

Puberulic acid の誘導体合成および Avermectin 類の収束的合成法の確立

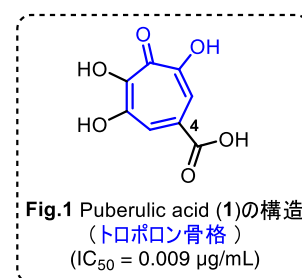
感染制御科学専攻 創薬科学履修コース 生物有機化学

DI-19002 齋藤 亮

「抗マラリア薬創製を指向した Puberulic acid 類の合成と構造活性相関研究」

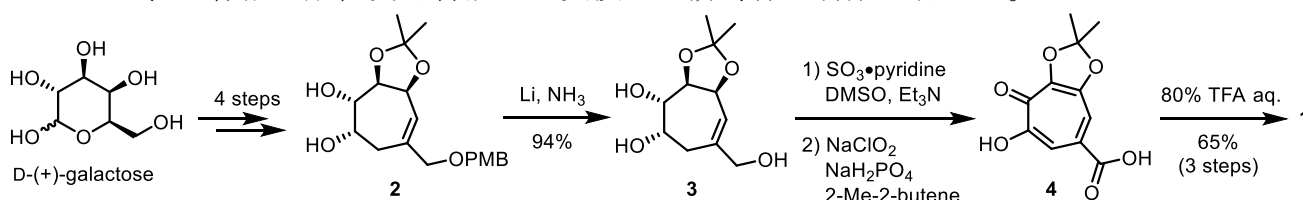
【目的】

世界三大感染症の一つであるマラリアは、既存薬に耐性を持つ原虫の増加により新規作用機序を持つ治療薬の開発が急務である¹⁾。また、蔓延地域の衛生的・経済的状況から、新薬には経口薬として効果を示すことが求められる。この背景の下、所属研究所において puberulic acid (**1**)(Fig. 1)が新規糸状菌から単離された²⁾。その構造的特徴として、高度に酸素官能基化された非ベンゼン系7員環芳香族であるトロポロン骨格を持つ。**1**は薬剤耐性原虫を用いた *in vitro* 抗マラリア活性試験で高活性を示し、新規作用機序を持つと期待される³⁾。しかし、**1**はネズミマラリア感染マウスを用いた *in vivo* 試験では皮下投与で毒性を示し、経口投与では治療効果を示さなかった。そこで新規抗マラリア薬の開発を目的に **1** の誘導化による構造活性相関の解明と、経口投与に有効で且つ無毒性な化合物の創製を目指した。



【方法・結果】

誘導体合成を行うにあたりトロポロン骨格を持つ高い求電子性から直接的な官能基変換は制限されるため、所属研究室で確立された **1** の全合成経路⁴⁾を活用することとした(Scheme 1)。即ち、合成した **1** や全合成中間体の脂肪族7員環化合物に対する変換により、母骨格の酸化度や官能基を変換した誘導体の合成を行った。

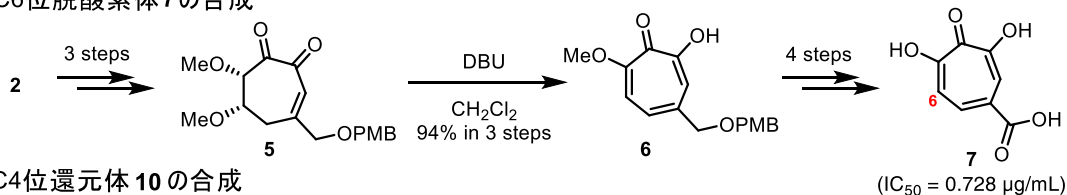


Scheme 1 Puberulic acid(**1**)の全合成経路

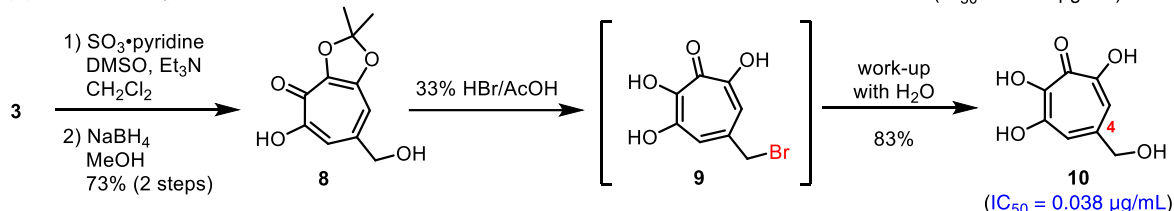
・C6位脱酸素体、C4位還元体、C6位及びC7位メチル化体の合成

まず、**1** のトロポロン骨格上の水酸基及び C4 位カルボキシル基の変換に着手した。C6 位脱酸素体 **7** は、全合成中間体 **2** から得られたジケトン **5** に対する β 脱離に伴う芳香族化により合成した(Scheme 2a)。C4 位還元体の合成では、中間体 **3** から導ける **8** に HBr/AcOH を作用させ、生じたブromo種 **9** を H₂O で後処理することで **10** を得た(Scheme 2b)。C6 位メチル化体 **12** は中間体 **4** の水酸基とカルボン酸を一挙にメチル化した後、加水分解と脱保護により導いた(Scheme 2c)。また、**1** のメチルエステル体 **13** に対して 1 等量の TMSCHN₂ を作用させると C7 位選択的なメチル化が進行し、その後の加水分解により類縁天然物である viticolin A (**15**)の全合成を達成した(Scheme 2d)。

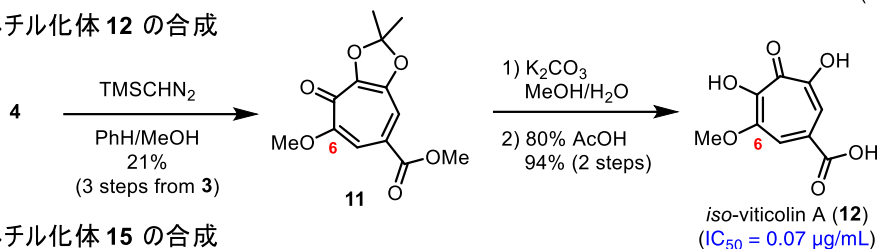
(a) C6位脱酸素体7の合成



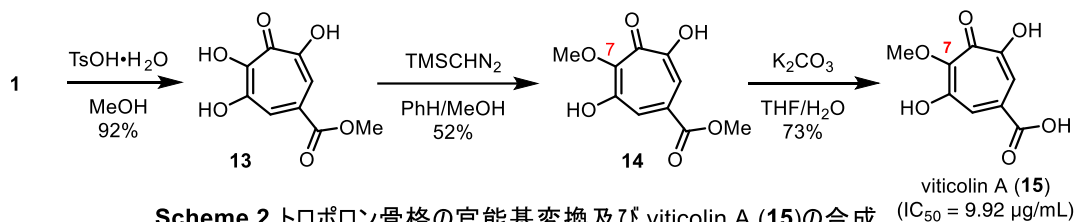
(b) C4位還元体10の合成



(c) C6位メチル化体12の合成



(d) C6位メチル化体15の合成

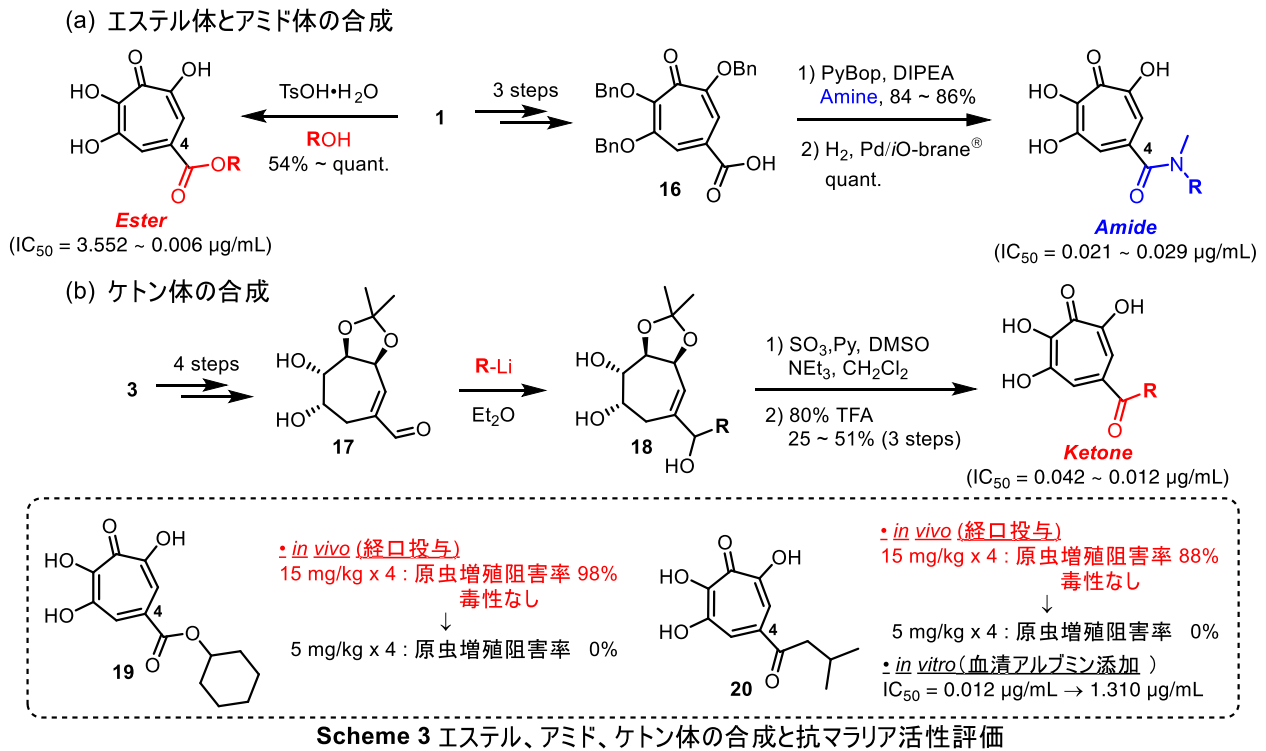


Scheme 2 トロポロン骨格の官能基変換及び viticolin A (15)の合成

合成した誘導体とその中間体の約 40 サンプルに対する *in vitro* 試験の結果、**10** と **12** が高活性を維持し他は活性が低下した。この結果からトロポロン骨格上の連続した無保護の酸素原子が活性発現に重要であり C4 位は変換許容であると示唆された⁵⁾。

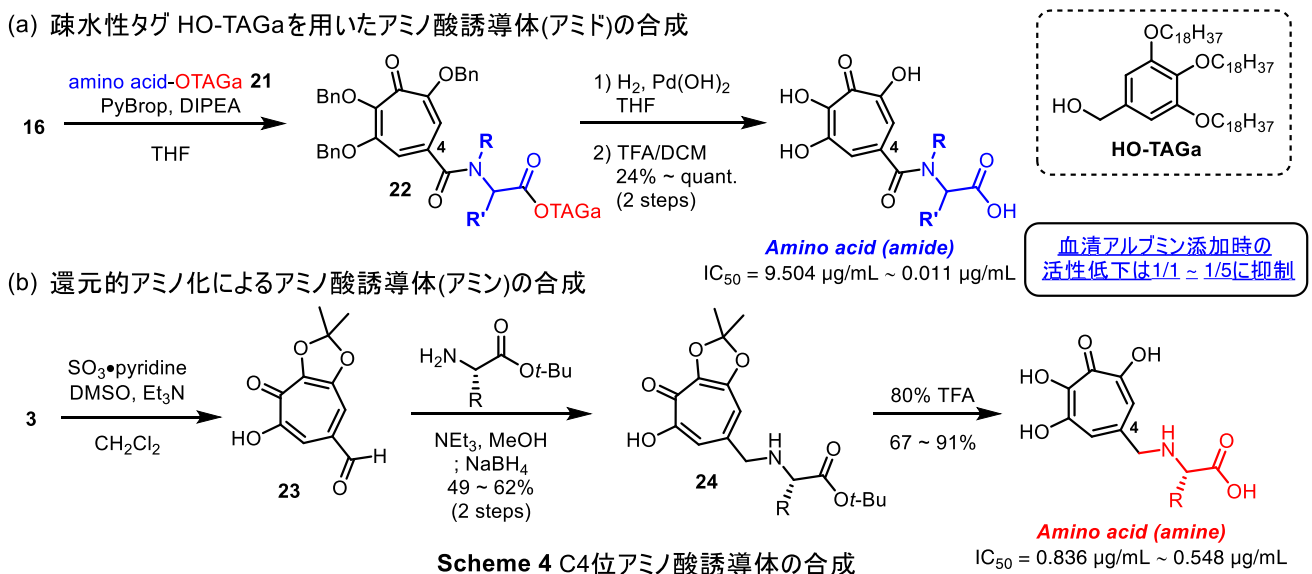
・C4 位エステル、アミド、ケトン体の合成

次の戦略として、**1** の C4 位を変換した誘導体の合成に着手した。エステル体は酸性条件下、種々のアルコールと反応させることで合成した(Scheme 3a)。アミド体の合成においては縮合後の生成物の極性が非常に高く、試薬の残渣との分離が困難であったため、**1** の水酸基を保護した **16** を経由することで純度の高いサンプルを調製した。ケトン体の合成ではトロポロン骨格が持つ求電子性を考慮し、中間体 **3** から導ける共役アルデヒド **17** に対して種々の求核剤を付加させた後に芳香族化することで導いた(Scheme 3b)。得た誘導体 25 種に対し *in vitro* 試験を行ったところ、多くが **1** と同等の活性を示した。一方で、*in vivo* 試験では腹腔内投与においてアミド体は毒性を示したものの、エステル体とケトン体は **1** よりも高い治療効果と安全性を示した。傾向として側鎖の脂溶性を高めた誘導体が有効であり、中でもシクロヘキシルエステル体 **19** とイソブチルケトン体 **20** は天然物の課題を克服し、経口投与(15 mg/kg)においても毒性を示さずに高い治療効果を示した⁶⁾。しかし、投与濃度 5 mg/kg では全ての誘導体が効果を示さなかった。この活性消失は体内吸収後の代謝によるものと推測し、実際に血漿中タンパク質であるヒト血清アルブミンを **20** の *in vitro* 試験に添加すると抗マラリア活性が約 1/100 に低下することが判明した。



・C4位アミノ酸誘導体 (アミド、アミン) の合成

課題克服に向けアルブミンとの結合抑制に有効な立体化学を有し、且つ経口吸収性の改善をも狙えるアミノ酸の導入を試みた。アミド型誘導体の合成では生成物の極性が高く精製が困難であるため、疎水性タグ HO-TAGa⁷⁾を担持させたアミノ酸 **21** を **16** との縮合に用いることで、晶析・濾過のみで高純度かつ高収率で目的物を取得できた (**Scheme 4a**)。また、加水分解耐性を持つアミン型誘導体は **3** から導ける全合成中間体 **23** に対する還元的アミノ化により合成した (**Scheme 4b**)。

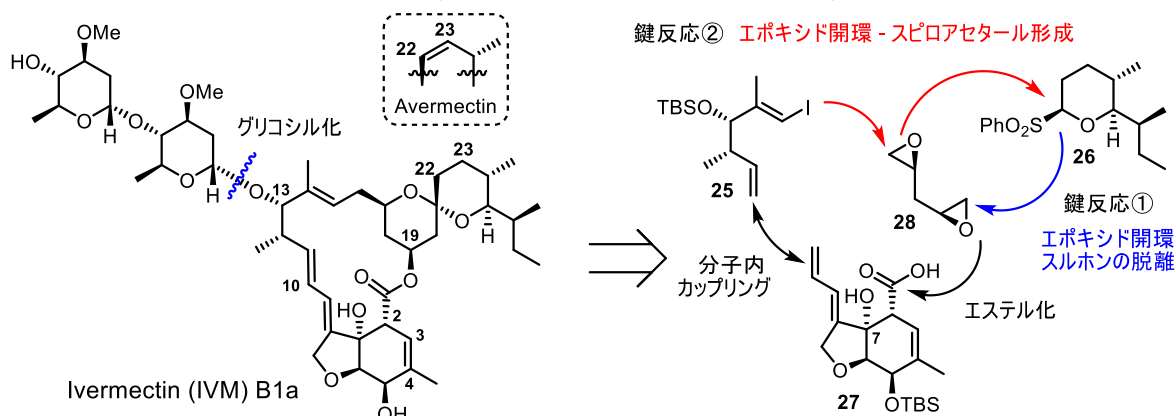


合成したアミノ酸誘導体はケトン体と比較して、アルブミンを添加した *in vitro* 試験における活性が維持された。今後、更なる構造最適化により **1** の誘導体が新規抗マalaria薬として臨床試験に進み、実用化に至ることを期待する。

「コンビナトリアルライブラリー構築を指向した Avermectin 類の合成研究」

【目的・方法】

Avermectin(AVM)は、当研究所で単離された抗寄生虫・殺虫活性を示すマクロライド系天然物である⁸⁾。これまでに ivermectin (IVM) (Scheme 5)を含む 10 種以上の関連誘導体が医薬や動物薬、農薬として全世界で利用されてきた。近年、AVM 類が新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 等に対する抗ウイルス活性や、抗菌、抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった⁹⁾。また、各新作用の構造活性相関は既知の抗寄生虫・殺虫活性とは異なることも判明しているが、既存の半合成的手法では変換部位に限られるためその解明には至っていない。そこで AVM 類の網羅的誘導体合成法を確立し、化合物ライブラリーを構築することで迅速な構造活性相関研究が可能になると考えた。まず本研究の基盤として IVM B1a の効率的合成法の確立を目指し次の戦略を立案した。即ちアグリコンを 3 つのフラグメント (ビニルヨージド **25**、スルホン **26**、ベンゾフラン **27**) に分割し、ビスエポキシド **28** を介した 2 つの鍵反応で連結する。本経路は変換した各フラグメントの組み合わせにより骨格、官能基、立体多様な誘導体合成が可能である。

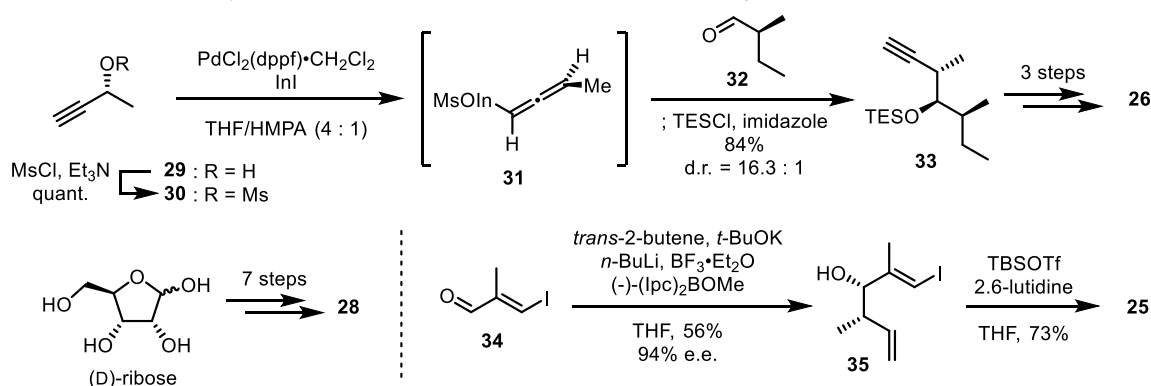


Scheme 5 IVM B1a の構造と逆合成戦略

【結果】

・IVM のアグリコン上部フラグメント **25**、**26**、**28** の量的供給

市販品の不斉アルコール **29** より 2 工程で導ける不斉源 **31** から不斉炭素を有するアルデヒド **32** へのアンチ選択的付加反応¹⁰⁾を鍵に **26** を合成した(Scheme 6)。また **28** は D-ribose をキラルプールとして 7 工程¹¹⁾で、**25** は別途調製した共役アルデヒド **34** に対する不斉クロチル化¹²⁾と水酸基の保護により合成した。



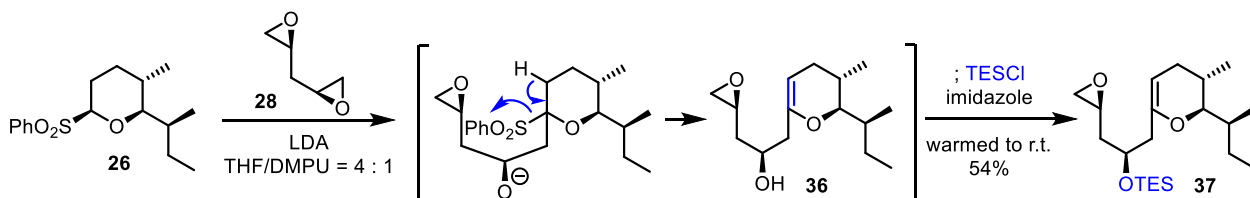
Scheme 6 上部フラグメント **25**、**26**、**28** の調製

・2つの鍵反応による上部ユニット **39** の合成

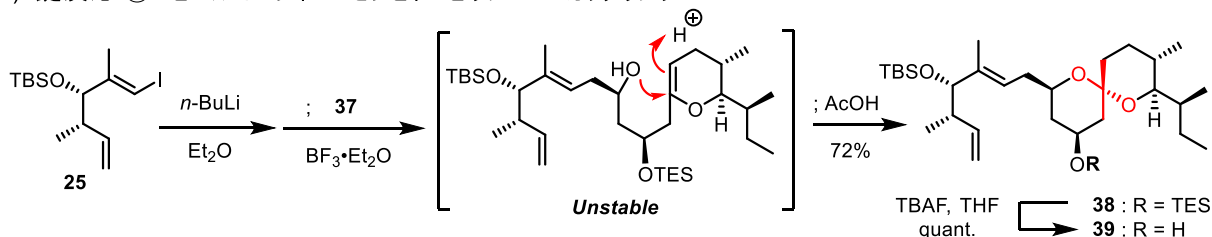
1つ目の鍵反応の塩基性条件下において **26** が不安定であったため、**26** と **28** の混合溶液に対して求核性の無い塩基である LDA を滴加し、脱プロトン化直後に付加を進行させることで基質の分解を抑制した(Scheme 7a)。また、生じるジヒドロピラン **36** は精製条件に不安定であったが、第二級水酸基を系中で保護することで単離可能な **37** を 1pot で取得した。

2つ目の鍵反応では **25** より調製したビニルアニオンから **37** のエポキシドへの付加と、生じた水酸基からエノール部位への分子内環化を一挙に行う(Scheme 7b)。本反応においてはエポキシドが開環した中間体が後処理時に昇温すると分解したため、低温下 AcOH を系中へ添加することでスピロアセタール化を促進させ安定な上部ユニット **38** へと導いた。そして、その後の脱保護により目的の **39** を取得した。

(a) 鍵反応 ① : スルホン **26** とビスエポキシド **28** のカップリング



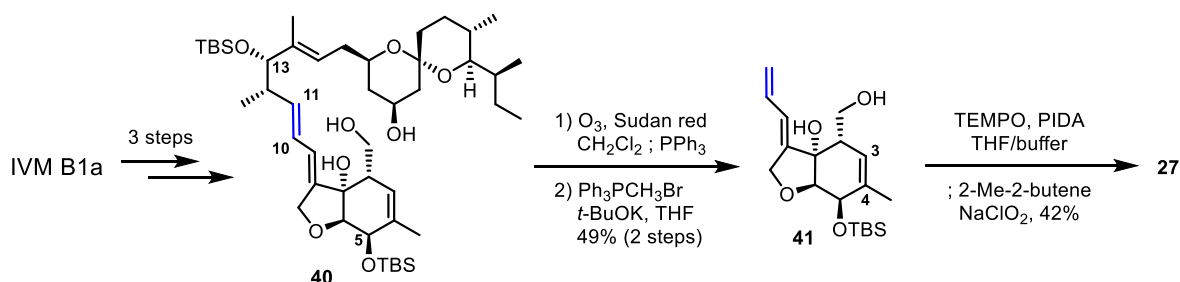
(b) 鍵反応 ② : ビニルヨード **25** とジヒドロピラン **37** のカップリング



Scheme 7 2つの鍵反応による上部ユニット **39** の合成

・IVM のアグリコン下部ユニット **27** の量的供給

IVM B1a から 3 工程で得られるトリオール **40** の共役ジエン(C10-C11)をオゾン分解により開裂した後、得られたアルデヒド体を Wittig 反応により **41** へと変換した(Scheme 8)。次に **41** の第一級水酸基を酸化する際に C3-C4 位オレフィンの異性化やベンゾフラン環の芳香族化を避けるため、中性条件である TEMPO 酸化によりアルデヒドへと変換した後、Pinnick 酸化の試薬を加えることでカルボン酸 **27** へと一挙に導いた。

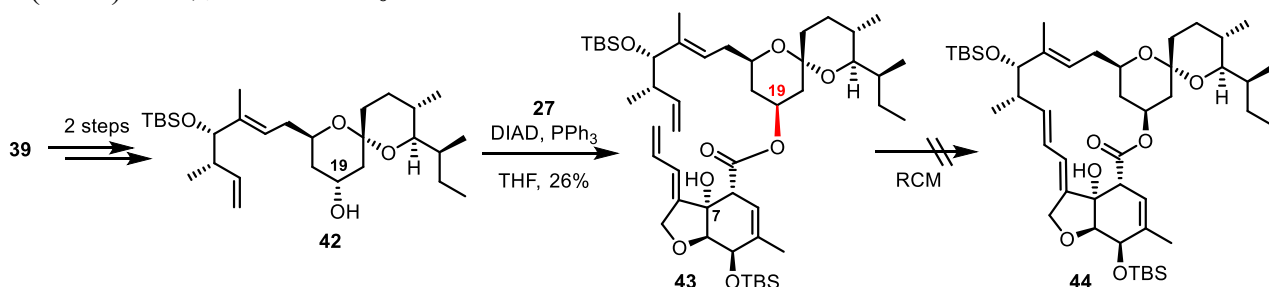


Scheme 8 IVM B1a の分解による **27** の取得

・IVMのアグリコン構築

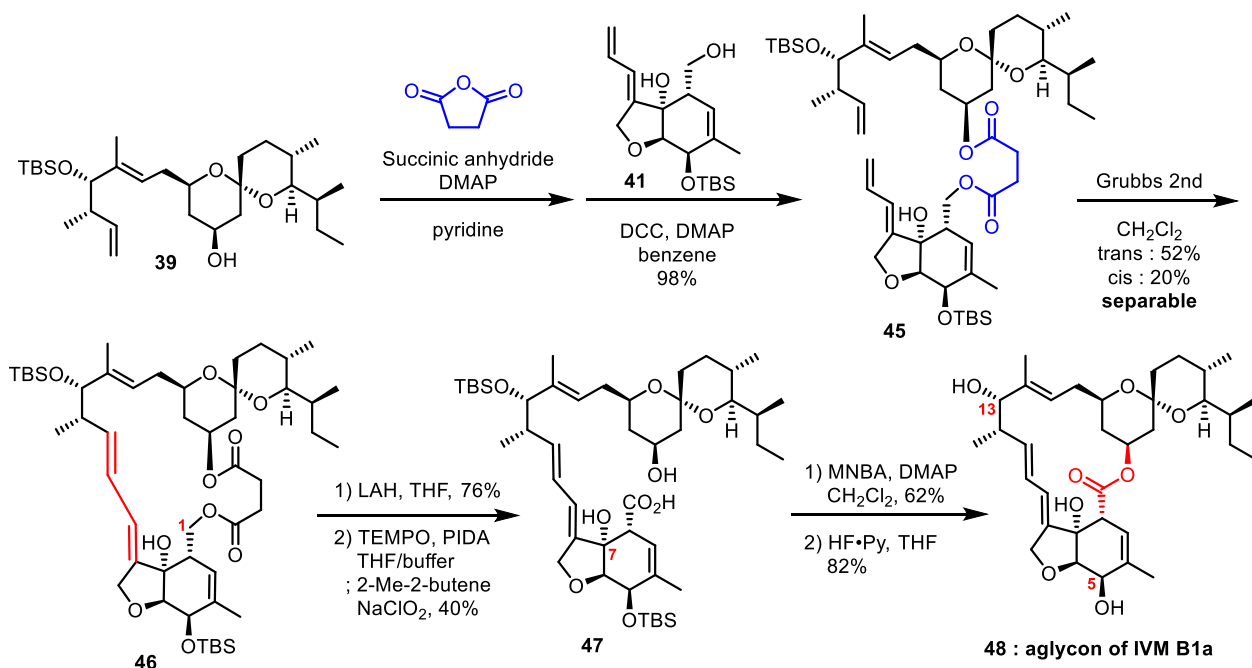
次に合成した上部ユニット **39** と下部ユニット **27** の縮合剤を用いたエステル化を試みたが、いずれの条件においても **27** が分解する結果となった。これは縮合剤とカルボン酸から生じる活性エステルが C7 位水酸基と不安定な β ラクトンを形成し、その分解に伴って副反応を誘発しているものと推測した。

そこで他のエステル化の手法として、**39** の C19 位水酸基を立体反転させた **42** と **27** を用いた光延反応により目的の **43** を与えることを見出した(Scheme 9)。しかし、**43** は多くの不斉炭素や官能基を有するため柔軟性に乏しく、その後の Ring closing metathesis (RCM)は進行しなかった。



Scheme 9 光延反応によるエステル結合の形成

そこで、環員数の増加による基質の柔軟性向上を目的に無水コハク酸をテザーとして **39** と **41** を繋ぎ **45** を調製したところ、期待通り RCM が進行し共役ジエン体 **46** を与えた(Scheme 10)。得られた **46** のテザーを還元的に除去した後、C1 位の第一級水酸基を選択的にカルボンへ酸化し環化前駆体 **47** へと導いた。そして椎名マクロラクトン化と、続く C5、C13 位水酸基の脱保護により IVM B1a のアグリコン **48** の合成を達成し、既存の機器データと完全に一致したことを確認した。



Scheme 10 IVM B1a のアグリコン **48** の合成

今後、本アグリコン合成法の活用により、既存法では困難な構造変換による AVM 類の新規誘導体合成が行われ、各新作用の構造活性相関が解明されることを期待する。

【結論】

1 つ目のテーマでは、所属研究所において見出された抗マラリア活性物質 **1** の網羅的な誘導体合成と生物活性評価により、天然物の課題であった毒性問題を克服し更に経口投与においても効果的な化合物を創製した。また、構造活性相関の一端及び血清アルブミンとの結合を抑制する方法についても明らかにした。

2 つ目のテーマでは、2 つの鍵反応を用いたスピロアセタールを含む IVM B1a 上部ユニットの簡便な合成法と、テザー形成に続く RCM とマクロラクトン化による IVM の新規アグリコン骨格構築法を確立した。

【参考文献】

- 1) Geneva: World Health Organization, World Malaria Report 2021.
- 2) M. Iwatsuki, *et al.*, *J. Antibiot.*, **2011**, *64*, 183-188.
- 3) A. Ishiyama, *et al.*, *J. Antibiot.*, **2014**, *67*, 545-547.
- 4) G. Sennari, *et al.*, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 8715-8718.
- 5) G. Sennari, R. Saito, *et al.*, *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 7259.
- 6) R. Saito, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **2021**, *69*, 564-572.
- 7) H. Tamiaki, *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2001**, *74*, 733-738.
- 8) S. Ōmura, *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1979**, *15*, 361-367.
- 9) C. Andy, *J. Antibiot.*, **2017**, *70*, 495-505.
- 10) J. A. Marshall, C. M. Grant, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 8214-8219.
- (11) Stephan V. Attwood, *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1984**, *1*, 1315-1322.
- (12) K. Arai, *et al.*, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 5560-5563.