

薬理活性を有するC4-四置換型ヌクレオシド誘導体の効率的合成法の開発

著者	福山 圭
号	52
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1158号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122791

ふくやま けい

氏名（本籍地） 福 山 圭

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1158 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）生物産業創成科学専攻

論 文 題 目 薬理活性を有する C4-四置換型ヌクレオシド誘導体の効率的合成法の開発

博士論文審査委員 （主査）教 授 桑原 重文

教 授 山下 まり

准教授 仲川 清隆

准教授 不破 春彦

論文要旨

薬理活性を有する C4-四置換型ヌクレオシド誘導体の
効率的合成法の開発

東北大学大学院農学研究科

生物産業創成科学専攻

生物有機化学分野

福山 圭

指導教員 桑原 重文 教授

序

フレミングによる 1928 年のペニシリンの発見に端を発する抗生物質の開発・供給は、人々の細菌感染症による死亡率を大きく低下させることに貢献してきたが、近年大きな社会問題となっている感染症は、鳥インフルエンザ、エイズ、エボラ出血熱などウイルスによるものが多い。それらのウイルスは遺伝子変異による強毒性化や薬剤耐性の獲得などにより、人類に対する脅威を深刻化させており、それらに対抗する新たな医薬品の創製は現代医療における喫緊の課題と言えよう。

本博士論文では、修飾ヌクレオシド構造を有する抗エイズウイルス候補薬 EFdA (4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine) の効率的全合成法の確立と、その研究過程で見出した新規 C4-四置換型フラノース誘導体を用いた架橋化核酸 (bridged nucleic acid : BNA) 単量体の単段階合成について研究を行った。第 1 章では、EFdA 合成の鍵となる新規 C4-四置換型フラノース誘導体の創製と、それを用いた EFdA の高収率全合成ルートの開拓について記述した。第 2 章では、核酸医薬品としての期待が高まっている BNA の単量体合成における新規 C4-四置換型フラノース誘導体の適用について述べた。

第 1 章 抗 HIV 活性を有するヌクレオシド誘導体 EFdA の合成研究

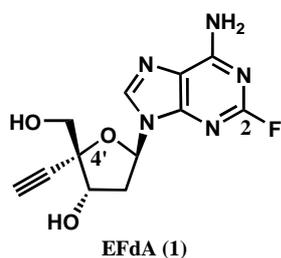
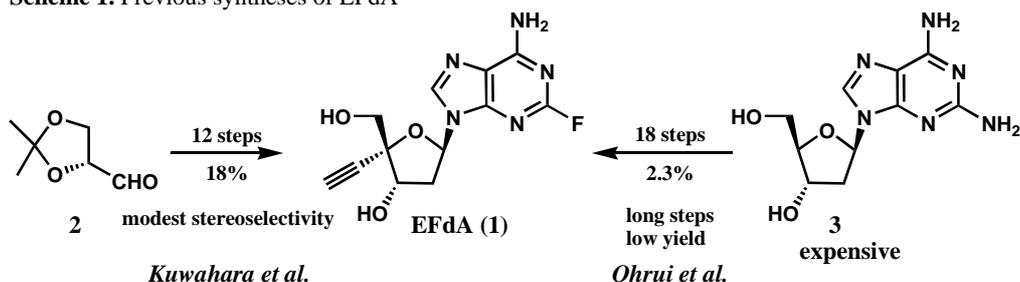


Figure 1. Structure of EFdA (1).

EFdA (**1**) は東北大学名誉教授 (現横浜薬科大教授) の大類洋らにより設計・合成されたヌクレオシド型逆転写酵素阻害剤である (Figure 1)¹⁾。その特徴として①既存臨床薬の数万倍から数百倍の増殖阻害活性を持つ [EC_{50} (HIV-1_{NL4-3}), 50 pM]、②急性毒性を示さない (ICR マウス, 100 mg/kg p.o.)、③長い血中半減期 ($t_{1/2}$, 17.2 h)、④薬剤耐性を含む各種 HIV に有効、など抗 HIV 薬として望ましい特性を備えている。一方、本化合物の臨床開発における最大のネックは **1** の供給体制が十分でない点にある。既存の 2 つの合成法 (大類法^{1a, 2)}、桑原法³⁾) が知られているものの (Scheme 1)、原料価格、収率、立体選択性の点で問題を残していた。この様な背景の下、著者は真に実用的な EFdA 合成法の開発研究を行った

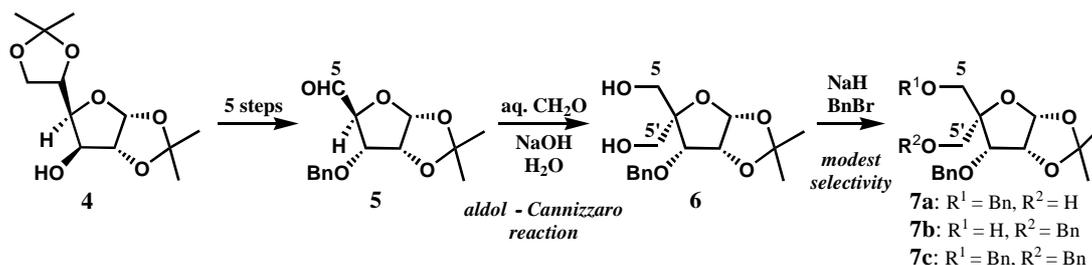
Scheme 1. Previous syntheses of EFdA



1-1. 新規 C4-四置換型フラノース誘導体の創製研究

EFdA の合成における最大の課題は、C4'位の四置換不斉炭素を如何にして構築するかである。フラノース誘導体の4位に炭素置換基を導入して四置換炭素とする方法としては、安価で大量に入手可能な diacetone-D-glucose (**4**)から5工程で得られる5-オキソペントフラノース誘導体 **5** を aldol-Cannizzaro 反応により4-ヒドロキシメチル化して **6** を得る Moffatt らの方法が唯一の報告例であったが⁴⁾、生成する2つの水酸基の選択的保護に問題があった (Scheme 2)。

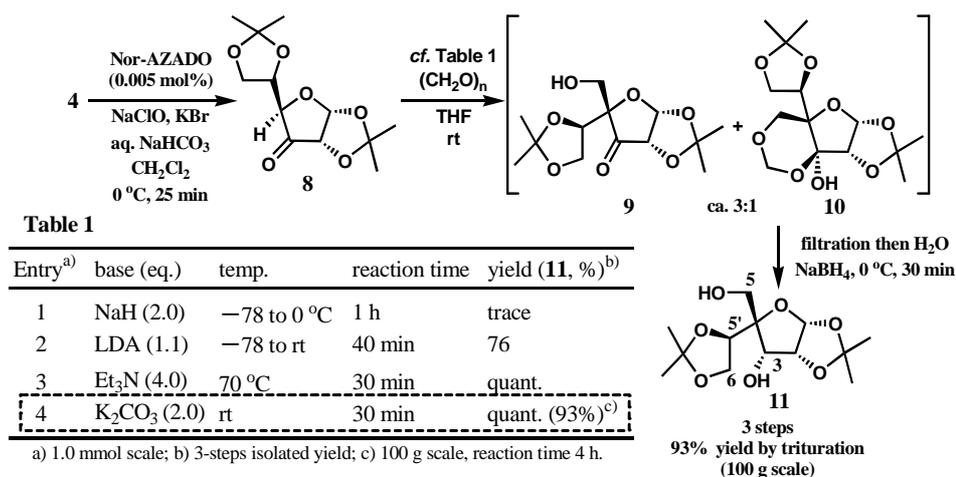
Scheme 2. Moffatt's 4-hydroxymethylation of 5-oxo pentofuranose



そこで、**4** の Nor-AZADO 酸化で定量的に得られる3-ケトフラノース誘導体 **8** とパラホルムアルデヒドとのアルドール反応について検討した結果、 K_2CO_3 や Et_3N を塩基として用いると、4位の立体化学の反転を伴って、アルドール反応生成物 **9** とそれがホルムアルデヒドと過剰反応を起こして環化した **10** の混合物が定量的に得られることを見出した (Scheme 3, Table 1)。 **10** は報告例の少ないアセタール/ヘミアセタール連続構造を持つ新規糖誘導体であり、還元処理により **9** とともにアルコール **11** へと立体選択的に変換できた (アルドール反応完結後、濾過により塩基を除去し、濾液に水と $NaBH_4$ を加えることで簡便に C4-四置換炭素を持つ **11** を得る手法を確立した;白色結晶, 100

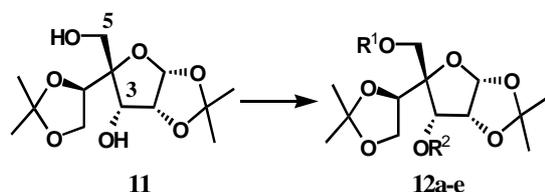
g スケール, **4** から3工程, 通算収率 93%)。以下に述べるように, **11** の3位, 5位および5', 6'位は選択的な修飾が可能であり, 自由度の高い新規な四置換炭素含有合成ユニットになり得るものと考えている。

Scheme 3. 4-Hydroxymethylation of 3-keto furanose



1-2. 3位および5位の水酸基の保護と5',6'-部位の変換

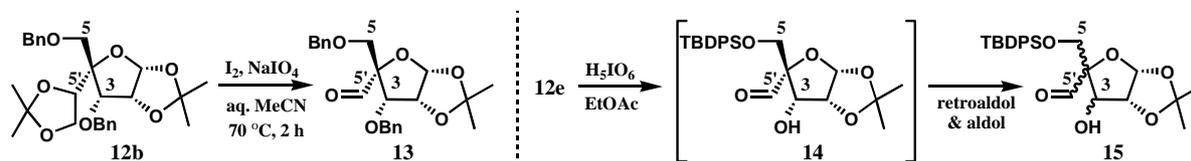
Table 2. Protection of the hydroxy groups at the C3 and C5 positions.



Entry	reagent (eq.)	base (eq.)	solvent	temp.	time	product		yield (%)	
						R ¹	R ²		
1	PMBCl (2.2)	NaH (2.5)	THF	reflux	30 min	12a	PMB	PMB	quant.
2	BnBr (2.2)	NaH (2.5)	THF	reflux	30 min	12b	Bn	Bn	quant.
3	BzCl (2.2)	Py.	—	rt	30 min	12c	Bz	Bz	81
4	TBSCl (3.0)	imid. (2.5)	DMF	rt	30 min	12d	TBS	TBS	quant.
5	TBDPSCl (1.2) then TBSCl (1.2)	imid. (2.5)	DMF	rt	30 min then 30 min	12e	TBDPS	TBS	quant.

NaIO₄で処理すると、5',6'位アセトナイドの選択的脱保護と酸化開裂が一挙に起こり、**13**を定量的に与えることを見出した (Scheme 4)⁵⁾。一方、シリル保護体**12e**をH₃IO₆で処理するとジアステレオマー混合物**15**が得られた。これは、脱保護と酸化開裂により**14**が生成し、retroaldol反応による開環とaldol反応による再閉環が起こった結果であると考えている。

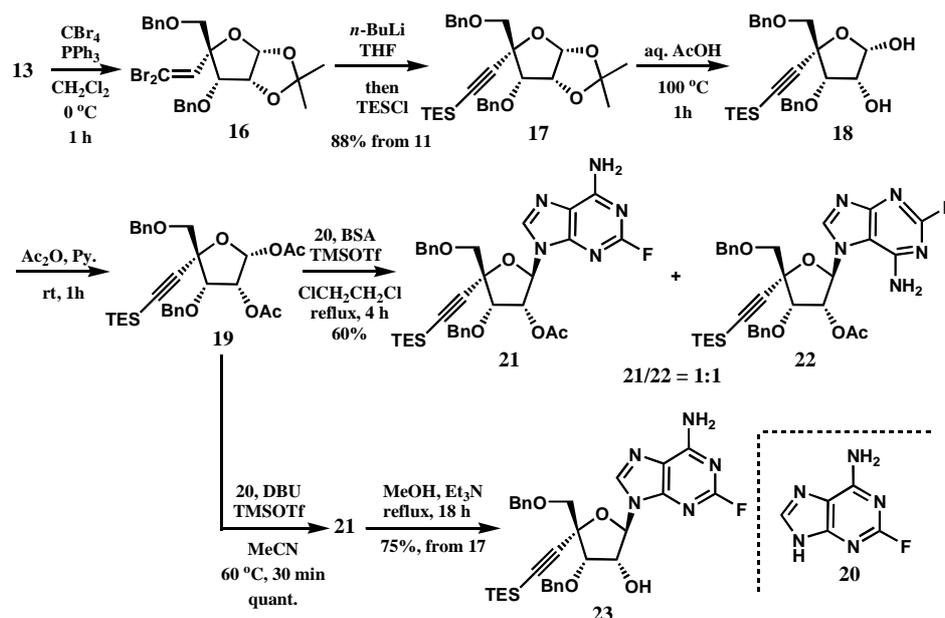
Scheme 4. Oxidative cleavage of acetonide **12b**



1-3. アセチレン部位の構築とβ選択的N-グリコシル化

アルデヒド**13**をCorey-Fuchs法により保護アルキン体**17**へと導いた (**11**より4工程, 88%) (Scheme 5)。 **17**のアセトナイドを脱保護して**18**とした後、アセチル化によりジアセテート**19**を得た。**19**をVorbrüggen条件⁶⁾(2-fluoroadenine (**20**)/BSA/TMSOTf)を用いてN-グリコシル化したところ、**21**と**22**の位置異性体混合物 (1:1) が得られた。そこでVorbrüggen変法⁷⁾(**20**/DBU/TMSOTf)を適用したところ、反応は位置選択的かつ立体選択的に進行し、目的とするヌクレオシド誘導体**21**のみを定量的に得ることが出来た。**21**をメタノリシスにより脱アセチル化してアルコール**23**に変換した (**17**より4工程, 75%)。

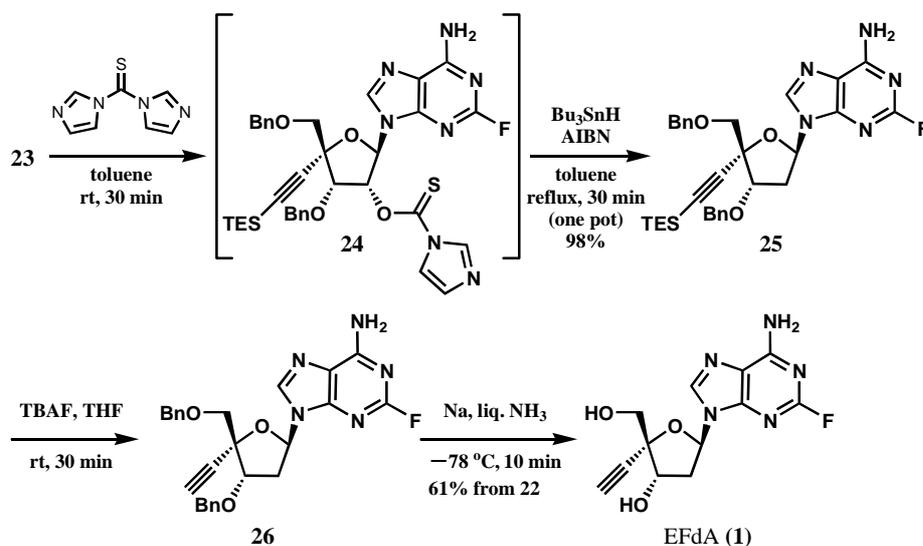
Scheme 5. Conversion of aldehyde **13** into ribonucleoside derivative **23**.



1-4. 2'-脱酸素化と脱保護による EFdA (**1**)の全合成の完成

23 に対する Barton–McCombie 法による 2'-脱酸素化⁸⁾を検討した。まず、THF 中、**23** を 1,1'-チオカルボニルジイミダゾールを用いて **24** に変換し、粗生成物のトルエン溶液に Bu_3SnH とラジカル開始剤 (AIBN) を室温で加えた後に還流したところ、高収率で **23** が再生する結果となった (Scheme 6 参照)。一方、**24** のトルエン溶液に、還流しながら Bu_3SnH と AIBN のトルエン溶液を加えたところ、目的とする 2'-デオキシ体 **25** が 77% (2 工程) の収率で得られた。最終的には、Scheme 6 に示す通り、**23** をトルエン中、室温で **24** に変換した後、その反応溶液を還流しながら Bu_3SnH と AIBN のトルエン溶液を滴下したところ、**23** からワンポット、98%の高収率で **25** を得るこ

Scheme 6. Completion of the synthesis of EFdA (**1**)



と成功した。**25** のシリル保護基を TBAF で除去して **26** とした後、2つのベンジル基を Birch 還元で除去することにより、EFdA (**1**) の全合成を完了した⁹⁾。合成した **1** の各種スペクトルは標品のものと良い一致を示した。

第2章 架橋化核酸単量体の合成研究

架橋化核酸 (bridged nucleic acid: BNA) は、糖部位に架橋構造を有するヌクレオチド鎖である¹⁰⁾。その内 Figure 2 に示した 2',4'-BNA モノマーを構成糖として含む 2',4'-BNA は、フラノース環部位のコンホーメーションが N-type に固定されることで相補的ヌクレオチド鎖に対する結合力が格段に増大するとともに、架橋部位の立体的かさ高さによりヌクレアーゼに対する分解抵抗性も向上することが知られており、主にアンチセンス法に基づく核酸医薬としての応用が期待されている¹¹⁾。

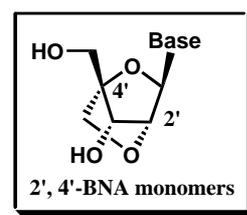


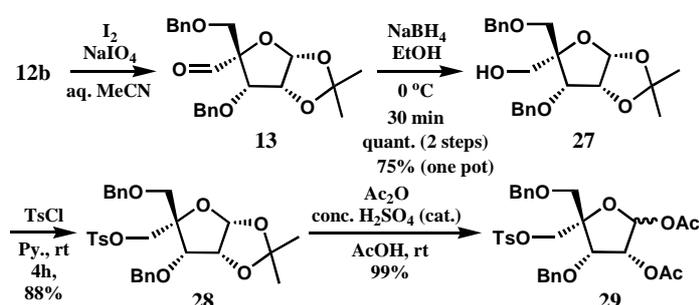
Figure 2. Structure of 2',4'-BNA monomers

2',4'-BNA モノマーの合成に関しては、Moffatt 法によりその C4'-四置換炭素の構築が行われているため、大類らの EFdA 合成と同様に生成する 2 つの水酸基の反応選択性が問題となっていた。そこで著者は、新たに見出した新規 C4'-四置換型フラノース誘導体 **11** を用いた BNA 単量体の効率的合成法の確立を目的として、以下の研究を行った。

2-1. 核酸塩基導入前駆体 **29** の調製

12b の酸化開裂で得たアルデヒド **13** (Scheme 4 参照) をエタノール溶媒中、NaBH₄ で還元することにより、5'-アルコール **27** を定量的に得た (Scheme 7)。収率の向上と操作性の向上を目的に **12b** から **27** へのワンポット変換を検討したが、**12b** を I₂ (cat.)/NaIO₄/aq.

Scheme 7. Preparation of N-glycosidation precursor **29**



MeCN 条件により **13** とした後、反応液に 30 w/v チオ硫酸ナトリウム水溶液と NaBH₄ を加える方法を試みたものの、**27** の単離収率は 75% に留まった。**27** をトシル化した後、アセトナイドの脱保護とアセチル化をワンポットで行い、核酸塩基導入前駆体であるジアセテート体 **29** へと誘導した。

2-2. Vorbrüggen 変法による核酸塩基部位の導入の検討

これまでに報告された 2',4'-BNA モノマーの合成では、核酸塩基 (あるいはその保護体) の導入には Vorbrüggen 条件 (核酸塩基/BSA/TMSOTf) が用いられており、第 1 章の EFdA の合成の際に好結果が得られた Vorbrüggen 変法 (核酸塩基/DBU/TMSOTf) を適用した例は見当たらなかった。そこで、Vorbrüggen 変法による核酸塩基部位の導入の検討を行った (Table 3)。ジアセテート体 **29** に対しアデニン (A)、⁶N-ベンゾイ

Table 3. Attempted N-glycosidation by the modified Vorbrüggen reaction.

Entry	TMSOTf (eq.)	base (eq.)	temp.	nucleobase	yield
1	6.0	DBU (2.0)	rt	A	90
2	6.0	—	rt	N ⁶ -Bz-A	12
3	6.0	DBU (2.0)	0 °C	N ⁶ -Bz-A	15
4	6.0	Et ₃ N (2.0)	0 °C	N ⁶ -Bz-A	25
5	3.0	DBU (1.5)	rt	U	decomp.
6	3.0	Et ₃ N (1.5)	0 °C	U	N. R. ^{a)}

a) N. R. = no reaction

ルアデニン (⁶N-Bz-A)、ウラシル (U) との N-グリコシル化を行ったところ、アデニンそのものに関しては ⁹N-グリコシル化が選択的に進行し、ヌクレオシド誘導体が高収率で得られた (Entry 1)。ところが、BNA を核酸自動合成装置で合成する際に実際に用いられる基質である ⁶N-ベ

ンゾイル保護 BNA モノマーの調製を意図して¹⁰⁾, ⁶N-Bz-A による N-グリコシル化を試みたところ、目的物は低収率で得られるのみであった (Entry 2–4)。ウラシルの導入に関しては、目的物を得ることは出来なかった。

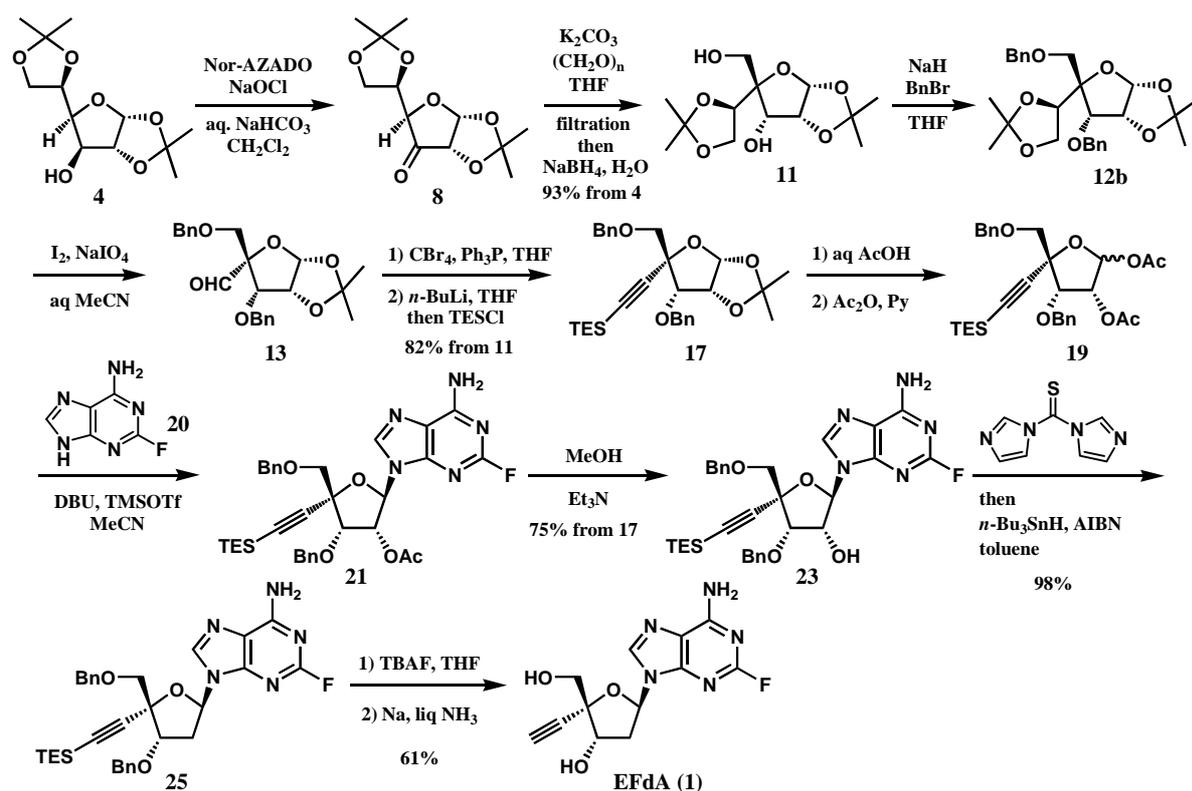
今後は Vorbrüggen 条件 (核酸塩基/BSA/TMSOTf) による核酸塩基またはその保護体の導入を行った後、架橋部位の構築を行って 2',4'-BNA モノマーの合成を目指す予定である。

総括

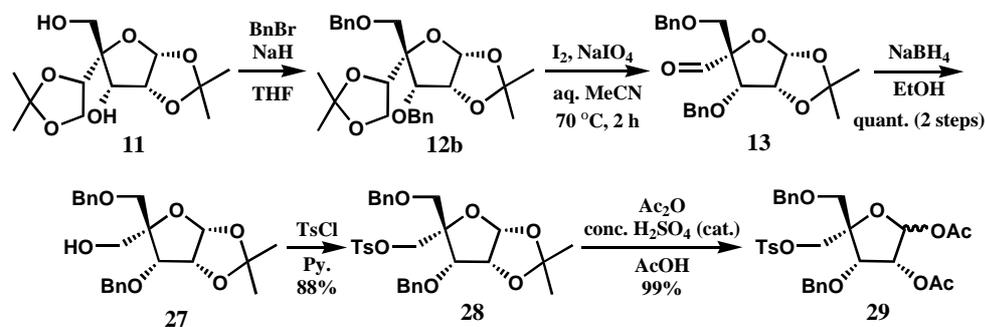
第1章では、安価な原料である diacetone-D-glucose (**4**)から 14 工程、通算収率 37% で EFdA (**1**)を得る合成ルートを確認した (Scheme 8)。本合成ルートでは、3-ケトフラノース誘導体 **8** とパラホルムアルデヒドとのアルドール反応を経る新規 C4-四置換型フラノース誘導体 **11** の創製に成功するとともに、アセトナイドのワンポットでの酸化開裂によるアルデヒドの調製 (**12b** → **13**), Barton–McCombie 法による 2'-脱酸素化のワンポット化 (**23** → **25**) も実現した。ジアステレオマーが生じる可能性のある工程 (**8** → **11**, **19** → **21**) の立体選択性も完璧であり、従来法と比較して効率的で実用的な合成法を確立できたものと考えている。

第2章では、新規 C4-四置換型フラノース誘導体 **11** を用いた架橋化核酸単量体 (2',4'-BNA モノマー) の合成研究を行った (Scheme 9)。これまでの Moffatt 法による C4-四置換中間体の調製を経るルートに比べて、より簡便に塩基導入前駆体 (**29**) を得ることが出来たと考えている。

Scheme 8. Total synthesis of EFdA (1).



Scheme 9. Preparation of N-glycosidation precursor 29 from 11



引用文献

- (1) a) Kohgo, S.; Ohru, H.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Mitsuya, H. WO2005/090349; b) Ohru, H. *Chem. Rec.* **2006**, *6*, 133–143; c) Ohru, H. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2011**, *87*, 53–65.
- (2) Ohru, H.; Hayakawa, H.; Kohgo, S.; Matsuoka, M.; Kodama, E.; Mitsuya, H. J.; *Synth. Org. Chem. Jpn.* **2006**, *64*, 716–723.
- (3) a) Kageyama, M.; Nagasawa, T.; Yoshida, M.; Ohru, H.; Kuwahara, S.; *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5264–5266.; b) Kageyama, M.; Miyagi, T.; Yoshida, M.; Nagasawa, T.; Ohru, H.; Kuwahara, S.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 1219–1225.

- (4) a) Youssefyeh, R. D.; Verheyden, J. P. H.; Moffatt, J. G.; *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1301–1309.; b) Waga, T.; Nishizaki, T.; Miyakawa, I.; Ohruai, H.; Meguro, H.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 1433–1438.
- (5) Yadav, J. S.; Satyanarayana, M.; Raghavendra, S.; Balanarsaiah, E.; *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8745–8748.
- (6) a) Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K.; Bennua, B. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1234.; b) Vorbrüggen, H.; Höfle, G. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1256.
- (7) Kristinsson, H.; Nebel, K.; O’Sullivan, A. C.; Struber, F.; Winkler, T.; Yamaguchi, Y.; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6825–6838.
- (8) Crich, D.; Quintero, L. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1413–1432.
- (9) Fukuyama, K.; Ohruai, H.; Kuwahara, S. *Org. Lett.* **2015** *17*, 828–831.
- (10) a) Kaur H.; Babu B. R.; Maiti S. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4672–4697.; b) Wengl L. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 301–310.
- (11) a)小比賀聡 薬学雑誌 **2000**, *120*, 147–158; b) 小比賀聡 薬学雑誌 **2004**, *124*, 781–790.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	福山 圭
審査委員	主査：教授 桑原 重文 副査：教授 山下 まり 准教授 仲川 清隆 准教授 不破 春彦
学位論文 題目	薬理活性を有する C4-四置換型ヌクレオシド誘導体の効率的 合成法の開発
論文審査の結果の要旨	
<p>本論文は、抗ウイルス作用などの薬理活性を有する C4-四置換型ヌクレオシド誘導体の効率的合成法の開発に関するものであり、二章から成る。第一章では、抗 HIV 活性を有するヌクレオシド誘導体 EFdA の合成について、第二章では、架橋化核酸単量体 (BNA 単量体) の合成について述べている。</p> <p>第一章では、極めて強力な抗 HIV 活性を持ち、耐性ウイルスにも有効で、急性毒性も無く、血中半減期も長いといった優れた薬理学的特徴を有する EFdA (4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine) の効率的合成法の開発に成功している。これまで、ペントフラノース誘導体の C4 位をアルキル化して C4-四置換体とする方法は Moffatt 法のみが知られていたが、C3-ケト型のペントフラノース誘導体とパラホルムアルデヒドとのアルドール反応が炭酸カリウムなどの弱塩基を用いることで定量的且つジアステレオ選択的に進行することを発見し、生成したアルドール付加体の C-3 位ケトン基を立体選択的還元することで、EFdA</p>	

合成のための好適な中間体となる C4-四置換型ペントフラノース誘導体を 90% 以上の単離収率で単一異性体として得ている。また、ビスアセトナイド中間体の選択的脱保護と生成したジオール体の酸化開裂をワンポットで行う新手法を開発している。さらに、ヌクレオシド型中間体の 2'-デオキシ化においては、これまで実施されていた 2 工程による Barton-MaCombie 脱酸素化をワンポットで行う方法を開発することで、定量的な脱酸素化を実現している。本合成法は、安価な原料である diacetone D-glucose から 14 工程で EFdA の全合成が達成され、また、通算収率は 37% と、これまでの合成例に比べて極めて高い。更に、立体選択性が問題となる工程の全てで、単一の立体異性体を与えており、クロマトグラフィーによる精製は僅か 4 回で、十分な純度の EFdA を得ている。以上の結果は、本合成法が、標品供給の問題がネックとなっている EFdA の抗エイズ薬としての治験を円滑化するための解決策になりうる可能性を示している。

第二章では、第三の医薬として注目を集めている核酸医薬の一つである架橋化核酸 (BNA) の単量体合成に、第一章で創製した C4-四置換型ペントフラノース誘導体を組み込む試みを実施し、従来の Moffatt 法経由の合成法に比べて効率的に BNA 単量体合成の重要中間体を得ている。

本研究は、抗エイズ候補薬として注目を集めている EFdA の大量供給を可能とする実用的合成法を開発するとともに、核酸医薬として期待されている BNA の効率的合成法の確立に道を開くものであり、有機合成化学及び創薬領域における貢献は極めて大きい。よって、審査員一同は、本研究が博士の学位に値する研究であると結論した。