

多置換アルケン型ジペプチドイソスターを利用した環状 RGD ペプチドの構造活性相関研究

大石 真也

Structure–Activity Relationship Studies on Cyclic RGD Peptides Utilizing Novel Alkene Dipeptide Isosteres

Shinya OISHI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606–8501, Japan

(Received February 6, 2004)

A structure–activity relationship study was performed on cyclic RGD peptides using a combination of multisubstituted alkene dipeptide isosteres. To clarify the effects on bioactivity of a valine *N*-methyl group in the *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-MeVal-) peptide developed by Kessler's group, novel D-Phe-Val-type isosteres with methyl-substituting groups on the olefin were designed and synthesized. Syntheses of D-Phe- ψ [(*E*)-CH=CMe]-Val-type isosteres were carried out in essentially identical fashion to the previously reported preparation of ψ [(*E*)-CH=CH]-type congeners. Alternatively, D-Phe- ψ [(*E*)-CMe=CX]-Val-type isosteres (X=H or Me) were synthesized *via* stereoselective alkylation of β -(1,3-oxazolidin-2-on-5-yl)- α,β -enoates using organocopper reagents. The resulting four isosteres were utilized in either solution- or solid-phase peptide synthesis to afford the cyclic RGD peptidomimetics, *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- ψ [(*E*)-CX=CX]-Val-) (X=H or Me). $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_{11b}\beta_3$ integrin antagonistic activities of the peptidomimetics along with Kessler's peptides were comparatively evaluated. In addition, structural calculations of these compounds by simulated annealing/energy minimization using dihedral and distance restraints derived from ¹H-NMR data in DMSO gave insight into the effects of the valine *N*-methyl group as well as the D-phenylalanine carbonyl oxygen.

Key words—(*E*)-alkene dipeptide isostere; cyclic peptide; RGD peptide; $\alpha_v\beta_3$ -integrin antagonist; structure-activity relationship study

1. はじめに

インテグリンは、 α 鎖と β 鎖から成るヘテロダイマーで、細胞–細胞間、細胞–マトリックス間の相互作用に関わる膜タンパク質である。これまでに、 α 鎖と β 鎖の組み合わせに基づく24種類のサブタイプが知られているが、このうち、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは腫瘍に関わる血管新生や破骨細胞の骨表面への接着に関与していることから、そのアンタゴニストは腫瘍転移抑制剤や骨粗鬆症の治療薬として期待されている。^{1–3)} 現在までに低分子化合物を含む数多くの $\alpha_v\beta_3$ アンタゴニストが報告されており、それらの多くはインテグリンの認識配列である RGD

(Arg-Gly-Asp) 配列を基にデザインされている。^{4–8)} 1991年、KesslerらはRGD配列を含む環状ペプチド *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **1**が強力な $\alpha_v\beta_3$ アンタゴニスト活性を有し、また、 $\alpha_{11b}\beta_3$ インテグリンに対するアンタゴニスト作用に比して高い選択性を有することを報告した (Fig. 1).⁹⁾ さらにKesslerらは、**1**の*N*-メチルアミノ酸スキャンを通じて、バリン残基を*N*-メチルバリン残基に置換した誘導体 *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-MeVal-) **2**が、**1**に比べてより強力かつ選択的な $\alpha_v\beta_3$ アンタゴニスト作用を有することを見出した。¹⁰⁾ ペプチド**1**はDMSO溶液中でD-PheとGlyをそれぞれtype II' β ターン構造と γ ターン構造の*i*+1残基目とする構造をとり、^{11,12)} 一方、ペプチド**2**は水溶液中で2つのinverse γ ターン構造と1つの γ ターン構造が相互変換する構造をとることによって、高い $\alpha_v\beta_3$ アンタゴニスト活性を示すと考えられている。¹⁰⁾

京都大学大学院薬学研究科 (〒606–8501 京都市左京区吉田下阿達町)

e-mail: soishi@pharm.kyoto-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

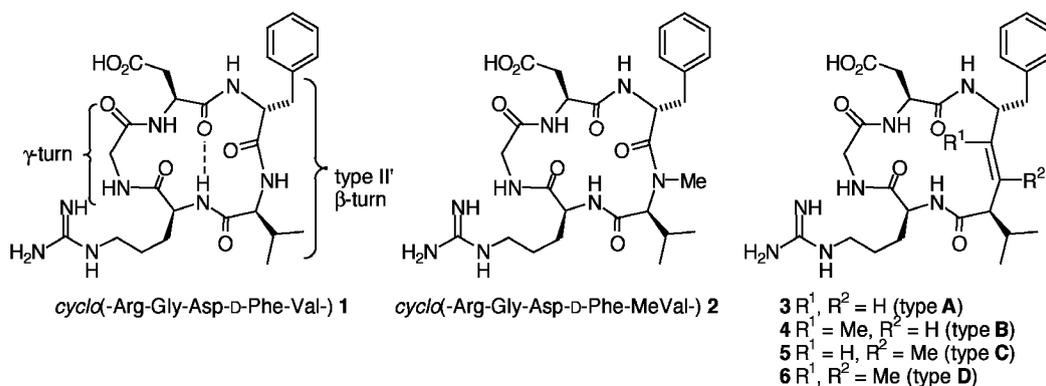


Fig. 1. Structures of Cyclic RGD Peptides and EADI-Containing Cyclic RGD Pseudopeptides

しかしながら、いずれの構造解析においても分子全体の構造（二次構造）によって議論がなされているのみであり D-Phe-L-Val 及び D-Phe-L-MeVal 部位の相対的な構造変化について詳細な検討はなされていない。

インテグリンのような膜タンパク質に結合するペプチド性リガンドは、X線結晶解析や固体 NMR の技術が進歩した現在においても、その結合状態におけるコンホメーションを知ることは容易ではない。2002 年、Xiong らは、ペプチド **2** が結合した $\alpha\beta_3$ の細胞外ドメインの結晶構造を解析し、その結合様式を明らかにしたが、¹³⁾ ペプチド **1** が結合したインテグリンの構造解析が行われていないことに加え、D-Phe-L-Val 及び D-Phe-L-MeVal 部位はインテグリンとの直接的な結合に関わる RGD 配列の反対側に位置するため、**2** におけるメチル基の寄与についてはいまだに明らかではない。筆者らは、このジペプチド部位にペプチドミメティックを利用することにより化学修飾を施し、その構造—活性相関を理解することとした。

E-アルケン型ジペプチドイソスター (EADI) は、ペプチド結合の共鳴構造に基づく平面性をモチーフとしたイソスターであり、ペプチドの構造全体への直接的なコンホメーション変化を与えずに、当該ペプチド結合の分子内若しくは分子間水素結合への関与と言った局所構造の検証を行う上で有用であることから、さまざまな生理活性ペプチドの構造—活性相関研究や構造—機能相関研究への応用がなされている (Fig. 2).^{14,15)} 最近、Wipf らは、(D,L)-型の EADI が type II' β ターン構造の優れたモチーフとなり、また三置換アルケン型の EADI **8** (type **B**)

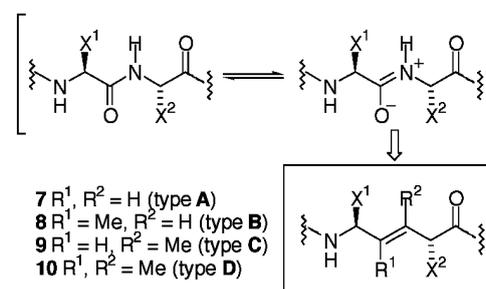


Fig. 2. Structures of (E)-Alkene Dipeptide Isosteres (EADIs)

が対応する二置換アルケン型の EADI **7** (type **A**) に比べてターン構造の安定化により大きく寄与することを報告した。¹⁶⁾ さらに、Gardner らは、四置換アルケン型の EADI **10** (type **D**) が β ヘアピン構造のプロモーターとなることを報告し、オレフィン上に置換基を有する EADI がより有用なペプチド結合の等価体となることを示唆している。^{17,18)} しかしながら、本研究を開始した当初、オレフィン上に置換基を有するイソスター **8—10** の実用的な合成法が確立していなかったため、実際のペプチドへの応用は二置換アルケン型の EADI **7** に限定されていた。

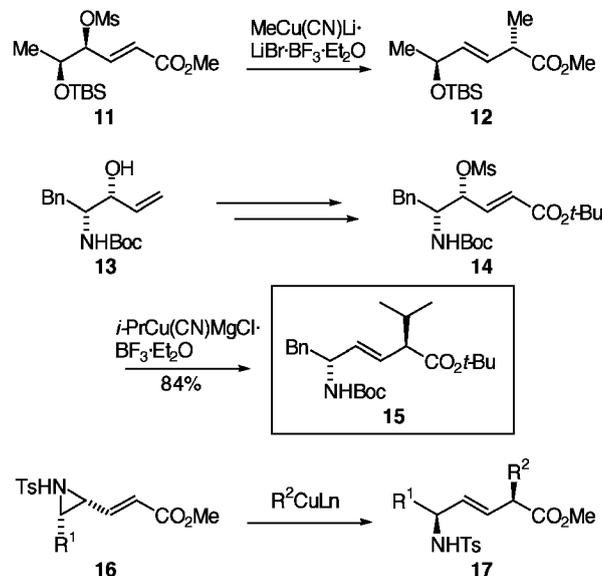
筆者らは、これら多置換アルケン型イソスターが、環状 RGD ペプチド中のターン構造のモチーフとして適当であるとの仮説を基に、D-Phe-L-Val 及び D-Phe-L-MeVal ジペプチドに相当する種々アルケン型イソスターを利用することにより、N-メチル化に伴う環状 RGD ペプチドの構造変化と活性の上昇の相関についてより合理的に評価できるものと考えた。本稿では、これらに必要とされるペプチド結合中の N-メチル基及びカルボニル酸素に相当するメチル置換基をオレフィン上に有する新規アルケ

ン型イソスターの合成とペプチド合成への応用、及び、得られたペプチドの生物活性の評価と NMR を用いた構造解析について紹介する。

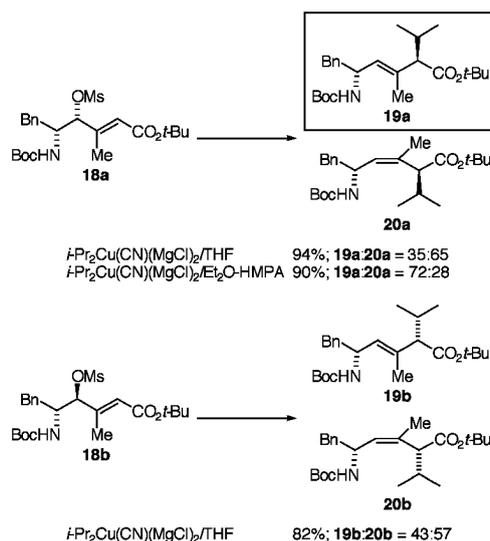
2. 二置換及び三置換アルケン型ジペプチドイソスター $\text{D-Phe-}\psi[(E)\text{-CH=CX}]\text{-L-Val}$ ($\text{X} = \text{H}$ or Me) の合成と環状 RGD ペプチドへの応用

EADI の合成では、アミノ酸側鎖に相当する 2 つのキラル中心と、オレフィンの幾何異性の選択的な構築が求められる。Ibuka らは、 γ 位に脱離基を有する α,β -不飽和エステル **11** の有機銅試薬を用いたアルキル化反応が、 α 位にのみ立体特異的に進行し、 E 体のオレフィンをもつ β,γ -不飽和エステル **12** のみを与えることを見出し、¹⁹⁻²³ 本反応が EADI の合成に有用であることを報告した (Scheme 1).^{24,25} すなわち、キラルなアミノ酸からジアステレオ選択的に合成可能なアミノアルコール **13** を原料とし、主鎖部分の炭素鎖を伸長後、**14** のメシロキシ基を脱離基として利用することで、目的の EADI **15** が効率的に得られる。さらに本反応は、アジリジン不飽和エステル **16** を基質とする反応にも応用され、汎用性の高い EADI の合成を可能にしている。²⁶⁻³⁰ 筆者らは、本法に従い、環状 RGD ペプチドの D-Phe-L-Val 部位に相当する二置換アルケン型ジペプチドイソスター **15** を合成した。³¹

この有機銅試薬を用いた位置及び立体選択的アルキル化反応を経る EADI の合成法は、 β 位にメチル基を有する β,γ -不飽和エステル **18a** を基質として用いることにより、 D-Phe-L-MeVal の N -メチル基に相当するメチル基を有する type C の EADI **19a** の合成に応用可能であると予想される (Scheme 2).^{31,32} しかしながら、**18a** は二置換アルケンの基質 **14** に比較して著しく反応性が低く、従来用いられていた有機銅試薬 $i\text{-PrCu}(\text{CN})\text{MgCl}$ では目的の反応が進行せず、 $i\text{-Pr}_2\text{Cu}(\text{CN})(\text{MgCl})_2$ により中程度の収率でアルキル化反応が進行した。また、THF 中において $anti\text{-S}_N2'$ 型のアルキル化反応が α 位に選択的に進行するものの、主生成物は D-Phe-D-MeVal 型の Z 型オレフィンをもつイソスター **20a** であった。同様に、 $anti$ 体の基質 **18b** の反応では、 D-Phe-L-MeVal 型のイソスター **20b** が主生成物として得られた。有機銅試薬を用いたアルキル化反応による Z 型オレフィンの副生についての報告は、これまでに二置換アルケンの基質に関する 1 例



Scheme 1. Synthesis of EADIs Having a Disubstituted Alkene



Scheme 2. Synthesis of $\psi[(E)\text{-CH=CMe}]$ -Type EADIs

のみであり、基質のオレフィン上の置換基によって生成物の生成比が著しく変化することは興味深い。³³ これら Z 型オレフィンをもつイソスターは、ペプチド結合をシス型のコンホマーに固定化したものとして有用であり、 N -メチル化に伴うペプチド結合のシストランス異性化の可能性を調べるために、**20b** もまた RGD ペプチドに応用した (Fig. 3).³¹ 目的とする D-Phe-L-MeVal 型の EADI **19a** は、反応条件の検討の結果、 Et_2O 中でのアルキル化反応により優先的に得ることができた。³²

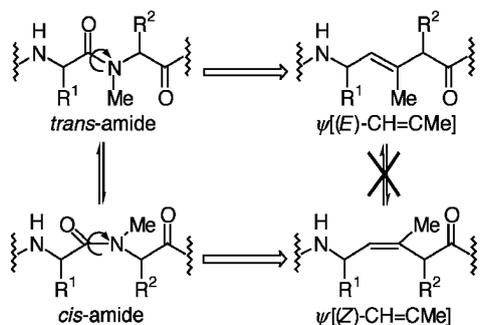


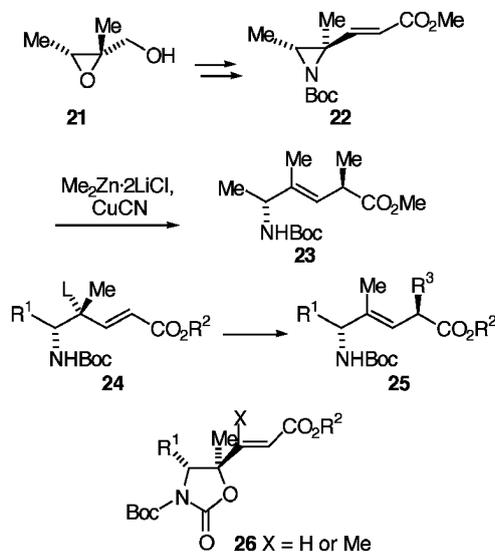
Fig. 3. Utilization of $\psi[(E)\text{-CH=CMe}]$ - and $\psi[(Z)\text{-CH=CMe}]$ -Type EADIs as Constrained Analogues of *trans*- and *cis*-Peptide Bonds

3. 1,3- オキサゾリジン -2- オン誘導体に対する有機銅試薬によるアルキル化反応を利用した三置換・四置換アルケン型ジペプチドイソスター $\text{D-Phe-}\psi[(E)\text{-CMe=CX}]\text{-L-Val}$ ($\text{X}=\text{H}$ or Me) の合成

カルボニル酸素に相当する炭素原子を有する三置換アルケン型イソスター **23** (type C) は, Wipf らによりアジリジン不飽和エステル **22** を基質とする有機銅試薬を用いたアルキル化反応を経て初めて合成された (Scheme 3).¹⁶⁾ しかしながら, 本合成法は, 出発原料としてキラルなエポキシド **21** を用いており, 多様なアミノ酸側鎖に相当する EADI を合成するための普遍性に欠ける. このため, 筆者らは, 二置換アルケン型イソスターと同様に, キラルなアミノ酸を出発原料とする三置換・四置換アルケン型イソスターの合成法を確立することとした.

γ 位にメチル基を有するイソスター **25** の鍵合成中間体となる α,β -不飽和エステル **24** は, γ 位の脱離基が三級炭素に結合しているため, **14** 若しくは **16** に相当する化合物の合成が容易でないことが予想された. 実際, Wipf らによるイソスターの合成において, エポキシド **21** からアジリジン **22** への変換の収率は極めて低い. 筆者らは, これに代わる中間体として γ 位にメチル基を有する β -オキサゾリジン $-\alpha,\beta$ -不飽和エステル **26** が, アミノ酸から容易に合成可能であり, かつ, 有機銅試薬によるアルキル化反応の基質として適当であると考えた.^{34,35)}

まず, アミド **27** 由来のメチルケトン若しくはアリルアルコール **28, 29** 由来のエノンに, 塩化セリウム存在下それぞれアルケニル若しくはメチル Grignard 試薬を作用させることにより, *syn* 体,

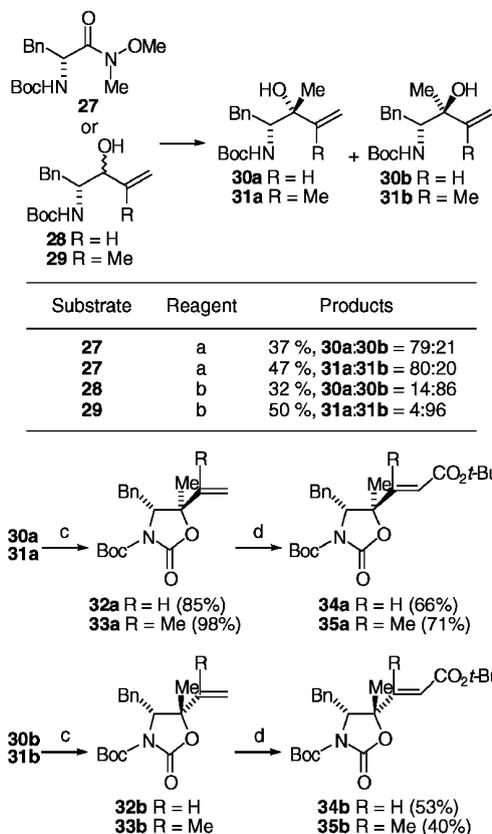


Scheme 3. Synthetic Scheme for EADI Having a Tri-Substituted Alkene

anti 体のアリルアルコール **30a,b, 31a,b** をそれぞれ優先的に得た. 続いて, 塩基性条件下の環化反応によりビニルオキサゾリジノン **32a,b, 33a,b** とし, オゾン酸化と Wittig 反応により不飽和エステル **34a,b, 35a,b** を得た. これらの基質は, アルキル化反応において脱離基となる γ 位の立体配置が $i+1$ 残基のアルキル基の立体配置を支配することが期待される点はこれまでの基質と同様であるが, **30a,b, 31a,b** の三級水酸基をそのまま脱離基として利用することにより, 基質の合成工程を簡略化している (Scheme 4).

イソプロピル Grignard 試薬由来の有機銅試薬によるオキサゾリジノン **34a,b, 35a,b** のアルキル化反応について, Table 1 にまとめた (Scheme 5). β 位にメチル基を有しない基質 **34a,b** からは, $i\text{-PrCu}(\text{CN})\text{MgCl} \cdot \text{BF}_3$ 及び $i\text{-Pr}_2\text{Cu}(\text{CN})(\text{MgCl})_2 \cdot \text{BF}_3$ のいずれから *anti*- $\text{S}_{\text{N}}2'$ 型の反応が進行し, 好収率で生成物を得た (entries 1—4). この際, *cis* 体のオキサゾリジノン **34b** からは, D-Phe-D-Val 型の EADI **36b** のみが得られたのに対し, *trans* 体 **34a** からは D-Phe-L-Val 型の EADI **36a** に加えて D-Phe-D-Val 型の *Z* 体のイソスター **38a** が副生した. 一方, β 位にメチル基を有する基質 **35a,b** からは, 基質 **18** のアルキル化反応と同様に, $i\text{-Pr}_2\text{Cu}(\text{CN})(\text{MgCl})_2 \cdot \text{BF}_3$ によってのみ反応が進行し, いずれの基質から *anti*- $\text{S}_{\text{N}}2'$ 成績体の *E* 体 **37a,b** と *Z* 体 **39a,b** の

異性体の混合物がそれぞれ得られた (entries 5—8). このうち, *cis* 体 **35b** からのアルキル化反応は *trans* 体 **35a** からの反応に比べて進行しにくく, *i*-Pr₃Cu(CN)(MgCl)₃·BF₃ を用いても中程度の収率であった (entry 9). 以上のように, 基質によって



Scheme 4. Diastereoselective Synthesis of β -Oxazolidinonyl- α,β -Enoates

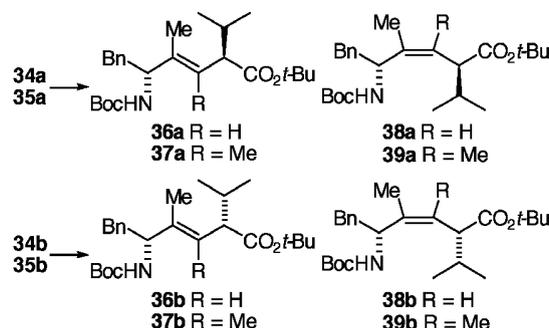
Reagents: a: i) MeMgCl, ii) CH₂=CR-MgX (R=H or Me), CeCl₃. b: i) (COCl)₂, DMSO, DIEA, ii) MeMgCl, CeCl₃. c: i) NaH, ii) (Boc)₂O. d: i) O₃ gas, ii) DMS, iii) (EtO)₂P(O)CH₂CO₂t-Bu, LiCl, DIEA, or Ph₃P=CHCO₂t-Bu.

は *Z* 体の副生を伴うものの, オキサゾリジノン誘導体の有機銅試薬によるアルキル化反応により, 目的の $\psi[(E)\text{-CMe=CX}]$ 型の EADI が効率的に得られることを明らかにした.

4. 多置換アルケン型ジペプチドイソスターの環状 RGD ペプチドへの応用

上述の方法により得られたイソスターは, 液相法若しくは固相法により RGD ペプチドに導入された (Scheme 6).^{31,36)}

二置換アルケン型イソスター **15** を含むペプチド **3** は, 液相法による縮合ののち, 活性エステル法により環化反応を行うことにより合成した. 一方, ヒドラジンリンカーを有する固相樹脂上で Fmoc 固相合成法により保護ペプチド樹脂を構築し, 脱保護と樹脂からの切り出しののち, アジド法による環化反応を行うことにより, 三置換・四置換アルケン型イソスターを含むペプチド **4—6** を得ることができた. さらに, *Z* 型オレフィンを含むイソスター **20b** を含むペプチド **51** は, クロロトリチル樹脂上でペプチド鎖を構築後, 酢酸処理により樹脂から切

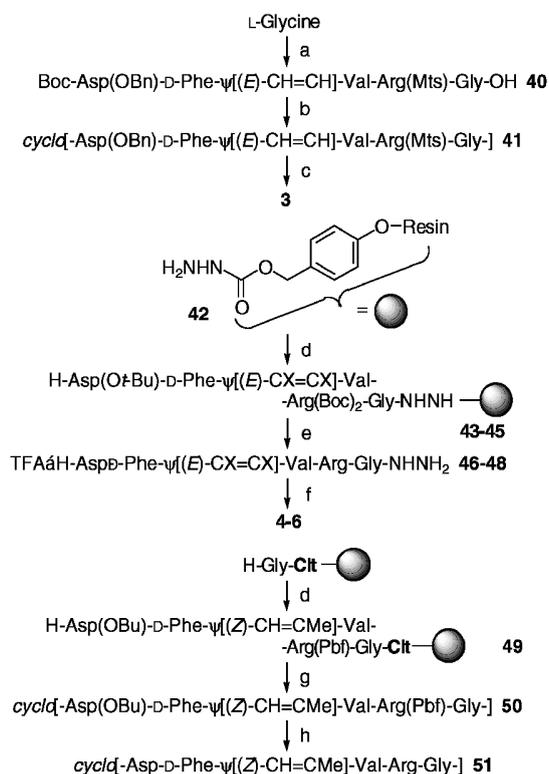


Scheme 5. Synthesis of $\psi[(E)\text{CMe=CX}]$ -Type EADIs (X = H or Me)

Table 1. Alkylation of β -(*N*-Boc-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl)- α,β -Enoates **34a,b** and **35a,b** by Organocopper Reagents

Entry	Substrate	Reagent	Products (Yield%)
1	34a	<i>i</i> -PrCu(CN)MgCl·BF ₃ ·2LiCl ^{a)}	36a (68) + 38a (31)
2	34a	<i>i</i> -Pr ₂ Cu(CN)(MgCl) ₂ ·BF ₃ ·2LiCl ^{a)}	36a (58) + 38a (27)
3	34b	<i>i</i> -PrCu(CN)MgCl·BF ₃ ·2LiCl ^{a)}	36b (95)
4	34b	<i>i</i> -Pr ₂ Cu(CN)(MgCl) ₂ ·BF ₃ ·2LiCl ^{a)}	36b (95)
5	35a	<i>i</i> -PrCu(CN)MgCl·BF ₃ ·2LiCl ^{b)}	—
6	35a	<i>i</i> -Pr ₂ Cu(CN)(MgCl) ₂ ·BF ₃ ·2LiCl ^{b)}	37a (75) + 39a (20)
7	35b	<i>i</i> -PrCu(CN)MgCl·BF ₃ ·2LiCl ^{b)}	—
8	35b	<i>i</i> -Pr ₂ Cu(CN)(MgCl) ₂ ·BF ₃ ·2LiCl ^{b)}	37b (55) + 39b (19)
9	35b	<i>i</i> -Pr ₃ Cu(CN)(MgCl) ₃ ·BF ₃ ·2LiCl ^{b)}	37b (52) + 39b (25)

a) -78°C, 30 min. b) -78°C, 30 min, then 0°C, 3 h.



Scheme 6. Synthesis of Cyclic RGD Peptidomimetics. Reagents: a: Boc-based Solution-phase Peptide Synthesis. b: i) DCC, HONB, ii) 4 M HCl/Dioxane, iii) NMM. c: 1 M TMSBr, thioanisole/TFA, *m*-cresol, EDT. d: Fmoc-based Solid-phase Peptide Synthesis. e: TFA. f: i) HCl, isoamyl nitrite, ii) DIEA. g: i) ACOH, ii) DPPA, NaHCO₃. h: TFA.

り出した保護ペプチドを DPPA-NaHCO₃ により環化反応を行い、最終脱保護反応に付すことにより得ることができた。以上のように、多置換アルケン型イソスターがペプチド合成化学反応上の多様な反応操作に耐えることを明らかにした。

5. インテグリン拮抗活性の評価と構造活性相関
得られた EADI を含むペプチド 3—6 及び D-Phe-L-Val 部位のペプチド結合を *cis* 型に固定化したイソスターを含むペプチド 51 について、1, 2 とともに $\alpha_V\beta_3$ 及び $\alpha_{11b}\beta_3$ アンタゴニスト活性を評価した (Table 2)。

$\alpha_V\beta_3$ アンタゴニスト活性について、3—6 はいずれも 1 よりも強力なアンタゴニスト活性を示した。^{31,36} このうち、カルボニル酸素に相当するメチル基を有する 4, 6 は、同じメチル基を有しない 3 及び 5 に比較して高い活性を示し、2 に匹敵する高い活性を示した (2.4, 1.8 nM)。この結果は、カルボニル酸素若しくはそれに相当する重原子の存在が、

Table 2. Integrin Antagonistic Activities of Cyclic RGD Peptides and Peptidomimetics

Peptide	$\alpha_V\beta_3$ IC ₅₀ (nM)	$\alpha_{11b}\beta_3$ IC ₅₀ (nM)	SI ^{b)}
RGDS ^{a)}	98 ± 29	270 ± 41	2.7
1	6.8 ± 2.7	770 ± 120	110
2	1.4 ± 0.31	280 ± 42	200
3	3.6 ± 1.3	140 ± 18	40
4	2.4 ± 0.33	81 ± 18	34
5	3.3 ± 0.93	100 ± 42	30
6	1.8 ± 0.51	48 ± 11	26
51	18000	370000	—

a) A linear peptide RGDS (H-Arg-Gly-Asp-Ser-OH) was used as a standard peptide. b) SI values were calculated as $SI = IC_{50}(\alpha_{11b}\beta_3) / IC_{50}(\alpha_V\beta_3)$.

1,3-アリリックストレイン様の立体配座制御などにより側鎖官能基の適当な位置への配向に寄与していることを示唆している。同様に、ペプチド結合のミミックとして EADI を用いる際に、カルボニル酸素に相当する γ -メチル基の存在がその構造等価性を高める可能性を示唆している。一方、バリン残基の *N*-メチル基若しくは β -メチル基について、3 と 5 若しくは 4 と 6 の $\alpha_V\beta_3$ インテグリンに対する活性の差は、1 と 2 のそれに比べて小さく、*N*-メチル基が立体的な要因により活性の向上に寄与した可能性は否定された。

また、ペプチド 3—6 の $\alpha_{11b}\beta_3$ アンタゴニスト活性は、その $\alpha_V\beta_3$ アンタゴニスト活性と同様の傾向を示したが、1 及び 2 に比較して高い活性を有しており、イソスターを含むペプチドの受容体選択性は減少した。*Z*型オレフィンを有するイソスターを含むペプチド 51 では、両方のインテグリンに対して著しい活性の低下が見られ、活性コンホメーションにおいて D-Phe-L-Val 部位のペプチド結合が *cis* 型である可能性は否定された。

続いて、NMR 測定と分子動力学計算により、一連の誘導体の活性コンホメーションと多置換アルケン型イソスターのターン構造のモチーフとしての妥当性について評価を行った。³⁶ まず、ペプチド 3—6 の各残基のアミドプロトン及び α プロトンの化学シフト、及び $^3J(H^N, H^\alpha)$ の値には有意な傾向は認められなかった。アミドプロトンの化学シフトの温度依存性 ($-\Delta\delta/\Delta T$) は、1 において Arg で水素結合の存在を示唆する小さな $-\Delta\delta/\Delta T$ 値を示し、

Table 3. Temperature Dependence of Amide Proton Chemical Shifts, $-\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K) of Cyclic Peptides 1–6

Peptide	Arg	Gly	Asp	D-Phe	Val
1	1.8	5.5	5.1	3.1	3.0
2	5.5	1.0	4.7	5.1	—
3	5.4	2.2	3.0	3.5	—
4	4.8	0.9	5.5	3.3	—
5	5.7	2.5	5.5	2.7	—
6	6.8	-1.4	7.4	2.5	—

Kessler らの提唱する type II'β ターン構造の存在を示唆した (Table 3). 一方, 3–6 では Arg で 4.8~6.8 ppb/K と大きな値を示し, 環状 RGD ペプチドにおいて多置換アルケン型イソスターは期待された type II'β ターン構造のモチーフとはならないことが明らかとなった. しかしながら, 興味深いことに, 3–6 の各アミノ酸残基の $-\Delta\delta/\Delta T$ 値は, 1 とは異なり, むしろ最も活性の高い 2 の値とよく類似していた. すなわち, Arg では比較的大きな値を示すものの, Gly では -1.4~2.5 ppb/K と比較的小きな値を示し, Gly のアミドプロトンがいずれも溶媒との接触が妨げられている環境にあることが示唆された. さらに, 3–6 の NOESY スペクトルにより得られた距離拘束, ${}^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ の値から算出された ϕ 二面角の拘束を用いて, Simulated annealing MD 計算とエネルギー最小化を行った. 得られた 3–6 の低エネルギーの構造を比較したところ, いずれも type II'β ターン構造を含まず, ほぼ類似したコンホメーションであることが示唆された. これら 2–6 の構造類似性から, 1 から 2 への約 5 倍の活性上昇は, バリン残基の *N*-メチル化に伴い水素結合性のアミドプロトンがなくなり, これが分子内若しくはインテグリンとの相互作用に有利に作用したことによることが示唆された.

6. おわりに

本研究により, 筆者らはアミノ酸を原料とする多置換アルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立した. 本法は, 2つの不斉中心の構築と *i* 残基目の側鎖を原料のアミノ酸側鎖に, *i*+1 残基目の側鎖をアルキル化反応に用いる有機銅試薬に依存することから, 多様な組み合わせのイソスターの合成に応用可能である. また, これらのイソスターは従来の液相若しくは固相法によるペプチド合

成法に適用できることから, 生理活性ペプチドの活性コンホメーションの探索に簡便に利用することができるものである. さらに, 置換様式の組み合わせや *Z* 型アルケンを有するイソスターを利用することにより, 環状 RGD ペプチドの *N*-メチル化に伴う活性の上昇が, メチル基の立体的な作用によるものではなくアミド水素が置換されたことにより分子内若しくは分子間相互作用を失ったことによるものであることを明らかにした.

近年, 本稿で紹介した多置換アルケン型イソスターに加えて, *cis* 型アミドの存在比が高いとされる Xaa-Pro ジペプチドに相当するイソスター^{37,38)} やカルボニル酸素をフッ素原子に置換したフルオロアルケン型イソスター^{39),40)} の合成法が開発され, その応用範囲を広げている. 生体反応の機能分子であるタンパク質の構造の骨格を成すペプチド結合は, 相互作用に関わる官能基としてのみならず, 分子の二次・三次構造に大きな影響を及ぼすことから, そのミメティックを用いた研究は分子の機能部位や活性コンホメーションの同定や機能様式の解明に役立つものである. また, 多くのペプチドミメティックは, ポストゲノム時代を迎え今後指数関数的な増大が予想される天然型リガンドからの効率的な非ペプチド性低分子医薬品のデザインを行う上で有益な化学修飾の手法を提供するものであり, これらアルケン型イソスターが今後広く利用されることを期待したい.

謝辞 本研究は, 京都大学大学院薬学研究科薬品有機製造学分野において行われたものであり, 終始ご指導ご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 藤井信孝教授に心より御礼申し上げます. また, 有益なご助言ご指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科 大高 章助教授, 玉村啓和講師に厚く御礼申し上げます. さらに, 本研究を遂行するに当たり多大なご協力をいただきました薬品有機製造学分野の諸氏に深く感謝いたします.

X 線結晶構造解析を行っていただきました小野薬品工業株式会社 浜中信行博士, 小田垣良彦博士, 京都大学大学院薬学研究科 多賀 徹名誉教授, 三輪嘉尚講師, ペプチドの生物活性の評価を行っていただきました明治製菓株式会社 味戸慶一博士, 山本幹夫博士, 分子動力学計算に当たりご指導

いただきました京都大学大学院薬学研究科 黒田義弘助教授、宮本和英博士（現・理化学研究所）に感謝いたします。なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（特別研究員奨励費）によって行われたものであり、併せて深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Ross F. P., Chappel J., Alvarez J. I., Sander D., Butler W. T., Farach-Carson M. C., Mintz K. A., Robey P. G., Teitelbaum S. L., Cheresch D. A., *J. Biol. Chem.*, **268**, 9901–9907 (1993).
- 2) Brooks P. C., Clark R. A., Cheresch D. A., *Science*, **264**, 569–571 (1994).
- 3) Varner J. A., Cheresch D. A., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 724–730 (1996).
- 4) Kerr J. S., Wexler R. S., Mousa S. A., Robinson C. S., Wexler E. J., Mohamed S., Voss M. E., Devenny J. J., Czerniak P. M., Gudzelak A. Jr., Slee A. M., *Anticancer Res.*, **19**, 959–968, (1999).
- 5) Miller W. H., Alberts D. P., Bhatnagar P. K., Bondinell W. E., Callahan J. F., Calvo R. R., Cousins R. D., Erhard K. F., Heerding D. A., Keenan R. M., Kwon C., Manley P. J., Newlander K. A., Ross S. T., Samanen J. M., Uzinskas I. N., Venslavsky J. W., Yuan C. C.-K., Haltiwanger R. C., Gowen M., Hwang S.-M., James I. E., Lark M. W., Rieman D. J., Stroup G. B., Azzarano L. M., Salyers K. L., Smith B. R., Ward K. W., Johanson K. O., Huffman W. F., *J. Med. Chem.*, **43**, 22–26 (2000).
- 6) Kumar C. C., Malkowski M., Yin Z., Tangghetti E., Yaremko B., Nechuta T., Varner J., Liu M., Smith E. M., Neustadt B., Presta M., Armstrong L., *Cancer Res.*, **61**, 2232–2238 (2001).
- 7) Goodman S. L., Hölzemann G., Sulyok G. A., Kessler H., *J. Med. Chem.*, **45**, 1045–1051 (2002).
- 8) Hutchinson J. H., Halczenko W., Brashear K. M., Breslin M. J., Coleman P. J., Duongle T., Fernandez-Metzler C., Gentile M. A., Fisher J. E., Hartman G. D., Huff J. R., Kimmel D. B., Leu C. T., Meissner R. S., Merkle K., Nagy R., Pennypacker B., Perkins J. J., Prueksaritanont T., Rodan G. A., Varga S. L., Wesolowski G. A., Zartman A. E., Rodan S. B., Duggan M. E., *J. Med. Chem.*, **46**, 4790–4798 (2003).
- 9) Aumailley M., Gurrath M., Muller G., Calvete J., Timpl R., Kessler H., *FEBS Lett.*, **291**, 50–54 (1991).
- 10) Dechantsreiter M. A., Planker E., Mathä B., Lohof E., Hölzemann G., Jonczyk A., Goodman S. L., Kessler H., *J. Med. Chem.*, **42**, 3033–3040 (1999).
- 11) Haubner R., Gratias R., Diefenbach B., Goodman S. L., Jonczyk A., Kessler H., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7461–7472 (1996).
- 12) Haubner R., Finsinger D., Kessler H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**, 1374–1389 (1997).
- 13) Xiong J.-P., Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman S. L., Arnaout M. A., *Science*, **296**, 151–155 (2002).
- 14) Vasbinder M. M., Jarvo E. R., Miller S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2824–2827 (2001).
- 15) Tamamura H., Hiramatsu K., Miyamoto K., Omagari A., Oishi S., Nakashima H., Yamamoto N., Kuroda Y., Nakagawa T., Otaka A., Fujii N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 923–928 (2002).
- 16) Wipf P., Henninger T. C., Geib S. J., *J. Org. Chem.*, **63**, 6088–6089 (1998).
- 17) Gardner R. R., Liang G.-B., Gellman S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3280–3281 (1995).
- 18) Gardner R. R., Liang G.-B., Gellman S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1806–1816 (1999).
- 19) Ibuka T., Nakao T., Nishii S., Yamamoto Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7420–7422 (1986).
- 20) Ibuka T., Tanaka M., Nishii S., Yamamoto Y., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1596–1598 (1987).
- 21) Ibuka T., Akimoto N., Tanaka M., Nishii S., Yamamoto Y., *J. Org. Chem.*, **54**, 4055–4061 (1989).
- 22) Ibuka T., Tanaka M., Nishii S., Yamamoto Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4864–4872 (1989).
- 23) Ibuka T., Tanaka M., Yamamoto Y., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 967–969 (1989).
- 24) Ibuka T., Habashita H., Funakoshi S., Fujii N., Oguchi Y., Uyehara T., Yamamoto Y., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **29**, 801–803

- (1990).
- 25) Ibuka T., Habashita H., Otaka A., Fujii N., Oguchi Y., Uyehara T., Yamamoto Y., *J. Org. Chem.*, **56**, 4370–4382 (1991).
- 26) Ibuka T., Nakai K., Habashita H., Hotta Y., Fujii N., Mimura N., Miwa Y., Taga T., Yamamoto Y., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 652–654 (1994).
- 27) Fujii N., Nakai K., Tamamura H., Otaka A., Mimura N., Miwa Y., Taga T., Yamamoto Y., Ibuka T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1359–1371 (1995).
- 28) Tamamura H., Yamashita M., Muramatsu H., Ohno H., Ibuka T., Otaka A., Fujii N., *Chem. Commun.*, 2327–2328 (1997).
- 29) Tamamura H., Yamashita M., Nakajima Y., Sakano K., Otaka A., Ohno H., Ibuka T., Fujii N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2983–2996 (1999).
- 30) Oishi S., Tamamura H., Yamashita M., Odagaki Y., Hamanaka N., Otaka A., Fujii N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2445–2451 (2001).
- 31) Oishi S., Kamano T., Niida A., Odagaki Y., Hamanaka H., Yamamoto M., Ajito K., Tamamura H., Otaka A., Fujii N., *J. Org. Chem.*, **67**, 6162–6173 (2002).
- 32) Oishi S., Kamano T., Niida A., Odagaki Y., Tamamura H., Otaka A., Hamanaka H., Fujii N., *Org. Lett.*, **4**, 1051–1054 (2002).
- 33) Yang H., Sheng X. C., Harrington E. M., Ackermann K., Garcia A. M., Lewis M. D., *J. Org. Chem.*, **64**, 242–251 (1999).
- 34) Oishi S., Niida A., Kamano T., Odagaki Y., Tamamura H., Otaka A., Hamanaka H., Fujii N., *Org. Lett.*, **4**, 1055–1058 (2002).
- 35) Oishi S., Niida A., Kamano T., Odagaki Y., Hamanaka H., Yamamoto M., Ajito K., Tamamura H., Otaka A., Fujii N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1786–1793 (2002).
- 36) Oishi S., Miyamoto K., Niida A., Kamano T., Yamamoto M., Ajito K., Tamamura H., Otaka A., Kuroda Y., Fujii N., *J. Am. Chem. Soc.* (submitted).
- 37) Hart S. A., Sabat M., Etzkorn F. A., *J. Org. Chem.*, **63**, 7580–7581 (1998).
- 38) Otaka A., Katagiri F., Kinoshita T., Odagaki Y., Oishi S., Tamamura H., Hamanaka N., Fujii N., *J. Org. Chem.*, **67**, 6152–6161 (2002).
- 39) Otaka A., Watanabe H., Yukimasa A., Oishi S., Tamamura H., Fujii N., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 5443–5446 (2001).
- 40) Otaka A., Watanabe J., Yukimasa A., Sasaki Y., Watanabe H., Kinoshita T., Oishi S., Tamamura H., Fujii N., *J. Org. Chem.*, **69**, 1634–1645 (2004).