それによって gp41 が活性化され N 末端の疎水性アミノ酸部位が細胞膜に貫通する。融合の過程で、gp41 の N 末端側ヘリックス(HR1)と C 末端側ヘリックス(HR2)が相互作用し六量体を形成することでウイルスと細胞膜を接近させ、膜融合を起こすと考えられている。

本研究ではこの HIV の細胞内侵入を阻害する薬剤を網羅的に探索・開発し、現在臨床で問題となっている逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性 HIV を効率よく抑制することを目的としている。そのため初年度においてスクリーニング効率の向上と作用機序の解明のために新たなスクリーニング系を確立した。この方法によって CCR5 を利用して感染する実験室株や臨床分離株など

を効率よく簡便にスクリーニングできることを示した。また一方で、我々がこれまでに開発してきた有望なペプチド性融合阻害剤の小分子化と耐性克服ペプチド製剤デザイン方法を確立させ、また小分子化合物による侵入阻害剤の開発を行った。

B. 研究方法

細胞

HeLa-CD4/CCR5LTR- $\beta$ -galactosidase (MAGI) およびヒト glioma 由来 NP-2 細胞に HIV レセプターである CD4/CXCR4/CCR5 を導入した NCK45 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清 (FCS)、0.2 mg/ml G418、0.1 mg/ml ハイグロマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養した。NCK45 細胞にレポーター遺伝子を含むプラスミドを遺伝子導入し、ピューロマイシンで導入細胞を選択した (NCK- $\beta$ -Gal/SEAP, Figure 1)。HIV-1<sub>IIIb</sub> と HIV-1<sub>BaL</sub> は NCK45 細胞を用いて培養、回収した。臨床分離株は国立国際医療センター岡慎一博士より供与を受けた。T-20 耐性 HIV-1 クローンは site-directed mutagenesis 法を用い



て pNL4-3 に変異を導入し作製した。これらクローンを 293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間後にウイルスを回収した。

#### 抗ウイルス剤とペプチド

gp41 由来のペプチドである N36、T-20、C22、C29 と C34 および SC22EK、SC29EK、SC34EK、SC35EK は化学合成により作製した。DS5000、AZT および ddC は Sigma-Aldrich 社より購入した。CXCR4、CCR5 アンタゴニストである T-140 と TAK-779 はそれぞれ京都大学薬学部、米国 NIH より分与を受けた。

ポルフィリンとその誘導体および V3 loop ペプチドは同志社大学薬学部より分与を受けた。

#### 抗 HIV-1 活性の評価

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator assay を用いた。10<sup>4</sup> cells/well の MAGI 細胞を 96 well flat microtiter culture plate で培養し、翌日に HIV-1 クローンと抗ウイルス剤を加える。ウイルスを加えてから 48 時間培養後 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) によって感染細胞を染色した。呈色した細胞数を数えコントロールとの比較によってその濃度における HIV-1 の細胞への感染阻害率を求めた。抗 HIV-1 活性は HIV-1 の複製を 50% 阻害する濃度 (EC<sub>50</sub>) を算出し評価した。

#### Circular Dichroism スペクトルの測定

SC29EK と N-HR 由来のペプチド N36 との結合親和性は circular dichroism (CD) により検討した。CD スペクトルはペプチド(等モルの C 末端側ヘリックスと N 末端側ヘリックス)を PBS に溶かし、分光計で測定した。PBS のみのモル楕円率の波長[ $\theta$ ]を基準として、各複合体の[ $\theta$ ]は 25°C において測定した。結合したペプチドの熱安定性は 222 nm における CD スペクトルの変化を見ることで評価した。0.5°C 刻みに測定し、熱変性過程の中間を融解温度  $T_m$  として求めた。

#### T-20 耐性ウイルスの作製

pNL4-3 に存在するユニークサイトには含まれる NheI-BamHI 断片 (1215 bp、gp120 V4 領域から gp41 の細胞外 domain を含む) をク

ローニングした pSLgp41WT を作製した。これに対して site directed mutagenesis を行い、変異を有する NheI-BamHI 断片を pNL4-3 に戻すことで目的の変異を有するクローンを作製した。これらクローンを 293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間後にウイルスを回収した。ポルフィリンに対する耐性ウイルスの誘導

ウイルスは pNL4-3 を 293T 細胞にトランスフェクトし、作成する。ポルフィリン誘導体を 50%ウイルス複製阻止濃度から培養液に加え、その状態でウイルス複製を繰り返す。細胞変性効果が十分に見られるようになった場合、培養液に加える薬剤濃度を 2 倍に増加させ、さらに培養を続ける (dose escalating method)。ある一定濃度を超える濃度でもウイルスが複製してくるようになったら、感染細胞の一部を回収し、DNA を抽出、PCR 法でウイルスのエンベロープ領域を増幅し、その塩基配列を決定する。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

### C. 研究結果

#### 1. Screening 法の開発

#### NCK- $\beta$ -Gal/SEAP 細胞における $\beta$ -Gal 活性と SEAP 活性の比較

まず NCK- $\beta$ -Gal/SEAP 細胞において $\beta$ -Gal 活性と SEAP 活性が相関するかを検討した。両活性値はともに感染価とよく相関していた (相関係数 0.928, **Figure 1**)

さらに吸着阻害剤である DS5000、T-140、TAK-779、逆転写酵素阻害剤である AZT、ddC の抗 HIV 活性を MAGI 法と比較した (**Table 1**)。ウイルスには CXCR4 をコレセプターとする HIV-1<sub>IIIb</sub> と CCR5 をコレセプターとする HIV-1<sub>BaL</sub> を用いた。CXCR4 アンタゴニストである T-140 は HIV-1<sub>BaL</sub> に、CCR5 アンタゴニストである Tak-779 は HIV-1<sub>BaL</sub> に効果を示さないが、その傾向も MAGI 法と NCK- $\beta$ -Gal/SEAP 細胞では同等であった。しかし、NCK- $\beta$ -Gal/SEAP 細胞では AZT の活性

値の絶対値は約 10 倍感度が高く、逆に TAK-779 の感受性は約 10 倍低かった。この理由として AZT に関しては細胞内リン酸化酵素活性の違いや細胞膜の透過性の違いが考えられ、また TAK-779 では細胞表面上の CCR5 の発現量が高いことが考えられる。しかし、その程度は 10 倍以下であった。また、 $\beta$ -galactosidase と SEAP 活性は抗 HIV 活性測定時によく相関していた (Table 1)。

#### 臨床検体の複製

この細胞が臨床分離株の複製を支持するかどうかを検討した。5つの dual tropic および 1 つの CCR5 tropic HIV-1 を NCK- $\beta$ -Gal/SEAP 細胞に感染させたところすべてのウイルスが NCK- $\beta$ -Gal/SEAP 細胞に感染し、抗ウイルス活性を測定することが可能であった。臨床分離株においても  $\beta$ -galactosidase と SEAP 活性はよく相関していた。

## 2. 融合阻害剤

### 融合阻害ペプチドの抗 HIV-1 活性

NL4-3 株では gp41 の 36 番目のアミノ酸はアスパラギン酸(D)だが、ほとんどの HIV-1 株ではこのアミノ酸がグリシン(G)である。D を有するウイルスは複製能が低下することが報告されていることから site-directed mutagenesis 法を用いて pNL4-3 の 36 番目のアミノ酸を G へ戻し、これに種々の耐性変異を導入したものを抗 HIV-1 活性の評価に用いた。このウイルスを用いることにより、これまで十分なウイルス力価が得られなかったウイルスにおいても比較的安定に十分な力価を得ることが可能となった。この NL4-3-D36G を HIV-1<sub>WT</sub> として T-20 耐性株に対しての SC29EK の活性を調べた。臨床で T-20 耐性変異として報告されている変異 V38A、N43D、N43D/S138A を HIV-1<sub>WT</sub> に導入した。

C34 から 5 アミノ酸小分子化した C29 の抗 HIV-1 活性は C34 と比較して減弱しており、T-20 耐性 HIV-1 に対しても効果を示さなかった (Table 2)。一方 SC29EK は HIV-1<sub>WT</sub> や T-20

耐性 HIV-1 に対して SC34EK と同等の抗 HIV-1 活性を示した。さらに 7 残基小分子化した SC22EK の活性は HIV-1<sub>WT</sub> に対して T-20 より弱く、さらに T-20 耐性 HIV-1 に対して活性を示さなかった。EK 置換を行っていない C22 は HIV-1<sub>WT</sub> に対しても活性がなかった。

### N36 との結合親和性

SC29EK が強い抗 HIV-1 活性を示すメカニズムを明らかにするため、我々は N36/SC29EK 複合体の CD 解析を行った。N36/SC29EK の CD スペクトルは N36/C34 や N36/SC35EK と同様に [0]<sub>222</sub> 付近において極小値をとる  $\alpha$ -ヘリックス構造に特徴的なスペクトルを示していた (Figure 2)。また N36/C22 複合体ではほとんど  $\alpha$ -ヘリックス構造をとっていないと考えられた。T-20 耐性変異の入った N36 と SC29EK との複合体 (N36<sub>V38A</sub>/SC29EK、N36<sub>N43D</sub>/SC29EK) の CD スペクトルは、N36/SC29EK のスペクトルと同じであることから SC29EK は変異の入った N36 に対しても結合力を維持していると考えられた。一方、C29 では V38A 変異に対して  $\alpha$ -ヘリックス性の減弱が見られ、N43D 変異に対しては  $\alpha$ -ヘリックス構造をとっていないことから、変異により結合力が低下していると考えられた。

[0]<sub>222</sub> の変化を利用し、N36/SC29EK の結合力を熱安定性によって評価した。N36/SC29EK の融解温度  $T_m$  は N36/C29 の  $T_m$  より高く、 $\alpha$ -ヘリックス性を向上させることにより六量体の熱安定性が増強したと考えられた。ウイルス感染において生理的温度である 37°C において SC29EK は N36 と安定な結合性を示した。これらの結果から  $\alpha$ -ヘリックス性の増強が抗 HIV-1 活性に関与すると考えられた。

### 血清タンパクの影響

SC29EK が高濃度の FCS 存在下やヒト血清存在下でその抗 HIV 活性を維持できるかを検討した。培養液中の FCS の濃度を 5、10、20、50% に調整して HIV-1<sub>WT</sub> に対する EC<sub>50</sub> を MAGI 法により決定した。コントロールとして用いた逆転写酵素阻害剤 ddC の抗 HIV-1

活性は FCS 濃度依存的に減少した(Figure 3A)。同様に、T-20 においても弱い FCS 濃度依存的な活性の減少傾向が認められた。SC29EK、SC34EK は FCS の濃度に関わらず高い活性を維持していた。

次に二人の HIV 抗体陰性の健常者から血清を採取しヒト血清の影響を検討した。その結果、T-20 と SC29EK は PBS、FCS、ヒト血清処理を行っても活性に変化は見られなかった(Figure 3B)。これらのことから SC29EK は T-20 と同様に *in vivo* で強い抗 HIV-1 活性を安定的に発揮すると考えられた。

### 新規分子クローンの構築

NL4-3 株では gp41 の 36 番目のアミノ酸はアスパラギン酸(D)だが、ほとんどの HIV-1 株ではこのアミノ酸がグリシン(G)である。D を有するウイルスは複製能が低下することが報告されていることから site-directed mutagenesis 法を用いて pNL4-3 の 36 番目のアミノ酸を G へ戻し、これに種々の耐性変異を導入したものを抗 HIV-1 活性の評価に用いた。このウイルスを用いることにより、これまで十分なウイルス力価が得られなかったウイルスにおいても比較的安定に十分な力価を得ることが可能となった。この NL4-3<sub>D36G</sub> を HIV-1<sub>WT</sub> として、臨床で T-20 耐性変異として報告されている変異 V38A、N43D、N43D/S138A を導入した。これらのウイルスはそれぞれ 10、20、35 倍の T-20 感受性低下を示した。D36G を持つウイルスは T-20 に対して約 10 倍程度の感受性増加が認められたが、D36G を有するウイルスをコントロールとした場合、T-20 耐性度には影響がなかった。

### 2 次変異 S138A の影響

gp41 HR2 由来ペプチドである T-20 に対して高度耐性を付与する責任変異として HR1 に存在する変異、N43D が挙げられるが、N43D に対する 2 次変異 S138A は HR2 領域に同定されている。初めに S138A が代償変異として HIV-1 複製能に及ぼす影響について検討を行った。その結果、S138A は N43D によって減弱した HIV-1 複製速度を著明に改善させ、

アラニンへの置換が感染性の維持に合理的な変異であることが明らかになった。

### S138 変異を導入した T-20 の効果

S138A は T-20 のアミノ酸配列中に存在するため S138A を導入した T-20、T20<sub>S138A</sub> を化学合成しその抗 HIV 活性を検討したところ、野生株に対して感受性を上げただけでなく、T-20 耐性株に対しても感受性を維持した。S138 の意義を明らかとするために他の生理的アミノ酸 18 種類に置換したところ、S、A に準ずる側鎖が小さいアミノ酸においては活性が維持されたが、T-20 耐性株に対する効果は減弱した。活性は側鎖の大きさに逆相関していた。また、K、E、D 等のチャージを持つアミノ酸や側鎖が大きな Y、F では活性がほとんど消失していた。

### S138 置換ペプチドの HR1 に対する結合性

代償変異であるアラニン及び他のアミノ酸に置換したペプチドは活性がことなることから、その機序として gp41 N-HR に対する結合性の変化を考え、S138 置換ペプチドを作製し、N-HR との結合能を circular dichroism (CD)により検討した。T-20 は *in vitro* binding assay において HR1 との結合性が乏しいため、T-20 の代わりに 12 アミノ酸 N 末端側を含む HR2 の代表的なペプチド C34 に S138 置換を導入し、HR1 の代表的な N36 との親和性を CD によって解析した。耐性 HIV-1 に対して T-20<sub>S138A</sub>、T-20<sub>S138L</sub> ペプチドは若干の感受性低下を示すものの T-20 と比較して感染を効果的に阻害した。HR1 の代表ペプチド N36 と、HR2 を代表するペプチド C34、S138 を置換した C34<sub>S138X</sub> の親和性を求めると、C34<sub>S138A</sub>、C34<sub>S138L</sub> は C34 よりも強固な N36 との結合能を示し、N43D を導入した N36 (N36<sub>N43D</sub>) との検討においても同様の結果が得られた。また、N43D と同等の T-20 耐性度を示す V38A を導入した N36<sub>V38A</sub> においても同様の結果が得られ、これらの融解温度と抗 HIV-1 活性には相関性が認められた。

### C34 耐性変異の応用

以前我々のグループは T-20 誘導体である C34 に対する耐性機序を解明している。C34

耐性ウイルスの HR2 領域に S138A のような 2 次変異として N126K が導入されていたことから、この N126K を導入した C34<sub>N126K</sub> ペプチドを作成した。このペプチドの抗 HIV 活性を検討したところ、野生型だけにとどまらず、C34 耐性ウイルスの複製をも抑制することが明らかとなった (Table 3)。HR2 N126K 変異が HR 1 との親和性向上に関与することが明らかになっていることと併せ、HR 2 内のアミノ酸変異を利用した融合阻害ペプチドは、HR 1 との結合増強により強力な抗 HIV-1 活性を発揮し有用な治療薬となりうることが示唆された。

#### T-20<sub>S138A</sub> に対する耐性を付与する変異の誘導

T-20<sub>S138A</sub> に対する耐性変異の同定のために dose escalating 法にて耐性ウイルスを誘導した。耐性誘導には T-20 耐性である HIV-1<sub>N43D/S138A</sub> を用いた。HR1 に L33S、HR2 に E137K が導入され、耐性を獲得した。

### 3. 進入阻害剤

#### 新規ポルフィリン誘導体の効果

図 1 に新規ポルフィリン誘導体の化学構造を示すが、今回の誘導体はポルフィリン環からの側鎖を変更して作成した。基本的には側鎖にベンゼン環とカルボキシル基を配位して HIV のエンベロープタンパク質に強く結合しうるように設計を行った。本実験では CXCR4 をレセプターの一つとして用いる HIV-1<sub>IIIb</sub> と CCR5 を用いる HIV-1<sub>BaL</sub> に対しての効果を MAGI 細胞での single round replication 阻害効果を検討した。

今回作成したポルフィリン誘導体はすべて HIV-1<sub>IIIb</sub> と HIV-1<sub>BaL</sub> に対して同等の効果を示した (Table 4)。効果は低いものでも 5  $\mu$ M 程度の EC50 値を示し、強いものでは 0.06  $\mu$ M という低い濃度でも HIV-1 の複製を抑制していた。Fe をポルフィリン環に配位させたものはそうでないものと比べ効果が増強していた。興味深いことに Fe を配位させると細胞毒性が逆に低下することが明らかとなった。そのため、選択性が著しく向上する結果となった。HIV-1<sub>IIIb</sub> と HIV-1<sub>BaL</sub> に対する効果より、

これらのポルフィリン誘導体はケモカインレセプターの利用には影響を受けないことが明らかとなった。

#### Time of addition

ポルフィリン誘導体の作用機序を明らかにするために、time of addition 実験を行った。侵入阻害剤としては DS5000、主に CD4 と gp120 との吸着を阻害、AMD3100、吸着後の CXCR4 との結合を阻害、逆転写酵素阻害剤の AZT といった作用機序が明らかな薬剤と誘導体である FeP1 を比較した。ウイルスは HIV-1<sub>IIIb</sub> を用いて検討した。Figure 4 に結果を示すが、FeP1 の活性 profile は DS5000 と AMD3100 とほとんど同様であり、entry 阻害剤として作用していることが明らかとなった。

#### ポルフィリン誘導体の標的分子の同定

ポルフィリン誘導体がウイルス側または宿主側のどちらに作用して HIV entry を阻害しているかを検討するために、誘導体をウイルス前に細胞に加え、2 時間後に PBS でよく洗浄したのちにウイルスを加えて抗 HIV 効果を MAGI 法で検討した。その結果細胞側に作用する AMD3100 のみが強い効果を示したがポルフィリン誘導体は効果を示さなかった。一方逆転写酵素阻害剤 AZT は細胞に取り込まれたのち、宿主リン酸化酵素によってリン酸化を受けるため、一度細胞内に取り込まれリン酸化されたものは細胞内にとどまることから、弱い効果が見られた。このことから、ポルフィリン誘導体はウイルス側に作用していると考えられた。

#### ポルフィリン誘導体の gp120 V3 loop への結合

ポルフィリン誘導体がウイルス gp120 に結合し、Entry を阻害していると予想されたため、ウイルスの細胞レセプター結合に重要な働きをする V3 loop 領域の合成ペプチドを合成し、ポルフィリン誘導体との結合能を UV/Vis 法で解析した。ポルフィリン誘導体は HIV-1<sub>IIIb</sub> と HIV-1<sub>BaL</sub> 由来の V3 ペプチドに同等に結合することが示され、ポルフィリンの結合部位の候補の一つとして V3 loop が挙げ