

氏 名 (本籍) 小 松 弘 典

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 9 3 号

学位授与年月日 平成 17 年 1 月 19 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 核酸塩基の立体選択的グリコシル化反応を基盤とするデオキシヌクレオシド類の実用的製法開発

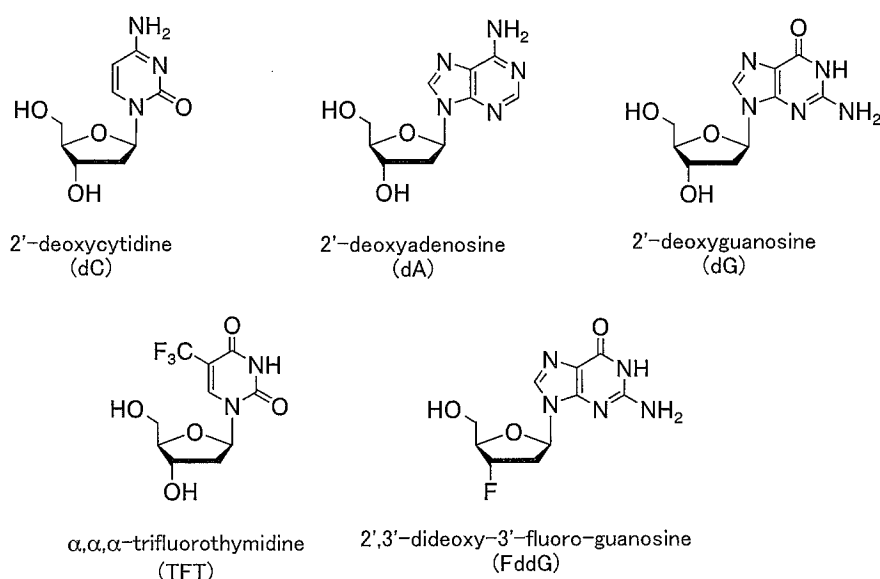
論文審査委員 (主 査) 教 授 井 原 正 隆

教 授 岩 渕 好 治

助教授 豊 田 真 弘

# 論文内容要旨

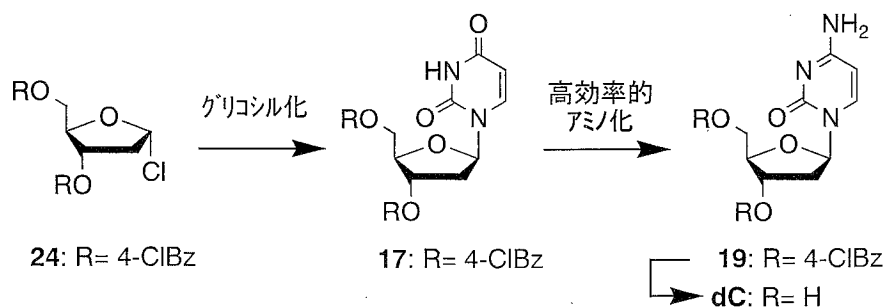
アンチセンスに代表される DNA 医薬の製造原料として有用な天然型デオキシヌクレオシド、2'-deoxycytidine (dC)、2'-deoxyadenosine (dA)、2'-deoxy-guanosine (dG)、及び抗ウイルス剤として有用な非天然型デオキシヌクレオシド、 $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluorothymidine (TFT)、2',3'-dideoxy-3'-fluoroguanosine (FddG) の実用的な製法開発に関する研究を行った。何れも核酸塩基の選択的なグリコシル化反応を基盤とすることで効率的な製造ルートを確立することができた。



## 1. 2'-Deoxyuridine の実用的なアミノ化反応の開発と 2'-Deoxycytidine の合成

Uracil をクロロ糖 (24) と縮合してグリコシル化することにより、 $\beta$  選択的に 2'-deoxyuridine (dU) を合成できる。そこで dU 誘導体 (17) を効率的にアミノ化する反応開発を行った。本反応では、工業的にも入手容易で安価な toluenesulfonyl chloride (TsCl) を反応剤とし、1-methylpiperidine を反応活性化剤として用いることで、dC 誘導体 (19) /17 比を 99.7 : 0.3 に向上した。

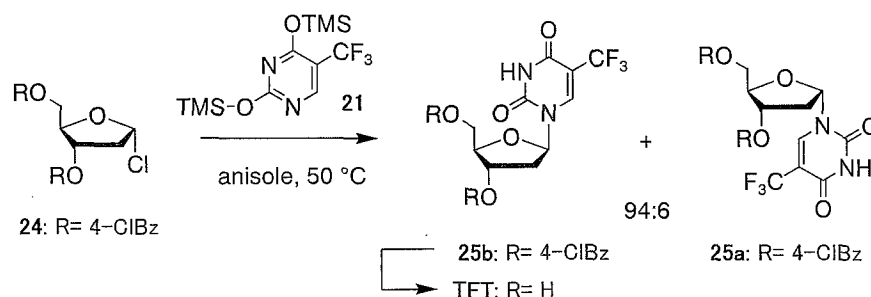
従来法では高価な反応剤を過剰量必要とし、反応に長時間を要していたが、本法の開発により原料費と共に製造時間に係る人件費の抑制効果も期待できる。Uracil の立体選択的なグリコシル化反応により得た 17 を、ここで開発したアミノ化反応に付すという本製造ルートを用いて、実際に 28.2 kg の dC を塩酸塩として得ることに成功した。



## 2. 立体選択的、且つグリーンなグリコシル化反応の開発と $\alpha, \alpha, \alpha$ -Trifluorothymidineの合成

Trifluorothymine 誘導体 (21) のグリコシル化反応により、TFTを合成することができる。しかし従来法では、糖供与体 (24) に対して過剰量の21を用いた場合でも立体選択性は低かった。さらにZnCl<sub>2</sub>などの遷移金属やCHCl<sub>3</sub>溶媒を必要としていたため、コスト高に加えて医薬品としての品質管理上も問題があった。

立体選択性は、グリコシル化の反応速度と24の異性化速度に因って決定される。そこで、24に対して等モル量の21を用いた場合でもグリコシル化の反応速度を向上することができる反応条件を探索した。その結果、反応温度と反応液の濃度が影響を与えることを見出した。つまり、高濃度条件下50℃でグリコシル化を行うことにより、等モル量の21を用いた場合でも $\beta/\alpha$ 比が94:6という高い立体選択性を実現した。さらに、24の異性化速度を抑制する反応溶媒を見出してスケールアップ可能な反応条件に改良し、100 gスケールでの製造を行った。



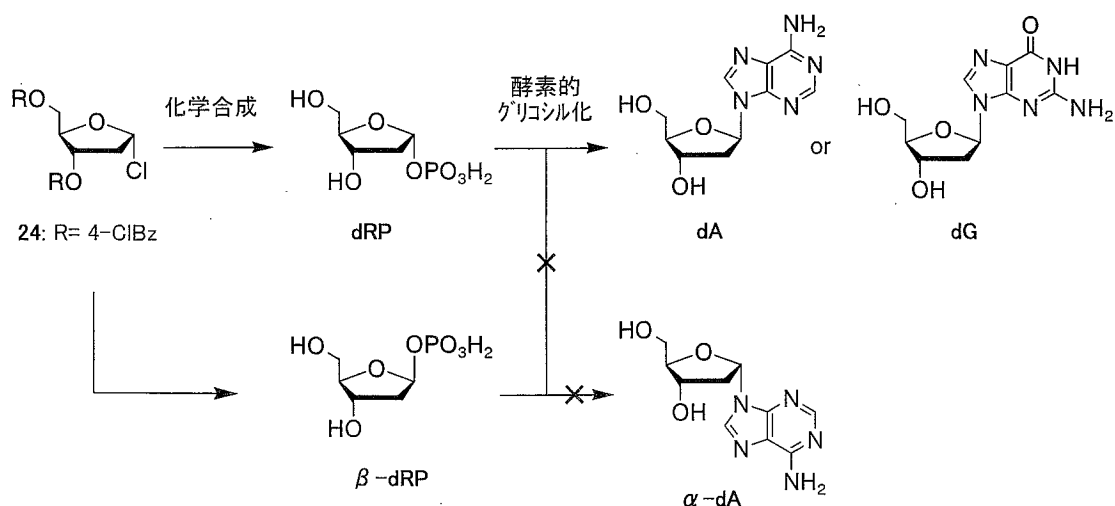
本製法により、抗ウイルス剤として有用なTFTを、遷移金属やCHCl<sub>3</sub>を必要としないグリーンなグリコシル化反応を用いて、コスト的にも優位に製造することが可能となった。

## 3. 2-Deoxyribose 1- $\alpha$ -Phosphateを経由するケモ酵素的なデオキシヌクレオシドの合成

プリン塩基の化学的なグリコシル化反応を選択的に行うことは困難である。一方、2-deoxyribose 1- $\alpha$ -phosphate (dRP) を基質として酵素的にグリコシル化することができる。しかしながら、本反応をプリンデオキシヌクレオシド合成に適用するためには二つの問題点を克服する必要がある。

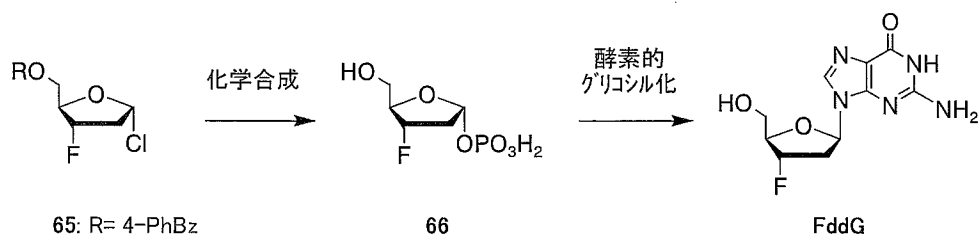
第一は、dRPの立体選択的の合成であり、第二は酵素的グリコシル化反応の効率化である。著者は、異性化晶出法 (crystallization-induced asymmetric transformation) を開発し、dRPの立体選択的の合成法を確立した。さらにpurine nucleoside phosphorylase (PNPase) による酵素反応においては、加リン酸分解による逆反応を抑えて反応収率を向上した。

さらに24を出発原料として立体選択的なリン酸化反応を行った後に再結晶により精製し、dRPの $\beta$ 異性体 ( $\beta$ -dRP) を高純度で合成した。ここで得た $\beta$ -dRPは本酵素反応の基質とはならず、dAあるいはdAの異性体である $\alpha$ -dAの何れも生成しないことを確認した。つまり本ケモ酵素的な合成ルートに因れば、dA及びdGを立体特異的に得ることができる。これらの検討結果により、これまで実用的な製造が困難とされていたdA及びdGの製法開発に成功した。



#### 4. 2,3-Dideoxy-3-fluororibose 1- $\alpha$ -Phosphate を経由するケモ酵素的な 2',3'-Dideoxy-3'-fluoroguanosine の合成

上記3項で開発したケモ酵素的な製法を非天然型デオキシヌクレオシド、FddGの合成に応用した。2,3-dideoxy-3-fluororibose 1- $\alpha$ -phosphate (66) を立体選択的に合成し、PNPaseを用いる酵素的グリコシル化反応に付すことにより、FddGを立体特異的に得た。本ルートに因れば、グアニンへの保護基導入などの誘導体化を必要とせず、目的とするN<sup>9</sup>、 $\beta$ 体のみを合成できることから、異性体など類縁体混入に関して厳しい品質管理を要求される、FddGなど医薬品の合成ルートとして優位性が高い。



以上、著者は、医薬品開発に有用なデオキシヌクレオシド類の製造に際し、類縁体の副成という共通の問題を克服する製法開発に関する研究を行った。

その結果、dC、TFT、dA、dG及びFddGといった種々の特徴を有するデオキシヌクレオシドについて、何れも立体選択的なグリコシル化反応を基盤とする製法確立に成功した。dC合成では、グリコシル化反応に続く選択的なアミノ化方法を開発して副生物を低減し、スケールアップにも対応可能な製造ルートを見出した。TFT合成では、グリコシル化反応の選択性を向上し、且つグリーンな反応条件を用いる製法を見出した。dA、dG及びFddGの合成では、立体特異的な酵素的グリコシル化反応を利用し、ケモ酵素的な合成ルートを開発した。

本研究成果により、DNA医薬、制ガン剤あるいは抗ウイルス剤として研究開発が活発化しているデオキシヌクレオシド類の新たな製法を提供し、医薬品開発の進展に大きく寄与すると考える。

## 審査結果の要旨

アンチセンスに代表される DNA 医薬の製造原料として有用な天然型デオキシヌクレオシド、2'-deoxycytidine (dC)、2'-deoxyadenosine (dA)、2'-deoxyguanosine (dG)、及び抗ウイルス剤として有用な非天然型デオキシヌクレオシド、trifluorothymidin (TFT)、2',3'-dideoxy-3'-fluoroguanosine (FddG) の実用的な製法開発に関する研究を行った。まず、工業的にも入手容易で安価な TsCl を反応剤とし、1-methylpiperidine を反応活性化剤として用いることで、dC 誘導体を高選択的に得た。従来法では高価な反応剤を過剰量必要とし、反応に長時間を要していたが、本法の開発により原料費と共に製造時間に係る人件費の抑制効果も期待できる。

また、trifluorothymine 誘導体と糖供与体の反応において、反応温度と反応液の濃度が影響を与えることを見出し、高い立体選択性を実現した。本製法により、抗ウイルス剤として有用な TFT を、遷移金属や  $\text{CHCl}_3$  を必要としないグリーンなグリコシル化反応を用いて、コスト的にも優位に製造することが可能となった。

一方、プリン塩基の化学的なグリコシル化反応を選択的に行うために、異性化晶出法を開発し、dRP の立体選択的合成法を確立した。さらに PNP<sub>a</sub> による酵素反応においては、加リン酸分解による逆反応を抑えて反応収率を向上させた。そこで、これまで実用的な製造が困難とされていた dA 及び dG の製法開発に成功した。

以上のように、医薬品開発に有用なデオキシヌクレオシド類の製造に際し、類縁体の副成という共通の問題を克服する製法開発に関する研究を行った。その結果、dC, TFT, dA, dG 及び FddG の特徴を有するデオキシヌクレオシドについて、何れも立体選択的なグリコシル化反応を基盤とする製法確立に成功した。dC 合成では、グリコシル化反応に続く選択的なアミノ化方法を開発して副生物を低減し、スケールアップにも対応可能な製造ルートを見出した。TFT 合成では、グリコシル化反応の選択性を向上し、且つグリーンな反応条件を用いる製法を見出した。dA, dG 及び FddG の合成では、立体特異的な酵素的グリコシル化反応を利用し、ケモ酵素的な合成ルートを開発した。そこで、本研究は DNA 医薬、制ガン剤あるいは抗ウイルス剤としてのデオキシヌクレオシド類の新たな製法を提供し、医薬品開発の進展に大きく寄与するであろう。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。