

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890113

研究課題名（和文） 新規アミド結合等価体を基盤とするケモカイン受容体CXCR4アンタゴニストの創製

研究課題名（英文） Synthetic Studies on Amide Bond Isosteres and Their Application to Artificial CXCR4 Ligands

研究代表者

鳴海 哲夫 (NARUMI TETSUO)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：50547867

研究成果の概要（和文）：ペプチドは微量で強力な生理活性を有するものが多いことから重要な創薬標的分子であるため、ペプチドを医薬品につなげる創薬技術の開発は最重要かつ緊急の研究課題である。本研究は、ペプチドリード創薬において有効と期待される新規なアミド結合等価体（クロロアルケン型ジペプチドイソスター）の開発および生理活性ペプチドへの応用を目的として、*gem*-アリルジクロリド系化合物を用いた有機銅試薬による合成研究を行った。ペプチド結合をクロロオレフィンで置換したクロロアルケン型ジペプチドイソスターを設計し、有機銅試薬を用いたトランスアミド等価体（*Z*型クロロアルケン）およびシスアミド等価体（*Z*型クロロアルケン）、それぞれの高立体選択的合成法を開発に成功した。これらの成果は、今後のペプチドミメティックを用いた創薬研究の進展に資するものである。なお、開発された研究成果の一部を用いた、生理活性ペプチドへの応用研究が進行中である。

研究成果の概要（英文）：Replacement of the planar amide bond with a surrogate alkene substructure represents a promising approach to overcome their major limitations such as poor bioavailability and short physiological half-life, which limit their medicinal and biological use. However, development of effective ground state isosteric and isoelectronic analogues of the amide bond have yet to be developed. In this study, synthetic methodologies for a newly designed chloroalkene dipeptide isosteres (CADIs) were examined to develop diastereoselective, divergent, and practical synthetic approaches toward (*Z*)-chloroalkene and (*E*)-chloroalkene isostere skeletons utilizing organocopper-mediated reactions. These studies should contribute to the development of peptidomimetics-based medicinal chemistry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学

## 1. 研究開始当初の背景

ペプチドは微量で強力な生理活性を有するものが多いことから、古くからペプチド性医薬品の開発研究が行われ、近年では 40 種類を超えるペプチド性医薬品が市販され、さらに臨床応用中のものは 300 種類近くに及んでいる。しかしながら、ペプチドは主鎖骨格を形成するアミド結合（ペプチド結合）や構成分子であるアミノ酸の側鎖に起因する易水解性や凝集性などが問題となり、医薬品への直接展開は容易ではない。これら問題の解決法の一つに、ペプチドミメティックに代表されるペプチドを非ペプチド化する有機化学的手法が有効と考えられている。これまでに、酵素によるペプチドの加水分解機構に基づいた「酵素基質遷移状態模倣型ペプチドミメティック」が考案され、がんやエイズ、アルツハイマー型痴呆症など難治性疾患に対する医薬品創製において、重要な役割を果たしている。一方、ペプチドの基底状態を模倣した「基底状態模倣型ペプチドミメティック」はいまだ有効なものが見出されていないのが現状である。このような状況において、報告者は有効な基底状態模倣型ペプチドミメティックとして期待されるペプチド結合を不飽和結合で置換したアルケン型ジペプチドイソスター<sup>1</sup>の合成研究、およびそれらを基盤とした創薬研究を展開してきた (Figure 1)。

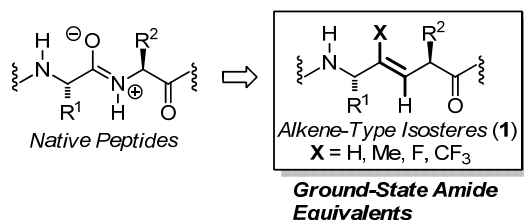


Figure 1

## 2. 研究の目的

このような背景を基に報告者は新たなアミド結合等価体を開発することで、ケミカルバイオロジー研究における新たなケミカルプローブ、さらには新規ペプチド性医薬品の創製につながると考え、ヘテロ原子置換アルケン型イソスターの効率的かつ実用的合成法を開発することを計画した。また、合成したアミド結合等価体を生理活性ペプチドに応用し、構造活性相関研究やケミカルプローブとしての構造機能相関研究についても併せて展開する。具体的な創薬標的として、固形がんの転移、血液癌の進行、エイズ、関節リュウマチ等に関与するケモカインレセプターの一つである CXCR4 を設定し、本研究を基盤とした新規 CXCR4 アンタゴニストの創出を目指す。

## 3. 研究の方法

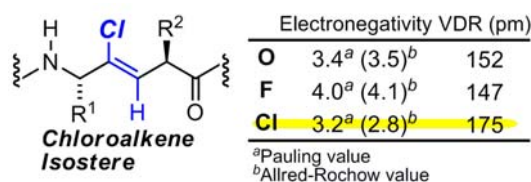


Figure 2

### (1) 新規アミド結合等価体の設計と合成

これまでのアミド結合等価体を用いた創薬研究を踏まえ、新規アミド結合等価体としてペプチド結合をクロロオレフィンで置換したクロロアルケン型ジペプチドイソスター (CADIs) を設計した (Figure. 2)。塩素原子はフッ素原子、酸素原子に次いで高い電気陰性度 (Electronegativity) を有しており、その電気陰性度に起因する双極子モーメントが期待できる。さらに、van der Waals 半径 (VDR) においても一原子のみの置換ではフッ素原子に次いで酸素原子の van der Waals 半径と近いことから、有用なアミド結合等価体になると考えられる。そこで、所属研究室で見出した反応を基に、1) 有機銅試薬による One-Pot 還元/不斉アルキル化反応を鍵反応とする合成アプローチ、2) パラジウム触媒によるクロスカップリング/求核置換反応を鍵反応とする合成アプローチ、3) 銅触媒による S<sub>N</sub>2'型アルキル化反応を鍵反応とする合成アプローチの三つの合成戦略により CADIs の立体選択的合成法を確立する。

### (2) アミド結合等価体導入による環状ペプチドの構造解析

これまでにアミド結合等価体間での活性評価は報告者らの論文も含め複数報告されているが、等価体導入によるペプチドの構造変化が活性発現に与える影響について詳細な解析はほとんどされていない。そこで、ペプチドリガンドの分子設計において実績が報告されている環状ペプチドを題材として、等価体導入に伴う構造変化を詳細に検証する。具体的には CADIs や FADIs、EADIs を含む複数の等価体を CXCR4 アンタゴニストである環状ペプチドテンプレート [*cyclo*(-D-Xaa-Yaa-Arg-Nal-Gly-)] の D-Xaa-Yaa 間に導入し、NMR による構造解析を行う (Figure 3)。さらに活性評価試験も平行して行い、構造と活性の相関の有

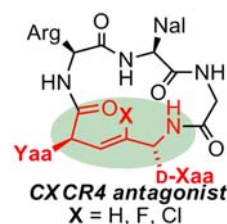


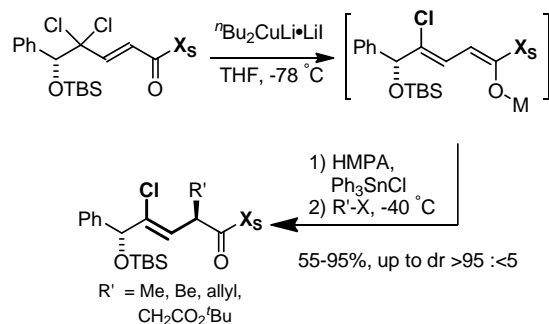
Figure 3

無を調べ等価体導入による構造変化が活性発現に与える影響について考察する。

#### 4. 研究成果

(1) 平成21年度は、ペプチド結合をクロロオレフィンで置換したクロロアルケン型ジペプチドイソスターを設計し、短工程かつ様々な置換基を導入可能な効率的合成法の開発を目指し、 $\alpha$ 位置換基の立体選択的導入およびクロロアルケン骨格の構築法について検討し、以下の結果を得た。

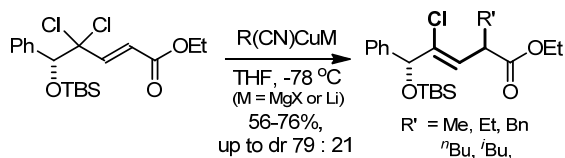
①有機銅試薬による One-Pot 還元/不斉アルキル化反応を鍵反応とする合成アプローチ  
ベンズアルデヒドを出発原料として、分子内に不斉環境を有する鍵中間体 ( $\gamma,\gamma$ -dichloro- $\alpha,\beta$ -enoyl sultam) を合成し、報告者が以前に開発した One-Pot 還元反応/不斉アルキル化反応を行ったところ、目的としたクロロアルケン骨格および  $\alpha$  位置換基の One-Pot 同時構築に成功した (Scheme 1)。  $\alpha$  位置換基については、メチル基やベンジル基、プロパルギル基など様々な置換基が高立体選択的に導入可能であった (up to >95% de)。



Scheme 1

②有機銅試薬による  $S_N2'$ 型アルキル化反応を鍵反応とする合成アプローチ

上記の One-Pot 還元/不斉アルキル化反応の検討過程において、副反応として  $S_N2'$ 型アルキル化反応の進行も確認されたことから、これについても併せて精査した。その結果、有機銅試薬をギルマン型有機銅試薬から低次有機銅試薬に変えることで  $S_N2'$ 型アルキル化反応が選択的に進行し、対応するクロロアルケン骨格および  $\alpha$  位置換基の同時構築が短時間で効率的に達成できることを見出した (Scheme 2)。本法は One-Pot 還元反応/不斉アルキル化反応では合成できない化合物も合成可能であることから、両法を相補的に用いることで多種多様な CADIs の合成が期待できる。

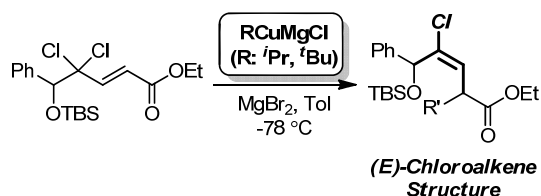


#### Scheme 2

(2) 平成22年度は生理活性ペプチドへの導入を視野にいれ、シスアミド等価体 (E型クロロアルケン) および $\alpha,\alpha$ -ジクロロ- $\beta$ -アミノ酸の合成研究について検討を行い、以下の結果を得た。

①シスアミド等価体の立体選択的合成法の開発

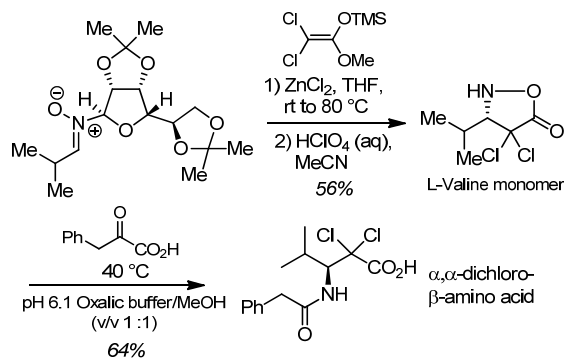
$\gamma$ 位に二つの塩素原子を有する $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物に対し、嵩高いアルキル基 ( $^i$ Pr,  $^t$ Bu) を有する有機銅試薬を作用させると、E型クロロアルケンが優先的に得られることを見出した。さらに有機銅試薬や溶媒、添加剤について精査したところ、リチウムイオンがE/Z選択性に大きく寄与していることが示唆された。そこで、反応系中からリチウムイオンを排除して、臭化マグネシウムを添加することで、E型クロロアルケンを高収率かつ高立体選択的に得ることに成功した (Scheme 3)。



#### Scheme 3

② $\alpha,\alpha$ -ジクロロ- $\beta$ -アミノ酸の立体選択的合成法の開発

クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成中間体である $\alpha,\alpha$ -ジクロロ- $\beta$ -アミノエステルの合成研究を行った。D-グルン酸由来の光学活性なニトロソとジクロロケテンシリルアセタールとのジアステレオ選択的な環化反応、続いて過塩素酸処理によって $\alpha,\alpha$ -ジクロロ- $\beta$ -アミノエステル誘導体である光学活性な $\alpha,\alpha$ -ジクロロイソキサゾリジンを合成した (Scheme 4)。本化合物に $\alpha$ -ケト酸を用いてN-O結合を切断し $\alpha,\alpha$ -ジクロロ- $\beta$ -アミノ酸の立体選択的合成に成功した (Heterocycles, 2011, 82, 1515)。



Scheme 4

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 18 件)

- ① “Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore”: W. Nomura, N. Ohashi, Y. Okuda, T. Narumi, T. Ikura, N. Ito and \*H. Tamamura (他0人、4番目): *Bioconjugate Chem.*, 査読有、2011年、*in press*
- ② “Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C”: W. Nomura, T. Narumi, N. Ohashi, Y. Serizawa, NE. Lewin, PM. Blumberg, T. Furuta and \*H. Tamamura (他 0 人、2 番目): *ChemBioChem*, 査読有、2011年、12巻、535-539.
- ③ “Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C $\delta$  as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding”: N. Ohashi, \*W. Nomura, T. Narumi, NE. Lewin, K. Itotani, PM. Blumberg and \*Hirokazu Tamamura (他0人、3番目): *Bioconjugate Chem.*, 査読有、2011年、22巻、82-87.
- ④ “Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists”: T. Tanaka, \*T. Narumi, T. Ozaki, A. Sohma, N. Ohashi, C. Hashimoto, K. Itotani, W. Nomura, T. Murakami, N. Yamamoto and \*H. Tamamura (他 0 人、2 番目): *ChemMedChem*, 査読有、2011年、6巻、834-839.
- ⑤ “Bivalent Ligands of CXCR4 with Rigid Linkers for Elucidation of the Dimerization State in Cells”: T. Tanaka, \*W. Nomura, T. Narumi, A. Masuda, and \*H. Tamamura (他0人、3番目): *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有、2010年、132巻、45号、15899-15901.
- ⑥ “ $\alpha,\alpha$ -Dichloroisoxazolidinones for the synthesis and chemoselective peptide ligation of  $\alpha$ -peptide  $\alpha$ -ketoacids”: T. Narumi, and \*J. W. Bode (他0人、1番目): *Heterocycles*, 査読有、2010年、*in press*.
- ⑦ “CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist”: T. Narumi, C. Ochiai, K. Yoshimura, S. Harada, T. Tanaka, W. Nomura, H. Arai, T. Ozaki, N. Ohashi, S. Matsushita, and \*H. Tamamura (他0人、1番目): *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、2010年、20巻、5853-5858.
- ⑧ “Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: structure-activity relationship studies”: S. Suzuki, K. Maddali, C. Hashimoto, E. Urano, N. Ohashi, T. Tanaka, T. Ozaki, H. Arai, H. Tsutsumi, T. Narumi, W. Nomura, N. Yamamoto, Y. Pommier, JA Komano, and \*H. Tamamura (他0人、10番目): *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、2010年、18巻、6771-6775.
- ⑨ “Peptide HIV-1 Integrase Inhibitors from HIV-1 Gene Products”: S. Suzuki, E. Urano, C. Hashimoto, H. Tsutsumi, T. Nakahara, T. Tanaka, Y. Nakanishi, K. Maddali, Y. Han, M. Hamatake, K. Miyauchi, Y. Pommier, JA. Beutler, W. Sugiura, H. Fuji, T. Hoshino, K. Itotani, W. Nomura, T. Narumi, N. Yamamoto, JA. Komano, and \*H. Tamamura (他0人、19番目): *J. Med. Chem.*, 査読有、2010年、53巻、5356-5360.
- ⑩ “Development of crosslink-type tag-probe pairs for fluorescent imaging of proteins”: W. Nomura, T. Mino, T. Narumi, N. Ohashi, A. Masuda, C. Hashimoto, H. Tsutsumi, and \*H. Tamamura (他0人、3番目): *Biopolimers: Peptide Science*, 査読有、2010年、94巻、843-852.
- ⑪ “CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry”: Y. Yamada, C. Ochiai, K. Yoshimura, T. Tanaka, N. Ohashi, T. Narumi, W. Nomura, S. Harada, S. Matsushita, and \*H. Tamamura: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、2010年、20巻、354-358.
- ⑫ “Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules including neutralizing antibodies”: T. Nakahara, W. Nomura, K. Ohba, A. Ohya, T. Tanak, C. Hashimoto, T. Narumi, T. Murakami, N. Yamamoto, and \*H. Tamamura (他0人、7番目): *Bioconjugate Chem.*, 査読有、2010年、21巻、709-714.
- ⑬ “Synthesis and biological evaluation of selective CXCR4 antagonists containing alkene dipeptide isosteres”: T. Narumi, R. Hayashi, K. Tomita, K. Kobayashi, N. Tanahara, H. Ohno, T. Naito, E. Kodama, M. Matsuoka, \*S. Oishi, and \*N. Fujii (他0人、1番目): *Org. Biomol. Chem.*, 査読有、2009年、頁616-621.
- ⑭ “Synthesis of protein kinase C $\delta$  C1b domain by native chemical ligation methodology and characterization of its

- folding and ligand binding”: N. Ohashi, W. Nomura, M. Kato, T. Narumi, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, and \*H. Tamamura (他 0 人, 4 番目): *J. Pep. Sci.*, 査読有、2009 年、15 巻、頁 642-646.
- ⑮ “Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligand possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids”: T. Tanaka, W. Nomura, T. Narumi, A. Esaka, S. Oishi, N. Ohashi, K. Itotani, B. J. Evans, Z.-X. Wang, S. C. Peiper, N. Fujii, and \*H. Tamamura (他 0 人, 3 番目): *Org. Biomol. Chem.*, 査読有、2009 年、頁 3805-3809.
- ⑯ “Peptide Bond Mimicry by (E)-Alkene and (Z)-Fluoroalkene Peptide Isosteres: Synthesis and Bioevaluation of  $\alpha$ -Helical Anti-HIV Peptide Analogues”: S. Oishi, H. Kamitani, Y. Kodera, K. Watanabe, K. Kobayashi, T. Narumi, K. Tomita, H. Ohno, T. Naito, E. Kodama, M. Matsuoka, and \*N. Fujii (他 0 人, 7 番目): *Org. Biomol. Chem.*, 査読有、2009 年、頁 2872-2877.
- ⑰ “Amino Acid-Based Synthesis of Trifluoromethylalkene Dipeptide Isosteres by Alcohol-Assisted Nucleophilic Trifluoromethylation and Organozinc-Copper-Mediated  $S_N2'$  Alkylation”: K. Kobayashi, T. Narumi, S. Oishi, H. Ohno, and \*N. Fujii (他 0 人, 2 番目): *J. Org. Chem.*, 査読有、2009 年、74 巻、頁 4626-4629.
- ⑱ “Synthesis of Fluoroalkene Dipeptide Isosteres by an Intramolecular Redox Reaction Utilizing N-Heterocyclic Carbenes (NHCs)”: Y. Yamaki, A. Shigenaga, K. Tomita, T. Narumi, N. Fujii, and \*A. Otaka (他 0 人, 4 番目): *J. Org. Chem.*, 査読有、2009 年、74 巻、頁 3272-3277.

[学会発表] (計 58 件)  
 主要なもののみ記述

- ① 鳴海哲夫, 新井啓之、吉村和久、原田恵嘉、野村 渉、松下修三、玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製研究. 日本薬学会第 131 年会 (震災により中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
- ② 鳴海哲夫, 玉村啓和. イミダゾリウム塩の構造最適化を指向した構造活性相関研究. 日本薬学会第 131 年会 (震災により中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
- ③ Narumi T., Bode JW.  $\alpha, \alpha$ -Dichloroisoxazolidinones for the Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of  $\alpha$ -Peptide  $\alpha$ -Ketoacids. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
- ④ 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 尾崎太郎, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村 啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- ⑤ 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 京都, 2010 年 11 月 17-19 日.
- ⑥ 野村 渉, 中原 徹, 橋本知恵, 大庭賢二, 相馬 晃, 田中智博, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を模倣した立体構造特異的人工抗原分子の創製. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム. 愛知, 2010 年 11 月 1-2 日.
- ⑦ 鳴海哲夫, 清家俊輔, 尾崎太郎, 新井啓之, 野村 渉, 玉村啓和. 有機銅試薬によるクロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム. 愛知, 2010 年 11 月 1-2 日.
- ⑧ Arai H, Narumi T., Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. Development of Small CD4 Mimic Molecules that Induce Conformational Changes in gp120. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
- ⑨ 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- ⑩ 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 尾崎太郎, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- ⑪ 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体の創製研究. クロロアルケン型ジペプチドイソスターの

合成研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.

- ⑫ 鳴海哲夫, 落合千裕, 山田裕子, 吉村和久, 原田恵嘉, 大橋南美, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.
- ⑬ 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.
- ⑭ Narumi T, Hayashi R, Tomita K, Kobayashi K, Tanahara N, Ohno H, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Nomura W, Tamamura H, Oishi S, Fujii N. Diastereoselective synthesis of (Z)-fluoroalkene dipeptide isosteres and their incorporation into the selective CXCR4 antagonists. The 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium. Jeju Island, Korea, Nov8-11, 2009
- ⑮ Ochiai C, Yoshimura K, Yamada Y, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Shibata J, Hatada M, Matsushita S, Tamamura H. Development of CD4 mimic small molecules targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV entry. 第 10 回熊本エイズセミナー. 熊本, 2009 年 9 月 28-29 日.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: ケモカインレセプターCXCR4 の二価型  
アンタゴニストの創製とがん細胞のイメ  
ーシング方法の開発

発明者: 玉村啓和、野村渉、鳴海哲夫、田中  
智博

権利者: 玉村啓和、野村渉、鳴海哲夫、田中  
智博

種類: 特許

番号: 特願 2009-159771

出願年月日: 2009 年 7 月 6 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

該当事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳴海 哲夫 (TETSUO NARUMI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
助教

研究者番号: 50547867

(2) 研究分担者

該当事項なし