

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：32622
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790141
研究課題名（和文）糖部 4' 位に置換基を有するヌクレオシド誘導体の新規合成法の開発と生物活性評価
研究課題名（英文）Synthesis and anti-viral evaluation of 4'-substituted nucleoside derivatives
研究代表者 窪田 豊 (KUBOTA YUTAKA) 昭和大学・薬学部・助教 研究者番号：50365714

研究成果の概要（和文）：

本研究は新規抗ウイルス剤及び抗腫瘍剤の創製を目的とし、糖部 4' 位に置換基を有するコルジセピン誘導体の合成法の開発を行った。鍵段階としてオレフィンに対するヒドロフェニルスルフェニル化を用い、引き続き官能基変換により多数の新規コルジセピン誘導体の合成に成功した。得られた 4' 位置換コルジセピン誘導体の生物活性評価を行い、抗ウイルス活性を有する化合物を見出した。

研究成果の概要（英文）：

With an aim to discovery of novel anti-viral/tumor agents, I have developed a new method for the synthesis of 4'-substituted cordycepin derivatives by substitution of a phenylsulfanyl leaving group. Anti-viral evaluation of 4'-substituted cordycepin found some compounds having an activity against RNA virus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

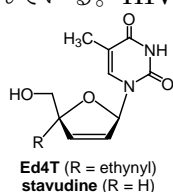
科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

医療の進化した現代社会においても、治療薬の無い疾患が多く存在する。特に最近では新型インフルエンザの流行が社会を脅かし、犠牲者を増やし続けている。将来的には、多剤耐性結核菌の蔓延が危惧されている。HIV に関しても感染者増加が著しい中、未だこのウイルスを駆逐する薬剤は開発されていない。

現在、多くの化学修飾ヌクレオシドが抗ウイルス剤として臨床で用いられている。しかしながら、心筋等に対する副作用や耐性ウイルスの発現など、多くの課題が残されている。近年、当研究室で開発された Ed4T は母化合物である stavudine よりも強力な抗 HIV 活性を有し、且つ細胞毒性が低いことが見出された。

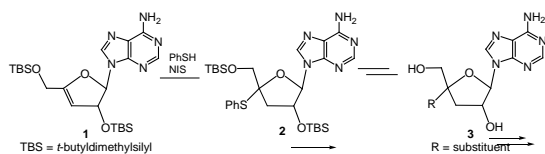


本化合物の発見を契機として、糖部 4' 位に置換基を有するヌクレオシド誘導体の合成法の開発と、その生物活性に興味を持たれ始めた。

2. 研究の目的

新規抗ウイルス剤及び抗腫瘍剤の創製を目的とする、糖部修飾型ヌクレオシド誘導体の新規合成法の開発を検討してきた。その過程で、3',4'-不飽和アデノシン誘導体(1)に対し、N-ヨードコハク酸イミド(NIS)の存在下、チオフェノール(PhSH)を反応させると、糖部 4' 位にベンゼンスルフェニル基を有するコルジセピン誘導体(2)が見出された。本反応は新しいタイプの親電子付加反応であり、反応機構に興味を持たれた。得られた 4'-ベンゼンスルフェニルコルジセピン誘

導体は、様々な化学変換を行うことで、生物活性的に興味深い、新たな4'位置換コルジセピン誘導体(3)を合成することが可能である。

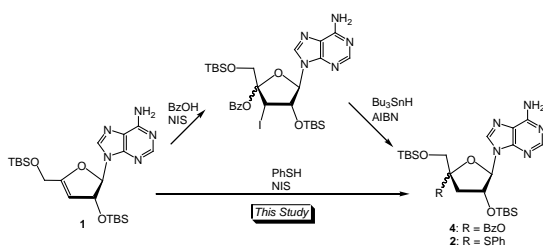


本研究では、ヒドロフェニルスルフェニル化(1→2)の反応機構の検討、化合物2の化学変換及び得られた新規4'位置換コルジセピン(3)の生物活性評価を目的とした。

3. 研究の方法

基質となる3',4'-不飽和アデノシン誘導体(1)は当研究室で開発した方法により、アデノシンから4工程を経て調製した。すなわち、アデノシンの3'位の臭素化と引き続き脱離反応により、3',4'-不飽和誘導体とした。この化合物をメタノール性アンモニアで脱保護した後、TBS基で水酸基を保護することで化合物1を得た。

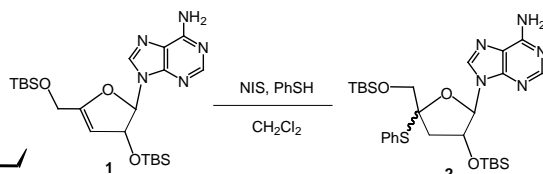
当研究室では既に、化合物1に対するNIS存在下、安息香酸による求電子付加反応と引き続きラジカル的な脱ヨウ素化による、4'-ベンゾイルオキシコルジセピン4の合成を報告している。今回本研究においては、化合物1に対する求電子付加反応において、安息香酸の代わりにチオフェノールを求核剤として用いてみた。すると予期に反して、3'位にヨウ素原子を欠く4'-フェニルスルファニルコルジセピン誘導体2がβ-Dとα-Lの混合物として得られた。



化合物2の構造決定を行うにあたっては、プロトンNMRチャートの2~3 ppm付近に水素原子2つ分のダブルダブレットのピークが認められたことから、糖部3'位にはヨウ素原子ではなく水素原子が付加していることから推測した。続いて測定したFAB-MSの588という結果により、それを確認することができた。混合物4を高速液体クロマトグラフィーにより分離精製し、NOE実験によりそれぞれの立体化学を決定した。

化合物4の4'位のフェニルスルファニル基を脱離基として用い求核置換反応を行え

ば、以前開発した方法より短工程で4'-位置換コルジセピンを合成できると考え、本反応の最適化を行った。

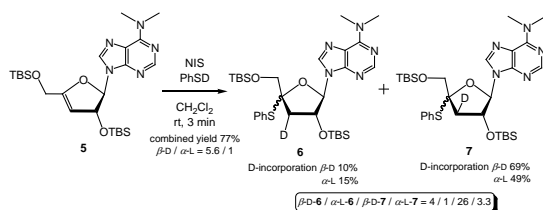


entry	NIS (equiv)	PhSH (equiv)	time (min)	temp.	yield (%)	ratio of isomers
1	3	3	3	rt	62	2.3/1
2	3	1.5	3	rt	trace	
3	3	6	3	rt	71	6.6/1
4	2	6	3	rt	79	6.6/1
5	1	6	3	rt	0	
6	3	6	3	0°C	54	2.5/1
7	3	6	10	rt	76	5.9/1

まず、チオフェノールの当量数の検討を行った。チオフェノールの当量数を1.5当量とした場合には反応はほとんど進行しなかったが、3当量及び6当量にした場合には、4'-フェニルスルファニル体4を良好な収率で得ることができた。また、チオフェノールの当量数を上げることで、得られる化合物2の立体選択性が向上することがわかった。次に、NISの当量数を検討した。2当量のNISを用いても、反応結果に大きな変化は見られなかったが、1当量の場合、反応は全く進行せず、原料回収に終わった。反応を0度で行うと、収率、立体選択性ともに低くなった。また、反応時間を3分間から10分間に延長しても反応結果に大きな変化はなかった。

本反応の反応機構を調べる目的で、更なる検討を重ねた。まず、チオフェノールのナトリウム塩を用いて反応を行ったところ、原料回収に終わった。また、塩基であるDMAPを添加し反応を行ったところ、こちらも原料を回収した。次に、NISの代わりにN-クロロコハク酸イミドやN-ブromoコハク酸イミド、ヨウ素を用いて反応を行った。その結果、ヨウ素を用いた場合のみ、化合物2が中程度の収率で得られた。

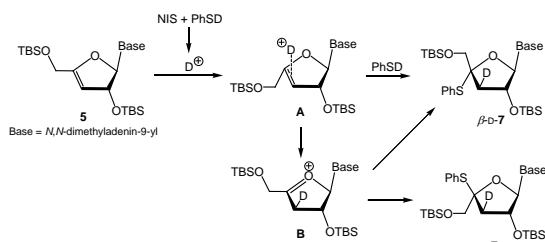
次に、重水素化実験を行った。3',4'-不飽和アデノシン誘導体1のアミノ基が持つ2つの水素原子は、重水素と交換可能なため、予めメチル基で保護した化合物5を基質として用いることとした。



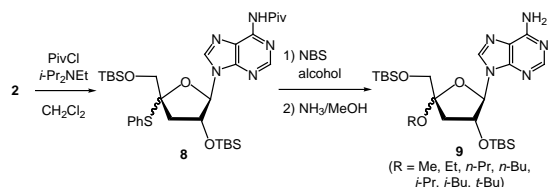
D-incorporation β-D 10%
α-L 15%
β-D/α-L = 5.6/1

D-incorporation β-D 69%
α-L 45%
β-D/α-L = 4/1/26/33

化合物 **5** に対して、NIS と重水素化されたチオフェノールを反応させると、3'位に重水素が導入された 4'-フェニルスルファニル体 **6**、**7** が得られた。得られた化合物はジアステレオマーの混合物であり、その立体選択性は 5.6/1 であった。また、NMR の積分値より、得られた 4 種類の化合物の生成比を算出した。その結果、 β -D 体、 α -L 体いずれにおいても、重水素が糖の β 面から付加した化合物 **7** がより多く生成したことがわかった。この結果より以下の反応機構を推定した。化合物 **7** の生成を例にとり説明する。まず、NIS と PhSD からデューテリウムカチオンが生成し、それが基質 **5** と反応することで中間体 **A** ができる。この中間体に PhSD が求核的に攻撃することで、 β -D-**7** が生成する。またこれとは別に、カチオン中間体 **A** からオキソニウムカチオン中間体 **B** になり、それに対する PhSD の求核的な攻撃により、 β -D-**7**、 α -L-**7** の 2 種類の生成物ができる経路も存在すると推測した。この時、オキソニウムカチオン中間体 **B** から β -D 体がより多く生成するのは、アデニン塩基の立体障害により、PhSD の α 面からの攻撃が優位に起こる為と考えられる。



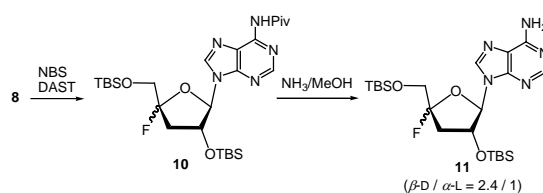
次に、4'位への置換基の導入を検討した。過去の知見に基づき、4'-フェニルスルファニルコルジセピン誘導体 **2** を基質に用い、NBS とアルコールを反応させることにより、4'-アルコキシコルジセピン誘導体の合成を試みた。アデニン塩基部の臭素化を防ぐ目的で、6 位のアミノ基をピバロイル基で保護し **8** とした後、NBS の存在下、種々のアルコールを



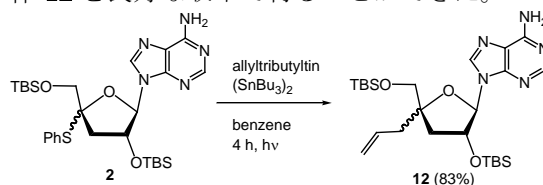
entry	alcohol	R	yield (%)	ratio of isomers (β -D / α -L)
1	MeOH	Me	93	1.6 / 1
2	EtOH	Et	86	1.5 / 1
3	<i>n</i> -PrOH	<i>n</i> -Pr	99	1.9 / 1
4	<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Bu	91	1.8 / 1
5	<i>i</i> -PrOH	<i>i</i> -Pr	98	2.0 / 1
6	<i>i</i> -BuOH	<i>i</i> -Bu	100	2.3 / 1
7	<i>t</i> -BuOH	<i>t</i> -Bu	88	2.6 / 1

反応させた。得られた生成物はジアステレオマーの混合物であり、分離精製が困難であったため、メタノール性アンモニアでピバロイル基を脱保護した。その結果、対応する 4'-アルコキシコルジセピン誘導体 **9** を良好な収率で得ることができた。

上記の方法を用いて、フッ素原子の導入を検討した。化合物 **8** に対し、NBS の存在下、三フッ化 *N,N*-ジエチルアミノ硫黄(DAST)を加え攪拌したところ、75%の収率で目的とする 4'-フルオロコルジセピン誘導体 **10** を得ることができた。得られて化合物 **10** はジアステレオマーの混合物であり、分離精製が困難であったため、メタノール性アンモニアでピバロイル基を脱保護し **11** とした後、HPLC で精製した。化合物 **11** の立体化学は NOE 実験に基づき決定した。

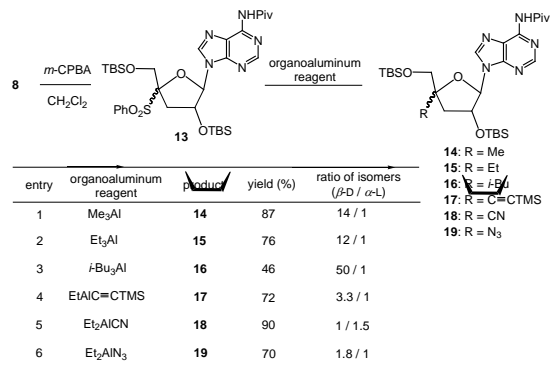


炭素 - 硫黄結合を有する化合物は、スズラジカルにより容易に炭素ラジカルを発生し得ることが知られている。そこで、化合物 **2** に対するラジカル反応を用いた炭素置換基の構築を検討した。すなわち、化合物 **2** にアリトリブチルスズとラジカル開始剤であるビストリブチルスズを加え、光照射下 4 時間放置した。その結果、目的とする 4'-アリル体 **12** を良好な収率で得ることができた。



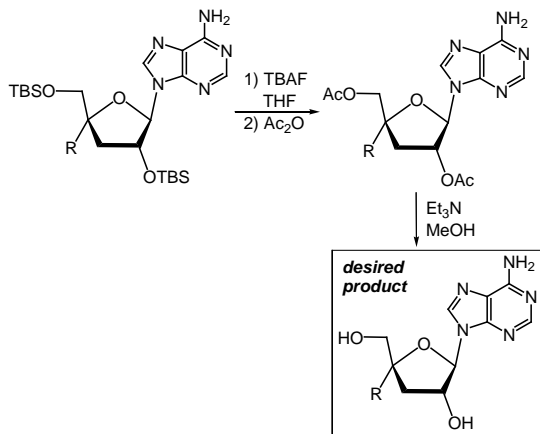
環状エーテルの α 位に結合するベンゼンスルホン基に対する、トリメチルアルミニウムによる求核置換反応が既に報告されている。そこで、4'-ベンゼンスルファニル体 **2** の酸化により得られるスルホンに対し、有機アルミニウム試剤を反応させることで、4'-置換コルジセピン誘導体を合成することを考えた。

まず、*M*-オキシドの形性を防ぐため、アミノ基をピバロイル基で保護した化合物 **8** をメタクロロ過安息香酸 (*m*-CPBA) で酸化し、4'-ベンゼンスルホン酸 **13** を得た。このスルホン **13** を基質に用い、種々の有機アルミニウム試剤を反応させた。その結果、メチル基などのアルキル基のみならず、エチル基やシアン基も導入することができた。また、ジエチルアルミニウムアジドを用いることで、4'-

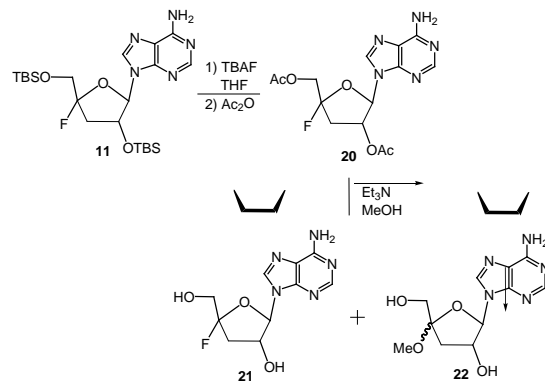


アジド体を良好な収率で得ることができた。

これまでに合成した 4'-置換コルジセピン誘導体の脱保護を行った。アデニン環のアミノ基がピバロイル基で保護されている場合は、メタノール性アンモニアで脱保護し、また、ジアステレオマーの混合物は HPLC で分離精製した。最終目的物の精製を容易にするため、テトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) で TBS 基を脱保護した後、one-pot で無水酢酸を加え、アセチル体とした。これに対し、メタノール中トリエチルアミンの条件に付すことでアセチル基を脱保護し、目的とする 4'置換コルジセピンの合成に成功した。



4'-フルオロコルジセピン誘導体 **11** の脱保護において、アセチル体 **20** にトリエチルアミンとメタノールを加え攪拌したところ、目的の 4'-フルオロコルジセピン **21** と共に 4'-メトキシ体 **22** が得られた。これは、一部の化合物 **21** が脱アセチル化中もしくはカラムクロマトグラフィーによる精製中のメタノールによる加溶媒分解を起し、副生成物 **22** となったと考えられる。4'-フルオロコルジセピン **21** が不安定であることが分かり、脱アセチル化やカラムクロマトグラフィーにおける種々の検討を行ったが、解決するには至らなかった。従って、4'-フッ素体については、アセチル体 **20** での生物活性の測定を行うことにした。



合成した 34 種類の 4'-置換コルジセピンの抗ウイルス活性及び細胞増殖抑制活性を測定した。その結果、4'-ベンゼンスルホニルコルジセピン **23** と 4'-フルオロコルジセピン誘導体 **20** が水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus) 及びコクサッキーウイルス B4 に対し阻害活性を示すことがわかった。水疱性口内炎ウイルス及びコクサッキーウイルス B4 は共に RNA ウイルスであり、前者は家畜に伝染性水疱性口内炎を引き起こし、後者は主に幼児にヘルパンギーナや心筋炎などの原因となることが知られている。

compound	Minimum cytotoxic concentration (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	
		Vesicular stomatitis virus	Coxsackie virus B4
23	>100	12	34
20	>100	20	45

また、4'-フルオロコルジセピン誘導体 α -L-**20** がマウス白血病細胞及びヒト T リンパ球細胞に対して、弱いながらも細胞増殖抑制活性を示した。

compound	IC ₅₀ (μ M)		
	L1210/0	Molt4/C8	CEM/0
α -L- 20	130 \pm 96	72 \pm 34	49 \pm 12

上記以外の化合物に生物活性は認められなかった。

4. 研究成果

アデノシンから 4 工程で得られる 3',4'-不飽和アデノシン誘導体 (**1**) に対し、NIS の存在下、チオフェノールを反応させると、糖部 4'位にフェニルスルファニル基を有するコルジセピン誘導体 **2** が得られることを見出した。

本反応について最適化を行い、その反応機構を推定した。本反応は短時間で完結し、単離収率も良いことから、今後の更なる応用が期待される。

得られた 4'-ベンゼンスルフェニル体 **2** に対するラジカル反応や **8** に対する NBS と求核試薬の反応、及び 4'-ベンゼンスルホニル体 **13** に対する有機アルミニウム試剤の反応により、4'位に炭素官能基、フッ素原子、アルコキシ基等を有する種々の 4'-置換コルジセピン誘導体を合成した。それらを脱保護し、生物活性の測定を行ったところ、抗ウイルス活性や細胞増殖抑制活性を有する化合物を見出すことに成功した。

合成した 34 種類の化合物の生物活性を評価を行い、数種の誘導体に抗ウイルス活性や細胞増殖抑制活性を示すことが認められた。

本研究で開発したヒドロベンゼンスルファニル化は、ヌクレオシド 4' 位における既知の官能基導入法に比べ工程数、全体収率、幅広い官能基の種類等の多く点で優れている。ヌクレオシド化学の領域のみならず、多分野において活用されることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Kazuhiro Haraguchi, Shingo Takeda, Yutaka Kubota, Hiroki Kumamoto, Hiromichi Tanaka, Takayuki Hamasaki, Masanori Baba, Elijah Paintsil, Yung-Chi Cheng, From the Chemistry of Epoxy-Sugar Nucleosides to the Discovery of Anti-HIV Agent 4'-ethynylstavudine-Festonavir, Current Pharmaceutical Design, 査読有, Vol.19, No.10, 2013, 1880-1897.

(2) Yutaka Kubota, Mariko Ehara, Kazuhiro Haraguchi, Hiromichi Tanaka, Phenylsulfanylation of 3',4'-Unsaturated Adenosine Employing Thiophenol-*N*-Iodosuccinimide Leads to 4'-Phenylsulfanyl cordycepin: Synthesis of 4'-Substituted Cordycepins on the Basis of Substitution of the Phenylsulfanyl Leaving Group, The Journal of Organic Chemistry, 査読有, Vol. 76, No. 21, 2011, 8710-8717
DOI: 10.1021/jo201246

[学会発表] (計 3 件)

(1) 窪田 豊、須賀真理奈、熊本浩樹、原口一広、新規逆転写酵素阻害剤の創製を指向した 4' 位置換 β -L-チミジンの合成研究、2012 年 10 月 13 日、昭和大学 (東京)

(2) 原口一広、窪田 豊、鶴賀 伶、1'-シアノチミジンの ANP 誘導体の合成研究、2012 年 10 月 13 日、昭和大学 (東京)

(3) 窪田 豊、金田有里、原口一広、加藤宣之、田中博道、1' 位にメチル基を有するジオキソラニルヌクレオシドの合成とその抗 HCV 活性、第 21 回抗ウイルス療法研究会、2011 年 5 月 29 日、金沢市文化ホール (石川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 豊 (KUBOTA YUTAKA)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：50365714