

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460147

研究課題名(和文) 短寿命¹¹C放射性核種標識のためのsp³-sp³炭素間高速C-メチル化反応の開発研究課題名(英文) Development of rapid C-methylation between two sp³-hybridized carbons for incorporation of short-lived positron-emitting ¹¹C radionuclide

研究代表者

古山 浩子 (Koyama, Hiroko)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50402160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：「高速C-[¹¹C]メチル化反応」は、¹¹CH₃I使用のもと炭素-炭素結合形成反応により短寿命放射性核種¹¹Cを代謝安定な位置に標識できる新規標識合成法である。本研究では、最後に残されたsp³炭素間のクロスカップリング反応の実現に取り組み、薬剤分子構造において応用範囲が広いベンジル位およびアリル位炭素(sp³炭素)に¹¹Cで標識できる新たなパラジウム触媒系を見いだした。本反応は実際のN-(4-[¹¹C]エチルフェニル)プロピオンアミドの¹¹C標識体の効率的合成にも適用された。本法の活用により、ヒトPETイメージング研究への適用をも念頭にした再現性が高く、品質の高いプローブが提供される。

研究成果の概要(英文)：“Rapid C-[¹¹C]methylation” is a groundbreaking methodology introduced for the synthesis of short-lived ¹¹C-incorporated PET probes based on the use of C-C bond formation. The rapid cross-coupling reaction between two sp³-hybridized carbons remained to be explored. We developed Pd⁰-mediated cross couplings using CH₃I (and [¹¹C]CH₃I) on the benzylic and allylic sp³ carbons applicable in various drug molecular structures. The utility of a rapid reaction was demonstrated by reacting between [¹¹C]CH₃I and boronic acid ester to afford N-(4-[¹¹C]ethylphenyl)propionamide efficiently. The novel methodology possesses a high potential to incorporate the ¹¹C radionuclide into organic frameworks in high reproducibility and high quality for human PET imaging.

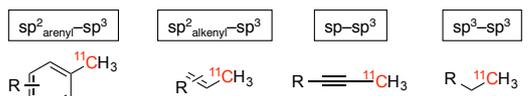
研究分野：医歯薬学

キーワード：PETプローブ合成 アルキル-アルキル間クロスカップリング反応 高速反応 ボロン化合物 パラジウム触媒

1. 研究開始当初の背景

(1) PETは、ポジロン放出核種 (^{11}C , ^{18}F など) の使用のもとに、生物が生きた状態のまま外部から体内の分子を高精度かつ非侵襲的に画像化できる唯一の方法である。創薬プロセスの早い段階でのPET技術の導入により、前臨床から臨床の間における候補薬剤の高い脱落率の抑制など医薬品開発の効率を大幅に改善することが期待される。 ^{11}C の半減期はわずか20.4分であり、放射能の急激な減衰のため、サイクロトロンを用いた放射性核種の製造から、標識反応、分離・精製、そして生体への投与までを半減期の3倍以内で遂行する必要がある。したがって、 ^{11}C 標識において反応に残された時間はわずか5分程度となり、ここに化学の新たな挑戦がある。

(2) 鈴木・土居らは、汎用性の観点から ^{11}C の使用を選択し、放射性核種含有化合物のヨウ化 ^{11}C メチルの捕捉基質として過剰量使用が可能で、分離・精製時にも安定なメタロイド基質を使用した高速カップリング反応による高速C- ^{11}C メチル化を実現した(図1) 引用文献①, 発表論文⑤。ヨウ化 ^{11}C メチルの捕捉

図1. 4型式のC- ^{11}C 結合.

基質として、化学的安定性が高く、高い疎水性により逆相クロマトグラフィーによる目的標識体の分離・精製を容易にする有機スズ化合物(トリブチルスタニル体)あるいはホウ素化合物(ボロン酸エステル体)の使用が重要である。本グループでは、脳内中枢型プロスタサイクリン受容体に特異的に結合する15R-TICの ^{11}C 含有PETプローブの創製を契機に、まず、ベンゼン環上へのStille型高速C- ^{11}C メチル化反応を創出した引用文献①。従来のStille反応の反応条件では高速反応の達成は困難であるが、配位不飽和錯体を形成する $\text{P}(\text{o-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4)_3$ や $\text{P}(\text{tert-C}_4\text{H}_9)_3$ のかさ高いホスフィン配位子の導入(図2A)と $\text{Cu}(\text{I})/\text{K}_2\text{CO}_3$ あるいは $\text{Cu}(\text{I})/\text{CsF}$ の組み合わせによる相乗効果(図2B)およびアミド系溶媒の使用により高速反応の進行が可能となった。ボロン酸エステル基質を使用する鈴木-宮浦反応も、高速化には同様にかさ高いホスフィン(図2A)と K_2CO_3 や CsF などの異なる塩基性添加剤の組み合わせが不可欠である。最近、ホスフィンの過剰量添加、 CuBr/CsF の添加効果、極性の高い環状アミド系NMP溶媒の導入により医薬品の基本構造に多く含まれるヘテロ芳香環上へのメチル化反応を実現した引用文献②。

2. 研究の目的

適用構造の一般化により図1に示した4型式の高速C- ^{11}C メチル化反応が実現されれば、

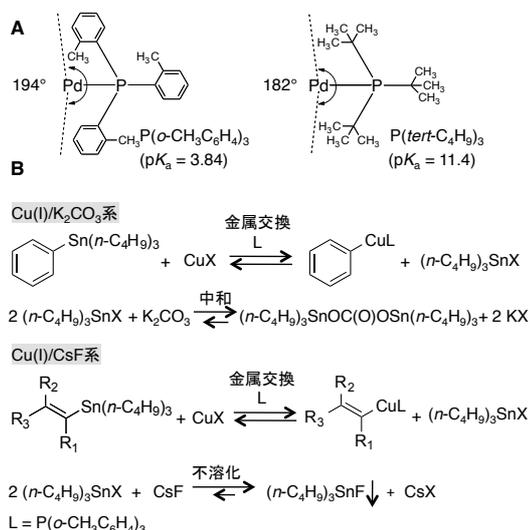


図2. A: 高速反応に必要なかさ高いホスフィン; B: $\text{Cu}(\text{I})/\text{K}_2\text{CO}_3$ あるいは $\text{Cu}(\text{I})/\text{CsF}$ を組み合わせた相乗効果: Sn/Cu 金属交換反応を促進する反応系で生じる反応性の高いハロゲン化スズ($(\text{n-C}_4\text{H}_9)_3\text{SnX}$)を塩基により中和あるいは不溶化し、 Sn/Cu 金属交換反応を促進する(K_2CO_3 と CsF の塩基性の違いも重要)。

ほとんどの有機化合物の ^{11}C メチル標識が可能になる。本研究では、4型式の高速反応のうち最後に残されたアルキル基間の $\text{sp}^3\text{-sp}^3$ 型高速メチル化反応の実現に取り組んだ。

3. 研究の方法

ベンジルトリブチルスタナンを使用したヨウ化メチルによるアルキル基間のクロスカップリング反応ではスズに置換したブチル基の反応への関与により低沸点化合物であるペンタン(^{11}C ペンタン)が副生し、安全面の問題のみならず原理的に低収率でしか目的放射性化合物を得ることができない。また、 β 位に水素を有するアルキルボロン酸エステルのカップリング反応では、 β -水素脱離反応によるアルケンの副生を避けることができない。これらの問題点を考え、ベンジルボロン酸エステルあるいはシンナミルボロン酸エステルを高速C-メチル化反応の基質とした。

(1) 過剰量のベンジルボロン酸ピナコールエステル(1)を基質としたヨウ化メチルとの高速クロスカップリング反応の条件検討: 極微量に生成されるヨウ化 ^{11}C メチル(約100 nmol)の使用を念頭にヨウ化メチル/捕捉基質のモル比を1:40に設定し、エチルベンゼン(2)の収率が90%以上で反応が進行する反応条件を探索する(図3)。具体的には、ホスフィンリガンドの種類およびその量、添加塩基の種類およびその量、極性溶媒の種類、反応温度をスクリーニングする。ホスフィンリガンドには、配位不飽和錯体を形成するようなかさ高い配位子である $\text{P}(\text{o-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4)_3$ 、 $\text{P}(\text{tert-C}_4\text{H}_9)_3$ 、BrettPhos類、*N*-ヘテロ環状カルベンのほか、1,2-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロンセンなどの二座配位子の効果を検討する。

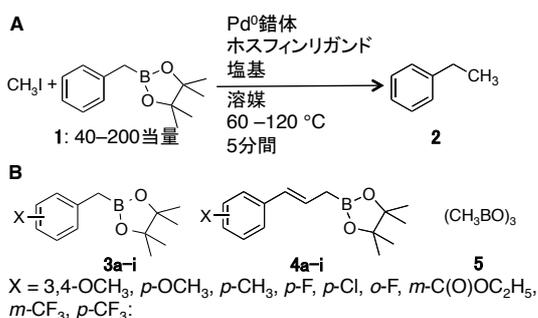


図3. A: sp³-sp³型高速C-メチル化反応条件を検討するためのモデル反応式: ベンジルピナコールボロン酸エステル(1)とヨウ化メチルとのクロスカップリング反応によるエチルベンゼン(2)の合成; B: sp³-sp³型高速C-メチル化反応を検討するボロン酸エステル誘導体の構造。

実際のPETプローブ合成では極微量のヨウ化¹⁴Cメチルに対して捕捉基質を超過剰量(1000当量以上)使用している。ヨウ化メチル/捕捉基質のモル比を、PET条件に近似したときの反応(1:200)を評価し、触媒系がPETプローブ合成に相応しいか評価する。

(2) sp³-sp³型高速メチル化反応が適用される構造の拡張: 各種ベンジルおよびシナミルボロン酸エステル誘導体とヨウ化メチルとの高速クロスカップリング反応への応用展開: sp³-sp³型高速C-メチル化反応が適用される構造の拡張のために、ベンジルピナコールボロン酸エステルおよびシナミルボロン酸エステルに電子供与性置換基および電子吸引性置換基を導入した誘導体(図3B, 3a-i, 4a-i), ボロキシ((CH₃BO)₃, 5)に対して、上記した(1)で確立された最適化反応条件を適用し、置換基効果にも留意しながら最適反応温度を検討する。

(3) 最適化「高速C-メチル化反応条件」の放射性条件下での適用: 実際の放射性化合物¹⁴CH₃Iを用いた¹⁴C標識化合成において、ベンジルピナコールボロン酸エステル誘導体上記した(1)および(2)で確立された最適化反応条件を適用する。

4. 研究成果

(1) ベンジルホウ素化合物の基本基質を用いた高速C-メチル化反応条件の最適化: 過剰量のベンジルボロン酸ピナコールエステルを基質としたヨウ化メチルとの高速クロスカップリング反応の条件(ホスフィンリガンドおよび塩基の種類と使用量, 溶媒, 反応温度)を最適化した(図3A)。その結果, ホスフィン配位子の塩基性(P(o-CH₃C₆H₄)₃: pK_a = 3.84; P(tert-C₄H₉)₃: pK_a = 11.4)が反応の加速に重要であることが示唆され, P(tert-C₄H₉)₃/CsF/H₂O/DMFの条件で高効率的反応が実現することを見いだした(2: 88%)。加えて, この条件下での反応収率はベル型温度依存性があることを見だし(無置換体(X = H)の反応では, 80 °Cの反応温度において最高収率を示す), 異なる化合物間での最適

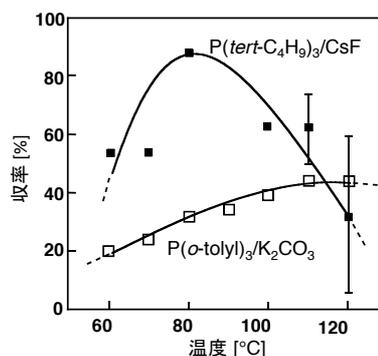


図4. エチルベンゼン(2)の収率の温度依存性: CH₃I/ホウ素化合物/[Pd{P(tert-C₄H₉)₃}₂]/CsF (1:40:1:10) in 90:10 DMF/H₂O (v/v)の条件(■); CH₃I/ホウ素化合物/[Pd₂(dba)₃]/P(o-tolyl)₃/K₂CO₃ (1:40:0.5:2:2) in 90:10 DMF/H₂O (v/v)の条件(□)。

条件の獲得に有益な知見となった(図4)。また, ヨウ化メチルに対して200当量の捕捉基質の使用によるPET条件に近似したときの反応を評価し, 本触媒系がPETプローブの合成に相応しいことを示すことができた。なお, 大きなbite angleをもつ二座ホスフィン配位子の使用は反応の加速には全く効果なかった。

(2) sp³-sp³型高速C-メチル化反応が適用される構造の拡張: 最適化 sp³-sp³型高速メチル化反応条件をベンジルおよびシナミルボロン酸エステルに電子供与性基としてp-メトキシおよびp-メチル基, 電子吸引性基としてp-フルオロ, p-クロロ, m-エチルエステルおよびm-トリフルオロ基を置換した誘導体3a-i, 4a-iおよびボロキシ(5)に適用したところ, 対応するメチル化体が高収率で得られることがわかった(図3B)。なお, ベンジルボロン酸エステルのオルト位フルオロ基置換体およびパラ位トリフルオロ基置換体に対しては, 低収率でしか対応するメチル化体が得られなかった。

(3) N-(4-エチルフェニル)プロピオンアミドの¹⁴C標識化合物: 実際の放射性化合物¹⁴CH₃Iを用いて最適化反応条件を適用したところ, 目的の¹⁴C標識N-(4-エチルフェニル)プロピオンアミドを90%HPLC分析収率で得られた(図5)。分取HPLCによる単離・精製により, 99%以上の放射化学的純度と95%の化学的純度で5.9 GBqの総放射能をもつ¹⁴C標識化合物が得られた。これにより再現性が高く, 品質の高いプローブの合成を実現した。

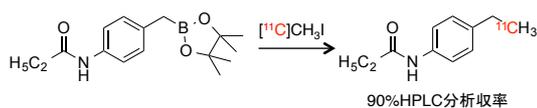


図5. N-(4-[¹⁴C]エチルフェニル)プロピオンアミドの合成 (条件: [Pd{P(tert-C₄H₉)₃}₂]/CsF in 90:10 DMF/H₂O (v/v), 90 °C, 5 min)

(4) T10H塩基のメチル化反応における加速効果: 岸らは, 鈴木-宮浦反応にT10Hの強塩基を添加するとクロスカップリング反応が加速されることを見いだしている。フェニル

ボロン酸エステル, (Z)-4-ベンゾロキシ-2-ブテニルボロン酸エステルおよびベンジルボロン酸エステルをホウ素試薬とし, ヨウ化メチルを用いる「高速 C-メチル化反応」において, TlOH はこれまで我々が開発してきた毒性の低い K_2CO_3 あるいは CsF に優るものではないことがわかった。

結語

本研究により, 新たな触媒系である $P(tert-C_4H_9)_3/CsF/H_2O/DMF$ を見だし, 温和な条件下, 5分で進行する sp^3 炭素であるベンジル位炭素あるいはアリル位炭素への高速 C-メチル化反応を確立した。本反応は電子供与性および吸引性基が置換したベンジルおよびシンナミルボロン酸エステル誘導体に適用され, 実際の PET とレーザーである *N*-(4-エチルフェニル)プロピオンアミドが高品質に合成された。本法の活用により, エチル鎖を炭素骨格に含むインスリン非依存型糖尿病でインスリン抵抗性のある患者の血糖値を下げるための薬であるピオグリタゾンや, ステロイドホルモン受容体陽性乳がんの治療薬として処方されているタモキシフェンなどの医学的に重要な薬剤の ^{11}C 含有 PET プローブの合成に応用される。

<引用文献>

- ① M. Suzuki, H. Doi, M. Björkman, Y. Andersson, B. Långström, Y. Watanabe, R. Noyori, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 2039-2042.
- ② M. Suzuki, K. Sumi, H. Koyama, Siqin, T. Hosoya, M. Takashima-Hirano, H. Doi, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12489-12495.

5. 主な発表論文等

(研究代表者および研究分担者に下線)

[雑誌論文] (計 10 件, すべて査読あり)

- ① Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residue with 1,2-dihydroxybenzene groups. Yoshiyuki Soeda, Misato Yoshikawa, Akio Sumioka, Sumihiro Maeda, Hiroyuki Osada, Yasumitsu Kondoh, Akiko Saito, Tomihiro Miyasaka, Tetsuya Kimura, Masaaki Suzuki, Hiroko Koyama, Yuji Yoshiike, Hachiro Sugimoto, Yasuo Ihara, and Akihiko Takashima, *Nature Commun.* **2015**. DOI: 10.1038/ncomms10216
- ② Discovery of non-competitive thrombin inhibitor derived from competitive tryptase inhibitor skeleton: Shift in molecular recognition resulted from skeletal conversion of carboxylate into phosphonate. Hiroshi Aoyama, Ryosuke Ijuin, Jun-ya Kato, Sarasa

Urushiyama, Masashi Tetsuhashi, Yuichi Hashimoto, Tsutomu Yokomatsu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3676-3680.

10.1016/j.bmcl.2015.06.039

- ③ Efficient syntheses of $[^{11}C]$ zidovudine and its analogues by convenient one-pot palladium(0)-copper(I) co-mediated rapid C- $[^{11}C]$ methylation. Zhouen Zhang, Hisashi Doi, Hiroko Koyama, Yasuyoshi Watanabe, Masaaki Suzuki, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2014**, *57*, 540-549. DOI: 10.1002/jlcr.3213
- ④ Synthesis of ^{11}C -labeled retinoic acid, $[^{11}C]$ ATRA, via an alkenylboron precursor by Pd(0)-mediated rapid C- $[^{11}C]$ methylation. Masaaki Suzuki, Misato Takashima-Hirano, Hideki Ishii, Chika Watanabe, Kenzo Sumi, Hiroko Koyama, Hisashi Doi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3622-3625. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.05.041
- ⑤ Pd(0)-mediated rapid cross-coupling reactions, the rapid C- $[^{11}C]$ methylations, revolutionarily advancing the syntheses of short-lived PET molecular probes, Masaaki Suzuki, Hisashi Doi, Hiroko Koyama, Zhang Zhouen, Takamitsu Hosoya, Hirotaka Onoe, Yasuyoshi Watanabe, *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 516-541. DOI: 10.1002/tcr.201400002
- ⑥ Evaluation of TlOH effect for Pd⁰-mediated cross-coupling of methyl iodide and excess boronic acid ester toward fabrication of $[^{11}C]CH_3$ -incorporated PET tracer. Hiroko Koyama, Hisashi Doi, Masaaki Suzuki, *Int. J. Org. Chem.*, **2013**, *3*, 220-223. DOI:10.4236/ijoc.2013.33030
- ⑦ Synthesis of poly-substituted pyrazolo[1,5-a]quinolines through one-pot two component cascade reaction. Jun-ya Kato, Ryosuke Ijuin, Hiroshi Aoyama, Tsutomu Yokomatsu, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 2766-2775. DOI: 10.1016/j.tet.2014.02.081
- ⑧ Pd⁰-mediated rapid coupling of methyl iodide with excess amounts of benzyl- and cinnamylboronic acid esters: efficient method for incorporation of positron-emitting ^{11}C radionuclide into organic frameworks by coupling between two sp^3 -hybridized carbons. Hiroko Koyama, Zhouen Zhang, Ryosuke Ijuin, Siqin, Jeongwan Son, Yuma Hatta, Masashi Ohta, Masahiro Wakao, Takamitsu Hosoya, Hisashi Doi, Masaaki Suzuki, *RSC Advances* **2013**, *3*,

- 9391-9401. DOI: 10.1039/C3RA40815A
- ⑨ Evaluation of Oatp and Mrp2 activities in hepatobiliary excretion using newly developed positron emission tomography (PET) tracer, [¹¹C]dehydropravastatin, in rats. Tomotaka Shingaki, Tadayuki Takashima, Ryosuke Ijuin, Xuan Zhang, Tomohiro Onoue, Yumiko Katayama, Takashi Okauchi, Emi Hayashinaka, Yilong Cui, Yasuhiro Wada, Masaaki Suzuki, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusahara, Yuichi Sugiyama, Yasuyoshi Watanabe, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, 347, 193-202. DOI: 10.1124/jpet.113.206425
- ⑩ Novel strategy for synthesis of substituted benzimidazo[1,2-a]quinolones. Jun-ya Kato, Yutaro Ito, Ryosuke Ijuin, Hiroshi Aoyama, Tsutomu Yokomatsu, *Org. Lett.* **2013**, 14, 3794-3797. DOI: 10.1021/ol14017723

[学会発表] (計 4 件)

- ① 国際学会発表: Hiroko Koyama, Hisashi Doi, Masaaki Suzuki, Evaluation of T1OH Effects for Pd⁰-Mediated Cross-Coupling of Methyl Iodide and Excess Boronic Acid Esters toward ¹¹C-Incorporated PET Tracer Synthesis, Research area (10) Bench to Bedside: Chemistry of Health Care, Poster 225, 2015 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2015) (2015年12月15~20日, ホノルル、ハワイ、米国).
- ② Hiroko Koyama, "Synthesis of Disease Oriented and Novel PET Probe by Revolutionarily ¹¹C Labeling Method", Japan-China Nuclear Medicine Joint Symposium in Okinawa, March 14-15, 2015, Mercure Hotel, Okinawa Naha. Invited lecture
- ③ 古山浩子 「¹¹C 標識 PET プローブ合成のための sp³炭素の高速メチル化法」, Bio Tech 2014 第13回国際バイオテクノロジー展/技術会議 2014年5月16日, 東京ビックサイト.
- ④ 古山浩子 「高速クロスカップリング法による短寿命 ¹¹C, ¹⁸F 含有 PET プローブの革新的合成法」国立大学法人名古屋大学名古屋大学グローバル COE プログラム「機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点」グローバル COE 第33回プログレスレポート会議 2012年9月25日, 名古屋大学基礎医学研究棟1階会議室. 招待講演

[図書] (計 1 件)

- ① Masaaki Suzuki, Hiroko Koyama, Misato Takashima-Hirano, Hisashi Doi, Pd⁰-Mediated Rapid C-[¹¹C]Methylation and C-[¹⁸F]Fluoromethylation: Revolutionary Advanced Methods for General Incorporation of Short-Lived Positron-Emitting ¹¹C and ¹⁸F Radionuclides in an Organic Framework. In *Positron Emission Tomography-Current Clinical and Research Aspects*; Chap. 5; Ed. Chia-Hung Hsieh; InTech; open access publisher; 2012; pp 115-152.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古山 浩子 (KOYAMA, Hiroko)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 5 0 4 0 2 1 6 0

(2) 研究分担者

伊集院 良祐 (IJUIN, Ryosuke)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 4 0 4 4 2 9 2 5