

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590143

研究課題名(和文)核酸医薬開発に有用なヌクレオシド誘導体の開発

研究課題名(英文)Synthesis of Nucleoside Derivatives Applicable to Nucleic Acid Medicine

研究代表者

吉村 祐一 (Yoshimura, Yuichi)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00230813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、十分なヌクレアーゼ抵抗性とDNA・RNAに対し安定な二重鎖形成能を有する示すオリゴヌクレオチドの開発を最終的な目標とし、オリゴヌクレオチドに搭載する新規ヌクレオシド誘導体の開発を検討した。1)ジヒドロピラノヌクレオシド、2)L-トレオペンチフランシルヌクレオシド、3)3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの3種のヌクレオシドをデザインし、これらヌクレオシド誘導体の合成を検討した。また、2)については対応するヌクレオシドホスホネートも合成した。これら合成により得られた誘導体については、AIDSの原因ウイルスであるHIVに対する抗ウイルス効果についても評価を行った。

研究成果の概要(英文)：To develop nucleoside derivatives applicable to introduce an oligonucleotide which can be used as nucleic acid medicine, design and synthesis of new nucleosides were investigated. We designed the following three nucleoside derivatives: 1) dihydropyranonucleoside, 2) L-threopentofuranosyl nucleoside, 3) 3'-deoxy-4'-thionucleoside. L-Threopentofuranosyl nucleoside was further converted to the corresponding nucleoside phosphonate derivative. All the nucleoside derivatives obtained were evaluated their antiviral activity including HIV.

研究分野：医薬品化学

キーワード：Nucleoside anti-HIV antiherpes Nucleic acid medicine

## 1. 研究開始当初の背景

核酸医薬は、抗体医薬とともに 21 世紀の治療薬として大きな期待が寄せられている。しかし、抗体医薬が癌化学療法分子標的薬を中心として、多くの医薬品が上市されているのに比べ、核酸医薬については、アプタマー医薬であるマクジェン®が使用されている程度で、抗体医薬に比べ実用化の面では遅れている。核酸医薬の場合、組織・細胞内への標的分子に如何に効率良く到達させるかが活性発現の鍵となる。この点が細胞表面の受容体等を標的分子とする抗体医薬と異なり、核酸医薬の広範囲での実用化を大きく妨げる要因となっている。これ以外にも、核酸医薬が抗体医薬と同じような実用的レベルに達するには、1) ターゲット DNA や RNA への特異的結合と二重鎖の形成並びにオフターゲット効果の抑制、2) ヌクレアーゼなどの核酸代謝酵素に対する抵抗性の獲得、3) インターフェロン応答による自然免疫活性化の回避などが解決すべき課題として存在する。これらの問題解決策として、核酸医薬に最適化された DDS の開発が必須であることは当然であるが、他方、リン酸ジエステル結合以外でのポリマー化や修飾ヌクレオチドを用いたポリマー構築により打開しようとする試みも行われている。後者では、核酸医薬の安定性で大きな障害となる血液中に存在するヌクレアーゼなどの酵素による鎖切断に対し抵抗性を獲得することも可能となる。実際、前述のマクジェン®では 2'位修飾ヌクレオチドが安定化のため構造中に組み込まれている。この他、2',4'位間をメチレン架橋で固定したヌクレオチドを含むオリゴデオキシヌクレオチドは、RNA に対して高い親和性を示し、2',4'-BNA/LNA の名称で広く認知されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、十分なヌクレアーゼ抵抗性と DNA・RNA に対し安定な二重鎖形成能を有する示すオリゴヌクレオチドの開発を最終的な目標とした。前述のように、目標達成の有効な手段として化学修飾したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドが有望と考えられており、オリゴヌクレオチドに搭載する新規ヌクレオチド誘導体のデザインと合成を検討した。また、新規ヌクレオチド誘導体には多くの場合、様々な生物活性が期待できる。合成により得られた誘導体については、AIDS の原因ウイルスである HIV に対する抗ウイルス効果についても評価を行うこととし、新規抗ウイルス性ヌクレオチド誘導体の探索についても視野に入れ研究を遂行することとした。

## 3. 研究の方法

研究目標達成のため、Figure 1 に示した 1) ジヒドロピラノヌクレオシド、2) L-トレオペンチフラノシルヌクレオシド、3) 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドをデザインした。はじめに、ジヒドロピラニルヌクレオシド **1** については、以前の研究でその合成には一応成功している。しかし、その合成に関しては収率や立体選択性等に問題が残っていた。本研究では、ジヒドロピラニルヌクレオシド **1** の合成方法の改良を行うとともに、PNA 型オリゴマー構成ユニット **2** の創製を目指した同誘導体の合成を検討する。次に天然核酸と同様にリン酸ジエステル結合でオリゴマー構築を行える新規ヌクレオチド誘導体として  $\alpha$ -L-2'-デオキシ-2'-ヒドロキシメチルトレオペンチフラノシルヌクレオシド **3** および 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド **6** を分子設計した。前者の  $\alpha$ -L-ヌクレオシド **3** は、天然ヌクレオシド同様に、分子内に 1 級水酸基と 2 級水酸基を有している。従って、1 級水酸基部分をジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護し、2 級水酸基をアミダイト化すれば、自動合成機に適応可能なアミダイトユニット **4** が得られることになる。また、 $\alpha$ -L-ヌクレオシド **3** の 2 級水酸基にホスホノメチル基を導入すればホスホノヌクレオシド **5** となる。同誘導体は、抗 HIV 薬である PMEА (アデフォビル) と類似の構造を有しており、核酸医薬の合成素子ばかりでなく、抗ウイルス活性が期待される新規誘導体の創製へも応用できる。

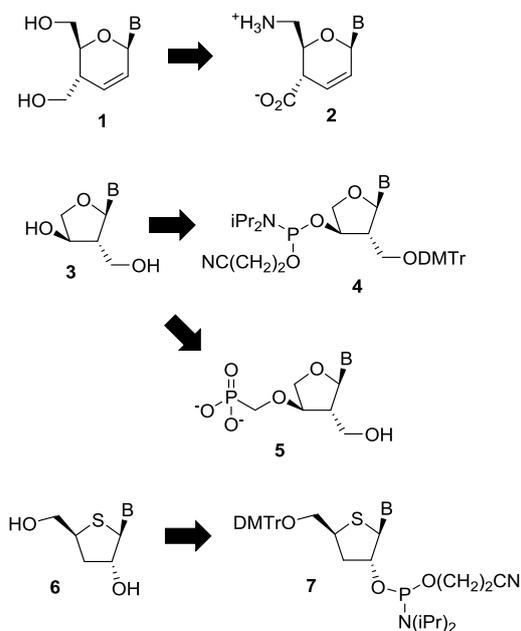


Figure 1

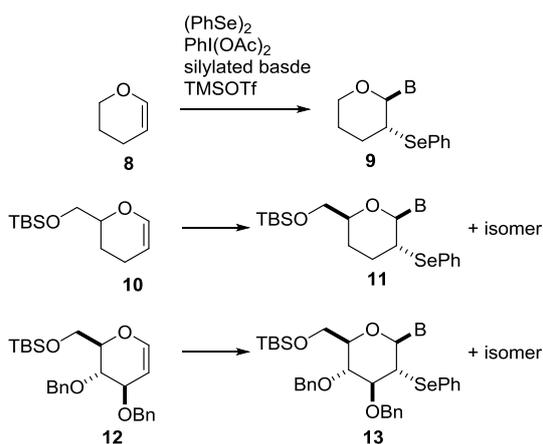
3'-デオキシヌクレオシドは、コルジセピンのように天然物としても存在するが、その 4'-チオヌクレオシド類 **6** の合成はほとんど報告

例がない。4'-チオヌクレオシド誘導体 **6** も、さきの $\alpha$ -L-ヌクレオシド **3** と同様、アミダイトユニット **7** へ変換可能であり、核酸医薬への展開が容易に行える。また、親化合物に相当するコルジセピンには抗癌活性や抗ウイルス活性が知られており、その4'-チオ誘導体は、生理活性ヌクレオシドとしても魅力的な標的分子となる (Figure 1)。3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの合成については、はじめに報告者が開発した Pummerer 型チオグリコシル化反応を鍵段階とする合成法を検討することとした。

#### 4. 研究成果

##### 1) ジヒドロピラノヌクレオシドの合成

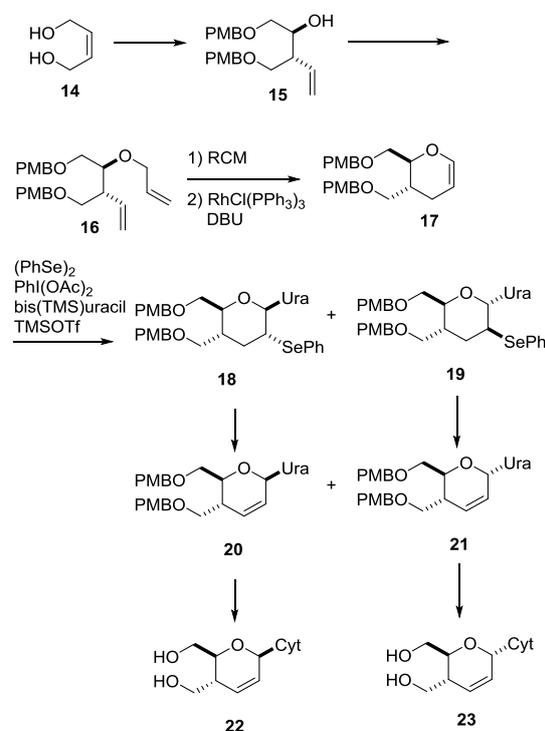
表題化合物については、以前の研究で既にその合成を達成している。しかし、鍵段階であるグリコシル化反応で、生成物が位置異性体を含む4種の混合物となるなど多くの問題点を残していた。そこで、この点を改良するため、グリカール誘導体へのグリコシル化反応を利用する合成法を検討することとした。また、鍵段階となるグリコシル化反応については、超原子価ヨウ素試薬を用いた新たな反応を開発することとした。ジヒドロピランを用いたモデル反応の検討の結果、触媒量のトリメチルシリルトリフラート (TMSOTf) 存在下、ジフェニルジセレニドとジアセトキシヨードベンゼンとの反応により、目的とする2'-セレノヌクレオシド誘導体が高収率で得られることを見出した。また、同反応条件により、グリカール誘導体 **10** 及び **12** から対応する2'-セレノヌクレオシドが得られたことから、開発したグリコシル化反応が実用性を備えたものであることが確認された (Scheme 1)。



Scheme 1

次にジヒドロピラノヌクレオシドの糖部の合成を行った。*cis*-1,4-Butenediol (**14**) を出発原料とし、文献既知の手法によりホモアリルアルコール誘導体 **15** を合成した。同誘導体をアリルエーテル **16** へ変換した後、閉環メタセシス (RCM) 反応に付し、さらにルテニウム触媒を利用した二重結合の異性化を

行い、目的とするグリカール誘導体 **17** へ誘導した。同誘導体を先に開発した超原子価ヨウ素を利用したグリコシル化反応に付したところ、対応する2'-セレノフェニル体を $\beta$ 体 **18**、 $\alpha$ 体 **19**の混合物として得ることが出来た。続く、*syn* 脱離、脱保護、塩基部の変換を経て、目的とするジヒドロピラノシチジン誘導体 **22** 及び **23** の合成を達成した (Scheme 2)。



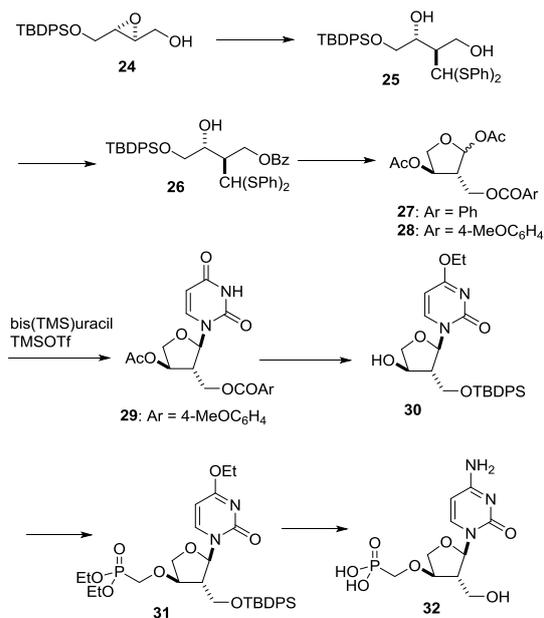
Scheme 2

合成したジヒドロピラノシチジン誘導体について抗 HIV 活性の評価を行ったが **22**、**23** いずれについても活性は認められなかった。また、これら誘導体の合成は、ラセミ体で行われており、光学活性体の合成には成功していない。そのため、PNA 型ポリマーの合成素子となるアミノ酸型誘導体 **2** の合成については未検討のままである。

##### 2) L-トレオペンタフラノシルヌクレオシドの合成

表題化合物である新規ヌクレオシド誘導体 **3** とそのホスホネート誘導体の合成について検討を行った。*trans*-2-Butene-1,4-diol を出発原料とし、2工程で既知のエポキシアルコール **24** のラセミ体を得た。さらに、ビス(フェニルチオ)メタンのリチオ体と処理し、ジオール体 **25** へ導いた。ジオール体 **25** は、1級水酸基をベンズイル基で保護し、*p*-トルエンスルホン酸処理による TBS 基の選択的除去、トリフルオロ酢酸中 NIS 処理によるビスフェニルチオ基の脱保護とフラノース環の構築、アセチル化の3工程でフラノース誘導体 **27** へ誘導した。得られたフラノース誘

導体 **27** に対し、Vorbrüggen 法によるビス(トリメチルシリル)ウラシルとのグリコシル化反応を行ったところ目的とするヌクレオシド誘導体が 40% の収率で得られたが、アノマーと思われる副生成物が少量 ( $^1\text{H-NMR}$  積分比 = 10 : 1) 含まれていた。このグリコシル化反応を改善する目的で、隣接基関与により生じるアシロキシニウムイオンの安定化が期待できる *p*-メトキシベンズイル誘導体 **28** を合成し、同様の反応を行うこととした。合成したフラノース誘導体 **28** を前述のグリコシル化反応に付したところ、目的とするヌクレオシド誘導体 **29** が、収率 87% で単一のアノマーとして得られた。ヌクレオシド誘導体 **29** は、4-*O*-エトキシ体 **30** へ誘導した後、1 級水酸基を TBDPS 基で保護し、得られたシリル体 **30** の 2 級水酸基へのメチレンホスホネート部の導入を経て、ヌクレオシドホスホネート誘導体 **31** へ誘導した。同誘導体はさらに、塩基部をシトシンに変換した後、糖部保護基の脱保護を行い、新規ヌクレオシドホスホネート誘導体 **32** の合成を達成した (Scheme 3)。



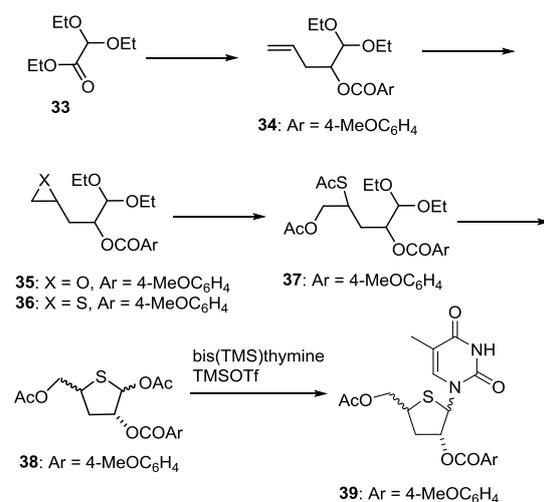
Scheme 3

合成したヌクレオシドホスホネート誘導体 **32** について抗 HIV 活性と抗ヘルペスウイルス活性の評価を行ったが、いずれのウイルスに対しても活性は認められなかった。また、これら誘導体の合成も、ラセミ体での検討が終了したばかりであり、光学活性体の合成については未検討である。

### 3) 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの合成

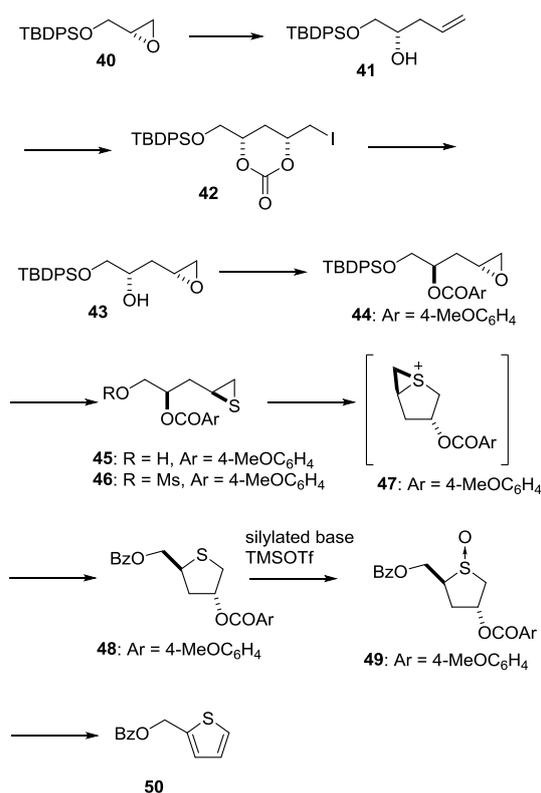
報告者がこれまで実施してきた 4'-チオヌクレオシド誘導体の合成研究の一環として表題化合物の合成を検討した。出発原料であるジエトキシ酢酸エチル (**33**) から得られる

ペンテン誘導体 **34** をエポキシ体 **35** へ誘導した後、チオエポキシ化してチオエポキシド **36** を得た。チオエポキシドを開環することで環化前駆体 **37** に変換後、酸処理による 4-チオ糖部の構築を行い、3'-デオキシ-4'-チオフラノース誘導体 **38** を得た。続くグリコシル化反応については、チミンを用いて Vorbrüggen 法によるグリコシル化反応を行った。BSA を用いて用時調製したシリル化塩基と TMSOTf を作用させることで、約 1:1 のジアステレオマー混合物としてチミンが導入された化合物 **39** を得る事が出来た。しかし、これらジアステレオマーの分離は困難であり、このルートによる合成検討を中断した (Scheme 4)。



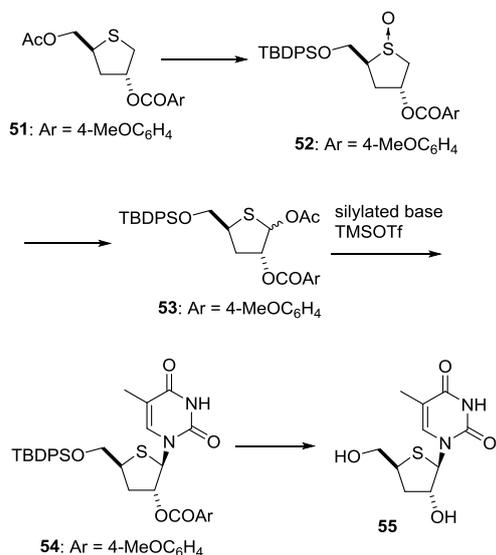
Scheme 4

次に単一ジアステレオマーのみを合成可能な Scheme 5 に示した経路で目的化合物の合成を検討した。アリルアルコールから文献記載の方法に従いエポキシ体 **40** を合成し、ビニルグリニア試薬によりエポキシドの開環を行い、ホモアリルアルコール **41** を得た。水酸基を Boc 化した後、IBr と処理しハロカーボネート化を行い、ヨードカーボネート **42** へ導いた。同誘導体を塩基処理しエポキシド **43** とした後、光延反応により 4 位の立体反転とアニル基の導入、さらにチオエポキシ化を含む数工程の官能基変換を行い、環化前駆体であるメシラート **46** を合成した。メシラート **46** に対し、DMF 中、フッ化セシウム存在下、安息香酸との反応を行ったところ、4-チオ糖誘導体 **48** が得られた。この反応は分子内 S<sub>N</sub>2 反応により生じたエピスルホニウムイオン **47** を経由しているものと推定している。さらに 4-チオ糖誘導体 **48** を酸化し、グリコシル化反応の基質であるスルホキシド **49** を合成した。この基質に対して報告者が開発した Pummerer 型チオグリコシル化反応による直接的な塩基の導入を行ったが、目的生成物はほとんど得られず脱離反応により生じたと思われるチオフエン誘導体 **50** が得られるのみであった (Scheme 5)。



Scheme 5

以上の結果からスルホキシドに対する Pummerer 型チオグリコシル化反応に代わり、1-アセトキシ基を有する基質に変換後、Vorbrüggen 法による塩基導入を行うこととした。



Scheme 6

先と同様の反応により合成した 3'-デオキシ-4'-チオフラノース誘導体 **51** の 1 級水酸基部分の保護基を TBDPS 基に変換した。さらにスルフィド部の酸化により得られたスルホキシド **52** を無水酢酸と処理し、Pummerer

反応により、1-アセトキシ体 **53** へと変換した。同誘導体に対する Vorbrüggen 法によるグリコシル化反応を行い 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド誘導体 **54** を得た。最後に保護基の除去を行い目的とする 3'-デオキシ-4'-チオチミジン **55** の合成の合成を達成した (Scheme 6)。

## 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 5 件)

- ① Yoshimura, Y.; Takahata, H.  
Recent Advances in Cyclonucleosides: C-Cyclonucleosides and Spore Photoproducts in Damaged DNA  
*Molecules*, **2012**, *17*, 11630-11654 (査読有, doi:10.3390/molecules171011630) .
- ② Kiran, Y. B.; Wakamatsu, H.; Natori, Y.; Takahata, H.; Yoshimura, Y.  
Design and Synthesis of A Nucleoside and A Phosphonate Analogue Constructed on A Branched-*threo*-tetrofuranoose Skeleton  
*Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3949-3952 (査読有, doi:10.1016/j.tetlet.2013.05.062) .
- ③ Kan-no, H.; Saito, Y.; Omoto, S.; Minato, S.; Wakamatsu, H.; Natori, Y.; Imamichi, T.; Takahata, H.; Yoshimura, Y.  
Synthesis of a Dihydropyranonucleoside Using an Oxidative Glycosylation Reaction Mediated by Hypervalent Iodine  
*Synthesis*, **2014**, *46*, 879-886 (査読有, doi:10.1055/s-0033-1340663) .
- ④ 吉村 祐一  
Pummerer 型チオグリコシル化反応の開発とヌクレオシド合成への応用  
東北薬科大学研究誌, 第 61 号, p.1-10 (2014) (査読有) .
- ⑤ Yoshimura, Y.; Kobayashi, S.; Kaneko, H.; Suzuki, T.; Imamichi, T.  
Construction of an Isonucleoside on a 2,6-Dioxobicyclo[3.2.0]heptane Skeleton  
*Molecules*, **2015**, *20*, 4623-4634 (査読有, doi:10.3390/molecules20034623) .

[学会発表] (計 17 件, 内, 招待講演 3 件)

- ① 菅野裕也, 吉村祐一, 高畑廣紀  
酸化的グリコシル化反応を利用したジヒドロピラノヌクレオシドの合成  
第 29 回有機合成化学セミナー, 静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ (静岡県, 静岡市), 2012 年 9 月 5 日~7 日
- ② 吉村祐一  
新規ヌクレオシド誘導体合成を指向したグリコシル化反応の開発  
平成 24 年度化学系学協会東北支部大会 (依頼講演), 秋田大学 (秋田県, 秋田市), 2012 年 9 月 15 日~16 日

- ③ 吉村祐一, 菅野裕也, Y. B. Kiran, 名取良浩, 斎藤有香子, 高畑廣紀  
超原子価ヨウ素試薬を利用したグリコシル化反応の開発  
第5回有機触媒シンポジウム, 学習院大学(東京, 豊島区), 2012年10月26日~27日
- ④ Y. B. Kiran, Yuichi Yoshimura, Yoshihiro Natori, Hiroki Takahata  
Synthetic Study of Novel Nucleoside Phosphonate Analog as a Potential Anti-HIV Agent  
IKCOC-12, リーガロイヤルホテル京都(京都府, 京都市), 2012年11月12日~16日
- ⑤ 吉村祐一, Y. B. Kiran, 高畑廣紀  
新規ヌクレオシドホスホネート誘導体の合成研究  
第30回メディシナルケミストリーシンポジウム, タワーホール船堀(東京都, 江戸川区), 2012年11月28日~30日
- ⑥ Yuichi Yoshimura  
Development of Oxidative Glycosylation Reaction for Nucleoside Synthesis Based on Hypervalent Iodine Chemistry  
First Japan-USA Organocatalytic Symposium, Hawaii Prince Hotel Waikiki(米国ハワイ州, ホノルル), 2012年12月15日~18日(招待講演)
- ⑦ 菅野裕也, 吉村祐一, Y. B. Kiran, 名取良浩, 斎藤有香子, 高畑廣紀  
超原子価ヨウ素試薬を用いたグリコシル化反応の開発とヌクレオシド合成への応用  
日本薬学会第133年会, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市), 2013年3月28日~30日
- ⑧ Yuichi Yoshimura, Hiroya Kan-no, Hiroki Takahata  
Synthesis of Dihydropyranonucleoside Using Hypervalent Iodine Mediated Glycosylation as a Key Reaction  
Advanced Molecular Transformations by Organocatalysts 1st International Conference & 6th Symposium on Organocatalysis, 大津プリンスホテル(滋賀県, 大津市), 2013年5月27日~28日
- ⑨ Yuichi Yoshimura, Y. B. Kiran, Hideaki Wakamatsu, Yoshihiro Natori, Hiroki Takahata  
Design and Synthesis of Nucleoside Phosphonate Constructed on a Branched-tetrofuranose Skeleton  
The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 神奈川大学(神奈川県, 横浜市), 2013年11月13日~15日
- ⑩ 菅野裕也, 植松拓也, 吉村祐一, 高畑廣紀

- 酸化的グリコシル化反応を利用したスタブジン及び4'-置換スタブジンの新規合成法  
第31回メディシナルケミストリーシンポジウム, アステールプラザ(広島県, 広島市), 2013年11月20-22日
- ⑪ 伊藤文, 吉村祐一, 若松秀章, 名取良浩, 高畑廣紀  
3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの合成研究  
日本薬学会第134年会, 熊本大学(熊本県, 熊本市), 2014年3月28日~30日
- ⑫ Yuichi Yoshimura, Hiroya Kan-no, Yoshihiro Natori, Yukako Saito, Hideaki Wakamatsu  
Syntheses of Stavudine and Its 4'-Substituted Analogue Using Hypervalent Iodine Mediated Oxidative Glycosylation  
第2回国際会議(兼)第7回有機触媒シンポジウム, 東京大学(東京都, 文京区), 2014年11月21日~22日
- ⑬ 伊藤文, 名取良浩, 若松秀章, 吉村祐一  
3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド誘導体の合成研究  
第32回メディシナルケミストリーシンポジウム, 神戸国際会議場(兵庫県, 神戸市), 2014年11月26-28日
- ⑭ Yuichi Yoshimura  
Development of New Glycosylation Reactions and Its Application to the Synthesis of Nucleoside Derivatives  
3rd SNU Mini-Symposium on Medicinal Chemistry, Seoul National University, ソウル国立大学(韓国, ソウル), 2015年2月6日(招待講演)

他3件

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 祐一 (YOSHIMURA, YUICHI)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 00230813

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし