

201226008A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV侵入の動的超分子機構を標的とする  
ケミカルバイオロジー創薬研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 鳴海 哲夫

平成25年（2013）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

**HIV侵入の動的超分子機構を標的とする  
ケミカルバイオロジー創薬研究**

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 鳴海 哲夫

平成25年（2013）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

HIV侵入の動的超分子機構を標的とする ケミカルバイオロジー創薬研究 鳴海 哲夫	----- 1
--	---------

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
--------------------	----------

III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 12
------------------	----------

## HIV 侵入の動的超分子機構を標的とするケミカルバイオロジー創薬研究

研究者代表者 鳴海 哲夫 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 助教

研究要旨 本研究課題では、HIV の細胞侵入過程である動的超分子機構を標的として、これまでほとんど行われてこなかった有機合成化学に基づいたケミカルバイオロジー研究を行うことで、HIV の細胞侵入時の HIV 外被タンパク質と宿主側タンパク質との相互作用様式に関して、有機化学的手法による解析を行い、その知見に基づいた新規 HIV 侵入阻害剤の創製研究を実施した。平成 22 年度は、宿主側から HIV 側タンパク質への機能解析として、申請者らが見出した低分子 CD4 ミミックを化学修飾することで高度化した誘導体群を合成し、gp120 に与える構造変化、細胞毒性および抗 HIV 活性を評価した。平成 23 年度は、CD4 ミミック誘導体の構造最適化を深化しつつ、コレセプター CCR5/CXCR4 との相互作用に重要な役割を担う V3 loop 領域を模倣した V3 loop ペプチドをリード化合物として、部分ペプチドライブラリーを構築し、コレセプター結合活性および抗 HIV 活性を評価した。これらの研究によりリード化合物と同等の構造変化誘起能を有し、低毒性かつ顕著な抗 HIV 活性を有する HAR-171 を見出し、さらなる構造最適化により HAR-171 の 2 倍程度強力な抗 HIV 活性を有する HAR-431 を見出した。平成 24 年度は、過去二年間の研究によって得られた知見を基に、標的タンパク質 (gp120) の機能制御を目的として、HAR-431 をリード化合物として高活性化、低毒性化を目指し、CD4 ミミック誘導体のさらなる構造活性相関研究を行い、新規 HIV 侵入阻害剤の創製研究を実施した。その結果、クロロアニリン骨格の代わりに一炭素で酸素間を架橋したカテコール骨格を有する誘導体が顕著な抗 HIV 活性を示し、さらに大幅に細胞毒性が改善されることを見出した。これらの成果は、今後の HIV 侵入過程を標的とした創薬研究の進展に資するものである。なお、見出した研究成果を基に更なる構造活性相関研究が進行中である。

## A. 研究目的

HIV 感染症の化学療法では多剤併用療法が有効な治療法として確立されているが、長期投与による毒性の軽減や耐性ウイルス抑制の観点から、新規治療薬の開発が求められている。また、感染予防や根本的治療を目指したエイズワクチンの開発は今もなお難しい状況になる。これら問題の解決には HIV の侵入から出芽に至る生命現象をこれまでとは異なる角度から改めて解析し、既存の情報を再構築する必要がある。一方、工学分野では化学を出発点に生命現象を解析するケミカルバイオロジー研究が盛んに行われ、様々なタンパク

質において新たな情報が見出されている。このような背景のもと、HIV 関連タンパク質に対してケミカルバイオロジー研究を行い、HIV の関わる生命現象を有機化学的に解析し、原子・分子レベルの相互作用として理解することは極めて重要と考えられる。そこで本研究課題では、HIV 側および宿主側タンパク質の機能を模倣した有機分子を創製し、それらを用いて HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式を両方向から解析し、その知見に基づいた合理的分子設計により新規 HIV 侵入阻害剤の創製を目指す。

## B. 研究方法

平成 22～23 年度の研究で得られた HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式に関する知見を基に、HIV 外被タンパク質 gp120 の機能を制御する CD4 ミミックの構造活性相関研究を進めた。これまでの構造活性相関研究において見出した HAR-431 をリード化合物として、高活性化および低毒性化など医薬品プロフィールの向上を目指し構造活性相関研究を行った。具体的には、HAR-431 を三つのフラグメント (芳香環部位、オキサミド部位、ピペリジン部位) に分割し、それぞれ化学修飾した CD4 ミミック誘導体を合成し、それら化合物の生物活性 (抗 HIV 活性、細胞毒性および gp120 の構造変化誘起能) を評価した。

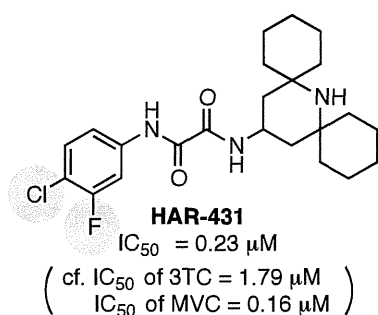


図1 HAR-431 の構造式および抗 HIV 活性

### CD4 ミミック誘導体の生理活性試験

細胞毒性および抗 HIV 活性については WST-8 細胞増殖測定法による評価を行った。96 well round-bottom micro culture plate にて、各 CD4 ミミック誘導体存在下または非存在下で、細胞毒性試験では無感染の PM1/CCR5 細胞  $3 \times 10^3$  cells を、抗 HIV-1 活性試験では HIV-1 (サブタイプ B-R5 臨床分離株 YTA48P) 感染させた PM1/CCR5 細胞を  $37^\circ C$  下で 5 日間培養した。それぞれの well から 100 mL の培養液を取り除き、WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitro-phenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt) 溶液 10 mL を加え、 $37^\circ C$  で 3 時間インキュ

ベートした。マイクロプレートリーダーにて吸光度 (450 nm) を測定して、細胞の生存率を算出した。ウイルスによる細胞死を 50% 阻害する濃度を  $IC_{50}$  およびウイルス非存在下での各誘導体による 50% の細胞が傷害される濃度を  $CC_{50}$  とした [研究協力者: 吉村和久第一室室長、原田 恵嘉博士 (国立感染症研究所エイズ研究センター)]。

### gp120 構造変化誘起能の評価

gp120 の構造変化誘起能は可溶性 CD4 存在下で gp120 に対する結合が増強される CD4i 抗体 (4C11) を用いて、HIV-1 JR-FL 株慢性感染細胞 (PM1/JR-FL) の細胞表面に対する CD4i 抗体の結合活性をフローサイトメーターにて評価した [吉村、原田]。具体的には、HIV-1 に継続感染させた PM1 細胞  $1 \times 10^5$  cells を、FACS buffer (PBS; 2% BSA, 0.2% azide, pH 7.2) 中において CD4 ミミック誘導体  $100 \mu M$  存在下または rsCD4  $0.5 \mu g/mL$  存在下で、 $4^\circ C$  下、15 分間攪拌したのち、CD4i 抗体 4C11 (終濃度  $3.4 - 6.7 \mu g/mL$ ) を加えて  $4^\circ C$  下で 30 分間攪拌した。遠心後 ( $4^\circ C$ , 1200 rpm, 3 分間)、上清を除去し、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。そこに fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合させたヤギ由来抗ヒト IgG 抗体を加え、 $4^\circ C$  下で 30 分間染色し、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。また、固定化溶液を加え、 $4^\circ C$  下で 30 分間固定化したのち、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。その後、フローサイトメーターにて測定を 2 回以上行った。

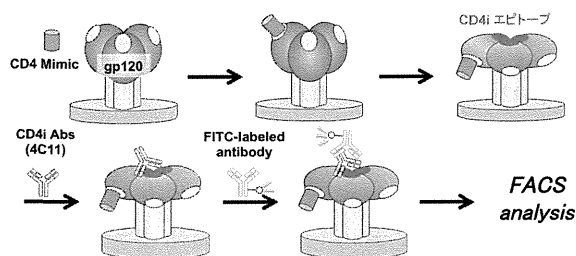


図2 gp120 構造変化誘起能の FACS による評価

**CD4 ミミック誘導体の耐性誘導実験**

顕著な生物活性を示した誘導体については HIV-1 YTA48P 株を PM1 細胞に感染させ、誘導体の濃度を徐々に上げながら継代培養 (in vitro 耐性誘導) を行い、耐性機序および結合部位の検討を行った [吉村、原田]。

**(倫理面への配慮)**

本研究は HIV 感染症例の血液サンプルを解析する必要があるため、熊本大学大学院生命科学研究部等臨床研究・医療技術倫理委員会により、臨床研究・医療技術承認を受けている。また、個人情報の紛失、漏洩を防ぐため、個人名は全て暗号化し、臨床データ、臨床サンプルを管理保管する。

**C. 研究結果**

**【CD4 ミミックの構造活性相関研究】**

これまでの研究および分子モデリングから CD4 ミミックの芳香環部位は Val255 や Ser375、Trp427 などポケット底部に位置するアミノ酸と相互作用し、この相互作用が強力な生物活性発現に重要と示唆されている (図 3)。しかし、芳香環部位にクロロアニリン骨格を持つ誘導体は共通して細胞毒性が高く、また溶解性も問題であった。そこで、塩素原子やフッ素原子の生物学的等価体である酸素原子や窒素原子に置換した誘導体群を合成した。また、クロロアニリン骨格以外の新規骨格の探索も平行して行った。分子モデリングの解析した結果、CD4 ミミックの芳香環部位とオキサミド部位の一部が高い平面性を保ち gp120 と相互作用していることが示唆された。そこで、芳香環部位とオキサミド部位に平面構造を付与しつつ構造固定化によるエントロピーの減少を図るためにインドール骨格を有する誘導体を生設計し、それら化合物群を合成した (図 4)。また、Chiron 社から報告されたインドール誘導体は、報告者らの CD4 ミミックと同様に gp120 の構造変化を誘起することで中和活性を増進させることが知られていることから、これら 4,6-ジメチルイ

ンドール体併せて合成した (図 5)。

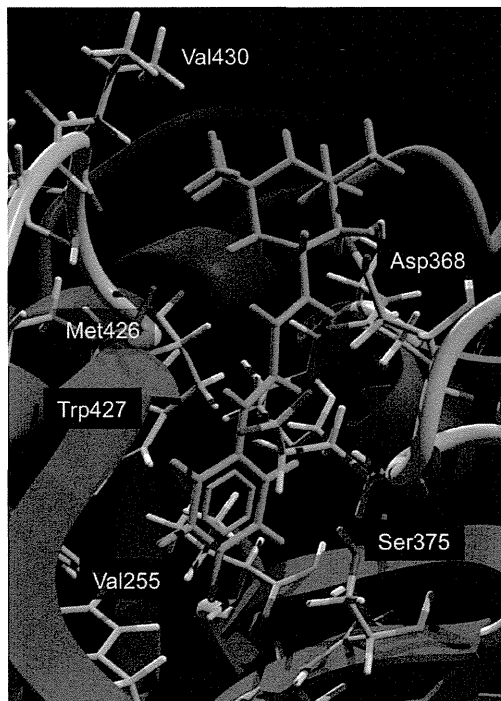


図 3. リード化合物の一つ NBD-556 と相互作用部位 Phe43 cavity の X 線共結晶構造 (PDB ID: 3TGS)

**Design of 5-Indole-Type CD4 Mimics**

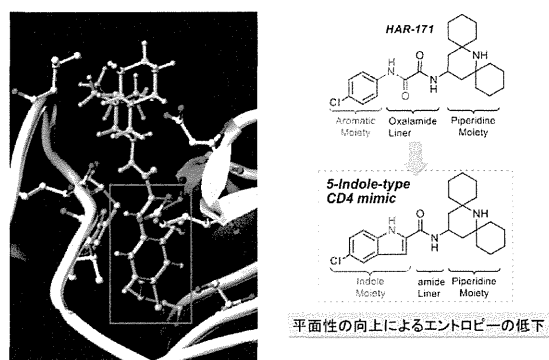
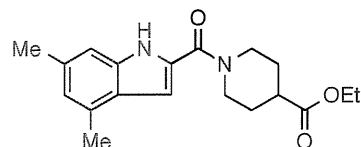


図 4. 芳香環パラ位およびメタ位に種々の置換基を導入した化合物群



(PCT Int. Appl. WO2005121175, 2005)

図 5. Chiron 社から報告されたインドール誘導体

合成した化合物群の生物活性について評価したところ、クロロアニリン骨格の代わりに一炭素で酸素間を架橋したカテコール骨格を有する誘導体が顕著な抗 HIV 活性を示し、さらに大幅に細胞毒性が改善されることが明らかになった ( $IC_{50} = 4.1 \mu M$ ,  $CC_{50} > 300 \mu M$ )。一方で、カテコール骨格に加え、平成 22 年度に見出した二つのシクロヘキシル基を含むピペリジン骨格 (ジシクロヘキシルピペリジン骨格) を同時に有する誘導体では顕著な抗 HIV 活性が見られなかった ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ,  $CC_{50} > 300 \mu M$ )。

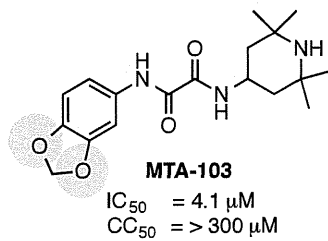


図 6. 新たに見出したカテコール骨格を有する CD4 ミミック誘導体 MTA-103

また、インドール骨格を含む誘導体群では 5 位に塩素原子を有する誘導体群が弱いながらも抗 HIV 活性を示し、特にジシクロヘキシルピペリジン骨格を同時に有するインドール誘導体では顕著な抗 HIV 活性を示した ( $IC_{50} = 3.6 \mu M$ ,  $CC_{50} = 11.4 \mu M$ )。また、細胞毒性の改善を目指し、インドールの窒素原子にメチル基を導入した N-メチルインドールでは顕著な生物活性が見られなかった。

**Anti-HIV Activity and Cytotoxicity:  
5-Indole-Type and 4,6-Dimethylindole-type CD4 Mimics**

NBD-556	eYTA48Pexp		eYTA48Pexp		eYTA48Pexp	
	$IC_{50} [^2]M^*$	$CC_{50} [^2]M^*$	$IC_{50} [^2]M^*$	$CC_{50} [^2]M^*$	$IC_{50} [^2]M^*$	$CC_{50} [^2]M^*$
	>15.6	31.2	-	-	-	-
	>10	19.4	>100	>200	3.6	11.4
	>100	60.3	>100	>200	>100	9.6

\* $IC_{50}$  values were determined using the WST8-assay using inhibition of PM1/CCR5 cells.  
<sup>†</sup> Using PM1/CCR5 cells.

図 7. 5-インドール型および4,6-ジメチルインドール型 CD4 ミミックの抗 HIV 活性と細胞毒性

ール型 CD4 ミミックの抗 HIV 活性と細胞毒性

**Anti-HIV Activity and Cytotoxicity:  
5-Indole-Type and 4,6-Dimethylindole-type CD4 Mimics**

NBD-556	eYTA48Pexp		eYTA48Pexp		eYTA48Pexp	
	$IC_{50} [^2]M^*$	$CC_{50} [^2]M^*$	$IC_{50} [^2]M^*$	$CC_{50} [^2]M^*$	$IC_{50} [^2]M^*$	$CC_{50} [^2]M^*$
	15.6	31.2	-	-	-	-
	>100	>20	-	-	-	-
	>100	13.9	>100	>20	>100	12.3
	>100	>20	>100	>20	>100	13.5

\* $IC_{50}$  values were determined using the WST8-assay using inhibition of PM1/CCR5 cells.  
<sup>†</sup> Using PM1/CCR5 cells.

図 8. N-メチル-5-インドール型および N-メチル-4,6-ジメチルインドール型 CD4 ミミックの抗 HIV 活性と細胞毒性

合成した全ての化合物の gp120 の構造変化誘起能について評価したところ、顕著な抗 HIV 活性を示したカテコール骨格を有する誘導体および 5 位に塩素原子を有するインドール誘導体は gp120 の構造変化をリード化合物と同様に誘起することが明らかになった。

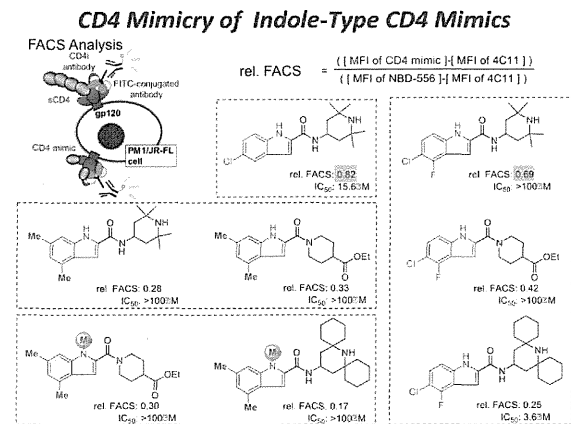


図 9. 顕著な gp120 構造変化誘起能を示したインドール誘導体

5-インドール型 CD4 ミミックの生物活性評価の結果、大幅な抗 HIV 活性の低下や細胞毒性の増強が見られたので、新たな分子設計に着手した。5-インドール型 CD4 ミミックの理論計

### 別添 3

算による構造最適化を行った結果、芳香環部位に大きなずれが見られたため、塩素原子の位置を近づけるため6位に塩素原子を有する6-インドール型 CD4 ミミックを新たに設計し、これまで顕著な生物活性を示したピペリジン類と組み合わせることで、種々の 6-インドール型 CD4 ミミックを合成した (図 10)。

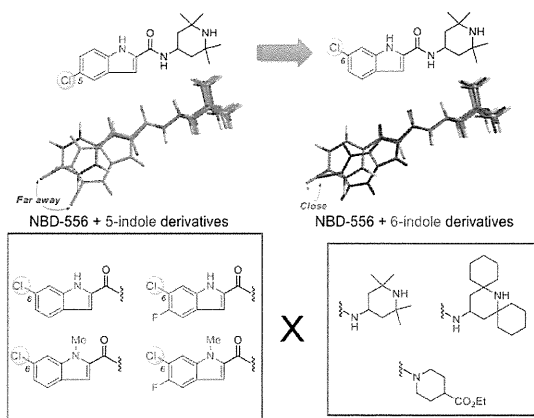


図 10. 新たに設計した 6-インドール型 CD4 ミミック誘導体

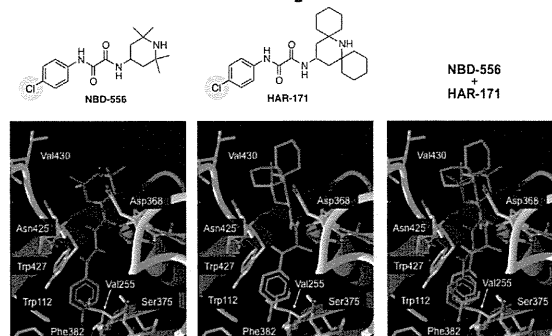
生物活性評価したところ、ほとんどの化合物は 5-インドール型誘導体と同様に大幅に抗 HIV 活性は低下したが、5 位にフッ素原子および 6 位に塩素原子を有する二置換インドール誘導体は 100  $\mu$ M 程度ではあるが抗 HIV 活性を示すことが明らかとなった。また、全体として細胞毒性が増強することも明らかとなった。

#### 【HAR-171 および HAR-431 の分子モデリング】

さらなる生物活性の向上には顕著な抗 HIV 活性を示した HAR-171 や HAR-431 などのより詳細な相互作用様式が必要であると考え、奉公された gp120 の X 線結晶構造 (PDB ID: 3TGS) をもとに理論計算による分子モデリングを行った (MOE program)。その結果、リード化合物の一つ NBD-556 に比べ、HAR-171 はポケット入り口付近の Val430 との疎水性相互作用が強く、芳香環部位がポケットの奥まで相互作用し

ていないことが示唆された (図 11)。また芳香環部位とピペリジン部位をつなぐオキサミド部位は、NBD-556 においてはほぼ直線上に乗っているのに対し、HAR-171 は大きくねじれていることが示唆された。

#### Revised Molecular Modeling: NBD-556 and HAR-171

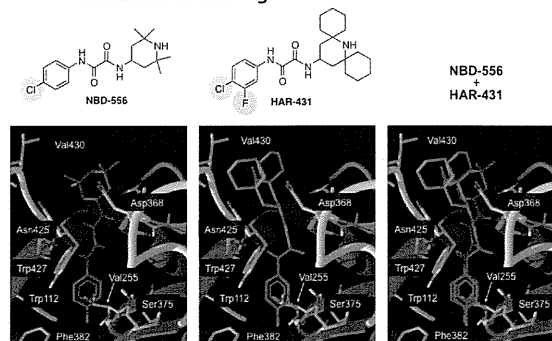


Molecular Modeling was performed with MOE Program by Dr. Ohashi. Structures were redrawn with Molegro Molecular viewer Program.

図 11. NBD-556 および HAR-171 の分子モデリング : NBD-556 (赤)、HAR-171 (青)

続いて、強力な抗 HIV 活性を示した HAR-431 についても同様に分子モデリングを行ったところ (図 12)、Val430 との疎水性相互作用に加え、芳香環部位はリード化合物と同様にポケット底部に位置することが示唆された。また、オキサミド部位は HAR-171 と同様に大きくねじれているが示唆された。

#### Molecular Modeling: NBD-556 and HAR-431



Molecular Modeling was performed with MOE Program by Dr. Ohashi. Structures were redrawn with Molegro Molecular viewer Program.

図 12. NBD-556 および HAR-431 の分子モデリング : NBD-556 (赤)、HAR-431 (青)



### 【CD4 ミミック誘導体の耐性変異】

CD4 ミミックの結合に関与する gp120 アミノ酸残基の同定を目指し、R5 臨床分離株を用いて、各 CD4 ミミック誘導体に対する *in vitro* 耐性誘導を行った。親化合物である NBD-556 やその誘導体 JRC-II-191、申請者らが見出したこれら化合物より強力な抗 HIV 活性を示した HAR-431 について耐性誘導実験を行った結果、gp120 の複数のアミノ酸 (V255M、T375I など) において共通した変異が見られ、これらの結果は理論計算による分子モデリングの結果とよく一致していた (図 13)。また、高い抗 HIV 活性を示した化合物群では三つの耐性経路のうち V255M の変異を伴う耐性経路を中心とすることが明らかになった。

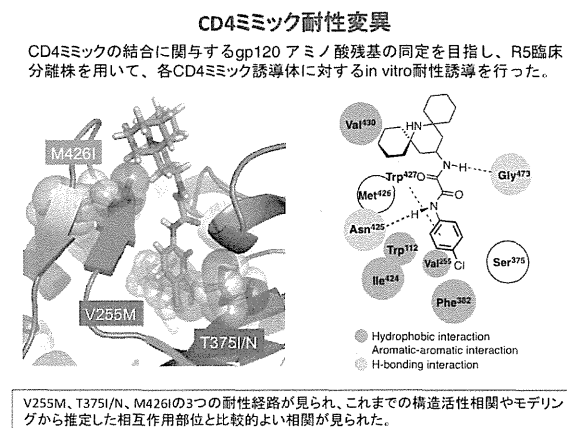


図 13. CD4 ミミックの耐性変異

### D. 考察

平成 22~23 年度の結果を受けて、宿主側タンパク質 CD4 の機能を模倣した CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究をさらに進めた。生物活性評価の結果から芳香環部位の新規骨格としてエーテル結合で架橋したカテコール骨格を有する誘導体は大幅に細胞毒性が改善されることを見出した、分子モデリングから従来の CD4 ミミックとは異なる相互作用様式であることが示唆された。また、インドール型誘導

体においても顕著な抗 HIV 活性や構造変化誘起能を示す誘導体を見出したことから、本骨格は CD4 ミミックの新規骨格として有用であることが示唆された。さらに、顕著な抗 HIV 活性を示した CD4 ミミックの分子モデリングと耐性誘導実験を行い、これらがよい一致を示しており、今後の CD4 ミミックの分子設計において有益な情報を得た。

### E. 結論

HIV の細胞侵入段階を標的とした HIV 侵入阻害剤の創製を目的として、報告者らが見出した CD4 ミミック誘導体の更なる構造最適化を行い、顕著な生物活性を有する複数の誘導体を見出した。これらの結果は今後の HIV 侵入阻害剤の創製研究の進展に資するものである。また、報告者らが見出した CD4 ミミック誘導体は顕著な抗 HIV 活性を示すだけでなく、可溶性 CD4 と同様に gp120 の構造変化誘起能を有している。これら特徴を生かして HIV 侵入阻害剤や中和抗体との併用剤として応用するには細胞毒性の改善などさらなる医薬品プロフィールの向上が必要となる。今後はこれまでの構造活性相関研究に加え、種々の中和抗体との併用も含め様々な応用研究へと展開し、本化合物を基盤としたより効果的な治療法の開発に貢献したい。これらの結果は今後の HIV 侵入阻害剤の開発研究において、重要な基礎的知見を与えるものと思われる。

### F. 謝辞

抗ウイルス活性の測定実験および gp120 構造変化誘起能の評価に関して、熊本大学エイズ学研究センター、吉村和久准教授 (現国立感染症研究所 エイズ研究センター第一室・室長)、原田恵嘉博士に、お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

## G. 研究発表

## I. 論文発表

- 1) Narum T, Kobayakawa T, Aikawa H, Seike S, Tamamura H. Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation. *Org. Lett.*, 14, 4490-4493, 2012.
- 2) Narumi T, Tanaka T, Hashimoto C, Nomura W, Aikawa H, Sohma A, Itotani K, Kawamata M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Pharmacophore-Based Small Molecule CXCR4 Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 4169-4172, 2012.
- 3) Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi K, Narumi T, Aikawa H, Komano JA, Yamamoto N, Tamamura H. Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 3287-3291, 2012.
- 4) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano JA, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem*, 7, 205-208, 2012.
- 5) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Tanaka T, Chiba J, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 1468-1474, 2012.
- 6) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg. Med. Chem.*, 21(9), 2518-2526, 2013.
- 7) Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. *ChemMedChem*, 8(1), 118-124, 2013.
- 2) Nomura W, Tsutsumi H, Abe S, Mori A, Narumi T, Aikawa H, Tamamura H. Intense Blue Fluorescence of Tag-probe Systems Based on a Leucine Zipper Assembly. *Peptide Science 2011*, Sakaguchi, K. (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 317, 2012.
- 3) 鳴海哲夫, Jeffrey W. Bode. 「 $\alpha$ -ケト酸とヒドロキシアミンの化学選択的な縮合反応によるペプチド合成」, 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用 (株式会社 メディカルドゥ), 68-75, 2012.

## 2. 学会発表

- 1) Narumi T, Tanaka T, Nomura W, Aikawa H, Tamamura H. HIV Inhibitors Targeting Entry, Fusion and Integrase. 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition Fall 2012, Philadelphia, USA, Aug19-23, 2012.
- 2) Nomura W, Tanaka T, Aikawa H, Narumi T, Tamamura H. Bivalent Ligands for the Chemokine Receptor CXCR4 Dimer and Their Function. 32nd European Peptide Symposium 2012, Athens, Greek, Sep2-7, 2012.
- 3) Narumi T, Seike S, Aikawa H, Tamamura H. Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Flanking two Stereogenic Centers by Organocopper-Mediated Reduction/Alkylation of Allylic gem-Dichlorides. 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition Fall 2012, Philadelphia, USA, Aug19-23, 2012.
- 5) Aikawa H, Matsumoto D, Nozue A, Urano E, Metifiot M, Maddai K, Nomura W, Narumi T, Komano JA, Murakami T, Pommier Y, Yamamoto N, Tamamura H. Structure-activity Relationship Studies of Peptidic HIV Integrase Inhibitors. The 13th Kumamoto AIDS Seminar・GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
- 6) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 高活性イミダゾールカルベンの創製研究: 窒素原子上の置換基と触媒活性の相関. 日本化学会第92春季年会. 横浜, 2012年3月25-28日.
- 7) 紺野 誠, 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 田中智博, 橋本知恵, 大橋南美, 尾崎太郎, 相馬 晃, 糸谷恭子, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. ジピコリルアミンおよびアザマクロサイクル環を有する二核金属錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 日本化学会第92春季年会. 横浜, 2012年3月25-28日.
- 8) 相川春夫, 野村 渉, 鳴海哲夫, 田中智博, 玉村啓和. 長さの調節が可能な二価結合型 CXCR4 リガンドの創製・蛍光ラベル化と応用.

## 著書

- 1) Nomura W, Tanaka T, Aoki T, Soma A, Aikawa H, Narumi T, and Tamamura H. Development of Designed Bivalent Ligands for CXCR4 and their Function on Receptor Binding. *Peptide Science 2011*, Sakaguchi, K., (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 79, 2012.

- 日本化学会第 92 春季年会. 横浜, 2012 年 3 月 25-28 日.
- 9) 橋本知恵, 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 山本直樹, 玉村啓和. 宿主タンパク質を基にしたエイズワクチン候補の探索. 日本薬学会第 132 年会. 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
  - 10) 野村 渉, 湊 夏来, 奥田善章, 大橋南美, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 蛍光性 DAG lactone 誘導体の合成と PKC リガンドの新規スクリーニング法の開発. 日本薬学会第 132 年会. 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
  - 11) 野村 渉, 森 あつみ, 大橋南美, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. プローブ導入型タグ付加標的タンパク質融合体による細胞内動態解析方法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会. 京都, 2012 年 6 月 7-9 日.
  - 12) 橋本知恵, 野村 渉, 鈴木貴晴, 大矢亜紀, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 相川春夫, 駒野 淳. 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入阻害剤としての外被タンパク質 gp41-C34 3 量体. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会. 京都, 2012 年 6 月 7-9 日.
  - 13) 鳴海哲夫. 高活性イミダゾールカルベンの創製研究: 窒素原子上の置換基と触媒活性の相関. 第一回全体班会議「有機分子触媒による未来型分子変換」. 京都, 2012 年 6 月 8-9 日.
  - 14) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 高活性イミダゾールカルベンの創製を目指した構造活性相関研究. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
  - 15) 紺野 誠, 鳴海哲夫, 野村 渉, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの創製. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
  - 16) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. アゾリウム塩によるインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応. 第 5 回有機触媒シンポジウム. 東京, 2012 年 10 月 26-27 日.
  - 17) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. アゾリウム塩を酸触媒とするインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応の開発. 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 5-6 日.
  - 18) 小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 有機銅試薬によるアリル位アルキル化反応を基軸とする Z 型クロロアルケン骨格の立体選択的合成法の開発. 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 5-6 日.
  - 19) 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 細胞内でのタンパク質動態イメージングのための細胞膜透過型 ZIP タグープローブシステムの創製. 第 49 回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012 年 11 月 7-9 日.
  - 20) 大附寛幸, 一瀬裕太郎, 小林 剛, 原田恵嘉, 吉村和久, 鳴海哲夫, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦, 三浦智行. 中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
  - 21) 村上 努, 高野 皓, 藤野真之, 鳴海哲夫, 相川春夫, 橋本知恵, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1MA/CA 部分ペプチドの細胞内導入による新規 HIV-1 複製制御法の探索. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
  - 22) 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 橋本知恵, 吉村和久, 原田恵嘉, 大附寛幸, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 相川春夫, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの創製研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
  - 23) 相川春夫, 松本大地, 野末愛美, 浦野恵美子, Mathieu Metifiot, Kasthuraiah Maddali, 野村 渉, 鳴海哲夫, 駒野 淳, 村上 努, Yves Pommier, 山本直樹, 玉村啓和. ペプチドミメティック型インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
  - 24) 高野 皓, 鳴海哲夫, 相川春夫, 橋本知恵, 藤野真之, 野村 渉, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 MA, CA タンパク質を基にした新規抗 HIV-1 剤の創製研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
  - 25) 原田恵嘉, 鳴海哲夫, 玉村啓和, 松下修三, 吉村和久. R5 臨床分離株を用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する *in vitro* 耐性ウイルス誘導. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
  - 26) 鳴海哲夫, 廣田雄樹, 吉村和久, 原田恵嘉, 橋本知恵, 松下修三, 玉村啓和. 低分子型 CD4 ミミック: HIV 外被タンパク質の構造変化を促す HIV 侵入阻害剤. 第 30 回メディナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 28-30 日.
  - 27) 高野 皓, 鳴海哲夫, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応する 8-アザクマリニルメチル型光分解性保護基の開発. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
  - 28) 小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. E 型クロロアルケン骨格の立体選択的合成法の開発. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
  - 29) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 新規アゾリウム塩によるインドール類の Friedel-Crafts 型

## 別添 3

共役付加反応. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.

- 30) 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 橋本知恵, 吉村和久, 原田恵嘉, 大附寛幸, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 相川春夫, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を標的としたインドール型低分子 CD4 ミミックの創製. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

- 1) 出願番号: 特願 2011-082813

発明者: 玉村啓和、鳴海哲夫、野村渉、橋本知恵、駒野淳、宮内浩典

発明の名称: HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド

出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学

出願日: 平成 23 年 4 月 4 日

以後、

国際公開番号: WO2012/137479 (公開日: 2012/10/11)

国際出願番号: PCT/JP2012/002312 (出願日: 2012 年 4 月 3 日)

## I. 健康危惧情報

該当事項なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 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
Nomura W, Tanaka T, Narumi T, Tamamura H, et al.	Development of Designed Bivalent Ligands for CXCR4 and their Function on Receptor Binding	Sakaguchi, K., (Eds.)	<i>Peptide Science 2011</i>	The Japanese Peptide Society	Sapporo	2012	79
Nomura W, Tsutsumi H, Narumi T, Tamamura H, et al.	Intense Blue Fluorescence of Tag-probe Systems Based on a Leucine Zipper Assembly	Sakaguchi, K., (Eds.)	<i>Peptide Science 2011</i>	The Japanese Peptide Society	Sapporo	2012	317
鳴海 哲夫, Jeffrey W. Bode	$\alpha$ -ケト酸とヒドロキシアミンの化学選択的な縮合反応によるペプチド合成	木曾良明	最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用	株式会社メデイカルドゥ	大阪	2012	68-75

## 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
Nomura W, Hashimoto C, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	A Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency	<i>ChemMedChem</i>	7	205-208	2012
Narumi T, Komoriya M, Tamamura H, et al.	Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	20	1468-1474	2012
Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	20	3287-3291	2012
Narumi T, Tanaka T, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Pharmacophore-based Small Molecule CXCR4 Ligands	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>	22	4169-4172	2012
Narumi T, Kobayakawa T, Aikawa H, Seike S, and Tamamura H	Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation	<i>Org. Lett.</i>	14	4490-4493	2012
Nomura W, Narumi T, Komano JA, Yamamoto N, Tamamura H. Et al.	Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency	<i>ChemMedChem</i>	7	205-208	2012

Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, and Tamamura H	CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents.	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	21	2518-2526	2013
Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H.	Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers	<i>ChemMedChem</i>	8	118-124	2013

# Stereoselective Formation of Trisubstituted (*Z*)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation

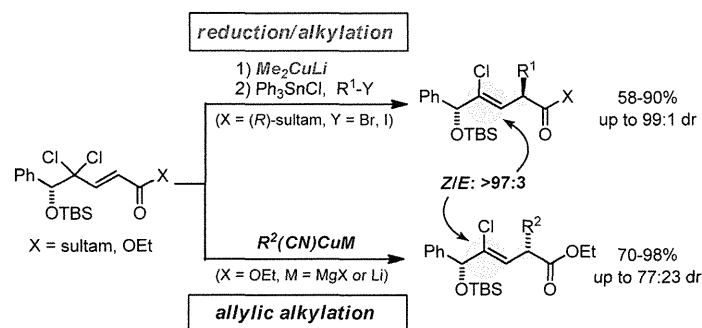
Tetsuo Narumi, Takuya Kobayakawa, Haruo Aikawa, Shunsuke Seike, and Hirokazu Tamamura\*

Department of Medicinal Chemistry, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

tamamura.mr@tmd.ac.jp

Received July 17, 2012

## ABSTRACT



A robust and efficient method for the synthesis of trisubstituted (*Z*)-chloroalkenes is described. A one-pot reaction of  $\gamma,\gamma$ -dichloro- $\alpha,\beta$ -enoyl sultams involving organocuprate-mediated reduction/asymmetric alkylation affords  $\alpha$ -chiral (*Z*)-chloroalkene derivatives in moderate to high yields with excellent diastereoselectivity, and allylic alkylation of internal allylic *gem*-dichlorides is also demonstrated. This study provides the first examples of the use of allylic *gem*-dichlorides adjacent to the chiral center for novel 1,4-asymmetric induction.

Stereoselective formation of functionalized alkenes is a challenging task in organic synthesis, and construction of halogenated alkenes while controlling the geometry of double bonds is of particular interest.<sup>1</sup> Among various halogenated

alkenes, chloroalkenes have attracted considerable interest in recent years,<sup>2–6</sup> not only because of their potential as synthetically valuable intermediates<sup>7</sup> but also because of their importance as structural components of natural products.<sup>8</sup>

(1) (a) Guinchard, X.; Roulland, E. *Synlett* **2011**, 19, 2779. (b) Shen, Y. *ACC. Chem. Res.* **1998**, 31, 584.

(2) For selected reviews of chloroalkene syntheses, see: (a) *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*; Katritzky, A. R., Meth-Cohn, O., Rees, C. W., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1995; Vol. 2, pp 606–619. (b) *Comprehensive Organic Synthesis*; Trost, B. M., Fleming, I., Semmelheck, M. F., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1991; Vol. 4, pp 272–278. (c) *Comprehensive Organic Synthesis*; Trost, B. M., Fleming, I., Schreiber, S. L., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1991; Vol. 1, pp 807–809.

(3) For some examples of trisubstituted (*E*)-chloroalkene syntheses, see: (a) Kigoshi, H.; Kita, M.; Ogawa, S.; Itoh, M.; Uemura, D. *Org. Lett.* **2003**, 5, 957. (b) Trost, B. M.; Pinkerton, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1988.

(4) For examples of terminal (*Z*)-chloroalkene syntheses, see: (a) Giannerini, M.; Fañanás-Mastral, M.; Feringa, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4108. (b) Sashuk, V.; Samojłowicz, C.; Szadkowska, A.; Grela, K. *Chem. Commun.* **2008**, 2468. (c) Barluenga, J.; Moriel, P.; Aznar, F.; Valdés, C. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 347. (d) Baati, R.; Barma, D. K.; Krishna, U. M.; Mioskowski, C.; Falck, J. R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 959 and references cited therein.

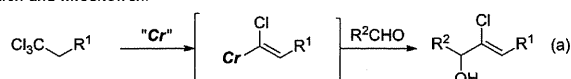
(5) (a) Baati, R.; Barma, D. K.; Falck, J. R.; Mioskowski, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9196. (b) Falck, J. R.; Bandyopadhyay, A.; Barma, D. K.; Shin, D.-S.; Kundu, A.; Kishore, R. V. K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3039. (c) Baati, R.; Barma, D. K.; Falck, J. R.; Mioskowski, C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2183. (d) Su, W.; Jin, C. *Org. Lett.* **2007**, 9, 993.

Despite the utility and importance of chloroalkenes, however, reactions leading to the stereoselective formation of trisubstituted (*Z*)-chloroalkenes are still limited.<sup>5,6</sup> Falck and Mioskowski reported that the reaction of CrCl<sub>2</sub> with 1,1,1-trichloroalkanes leads to the formation of (*E*)-chlorovinylidene chromium carbenoids, which can react with aldehydes to afford (*Z*)-chlorinated allylic alcohols (Scheme 1a).<sup>5a</sup> An alternative method is the Pd-catalyzed cross-coupling of 1,1-dichloro-1-alkenes with organometallic reagents.<sup>6</sup> In particular, Pd-catalyzed couplings with large bite angle bisphosphines such as Xantphos and DPEphos allow the selective formation of (*Z*)-chloroalkenes while avoiding the formation of bis-substituted products as has been described independently by Negishi<sup>6a</sup> and by Roulland<sup>6b-d</sup> (Scheme 1b). While these protocols have found widespread utility for the synthesis of these important structures, the development of efficient systems for stereoselective and divergent synthesis of trisubstituted (*Z*)-chloroalkenes bearing various functionalities remains challenging.

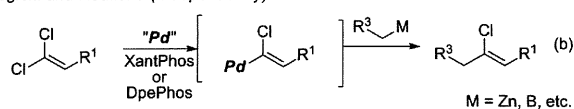
As part of a program aimed at development of novel approaches to chloroalkenes, we envisioned that the organocuprate-mediated reduction<sup>9</sup> of  $\gamma,\gamma$ -dichloro- $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds would permit an efficient access to (*Z*)-chlorinated dienolate intermediates, which can be trapped with an appropriate electrophile, providing trisubstituted (*Z*)-chloroalkenes (Scheme 1c).

### Scheme 1. Synthesis of Trisubstituted (*Z*)-Chloroalkenes

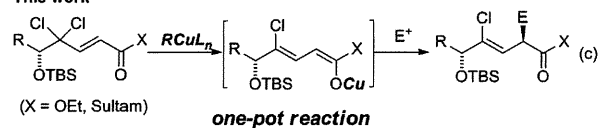
Falck and Mioskowski



Negishi and Roulland (independently)



This work



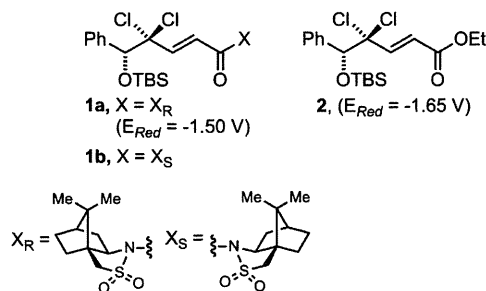
E<sup>+</sup> = electrophile; H<sup>+</sup>, alkyl halides

(6) For selected examples of Pd-catalyzed cross-coupling, see: Cross-coupling with organozincs: (a) Tan, Z.; Negishi, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 762. Cross-coupling with organoborons: (b) Guinchard, X.; Bugaut, X.; Cook, C.; Roulland, E. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 5793. (c) Roulland, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3762. (d) Liron, F.; Fosse, C.; Pernolet, A.; Roulland, E. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2220. Cross-coupling with other organometallics, see ref 1a.

(7) (a) Geary, L. M.; Hultin, P. G. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6354. (b) Bell, M.; Poulsen, T. B.; Jørgensen, K. A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3053. (c) Jones, G. B.; Wright, J. M.; Plourde, G. W., II; Hynd, G.; Huber, R. S.; Mathews, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1937. (d) Alami, M.; Gueugnot, S.; Domingues, E.; Linstrumelle, G. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1209.

In this paper, we describe the stereoselective formation of trisubstituted (*Z*)-chloroalkenes utilizing the organocuprate-mediated reduction/asymmetric alkylation of  $\gamma,\gamma$ -dichloro- $\alpha,\beta$ -enoyl sultam. This is a one-pot reaction which provides in high yield the synthetically valuable compounds containing a (*Z*)-chloroalkene flanking two stereogenic centers, the  $\alpha$ -chiral- $\beta,\gamma$ -unsaturated carbonyl motif, and a chiral allylic alcohol. In addition, we report the first allylic alkylation of *internal* allylic *gem*-dichlorides that provides an alternative method for the diastereoselective synthesis *via* 1,4-asymmetric induction of these important structural motifs.

We prepared sultam **1** and enoate **2** from chiral  $\alpha,\alpha$ -dichloro- $\beta$ -hydroxyester,<sup>10</sup> reported by Imashiro and Kuroda, as suitable substrates for reaction development (Figure 1). At the onset of our studies, it was unclear if the reaction of those substrates with organocuprates would entail reduction, generating the dienolate intermediate. In order to estimate the electron-accepting ability, our investigation started with measurement of the reduction potentials ( $E_{\text{Red}}$ ). The reduction potentials of sultam **1** and enoate **2** were  $-1.50$  and  $-1.65$  V, respectively. Based on these results and House's observation that  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds with reduction potentials between *ca.*  $-2.4$  V and *ca.*  $-1.1$  V can react with organocuprates such as Me<sub>2</sub>CuLi to give the conjugate addition products,<sup>11</sup> these substrates were expected to promote both the single-electron transfer reduction and the allylic alkylation.



**Figure 1.** Substrates for organocuprate-mediated reduction and their reduction potentials ( $E_{\text{Red}}$ ).

In order to control the reaction products, the reactivity of sultam **1a** with organocuprates was examined (Table 1),

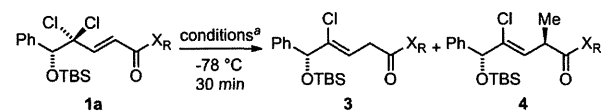
(8) For a recent example of the natural product bearing chloroalkene motif: Ando, H.; Ueoka, R.; Okada, S.; Fujita, T.; Iwashita, T.; Imai, T.; Yokoyama, T.; Matsumoto, Y.; van Soest, R. W. M.; Matsunaga, S. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1947 and also ref 1a.

(9) For selected examples of organocuprate-mediated reduction, see: (a) Narumi, T.; Niida, A.; Tomita, K.; Oishi, S.; Otaka, A.; Ohno, H.; Fujii, N. *Chem. Commun.* **2006**, 4720. (b) Meyers, A. I.; Snyder, L. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3814. (c) Fujii, N.; Habashita, H.; Shigemori, N.; Otaka, A.; Ibuka, T.; Tanaka, M.; Yamamoto, Y. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4969. (d) Takano, S.; Sekiguchi, Y.; Ogasawara, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 449 and references cited therein.

(10) Imashiro, R.; Kuroda, T. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 974. For details of the preparation of sultam **1** and enoate **2**, see the Supporting Information.

(11) House, H. O.; Umen, M. *J. J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2417.



**Table 1.** Reactivity of Sultam **1a** with Organocuprates

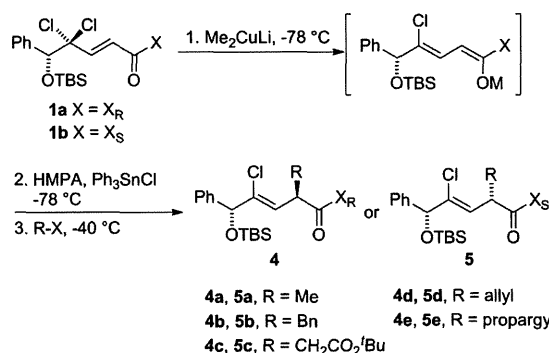
entry	reagents	additives <sup>b</sup>	Z/E of <b>3</b> <sup>c</sup>	<b>3+4</b> , yield (%) <sup>d</sup>	<b>3/4</b> <sup>e</sup>
1	Me <sub>2</sub> CuLi	–	>97:3	81	77:23
2	Me <sub>2</sub> CuLi <sup>e</sup>	–	>97:3	93	>97:3
3	<i>n</i> -Bu <sub>2</sub> CuLi <sup>e</sup>	–	>97:3	99	90:10
4	MeCu(CN)Li	–	>97:3	99	61:39 <sup>f</sup>
5	Me <sub>2</sub> CuLi <sup>e</sup>	TMSCl	>97:3	83	83:17
6	Me <sub>2</sub> CuLi <sup>e</sup>	BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub>	>97:3	91	31:69
7	Me <sub>2</sub> CuLi <sup>e</sup>	HMPA	>97:3	76	>97:3
8	Me <sub>2</sub> Cu(CN)Li <sub>2</sub>	–	>97:3	99	>97:3

<sup>a</sup> All reactions were carried out on a 0.1 mmol scale with 4 equiv of organocuprates in the presence of Li salts. <sup>b</sup> 4 equiv. <sup>c</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR. <sup>d</sup> Yields of isolated products. <sup>e</sup> Higher order cuprates (ca. 0.4 equiv) were contained. <sup>f</sup> Diastereomeric ratio (dr) = 97:3.

and as expected, exposure of **1a** to Me<sub>2</sub>CuLi followed by protic workup afforded a mixture of the reduced compound **3** and the  $\alpha$ -alkylated product **4** in high yield (81%, entry 1). Significantly, excellent Z-selectivity was observed.<sup>12</sup> The use of a 2.4:1 MeLi·LiBr/CuI mixture enabled selective reduction, providing pure reduced compound **3** in excellent yield (93%, entry 2). Changing the methyl group of alkyl ligands to an *n*-butyl group resulted in decreased selectivity (entry 3). Although the reaction with lower order cyanocuprate or Me<sub>2</sub>CuLi with TMSCl did not furnish better selectivity, addition of BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> led to the preferable formation of  $\alpha$ -alkylated product **4** (entries 4–6). In contrast, the reaction with HMPA provided excellent selectivity to the reduction but a decreased yield (76%, entry 7). The best result was obtained with higher order cyanocuprate, derived from CuCN·2LiCl and 2 equiv of MeLi·LiBr, which gave **3** in excellent yield and selectivity (entry 8). Having identified higher order cyanocuprate as the preferred reducing agent, we selected the Gilman reagent (Me<sub>2</sub>CuLi) as an optimal reducing agent because of the sufficient reactivity and selectivity to reduction.

The optimized reduction condition in Table 1 (entry 2) was applied to the one-pot reduction/asymmetric alkylation (Table 2). Previous studies have revealed that the transmetalation from Cu and/or Li dienolate intermediates to the more reactive Sn dienolate intermediates is critical for smooth alkylation.<sup>9a</sup> A variety of alkyl halides were allowed to react with the (Z)-chlorinated dienolate intermediate to provide chloroalkenes **4a–4e** flanking two stereogenic centers in moderate to high yield with >97% Z-selectivity. HPLC analysis showed that all the reactions

(12) A NOESY cross-peak was observed between the olefinic proton and the allylic stereogenic center, suggesting that the geometry of the double bond was defined as shown; see the Supporting Information.

**Table 2.** One-Pot Reduction/Asymmetric Alkylation of (R)-Sultam **1a** and (S)-Sultam **1b**<sup>a</sup>

entry	substrate	R–X	<b>4</b> or <b>5</b> , yield (%) <sup>b</sup>	dr (%) <sup>c</sup>
1	<b>1a</b>	MeI	<b>4a</b> , 58	97:3
2 <sup>d</sup>	<b>1a</b>	BnBr	<b>4b</b> , 83	99:1
3	<b>1a</b>	BrCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>t</sup> Bu	<b>4c</b> , 90	97:3
4	<b>1a</b>	allylBr	<b>4d</b> , 81	97:3
5 <sup>d</sup>	<b>1a</b>	propargylBr	<b>4e</b> , 82	>95:5 <sup>e</sup>
6	<b>1b</b>	MeI	<b>5a</b> , 60	99:1
7	<b>1b</b>	BnBr	<b>5b</b> , 86	95:5
8	<b>1b</b>	BrCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>t</sup> Bu	<b>5c</b> , 57	97:3
9	<b>1b</b>	allylBr	<b>5d</b> , 70	97:3
10 <sup>d</sup>	<b>1b</b>	propargylBr	<b>5e</b> , 46	>95:5 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> All reactions were carried out with 4 equiv of organocuprates, 16 equiv of HMPA, 2 equiv of Ph<sub>3</sub>SnCl, and 8 equiv of alkyl halide. <sup>b</sup> Yields of isolated products. <sup>c</sup> Determined by HPLC. <sup>d</sup> At –30 °C. <sup>e</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR.

proceeded with excellent diastereoselectivity. The reactions with methyl iodide and benzyl bromide provided the corresponding  $\alpha$ -alkylated products **4a** and **4b** in 58% and 83% yields, respectively (entries 1 and 2), and the absolute configuration of **4a** was confirmed by single-crystal X-ray analysis (Figure 2). Importantly, this strategy is amenable to the introduction of functional groups such as ester, allyl, and propargyl groups suitable for further transformation. Treatment of dienolate with *tert*-butyl bromoacetate and allyl bromide afforded the desired (Z)-chloroalkenes **4c** and **4d** with ester and allyl functionality, in high yields (entries 3 and 4). Propargyl bromide also gave the corresponding (Z)-chloroalkene **4e** in moderate yield (entry 5). In addition, this one-pot strategy can be applied to (S)-sultam **1b**, providing the corresponding chloroalkenes **5a–5e** in moderate to high yields (entries 6–10).

Finally, alkylation of allylic *gem*-dichlorides was examined. Recently, Feringa reported that terminal allylic *gem*-dichlorides undergo Cu-catalyzed asymmetric allylic alkylation with Grignard reagents affording (Z)-chloroalkenes bearing an allylic stereogenic center with excellent regio- and enantioselectivity.<sup>4a</sup> Guided by this work, we attempted Cu-catalyzed S<sub>N</sub>2'-type alkylation with  $\gamma$ ,  $\gamma$ -dichloro- $\alpha,\beta$ -enoate **2**, but these conditions did not work for enoate **2**, possibly due to the lower reactivity of the

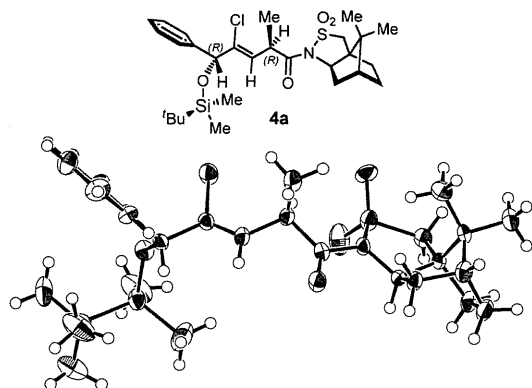
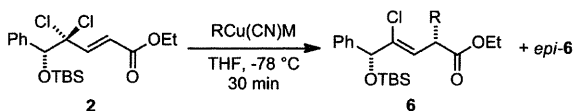


Figure 2. ORTEP representation of **4a**.

Table 3. Diastereoselective Allylic Alkylation of  $\gamma,\gamma$ -Dichloro- $\alpha,\beta$ -enoate **2** by 1,4-Asymmetric Induction<sup>a</sup>



entry	RCu(CN)M	Z/E <sup>b</sup>	<b>6</b> , yield (%) <sup>c</sup>	dr <sup>d</sup>
1	MeCu(CN)Li	>97:3	<b>6a</b> , 98	74:26
2	EtCu(CN)MgBr	>97:3	<b>6b</b> , 96	66:34
3	BnCu(CN)MgCl	>97:3	<b>6c</b> , 70	77:23
4	<sup>t</sup> BuCu(CN)MgCl	>97:3	<b>6d</b> , 95	69:31

<sup>a</sup> All reactions were carried out on a 0.2 mmol scale with 4 equiv of organocuprates in the presence of Li salts. <sup>b</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR. <sup>c</sup> Yields of isolated products. <sup>d</sup> Determined by HPLC.

internal allylic system (see Supporting Information). Attention was therefore turned to the organocuprate-mediated allylic alkylation. As presented in Table 1 (entry 4), the lower order cyanocuprate (MeCu(CN)Li) promotes the allylic alkylation preferably to provide the  $\alpha$ -methylated product **4a** with excellent diastereoselectivity (dr = 97:3). Extensive experimentation with MeCu(CN)Li revealed that the electron transfer from organocuprates

(13) See the Supporting Information for details.

(14) At the present stage of our understanding, the steric repulsions between the olefinic proton at C3 and the Ph group at C5 may destabilize the reactive conformer, which would lead to the (2*R*)-isomer. DFT calculations also suggest that the reactive conformer to the (2*S*)-isomer is favored by 4.42 kJ/mol over the conformer to the (2*R*)-isomer. See the Supporting Information.

competes significantly with allylic alkylation of the sultam **1a**, and the exclusive formation of **4a** was not realized. During the course of our studies on the allylic alkylation, we considered that the chiral center at C5 adjacent to the allylic *gem*-dichloride might induce the diastereoselectivity without chiral auxiliaries.

This hypothesis was tested with the enoate **2**. As shown in Table 3, treatment of **2** with MeCu(CN)Li afforded the  $\alpha$ -methylated  $\beta,\gamma$ -enoate **6a** in 98% yield as a 74:26 mixture of diastereomers with excellent *Z*-selectivity. The major isomer was the (2*S*)-isomer, identified by the correlation with the same compound **6a**, prepared from the corresponding (*S*)-sultam-derived compound **5a**.<sup>13</sup> Similar results were obtained using EtCu(CN)MgBr, BnCu(CN)MgCl, and <sup>t</sup>BuCu(CN)MgCl affording the corresponding  $\alpha$ -alkylated chloroalkenes **6b–d** in high yields with similar selectivities (entries 2–4). Although the observed diastereoselectivity has not been rationalized,<sup>14</sup> these results suggest that stereochemistry at C2 can be controlled by the chiral center at C5 via 1,4-asymmetric induction.

In conclusion, we have described a one-pot organocuprate-mediated reduction/asymmetric alkylation of  $\gamma,\gamma$ -dichloro- $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds. This protocol allows not only the exclusive formation of tri-substituted (*Z*)-chloroalkenes in high yields but also the construction of an  $\alpha$ -stereogenic center with excellent diastereoselectivity. The resulting products are notable for their high functionality and can perform as a potentially useful intermediate for this important class of molecules. In addition, we have identified a unique reactivity of substrates containing an allylic *gem*-dichloride system with organocuprates. These findings have proven to be useful for the development of novel reactions based on these classes of molecules. Efforts to elucidate the origin of novel 1,4-asymmetric induction and to extend this work to the diastereoselective synthesis of peptidomimetics with a chloroalkene moiety are currently in progress.

**Acknowledgment.** This research was supported in part by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and a grant from SENSHIN Medical Research Foundation. We are grateful to Prof. Shigeru Nishiyama and Dr. Tsuyoshi Saito (Keio University) for their assistance in the measurement of the reduction potentials.

**Supporting Information Available.** Representative procedures, characterization data, cif file of compound **4a**, and copies of NMR and HPLC spectra. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

The authors declare no competing financial interest.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmcl](http://www.elsevier.com/locate/bmcl)

## Pharmacophore-based small molecule CXCR4 ligands

Tetsuo Narumi<sup>a</sup>, Tomohiro Tanaka<sup>a</sup>, Chie Hashimoto<sup>a</sup>, Wataru Nomura<sup>a</sup>, Haruo Aikawa<sup>a</sup>, Akira Sohma<sup>a</sup>, Kyoko Itotani<sup>a</sup>, Miyako Kawamata<sup>b</sup>, Tsutomu Murakami<sup>b</sup>, Naoki Yamamoto<sup>c</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

<sup>b</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

<sup>c</sup>Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 117597, Singapore

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 March 2012

Revised 4 April 2012

Accepted 7 April 2012

Available online 20 April 2012

#### Keywords:

HIV entry inhibitors

Chemokine receptor

AIDS

Low molecular weight CXCR4 ligands

### ABSTRACT

Low molecular weight CXCR4 ligands were developed based on the peptide T140, which has previously been identified as a potent CXCR4 antagonist. Some compounds with naphthyl, fluorobenzyl and pyridyl moieties as pharmacophore groups in the molecule showed significant CXCR4-binding activity and anti-HIV activity. Structure–activity relationships were studied and characteristics of each of these three moieties necessary for CXCR4 binding were defined. In this way, CXCR4 ligands with two types of recognition modes for CXCR4 have been found.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

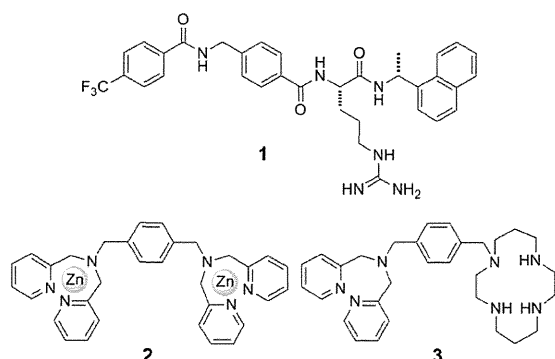
The chemokine receptor CXCR4 is classified into a family of G protein-coupled receptors (GPCRs), and transduces signals of its endogenous ligand, CXCL12/stromal cell-derived factor-1 (SDF-1).<sup>1</sup> The CXCR4–CXCL12 axis plays a physiological role in chemotaxis,<sup>2</sup> angiogenesis<sup>3</sup> and neurogenesis<sup>4</sup> in embryonic stages. The CXCR4 receptor is linked to many disorders including HIV infection/AIDS,<sup>5</sup> metastasis of cancer cells,<sup>6</sup> leukemia cell progression,<sup>7</sup> rheumatoid arthritis.<sup>8</sup> Since CXCR4 is an important drug target in these diseases, it is thought that effective agents directed to this receptor may be useful leads for therapeutic agents. To date, we and others have developed several potent CXCR4 antagonists. A highly potent antagonist, T140, a 14-mer peptide with a disulfide bridge, and its downsized analogue, FC131, with a cyclic pentapeptide scaffold, and several other related compounds have been reported.<sup>9</sup> Based on T140 and FC131, small-sized linear anti-HIV agents such as ST34 (**1**) have been developed (Fig. 1).<sup>10</sup> AMD3100,<sup>11</sup> KRH-1636,<sup>12</sup> Dpa–Zn complex (**2**)<sup>13</sup> and other azamacrocyclic compounds such as **3**,<sup>14</sup> which like **1**, contain benzylamine and electron-deficient aromatic groups, have also been reported as nonpeptidic antagonists. Compound **1** possesses significant anti-HIV activity but does not have high CXCR4 binding affinity. In the present study, more effective linear CXCR4 antagonists derived from compound **1** have been examined, and structure–activity relationship studies of these compounds have been performed.

Initially, three segments of compound **1** were selected for structural modification to support the design of new synthetic compounds: replacement of the 4-trifluoromethylbenzoyl group (Fig. 2, R<sup>1</sup>), modification of the stereochemistry of the 1-naphthylethylamine moiety (R<sup>2</sup>) and introduction of pyridine moieties on the nitrogen atom (R<sup>3</sup>). In a previous study of T140 analogues, 4-fluorobenzoyl was found to be superior to 4-trifluoromethylbenzoyl as an N-terminal moiety. Thus, 4-fluorobenzyl, 4-fluorobenzoyl and 4-fluorophenylethyl groups were used as substitutes for the 4-trifluoromethylbenzoyl group (R<sup>1</sup>) in **1**. The (R)-1-naphthylethylamine moiety in **1** is also present in KRH-1636 where it has the (S)-stereochemistry and thus both the (R) and (S)-stereoisomers were investigated in the present study. Several CXCR4 antagonists such as KRH-1636,<sup>12</sup> Dpa–Zn complex (**2**)<sup>13</sup> and Dpa-cyclam compound (**3**),<sup>14</sup> contain pyridyl rings. Thus, 2, 3, or 4-pyridylmethyl and 2, 3, or 4-pyridylethyl groups were introduced on the nitrogen atom of the 4-aminomethylbenzoyl group (R<sup>3</sup>). With these modifications, a total of 3 × 2 × 6 = 36 compounds (**12–47**) were designed (Fig. 2).

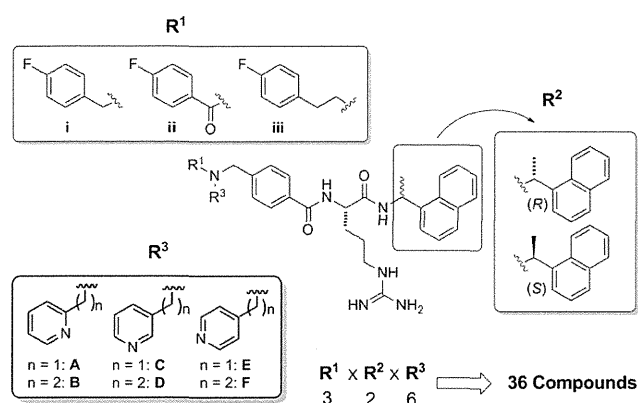
The synthesis of the structural fragment, Unit 1 is shown in Scheme 1. N-nosylation of 4-amino-methylbenzoic acid (**4**) with 2-nitrobenzenesulfonyl chloride and subsequent esterification gave the *t*-butyl ester **5**. Introduction of an R<sup>3</sup> moiety by means of a Mitsunobu reaction followed by removal of the Ns group yielded amines **6A–F**. Introduction of either 4-fluorobenzyl or 4-fluorophenylethyl groups by reductive amination of **6A–F** produced amines **7Ai–Fi** or **7Aii–Fii**, respectively. Conversion of **6A–F** to the appropriate amide (**7Aii–Fii**), and subsequent deprotection of the *tert*-butyl group yielded Unit 1, **8Ai–Fii**.

\* Corresponding author.

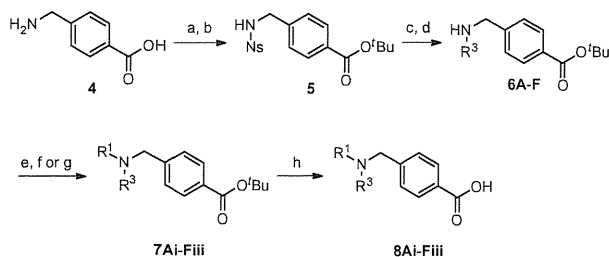
E-mail address: [tamamura.mr@tmd.ac.jp](mailto:tamura.mr@tmd.ac.jp) (H. Tamamura).



**Figure 1.** The structures of **1** (ST34), Dpa-Zn complex (**2**) and Dpa-cyclam compound (**3**).



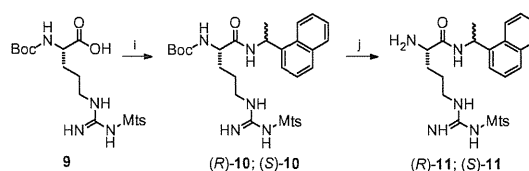
**Figure 2.** The structures of substituents for three parts of compound **1** in the design of new compounds.



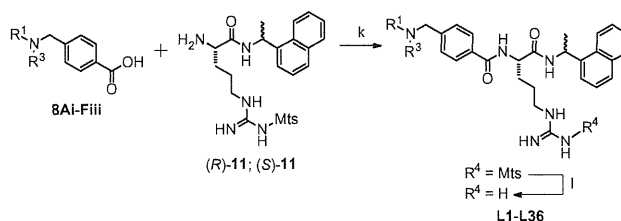
**Scheme 1.** The synthetic scheme of Unit 1, compounds **8Ai-Fiii**. Reagents and conditions and yields: (a)  $\text{NsCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  (1/1); (b) isobutene,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{SO}_4$  (10/1), 39% (2 steps); (c)  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{DEAD}$ ,  $\text{R}^3\text{OH}$ ,  $\text{THF}$ ; (d)  $\text{PhSH}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{DMF}$ , 42–92% (2 steps); (e)  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , 4-fluorobenzaldehyde,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (f)  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , (4-fluorophenyl)acetaldehyde,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (g) 4-fluorobenzoyl chloride,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 51–94%; (h) TFA then 4 M  $\text{HCl}/\text{EtOAc}$ , quantitative; The structures of  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^3$  are shown in Fig. 2 as i–iii and A–F, respectively.  $\text{Ns}$  = 2-nitrobenzenesulfonyl,  $\text{tBu}$  = *tert*-butyl,  $\text{DEAD}$  = diethyl azodicarboxylate.

The synthesis of Unit 2 is shown in Scheme 2. Condensation of  $\text{Boc-Arg}(\text{Mts})\text{-OH}$  (**9**) and (*R*)-1-naphthylethylamine or its (*S*) isomer produced amides (*R*)-**10** or (*S*)-**10**. Removal of the  $\text{Boc}$  group gave Unit 2, (*R*)-**11** and (*S*)-**11**.

Compounds **12–47** were synthesized by amide condensation of Unit 1, **8Ai-Fiii**, with Unit 2, (*R*)-**11** and (*S*)-**11**, and subsequent deprotection of the  $\text{Mts}$  group, as shown in Scheme 3.<sup>15</sup> All the synthetic compounds were purified by preparative reverse phase HPLC. In cases where peaks derived from side products appeared around the target peaks on the HPLC profile, the precise analysis was accomplished, giving rise to lower yields (Scheme 3, l).



**Scheme 2.** Synthetic schemes of Unit 2, compounds (*R/S*)-**11**. Reagents and conditions: (i)  $\text{EDCI}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , (*R/S*)-(+/-)-1-(1-naphthyl)ethylamine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 83–97%; (j) TFA then 4 M  $\text{HCl}/\text{EtOAc}$ , quantitative;  $\text{EDCI}\cdot\text{HCl}$  = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride,  $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$  = 1-hydroxybenzotriazol monohydrate,  $\text{Mts}$  = 2,4,6-trimethylphenylsulfonyl,  $\text{Boc}$  = *tert*-butoxycarbonyl.



**Scheme 3.** Synthetic schemes of compounds **12–47**. Reagents and conditions: (k)  $\text{EDCI}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{DMF}$ , 36–95%; (l)  $\text{TMSBr}$ , *m*-cresol, 1,2-ethanedithiol, thioanisole, TFA, 4–54%. The structures of  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^3$  are shown in Figure 2 as i–iii and A–F, respectively.

The CXCR4-binding activity of synthetic compounds was assessed in terms of the inhibition of [ $^{125}\text{I}$ ]-CXCL12 binding to Jurkat cells, which express CXCR4.<sup>16</sup> The percent inhibition of all the compounds at 10  $\mu\text{M}$  is shown in Table 1. Several of the compounds showed significant binding affinity. In general, compounds in which the 1-naphthylethylamine moiety ( $\text{R}^2$ ) has the (*S*)-stereochemistry, as in KRH-1636, are more potent than the (*R*)-stereoisomers. Ten compounds (**26–28**, **30**, **33**, **36**, **39**, **44**, **45** and **47**, Table 1) were found to induce at least 30% inhibition and compounds **26**, **27** and **33**, which have a pyridyl group with a nitrogen atom at the  $\beta$ -position, showed more than 60% inhibition. It is noteworthy that compounds **26** and **27** in which  $\text{R}^2$  is a (*R*)-1-naphthylethylamine moiety, are both more potent than the corresponding (*S*)-stereoisomers **44** and **45**. Compounds **26**, **27** and **33**, have a 4-fluorobenzyl or 4-fluorophenylethyl group, which rather than an amide, is a reductive alkyl type ( $\text{R}^1$ ). As can be seen from Table 1, there is a tendency for compounds with a pyridyl group with a nitrogen atom at the  $\beta$ -position ( $\text{R}^3$ : C or D), to be more potent in terms of CXCR4-binding activity than the corresponding compounds, which have a pyridyl group with a nitrogen atom at the  $\alpha$ - or  $\gamma$ - position ( $\text{R}^3$ : A, B, E or F), and those with a reductive alkyl 4-fluorobenzyl or 4-fluorophenylethyl group ( $\text{R}^1$ : i or iii), to be more potent in CXCR4-binding activity than the corresponding compounds, with a 4-fluorobenzoyl group ( $\text{R}^1$ : ii).

Compounds were next evaluated for anti-HIV activity and cytotoxicity. CXCR4 is the major co-receptor for the entry of T-cell line-tropic (X4-) HIV-1.<sup>5</sup> Accordingly, inhibitory activity against X4-HIV-1 (NL4-3 strain)-induced cytopathogenicity in MT-4 cells (anti-HIV activity), and reduction of the viability in MT-4 cells (cytotoxicity) were assessed<sup>16</sup> and are shown in Table 1. Compounds **26** and **33–35** showed significant anti-HIV activity with  $\text{EC}_{50}$  values in the micromolar range. Compounds **26** and **33** showed both potent CXCR4-binding activity (79% and 60% inhibition at 10  $\mu\text{M}$ , respectively) and anti-HIV activity ( $\text{EC}_{50}$  = 11 and 13  $\mu\text{M}$ , respectively), the two activities being highly correlated. Compounds **34** and **35** have significant anti-HIV activity with  $\text{EC}_{50}$  values of 8 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively, which is higher than CXCR4-binding activities, which are 16% and 20% inhibition at 10  $\mu\text{M}$ , respectively. Compound **27**, which showed relatively high CXCR4-binding activity (69% inhibition at 10  $\mu\text{M}$ ), failed to show