Sialic Acid Derivative Synthesis and Inhibitory Activities against Human Parainfluenza Virus Type 1

hPIV-1 シアリダーゼ阻害活性をもつシアル酸誘導体の合成

Ikeda, Kiyoshi

Department of Organic Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima International University 5-1-1,
Hirokoshingai, Kure, Hiroshima 737-0112, Japan
FAX: 81-823-73-8936, E-mail: ikeda@ps.hirokoku-u.ac.jp

(Received on November 19, 2010, accepted on January 25, 2011)

Key Words: *sialic acid, 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid, sialidase inhibitors, hPIV-1 sialidase, HN glycoprotein*

Abstract

Sialic acids (Neu5Ac, **1**) are involved in many biological functions of glycoproteins, glycolipids, and cells. Sialidases are a family of glycosidases that catalyze the removal of α -glycosidically linked sialic acid residues from carbohydrate groups of glycoconjugates. Among the compounds related to the sialic acid family, 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acids (Neu5Ac2en, **2**) are known to inhibit sialidases. Human parainfluenza viruses are important respiratory tract pathogens, particularly in children. However, no vaccines or specific therapies for infections caused by these viruses are currently available. This article reviews our progress and current trends of the modification of 2-deoxy-2,3-didehydro sialic acid analogs and biological evaluations of their inhibitory activities against human parainfluenza virus type 1 (hPIV-1) sialidases.

要 約

シアル酸 (Neu5Ac, **1**) は糖タンパク質、糖脂質、細胞において多くの生物学的機能に関わっていることが知られている。シアリダーゼは糖鎖から α -グリコシド結合したシアル酸残基を除去するグリコシダーゼである。シアル酸関連化合物の中で、2-デオキシ-2,3-デヒドロ-*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac2en, **2**) はシアリダーゼ阻害剤として知られている。ヒューマンパラインフルエンザウイルス (human parainfluenza viruses) (hPIVs) は特に、子供に重篤な呼吸器疾患を引き起こす。しかし、現在、これらのウイルスによる感染症に対してワクチンや有効な治療法はない。この総説では Neu5Ac2en 誘導体合成に関する我々の研究と最近の動向、さらにヒューマンパラインフルエンザウイルス タイプ1型 (hPIV-1) シアリダーゼに対する阻害活性について紹介する。

A. Introduction

Sialic acids, such as *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), and deaminoneuraminic acid (KDN), are often located at the non-reducing end of glycoconjugates on the cell surface, and play pivotal roles in many cell-surface recognition processes, cell adhesion, and viral receptor recognition (1). The most abundant sialic acid is Neu5Ac (5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid, **1a**) (Fig. 1). Modification of the functional groups on the sialic acid skeleton leads to changes in steric and/or electronic properties of the molecule, which can be used to probe space and charge requirements of sialic acid-

A. はじめに

シアル酸は、たとえば Neu5Ac、Neu5Gc、KDN として、細胞表面上の糖鎖の非還元末端にあり、多くの細胞表面の認識、細胞接着およびウイルスのレセプター認識 (1) で重要な役割を担っている。もっとも多く存在するシアル酸は *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac, **1a**) である (図 1)。シアル酸骨格上の官能基の化学修飾により、分子の立体的、電子的な特性に変化を与え、それによりシアル酸を認識するタンパク質のリガンド認識部位の空間の広がりや、必要とされる電荷を調べることができる (2)。

Fig. 1. Structures of sialic acids.

recognizing proteins (2).

Human parainfluenza viruses (hPIVs), members of the Paramyxoviridae family, are important respiratory tract pathogens in infants and children. Four different types of hPIVs have been identified, all of which cause a spectrum of illnesses of the upper and lower respiratory tracts of children (3). There are currently no effective vaccines or specific therapies available for controlling parainfluenza virus infections. Parainfluenza virus contains 2 spike glycoproteins, hemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoproteins, and fusion (F) glycoprotein, embedded in the envelope. HN proteins recognize sialic acid-containing glycolipids and glycoproteins of target cells; this recognition allows the virus to bind to target cells. Furthermore, HN proteins act as a sialidase, removing sialic acid from virus particles, and thus preventing self-aggregation and promoting efficient spread of the virus. The multifunctional role of HN in the viral life cycle makes it an attractive target for the development of chemotherapeutics to treat hPIV infection. In this minireview, we outline recent studies involving sialic acid modifications, including our work and current trends in the design, synthesis, and biological evaluation of Neu5Ac2en analogs against hPIV sialidase.

B. Analogs of 2-Deoxy-2,3-Didehydro Sialic Acids

Neu5Ac2en **2** (4) may be a transition state analog that binds to the active site of sialidase. It has been identified as an inhibitor of sialidase using both bacterial and viral sources, occupying an important position in modern medicinal chemistry (5). Synthesis of sialic acid derivatives may be applicable in the development of pharmaceutical agents.

Using molecular modeling techniques, von Itzstein *et al.* reported the design and biological evaluation of 4-amino-4-deoxy- (**3**) and 4-deoxy-4-guanidino-Neu5Ac2en analogs (**4**) (zanamivir) (6). These compounds significantly increase inhibition of influenza A and B virus sialidases compared with Neu5Ac2en alone. In particular, compound **4** exhibited selective inhibition of the virus over mammalian sialidase and was approved for human use. Further, potent and selective inhibition of influenza virus sialidase by **4** has prompted the synthesis of a range of structural variants of these compounds. For example, the non-carbohydrate derivatives such as a heterocyclic compound (**5**) (7) and a carbocyclic compound (**6**) (8) were developed.

Recently, Honda *et al.* reported that 7-*O*-methyl-

hPIVs は、Paramyxoviridae family に属し、小児や子供にとって重大な呼吸器の病原ウイルスである。hPIVs には4つの異なるタイプが同定されており、これらのすべてが子供の上気道、下気道の呼吸器における病原性スペクトルをもっている (3)。現在、パラインフルエンザウイルス (hPIV) 感染を制御する有効なワクチンや治療法は皆無である。hPIVs には、細胞表面上に二つのスパイク状の糖タンパク質、hemagglutinin-neuraminidase (HN) および fusion (F) 糖タンパク質が埋め込まれている。この HN 糖タンパク質は標的細胞のシアル酸を含んだ糖脂質や糖タンパク質を認識し、これによりウイルスが標的細胞に結合することができる。さらに HN タンパク質はシアリダーゼとしても働き、ウイルス粒子からシアル酸を除去し、それによってウイルスの自己縮合を抑え、ウイルスの効率的な拡散を促進している。hPIV の生活環の中で果たす HN 糖タンパク質の多機能な性質は、hPIV 感染を治療する化学療法剤開発のための魅力的なターゲットである。このミニレビューでは、シアル酸の修飾に関する我々の研究や最近のデザインと合成の動向、そして hPIV シアリダーゼに対する活性評価について紹介する。

B. 2-デオキシ-2,3-デヒドロ-シアル酸誘導体

Neu5Ac2en **2** (4) は、シアル酸残基が加水分解される際の遷移状態アナログであり、バクテリアやウイルスを根源としたシアリダーゼの阻害剤として認められており、医薬品化学では重要な立場にある (5) (図 2)。シアル酸誘導体の合成は創薬研究の観点から大変興味もたれている。

von Itzstein らは分子モデリング技術により、4-アミノ-4-デオキシ- (**3**) や 4-デオキシ-4-グアニジノ-Neu5Ac2en アナログ (**4**) (zanamivir) を考案し、インフルエンザウイルスに対する阻害活性を報告した (6)。これらの化合物はインフルエンザ A および B シアリダーゼに対して **2** よりも強力な阻害作用を示した。特に、**4** は哺乳動物シアリダーゼよりも選択的にウイルスシアリダーゼに阻害作用を示し臨床応用された。さらに、**4** は強力で選択的なウイルス阻害剤であることから、種々の誘導体の合成が行われてきた。たとえば **4** に関連した阻害剤として、ヘテロ環化合物 (**5**) (7) や 2 のジヒドロピラン環を非糖化合物で置き換えたカルボサイクル化合物 (**6**) (8) が合成された (図 3)。

最近、本田らは 4-グアニジノ-Neu5Ac2en 骨格をもつ

Fig. 2. Structure of Neu5Ac2en.

Fig. 3. Sialidase inhibitors.

Fig. 4. Zanamivir derivatives.

Neu5Ac2en derivative (**7a**) and 7-*O*-methyl-9-*O*-octanoyl-Neu5Ac2en sialidase inhibitor (**7b**), carrying a 4-guanidino-Neu5Ac2en framework, inhibited influenza virus replication much more effectively than zanamivir did (9) (Fig. 4). Compound **7b**, an octanoyl ester prodrug of the C-9 alcohol of **7a**, was found to be much longer acting than zanamivir, and was recently approved for human use.

C. 4,9-*O*-Disubstituted 2-Deoxy-2,3-Didehydro Neu5Ac2en Analogs

Crystallographic information regarding Newcastle disease virus (NDV) HN glycoprotein with Neu5Ac2en **2** showed that interactions near the carboxy group of **2** were very similar to those seen in other sialidase-Neu5Ac2en complexes. Furthermore, the amino acid residues interacting with C-7, C-8, and C-9 glycerol side chains and the C-5 acetamido group were largely conserved across 7 paramyxoviruses, including hPIV-1, although the catalytic pocket possessed a large cavity in the direction of the 4-hydroxy group of **2** as compared with those of influenza virus and bacterial sialidases (10). These structural findings indicated that suitable modification at the C-4 position of **2** for the large cavity of the HN glycoprotein has important effects in the design of potent inhibitors against sialidase from hPIV. Portner *et al.* reported that compounds BCX 2798 (**8a**) and BCX 2855 (**8b**) with modifications at C-4 and C-5 positions of **2** of which designs were based on the crystal structure of the HN of NDV were specific and potent inhibitors of hPIVs (11). (Fig. 5) A reported X-ray structure

7-*O*-メチル-Neu5Ac2en 誘導体 (**7a**) や 7-*O*-メチル-9-*O*-オクタノイル-Neu5Ac2en シアリダーゼ 阻害剤 (**7b**) が、**4** に比較してインフルエンザウイルスの複製をより有効に阻害することを報告した (9) (図 4)。化合物 **7b** は、9 位水酸基にオクタノイル基を持つ **7a** のプロドラッグであり、長時間持続型であることから最近臨床応用された。

C. 4,9-*O*-二置換-2-デオキシ-2,3-デヒドロ-シアル酸誘導体 Newcastle disease virus (NDV) の HN 糖タンパク質と **2** との複合体の結晶構造解析から、NDV はその触媒部位にインフルエンザやバクテリアのシアリダーゼと比較して **2** の 4 位水酸基の方向に大きな空洞をもっているが、**2** のカルボキシル基の周りの相互作用は、他のシアリダーゼと非常に類似しており、グリセロール鎖の C-7、C-8、C-9 の水酸基と C-5 位アセトアミド基に相互作用するアミノ酸残基は hPIV-1 を含めて 7 つの paramyxoviruses でよく保存されていることが明らかにされている (10)。これら構造上の知見から、HN 糖タンパク質の空洞に適合するように **2** の C-4 位を修飾することは、hPIV シアリダーゼに対する強力な阻害剤を考案するために重要である。Portner らは、NDV の HN の X 線結晶構造解析から hPIV 阻害剤のデザインによる新規な BCX 2798 (**8a**) および BCX 2855 (**8b**) を合成し、それらが hPIV-1 および hPIV-3 シアリダーゼに対して特異的で有効な阻害物質であることを報告した (11) (図 5)。この研究の後、hPIV-3 HN 糖タンパク質の X 線結晶構造が報告 (12) されたことから、今後、その構造

Fig. 5. Structures of BCX-2798 and BCX-2855.

9a: R ₁ = OH, R ₂ = OCH ₂ CN	10a: R ₁ = N ₃ , R ₂ = OCH ₂ CN
9b: R ₁ = OH, R ₂ = OCH ₂ C(=O)NH ₂	10b: R ₁ = N ₃ , R ₂ = OCH ₂ C(=O)NH ₂
9c: R ₁ = OH, R ₂ = OCH ₂ C(=NH)NH ₂	10c: R ₁ = N ₃ , R ₂ = OCH ₂ C(=NH)NH ₂
9d: R ₁ = OH, R ₂ = OCH ₂ C(=S)NH ₂	10d: R ₁ = N ₃ , R ₂ = OCH ₂ C(=NH)OMe
11a: R ₁ = NHAc, R ₂ = OCH ₂ C(=S)NH ₂	
11b: R ₁ = NHAc, R ₂ = OCH ₂ CN	
11c: R ₁ = NHAc, R ₂ = OCH ₂ C(=O)NH ₂	
11d: R ₁ = NHAc, R ₂ = OCH ₂ C(=NH)NH ₂	

Fig. 6. 4,9-O-Disubstituted Neu5Ac2en derivatives.

model of hPIV-3 HN (12) will allow for further directed, structure-based design of potential hPIV-3 inhibitors. Although the amino acid sequences of hPIV-1 surface glycoproteins have been described (10, 13), the crystal structure model of a complex of hPIV-1 HN glycoprotein and **2** is undetermined.

To ascertain the influence of the 4-hydroxyl group in **2** on the inhibitory activities towards sialidase, Neu5Ac analog hydroxyl groups at C-4 were replaced with cyanomethyl, carbamoylmethyl, amidinomethyl, methoxyiminomethyl, and thiocarbamoylmethyl groups. Furthermore, the hydroxyl group at C-9 was modified using azide or *N*-acetyl groups to determine whether the 9-hydroxyl group in **2** is important for inhibiting sialidases from various sources. We present the synthesis of Neu5Ac2en derivatives (**9**, **10**, and **11**) modified at the C-4 and C-9 positions of **2** and evaluations of their inhibitory activities against sialidases from both viral and mammalian sources (14) (Fig. 6).

Compounds **12**, **13**, and **14**, bearing a cyanomethyl group (**15**) at the C-4 position, were selected as key intermediates for the preparation of **9a-d**, **10a-d**, and **11a-d** in our synthesis. Cyanomethyl is a versatile functional group used for preparing sugar amides and amidine salts, which may induce new electrostatic and/or hydrogen-bonding interactions. C-4 modified Neu5Ac2en derivative **9a-d** was synthesized as shown in Scheme 1. After a cyanomethyl group was selectively introduced at the C-4 alcohol of **16** and after the isopropylidene group was successively removed followed by acetylation, compound **18** was transformed by treatment with dimethyl(methylthio)sulfonium triflate (DMTST and DBU) (16) to develop compound **12**. Intermediate **12** in turn was transformed into **9a-c**. Thus, deacetylation of **12** followed by hydrolysis yielded the cyanomethyl compound **9a**. Next, for synthesizing the carbamoylmethyl compound **9b**, **12** was treated with NaOMe followed by aqueous NaHCO₃ to yield **9b**. For the synthesis of the amidinomethyl compound **9c**, **12** was successively treated with NaOMe, anhydrous NH₄Cl, and then KOH to generate **9c**. After thioamidomethylation by

情報に基づき hPIV-3 の強力な阻害剤のデザインが可能になるであろう。hPIV-1 の表面糖タンパク質のアミノ酸配列はすでに明らかにされているが (10, 13)、hPIV-1 HN 糖タンパク質と **2** との複合体の結晶構造はまだ解明されていない。

図 5 シアル酸の 4 位の置換基のシアリダーゼ阻害活性に及ぼす影響を確かめるために、シアル酸の C-4 位水酸基をシアノメチル、カルバモイルメチル、アミジノメチル、メトキシイミノメチルおよびチオカルバモイルメチル基に変換した。さらに、C-9 位の水酸基が様々な起源のシアリダーゼの阻害に重要かどうか検討するために、9 位水酸基をアジド基や *N*-アセチル基で修飾した。この項では、**2** の C-4, 9 位を修飾したシアル酸誘導体 (**9**, **10**, **11**) の合成と、ウイルスや哺乳動物を起源とするシアリダーゼに対する阻害活性について述べる (14) (図 6)。

C-4 位にシアノメチル基を持つ化合物 **12**, **13**, **14** の合成には、**9a-d**, **10a-d**, **11a-d** を鍵化合物として選んだ。シアノメチル基 (**15**) は糖アミドやアミジノ体合成のための多目的な官能基であり、新たな静電気力や水素結合による相互作用を強力に誘起することができる。C-4 位を修飾した Neu5Ac2en 誘導体 **9a-d** の合成はスキーム 1 に示した。**16** の C-4 位の水酸基に選択的にシアノメチル基を導入し、次にイソプロピリデン基を除去し、アセチル化後、**18** は dimethyl(methylthio)sulfonium triflate (DMTST) と DBU (16) により鍵化合物 **12** へ誘導した。さらに、鍵化合物 **12** は **9a-c** へと導いた。まず、**12** の脱アセチル化、加水分解によりシアノメチル体 **9a** とした。次に、カルバモイルメチル体 **9b** の合成は、**12** をナトリウムメトキシド、そして炭酸水素ナトリウムで処理することにより **9b** とした。アミジノメチル体 **9c** の合成は、**12** をナトリウムメトキシド、塩化アンモニウムそして水酸化カリウムで連続的に処理して **9c** とした。**9d** はチオ酢酸によるチオア

Scheme 1. Reagents and conditions.

(a) (i) 0.1 M NaOMe-CH₂Cl₂-MeOH, (ii) IR120(H⁺), acetone, 81% (two steps); (b) (i) BrCH₂CN, Ag₂O, TBAI, DMF, (ii) 80% AcOH, 47% (two steps); (c) Ac₂O, pyridine, 98%; (d) (i) DMTST, CH₂Cl₂, (ii) DBU, 97%; (e) 0.1 M KOH-MeOH, 49%; (f) (i) 0.1 M NaOMe-MeOH, (ii) aq. NaHCO₃, 55% (two steps); (g) (i) 0.1 M NaOMe-MeOH, (ii) anhydr. NH₄Cl, (iii) 0.1 M KOH-MeOH, 57% (three steps); (h) AcSH, pyridine, 94%; i) 0.1 M KOH-MeOH, 52%.

AcSH-pyridine followed by hydrolysis, **9d** was produced.

For the synthesis of **10a-d**, bearing an azido group at C-9, **17** was converted to the common intermediate **13** (Scheme 2). Selective tosylation at the C-9 alcohol of **17**, subsequent treatment with NaN₃, and acetylation generated **22**. Compound **22** was similarly treated with DMTST and then DBU to yield **13**. Similar to the preparation of **9a-c**, **13** was converted into the corresponding cyanomethyl compound **10a**, carbamoylmethyl compound **10b**, and amidinomethyl compound **10c**. Furthermore, **13** was treated with NaOMe, and then hydrolyzed to yield **10d**.

Scheme 2. Reagents and conditions.

(a) TsCl, pyridine, 64%; (b) NaN₃, 18-crown-6, 74%; (c) Ac₂O, pyridine, 95%; (d) (i) DMTST, (ii) DBU, 99%; (e) 0.1 M KOH-MeOH, 80%; (f) (i) 0.1 M NaOMe-MeOH, (ii) aq. NaHCO₃, 67% (two steps); (g) (i) 0.1 M NaOMe-MeOH, (ii) anhydr. NH₄Cl, (iii) 0.1 M KOH-MeOH, 60% (three steps); (h) (i) 0.1 M NaOMe-MeOH, (ii) 0.1 M KOH-MeOH, 76% (two steps).

ミドメチル化、加水分解により得た。

C-9 位にアジド基を持つ **10a-d** の合成には、**17** を共通中間体 **13** へと誘導した (スキーム 2)。**17** の C-9 位水酸基の選択的トシル化、続くアジド化、アセチル化により **22** が得られた。化合物 **22** は同様に DMTST と DBU により **13** とした。**9a-c** の合成と同様に、**13** は対応するシアノメチル体 **10a**、カルバモイルメチル体 **10b**、アミジノメチル体 **10c** へと変換した。さらに、**13** はナトリウムメトキシド、そして加水分解により **10d** が得られた。

Scheme 3. Reagents and conditions. (a) AcSH, pyridine, 79%; (b) 0.1 M KOH-MeOH, 67%; (c) (i) PPh_3 -dioxane-MeOH- H_2O , (ii) Ac_2O , pyridine, 85% (two steps); (d) 0.1 M KOH-MeOH, 41%; (e) (i) 0.1 M NaOMe-MeOH, (ii) aq. NaHCO_3 , 60% (two steps); (f) (i) 0.1 M NaOMe-MeOH, (ii) anhydr. NH_4Cl , (iii) 0.1 M KOH-MeOH 52% (three steps).

For the synthesis of **11a-d** with an *N*-Ac group at C-9, transformation to the common intermediate **14** from **13** was examined (Scheme 3). After reduction of the azido group of **13**, simultaneous acetylation generated **23**, which was hydrolyzed to give thiocarbamoylmethyl compound **11a**. The azido group of **13** was reduced using PPh_3 , and following acetylation, compound **14** was produced. Similarly to the method described above, **14** was transformed to the corresponding cyanomethyl compound **11b**, carbamoylmethyl compound **11c**, and amidinomethyl compound **11d**.

The behavior of these newly synthesized compounds toward sialidase from influenza virus A/Memphis/1/71(H_3N_2) and pig liver membrane was examined by comparing inhibition activity to that of **2** (Table I). Additionally, we examined the inhibitory activities of synthesized compounds toward hPIV-1 sialidase (Table II). As can be seen from Table I, compounds **10d** and **11c,d** showed inhibitory activities against both sialidases. However, the inhibition degree of **11c,d** was less than that of **2**. Additionally, compound **10d** was essentially inactive against hPIV-1 sialidase. Interestingly, compound **11a** exhibited selective inhibition against the virus over mammalian sialidase, while the inhibitory effects of **10b,c** were only on mammalian sialidase. The most effective compound in this study was thiocarbamoylmethyl analog **9d**, whose IC_{50} of approximately $10 \mu\text{M}$ toward hPIV-1 sialidase was 30-fold smaller than that of **2**. Analogs of **2** modified at the *N*-acetyl group on C-9 showed decreased inhibition of hPIV-1 sialidase compared with 9-hydroxy analogs. Modification at the C-9 hydroxyl group of **2** with nitrogen substituents did not significantly enhance biological activity.

C-9 位に *N*-アセチル基を持つ **11a-d** を合成するために、**13** から共通中間体 **14** への誘導を検討した (スキーム 3)。**13** のアジド基の還元、同時にアセチル化により **23** とし、加水分解によりチオカルバモイルメチル体 **11a** が得られた。**13** のアジド基はトリフェニルホスフィンによる還元、アセチル化により **14** とした。同様に、**14** は対応するシアノメチル体 **11b**、カルバモイルメチル体 **11c**、アミジノメチル体 **11d** に変換した。

今回合成した新規化合物のインフルエンザ A およびブタ肝膜シアリダーゼに対する影響を **2** と比較検討した (表 I)。さらに、hPIV-1 シアリダーゼに対する合成化合物と **2** との阻害活性の比較も行った (表 II)。表 I から、化合物 **10d** と **11c,d** はいずれのシアリダーゼにも阻害活性を示した。しかし、**11c,d** の活性の度合いは **2** と比較して弱かった。また **10d** は hPIV-1 シアリダーゼには有効ではなかった。興味あることに、**11a** は哺乳動物のシアリダーゼよりもウイルスシアリダーゼに選択的な阻害作用を示した。今回、チオカルバモイルメチル誘導体 **9d** が最も有効であり、その hPIV-1 シアリダーゼに対する阻害活性 (IC_{50}) は $10 \mu\text{M}$ で **2** の 30 倍であった。一方、*N*-アセチル基で修飾した **2** の誘導体 (**11a-d**) は 9 位水酸基体と比較して hPIV-1 シアリダーゼに対して阻害活性は減少した。9 位水酸基を窒素置換基で修飾しても生物活性の向上には有効な影響はなかった。これらの結果は、C-7、C-8 および C-9 のグリセロール側鎖は paramyxovirus HN 糖タンパク質

Table I. Inhibitory activities against virus and mammalian sialidases.

Compound	Sialidase	
	A/Memphis/1/71(H3N2)	pig liver liver membrane
9a	++	+
9b	++	+
9c	++	+
10a	-	+
10b	-	++
10c	-	++
10d	++	++
11a	++	-
11b	+	+
11c	++	++
11d	++	++
2	++++	++++

Inhibition of sialidase at 1.0 mM of inhibitor; + : < 10%, ++ : 10 ~ 30%,
+++ : 30 ~ 90%, ++++ : > 90%.

These results support structural findings regarding the NDV HN glycoprotein. The C-7, C-8, and C-9 glycerol side chains are distinctive features of paramyxovirus HN glycoproteins and important determinants of sialic acid recognition. Compound **9d** may fit in the cavity of the hPIV-1 HN glycoprotein better than other analogs tested. Furthermore, the inhibitory activity of **9d** towards hPIV-3 sialidase was not significantly affected in comparison with the activity of **2** and 4-guanigino-Neu5Ac2en **4**.

D. 4-*O*-Thiocarbamoylalkyl-2-Deoxy-2,3-Didehydro-Neu5Ac2en Analogs

We found that 4-*O*-thiocarbamoylmethyl-Neu5Ac2en (**9d**) has strong inhibitory activity toward hPIV-1 sialidase compared with that of **2**. Therefore, we compared the inhibitory activity against hPIV-1 sialidase of a few thiocarbamoylalkyl groups on the hydroxyl group at the C-4 position. In this section, we present the synthesis of analogs possessing thiocarbamoylethyl **27** and thiocarbamoylpropyl **28** groups at the C-4 position of **2** and their inhibitory activities against hPIV-1 sialidase (17). As outlined in Scheme 4, the synthesis of compounds **27** and **28** began with intermediate compounds **25** and **26**, respectively.

First, for synthesis of **27**, a reaction of **24** with

Table II. Inhibitory activities against hPIV-1.

Compound	IC ₅₀ (μM)
11a	42
9a	60
9c	100
9d	10
2	300

の認識に必要であり、シアル酸を認識するための重要な決定要素であるという NDV HN 糖タンパク質の構造的な知見を支持している。化合物 **9d** は他の誘導体に比較して hPIV-1 HN 糖タンパク質の空洞に適合していたと考えられる。さらに **9d** の hPIV-3 に対する阻害活性には **2** や **4** に比較して顕著な差は見られなかった。

D. 4-*O*-チオカルバモイルアルキル-2-デオキシ-2,3-デヒドロ-シアル酸誘導体

4-*O*-チオカルバモイルメチル-Neu5Ac2en **9d** が hPIV-1 シアリダーゼに対して強い阻害活性をもつことを見出した。次に、C4 位の水酸基に置換したチオカルバモイルアルキル基の hPIV-1 シアリダーゼに対する阻害活性を比較した。この項では、**2** の C4 位にチオカルバモイルエチル基 **27** およびチオカルバモイルプロピル基 **28** をもつ誘導体の合成と、生物活性の検討について述べる (17)。スキーム 4 に示したように、**27** と **28** の合成は鍵化合物 **25** と **26** からそれぞれ行った。

まず、**27** の合成は、水素化ナトリウム存在下、**24** と 3-ブ

Scheme 4. Synthesis of 27 and 28.

Table III. Synthesis of 25 and 26.

Entry	Conditions	Time (h)	Products	Yields (%)
1	BrCH ₂ CH ₂ CN, NaH, DMF, r.t.	1	25	N.R. ^a
2	BrCH ₂ CH ₂ CN, Ag ₂ O, TBAI, DMF, 50 °C	12	25	58
3	CH ₂ =CHCN, DBU, CH ₃ CN, 0 °C	12	25	70
4	BrCH ₂ CH ₂ CH ₂ CN, NaH, DMF, r.t.	1	26	50
5	BrCH ₂ CH ₂ CH ₂ CN, Ag ₂ O, TBAI, DMF, r.t.	12	26	70

^a No reaction.

3-bromopropionitrile in the presence of sodium hydride resulted in the recovery of **24** by β -elimination of the 4-*O*-thiocarbamoyl ethyl moiety of **25** due to a retro-Michael reaction which occurred under strongly basic conditions (Table III, entry 1). Selective 4-*O*-cyanoethylation of **24** with 3-bromopropionitrile using silver oxide gave 4-*O*-cyanoethyl derivative **25** (entry 2). Interestingly, Michael addition reaction of **24** with acrylonitrile in the presence of DBU proceeded to give **25** (entry 3). For preparation of **28**, 4-*O*-cyanopropylation of **24** with 4-bromobutyronitrile in the presence of sodium hydride successfully generated 4-*O*-cyanopropyl derivative **26** (entry 4). The reaction of 4-bromobutyronitrile and silver oxide gave compound **26** (entry 5).

Thiocarbamoylalkylation of the C-4 position on **25** and **26** using a previously reported method (18) with AcSH-pyridine did not proceed. Therefore, deprotection of **25** and **26** generated alcohols were acetylated to give cyanoalkyl compounds **29** and **30**, respectively (Scheme 5).

For conversion of cyanoalkyl groups of **29** and **30** to a thiocarbamoyl group, we examined thiocarbamoylation of **29** and **30** using AcSH-pyridine in CH₂Cl₂; however, the

ロモプロピオニトリルから行ったが、強い塩基性条件による retro-Michael 反応で **25** からシアノエチル残基が β -脱離した **24** が回収された (表 III)。**24** の選択的な 4-*O*-シアノエチル化は酸化銀を用いて 3-ブロモプロピオニトリルと行い 4-*O*-シアノエチル体 **25** が得られた。興味あることに、**24** にアクリロニトリルと DBU を作用させると反応は順調に進み **25** が得られた。**28** の合成のために、**24** の 4-*O*-シアノプロピル化は水素化ナトリウム存在下、**24** と 4-ブロモブチロニトリルを用いて行い 4-*O*-シアノプロピル誘導体 **26** が得られた。また、4-ブロモブチロニトリルと酸化銀では **26** が得られた。

25 と **26** の C-4 位のチオカルバモイルアルキル化はチオ酢酸-ピリジンによる文献の方法 (18) で行ったが、反応は進まなかった。次に、**25** と **26** を脱保護し、アセチル化してシアノアルキル体 **29** と **30** とした (スキーム 5)。

29 と **30** のシアノアルキル基のチオカルバモイル基への変換のために、チオ酢酸およびピリジンを使って **29** と **30** のチオカルバモイル化を行ったが反応は進まなかった (表 IV、en-

reaction did not proceed (Table IV, entries 1 and 5). Treatment of **29** with AcSH-trimethylsilyl chloride in CH_2Cl_2 resulted in recovery of **29** (entry 3). Thiocarbamylation of **29** with AcSH-BnNH₂ gave **31** in 33% yield (entry 4). When using $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ instead of pyridine, the reaction gave the expected compound **32**, in contrast to the result of entry 5 (entry 6).

Hydrolysis of **32** resulted in the expected compound **28**; however, hydrolysis of **31** led to elimination of the

tries 1 and 5). **29** をチオ酢酸 - トリメチルシリルクロリドで処理したが原料回収であった (entry 3)。 **29** のチオカルバモイル化はチオ酢酸およびブチルアミンを用いることにより **31** が収率 33% で得られた (entry 4)。 Entry 5 の結果とは異なり、ピリジンの代わりに $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を用いることにより期待通り **32** が得られた (entry 6)。

32 の加水分解では予想通り **28** が得られたが、 **31** の場合は塩基性条件で 4-O-チオカルバモイルエチル部分が脱離した

Table IV. Synthesis of 31 and 32.

Entry	Substrate	Conditions	Product	Yield (%)
1	29	AcSH, pyridine, CH_2Cl_2 , 12 h	31	N.R. ^a
2	29	AcSH, BF_3OEt_2 , CH_2Cl_2 , 12 h	31	N.R.
3	29	AcSH, TMSCl, CH_2Cl_2 , 12 h	31	N.R.
4	29	AcSH, BnNH ₂ , 48 h	31	33
5	30	AcSH, pyridine, CH_2Cl_2 , 12 h	32	N.R.
6	30	AcSH, BF_3OEt_2 , CH_2Cl_2 , 12 h	32	63

^a No reaction.

4-*O*-thiocarbamoyl ethyl moiety to give **2** under strongly basic conditions. Therefore, we focused on searching for an efficient method conducted under mild conditions to hydrolyze the methyl ester residue of **31** without eliminating the 4-*O*-thiocarbamoyl ethyl moiety. We examined enzymatic hydrolysis of the methyl ester group of **31** using pig liver esterase (PLE) in neutral aqueous conditions. Thus, deprotection of acetyl groups of **31** with trimethylsilyl chloride in MeOH was performed to generate **33**. Hydrolysis of **33** with PLE readily produced **27** in quantitative yield (Scheme 6).

As can be seen in Table V, 4-*O*-thiocarbamoyl ethyl-**27** and 4-*O*-thiocarbamoyl propyl-Neu5Ac **28** have IC₅₀ values of 68 μ M and 102 μ M, respectively. However, the degrees of inhibition of both **27** and **28** were lower toward hPIV-1 sialidase than 4-*O*-thiocarbamoyl methyl-Neu5Ac **9d**

2 が回収された。次に、4-*O*-チオカルバモイルエチル部分の脱離を伴わない緩和な条件での **31** のメチルエステル基の加水分解反応を検討した。中性水溶液中での pig liver esterase (PLE) による酵素的な **31** のエステル基の加水分解を検討した。まず、メタノール中、トリメチルシリルクロリドを用いて **31** のアセチル基を除去した。**33** と PLE の反応は順調に進み定量的に **27** が得られた (スキーム 6)。

表 V に示したように、4-*O*-チオカルバモイルエチル-**27** と 4-*O*-チオカルバモイルプロピル-シアル酸 **28** の阻害活性はそれぞれ IC₅₀ 68 μ M と IC₅₀ 102 μ M であった。しかし、**27** と **28** の両方の阻害活性は 4-*O*-チオカルバモイルメチル体 **9d** (IC₅₀

Table V. Inhibitory activities against hPIV-1 sialidase.

Entry	Compound	IC ₅₀ (μ M)
1	2	300
2	9d	10
3	27	68
4	28	102

(IC₅₀ 10 μ M). The reason for this lower inhibitory activity of compounds **27** and **28** is unclear in this study, but the difference in carbon chain length of the substituent on the hydroxyl group at the C-4 position of **2** may affect inhibitory activities against hPIV-1 sialidase.

E. 4-*O*-Alkyl-2-Deoxy-2,3-Didehydro-Neu5Ac2en Analogs

We synthesized a series of 4-*O*-alkylated Neu5Ac2en derivatives and tested their ability to inhibit hPIV-1 sialidase (19). Selective 4-*O* alkylation of **24** with methyl iodide in the presence of silver oxide gave one major product, 4-*O*-methyl derivative **34a** (Table VI, entry 1). Using a similar method, 4-*O* alkylation of **24** with alkyl bromides in the presence of silver oxide gave **34b-d** (entries 2–4); however, the reaction of **24** with propargyl bromide in the presence of silver oxide was unsuccessful (entry 6). Reactions of **24** with allyl bromide and propargyl bromide using sodium hydride as a base successfully gave **34e** and **34f** (entries 7 and 8).

Deprotection of **34a-f** gave **35a-f** (Table VII). Interestingly, 4-*O*-ethyl-Neu5Ac2en **35b** (20) showed the most potent inhibitory activity (IC₅₀ 6.3 μ M) (Table VII). The degree of inhibition was the same as that of **9d**. Additionally, compound **35d** exhibited decreased sialidase inhibition compared with **35b** and **35c**, indicating that increasing the alkyl substituent size influences inhibitory activity. These results suggest that the substituent bulkiness at the C-4 alcohol of **2** affect interaction with the cavity. It is also possible that hPIV-1 has an area of hydrophobic interaction with the C-4 position of **2** in the cavity of the catalytic pocket in HN glycoprotein.

10 μ M) よりも弱かった。**27** と **28** の阻害活性が **9d** に比べて低かった理由は不明であるが、**2** の C-4 位の水酸基の置換基の炭素鎖長の相違が hPIV-1 シアリダーゼに対する阻害活性に影響を与えることが明らかとなった。

E. 4-*O*-アルキル-2-デオキシ-2,3-デヒドロ-シアル酸誘導体

この項では、4-*O*-アルキル化シアル酸誘導体の合成と hPIV-1 シアリダーゼに対する阻害活性について述べる (19)。選択的な **24** の 4-*O*-アルキル化を酸化銀の存在下、ヨウ化メチルと行い主生成物として 4-*O*-メチル体 **34a** を得ることができた (表 VI, entry 1)。

同様に、**24** の 4-*O*-アルキル化を酸化銀の存在下、種々のアルキルブロミドと行い **34b-d** を合成することができたが (entries 2, 3, and 4)、**24** とプロパルギルブロミドとの反応は酸化銀では進まなかった (entry 6)。**24** とアリルブロミドとプロパルギルブロミドとの反応は塩基として水素化ナトリウムを用いることにより **34e** と **34f** がそれぞれ順調に得られた (entries 7 and 8)。**34a-f** を脱保護し **35a-f** とした (表 VII)。

興味あることに、4-*O*-エチルシアル酸誘導体 **35b**(20) が最も強い阻害活性を示した (IC₅₀ 6.3 μ M)。その阻害活性は **9d** と同程度であった。一方、化合物 **35d** では、活性に影響を及ぼすアルキル基の大きさの増大に伴い **35d** や **35c** と比べて阻害活性が減弱した。これらの結果は、**2** の C-4 位水酸基上の置換基のかさ高さが触媒部位の空洞との相互作用に影響を与えていることが示された。hPIV-1 の HN の触媒部位の空洞は、**2** の C-4 位と疎水的な相互作用する部分をもっている可能性も考えられる。

Table VI. 4-*O*-Alkylation of **24**.

Entry	R-X	Condition	Product	Yield (%)
1	MeI	Ag ₂ O, TBAI	34a	56
2	EtBr	Ag ₂ O, TBAI	34b	45
3	<i>n</i> -PrBr	Ag ₂ O, TBAI	34c	41
4	<i>i</i> -PrBr	Ag ₂ O, TBAI	34d	25
5	allyl bromide	Ag ₂ O, TBAI	34e	69
6	propargyl bromide	Ag ₂ O, TBAI	34f	N.R. ^a
7	allyl bromide	NaH	34e	52
8	propargyl bromide	NaH	34f	56

^a No reaction.

Table VII. Synthesis and inhibitory activities of **35a-f** against hPIV-1 sialidase.

Entry	R	Product	Yield (%)	IC ₅₀ (μ M)
1	Me	35a	quant.	274
2	Et	35b	59	6.3
3	<i>n</i> -Pr	35c	85	26
4	<i>i</i> -Pr	35d	43	58
5	CH ₂ CH=CH ₂	35e	81	83
6	CH ₂ C $\equiv$ CH	35f	97	29

F. 4-*O*-(3-Heteroaryl-2-Propynyl)-2-Deoxy-2,3-Didehydro-Neu5Ac2en Analogs

We focused on synthesis of a novel Neu5Ac2en **36** (21) containing heterocycles primarily using the Sonogashira coupling reaction (22). We anticipated that the 4-hydroxy group configuration of **2** may play a substantial role in inhibition of sialidase by hPIV-1. Therefore, to gain further insight into the interaction of sialidase with the substituent at C-4 on Neu5Ac2en derivatives, we synthesized 4-epi-Neu5Ac2en derivative **37** modified at the C-4 of **2**. We initially focused on the synthesis of **36** using a Sonogashira coupling reaction starting from the 4-*O*-2-propynyl-Neu5Ac2en derivative **34f** (Scheme 7).

F. 4-*O*-(3-ヘテロアリール-2-プロピニル)-2-デオキシ-2,3-デヒドロ-シアル酸誘導体

この項では、菌頭カップリング反応 (**21**) を鍵反応としたヘテロ環部分を持つ **36** の合成について述べる (**22**)。 **2** の 4 位水酸基の立体配置が hPIV-1 シアリダーゼの阻害活性に重要な役割を果たしていると考えられてきた。さらに、Neu5Ac2en 誘導体の C-4 位の置換基とシアリダーゼとの相互作用を調べるために、 **2** の C-4 位を修飾した 4-epi-シアル酸誘導体 **37** の合成も行った。最初の研究は、4-*O*-(2-プロピニル)-シアル酸誘導体 **34f** から菌頭カップリング反応による **36** の合成であった (スキーム 7)。

Scheme 7. Synthesis of 4-*O*-(3-heteroaryl-2-propynyl) Neu5Ac2en derivatives.

Sonogashira coupling reactions were performed under the conditions in method A (23) (Table VIII). When iodobenzene was used as an aryl halide, the corresponding product **38a** was obtained (entry 1). When 2-iodopyridine, 3-iodopyridine, and 2-iodothiophene were used as heteroaryl halides under the same conditions, products **38b-d** were obtained, respectively (entries 2, 3, and 4). However, the coupling reaction of **34f** with 3-bromothiophene led to recovery of **34f** under the conditions in method A (entry 5). The reaction of **34f** with bromothiophene under the conditions in method B (24) as an alternative procedure gave poor yield of **38e** (entry 6). When iodothiophene and method A were combined, **38e** was obtained (entry 7). In sharp contrast with the result of entry 8, the coupling reaction of **34f** with 2-bromo-1,3-thiazole under the conditions in method B generated **38f** (entry 9). For the synthesis of **38g-j** with an additional substitution on the heteroaryl 5-membered ring, compound **34f** successfully underwent a Sonogashira coupling reaction with heteroaryl halides under the conditions in method A to generate **38g-j**.

菌頭カップリング反応は条件 A (23) (表 VIII) を用いて行った。アリールハライドとしてヨードベンゼンを用いたときには、対応する **38a** が得られた (entry 1)。2-ヨードピリジン、3-ヨードピリジン、2-ヨードチオフェンをヘテロアリールハライドとして用い、条件 A で反応を行ったとき **38b-d** がそれぞれ得られた (entries 2, 3, and 4)。しかし、**34f** と 3-ブロモチオフェンを条件 A で行った場合には **34f** が回収された (entry 5)。別法として条件 B (24) で **34f** と 3-ブロモチオフェンとの反応を行うと低収率ながら **38e** が得られた (entry 6)。3-ヨードチオフェンと条件 A で反応を行うと、**38e** が順調に得られた (entry 7)。Entry 8 の結果と対照的に、**34f** と 2-ブロモ-1,3-チアゾールとの反応を条件 B で行うと **38f** を得ることができた (entry 9)。ヘテロアリールの 5 員環上に置換基をもつ **38g-j** の合成は、**34f** とヘテロアリールハライドとの反応を条件 A により行い **38g-j** が得られた。

Table VIII. Synthesis of 38 by the Sonogashira coupling reaction.

Entry	Ar-X	Condition ^a	Yield (%)
1		A	38a (53)
2		A	38b (73)
3		A	38c (93)
4		A	38d (83)
5		A	N.R. ^b
6		B	38e (trace)
7		A	38e (76)
8		A	N.R.
9		B	38f (59)
10		A	38g (92)
11		A	38h (55)
12		A	38i (62)
13		A	38j (49)

A) RX (1.1 eq.), Pd (PPh₃)₂Cl₂ (2 mol%), CuI (4 mol%), Et₃N (3 eq.).

B) RX (1.1 eq.), Pd (CH₃CN)₂Cl₂ (5 mol%), Cu(OAc)₂ · H₂O (5 mol%), PPh₃ (10 mol%), *i*-Pr₂NH (2 mL).

No reaction.

Deprotection of **38a-j**, except for **38g**, gave the target compounds **39a-f** and **39h-j** (Table IX). In the production of **38g**, starting material decomposition occurred with the treatment under acidic conditions.

We were interested in comparing inhibitory activities of **36** and 4-epimer **37** of **36** against hPIV-1 sialidase. As outlined in scheme 8, synthesis of compound **42** as an intermediate was achieved using the known compound **40** (25). Installation of a propargyl group at the 4-hydroxyl group of **41** using sodium hydride and propargyl bromide gave intermediate **42**.

Synthesis of **43a-c** was performed using a Sonogashira coupling reaction in a manner similar to the preparation of **36**. The results are summarized in Table X. Deprotection of **43a-c**

Table IX. Synthesis and Inhibitory activities of 36a-j against hPIV-1 sialidase.

Entry	Ar	Yield of 39 (%)	Yield of 36 (%)	IC ₅₀ (μM)
1		39a (82)	36a (83)	15
2		39b (91)	36b (quant.) ^a	14
3		39c (83)	36c (quant.) ^a	88
4		39d (98)	36d (66)	1.2
5		39e (89)	36e (76)	2.5
6		39f (83)	36f (54)	3.1
7		39h (95)	36h (98)	250
8		39i (80)	36i (96)	230
9		39j (89)	36j (46)	60

^a The products were isolated as potassium salt.

38gを除く **38a-j** の脱保護により **39a-f** と **39h-j** が得られた (表 IX)。**38g** の場合には、酸性条件で出発原料が分解した。

36 とその 4-エピマー体 **37** の hPIV-1 シアリダーゼに対する阻害活性を比較することに興味を持たれた。スキーム 8 に示したように、鍵化合物 **42** の合成は既知化合物 **40**(24) から行った。**41** の 4 位水酸基へのプロパギル基の導入は水素化ナトリウムとプロパルギルブロミドを用いて行い、鍵化合物 **42** とした。

43a-c の合成は **38** の合成と同様の条件で菌頭カップリング反応を行った。結果は、表 X に示した。連続した **43a-c** の

Scheme 8. Reagents and conditions. (a) (i) MeOH, Amberlite IR120 (H^+), rt, 15 h, quant., (ii) Ac_2O , H_2SO_4 , 80 °C, 3 h, 96% ($4\alpha : 4\beta = 1 : 8$); (b) (i) NaOMe, MeOH, 0 °C, 1 h, quant.; (ii) 2,2-dimethoxypropane, DMF, Amberlite IR120 (H^+), rt, 12 h, 58%; (c) propargyl bromide, NaH, DMF, 0 °C, 1 h, 39%.

Table X. Synthesis of 43 by the Sonogashira coupling reaction

Entry	Ar-X	Condition ^a	Product	Yield (%)
1		A	43a	64
2		A	43b	73
3		B	43c	48

^a Method A: RX (1.1 eq.), Pd (PPh_3)₂Cl₂ (2 mol%), CuI (4 mol%), Et₃N (3 eq.).
Method B: RX (1.1 eq.), Pd (CH_3CN)₂Cl₂ (5 mol%), Cu(OAc)₂ · H₂O (5 mol%), PPh_3 (10 mol%), iPr_2NH (2 mL).

afforded compounds **37a-c**, respectively.

As seen in Table IX, 2-thienyl-Neu5Ac2en **36d** had a strong inhibitory effect (IC_{50} 1.2 μM) on hPIV-1 sialidase. Furthermore, compounds **36e** and **36f** had nearly the same inhibitory effects. In contrast, compound **37a-c**, the 4-epimer of **36**, inhibited sialidase much less than **36**, and compound **37c** was not effective against sialidase. These results demonstrate that side chain stereochemistry and conformation

脱保護により **37a-c** とした (表 XI)。

表 IX に示したように、興味あることに、2-チエニル-シアル酸誘導体 **36d** が hPIV-1 シアリダーゼに最も強い阻害活性 (IC_{50} 1.2 μM) を示した。さらに、化合物 **36e** と **36f** はほぼ同じ阻害活性を持っていた。これに対して、**36** の 4-エピマー体である **37a-c** は、**36** と比較して阻害活性はかなり弱く、**37c** はシ

Table XI. Synthesis and inhibitory activities of 37.

Entry	Ar	Yield of 44 (%)	Yield of 37 (%)	IC_{50} (mM)
1		44a (68)	37a (60)	1.1
2		44b (79)	37b (99)	1.7
3		44c (53)	37c (94)	1.3

have a dominating influence over the interaction of unsaturated sialic acids with the enzyme. This *in silico* procedure suggests that the origin of the strong binding affinity of **36d** may be caused by CH- π type interactions of the thienyl residue at 4-OH group of **2** with enzyme.

G. 4-*O*-*N*-Sulfonylamidinoalkyl-2-Deoxy-2,3-Didehydro-Neu5Ac2en Analogs

Multicomponent reactions (MCRs), a straightforward route to generate complexity and diversity in a single step, have become important tools in the combinatorial and pharmaceutical chemistry (25). Amidines are prominent pharmacophores present in numerous bioactive natural products (26). The introduction of a sulfonyl group into a wide range of heterocyclic compounds results in significant changes in the bioactivity of these compounds (27). There are no reports regarding the synthesis of a Neu5Ac2en analog with an *N*-sulfonylamidino group (**46**) at the C-4 position of **2** using copper-catalyzed three-component coupling of sulfonyl azide, alkyne, and amine. We describe the synthesis of a novel compound **46** with an *N*-sulfonylamidino group at the C-4 position of **2** using the three-component coupling reaction (28) (Scheme 9).

Scheme 9. Synthesis of *N*-sulfonylamidino analogs **46** using MCRs.

$R^1, R^2, R^3 = \text{H, alkyl, aryl}$

MCRs were performed using a combination of 4-*O*-2-propynyl-Neu5Ac2en derivative **34f**, amines, CuI, and Et₃N as listed in Table XII. Under optimized conditions, many 3-component groups were successfully coupled to afford the corresponding *N*-sulfonylamidines (**45a-e**) in yields ranging from 60% to quantitative yield (Table XII).

To synthesize **45f** with a primary amino group on the *N*-sulfonylamidino substituent, a coupling reaction of **34f** using ammonium chloride gave **45f** (Scheme 10).

Deprotection of **45a-e**, but not **45f**, gave the *N*-sulfonylamidino compounds **46a-e** (Table XIII).

Among synthesized compounds **46a-e**, compound **46b** showed the highest activity (IC_{50} 0.8 mM) against hPIV-1 sialidase (Table XIV). However, the degrees of inhibition of both **46a** and **46b** were weaker than that of **2** (IC_{50} 0.3 mM). Compounds **46c-e**, with the largest hydrophobic groups,

アリダーゼに有効ではなかった。これらの結果は、側鎖の立体配置や立体配座は酵素と不飽和シアル酸との相互作用を支配していることを示している。**36d**の高い阻害活性は**2**の4位水酸基上のチエニル残基と酵素との CH- π 相互作用に起因していることが *in silico* 法により示唆された。

G. 4-*O*-*N*-スルホニルアミジノアルキル-2-デオキシ-2,3-デヒドロ-シアル酸誘導体

Multicomponent reactions (MCRs) は、一回の操作で複雑さや多様性を化合物に付与できることから、コンビナトリアルケミストリーや医薬品合成化学において重要な合成手法となっている (25)。アミジンは、多彩な生物活性を持つ天然物の重要なファーマコフォアである (26)。さらに、広範なヘテロ環化合物へのスルホニル基の導入は、化合物の生物活性に大きな影響を与える (27)。これまで、銅触媒によるスルホニルアジド、アルキン、アミンの三成分結合反応による**2**のC-4位に*N*-スルホニルアミジノ基を持つ Neu5Ac2en 誘導体 **46** の合成は知られていない。この項では、三成分結合反応を鍵反応として用いた**2**のC-4位に*N*-スルホニルアミジノ基を持つ**46**の合成について述べる (28) (スキーム 9)。

表 XII に示したように、MCR は 4-*O*-(2-プロピニル)-シアル酸誘導体 **34f**、アミン、ヨウ化銅 (I)、トリエチルアミンとの組み合わせにより行った。最適条件下で多彩な三成分結合反応が順調に進み対応する *N*-スルホニルアミジン体 **45a-g** が 60%～定量的な収率で得られた (表 XII)。

N-スルホニルアミジンの置換基上に第一級アミノ基を持つ **45f** の合成には、**34f** と塩化アンモニウムを用いて行った (スキーム 10)。

45f を除いた **45a-e** の脱保護により、*N*-スルホニルアミジン化合物 **46a-e** が得られた (表 XIII)。

46a-e の中で、**46b** が hPIV-1 シアリダーゼに最も強い阻害活性 (IC_{50} = 0.8 mM) を示した (表 XIV)。しかし、**46a** や **46b** はともに **2** (IC_{50} = 0.3 mM) よりも弱かった。最も大きな疎水性基を持つ **46c-e** は **46a** や **46b** に比べて阻害活性は減少

Table XII. Synthesis of 45a-e by Cu(I)-catalyzed three-component coupling.

Entry	Azide (R ¹)	Amine (R ² R ³ NH)	Product	Yield (%)
1	Me	Et ₂ NH	45a	85
2	Me	PhNH ₂	45b	No conversion ^a
3	Me	PhNH ₂	45b	60 ^b
4	4-MeC ₆ H ₄	Et ₂ NH	45c	80
5	4-MeC ₆ H ₄	<i>i</i> -Pr ₂ NH	45d	quant.
6	4-MeC ₆ H ₄	<i>i</i> -PrNH ₂	45e	64

^a 79% starting material **34f** was recovered.

^b Et₃N (1.2 eq) was added.

Table XIII. Deprotection of 46a-e.

Entry	R ¹	NR ² R ³	Product	Yield (%)
1	Me	NEt ₂	46a	quant.
2	Me	NHPh	46b	quant.
3	4-MeC ₆ H ₄	NEt ₂	46c	quant.
4	4-MeC ₆ H ₄	Ni-Pr ₂	46d	95
5	4-MeC ₆ H ₄	NH <i>i</i> -Pr	46e	quant.

showed decreased inhibitions of sialidase compared with **46a** and **46b**. These studies suggest that diminished activity results from fewer favorable interactions between sialidase inhibitors **46** with the *N*-sulfonylamidino group at the C-4 position of **2** and the sialidase.

した。これらの研究により、阻害活性の低下は、**2** の C-4 位に *N*-スルホニルアミジノ基を持つ **46** と酵素の相互作用の不適合にあると推測している。

Table XIV. Inhibitory activities of 46a-e against hPIV-1 sialidase.

Entry	R ¹	NR ² R ³	Product	IC ₅₀ (mM)
1	Me	NEt ₂	46a	1.5
2	Me	NHPh	46b	0.8
3	4-MeC ₆ H ₄	NEt ₂	46c	9.1
4	4-MeC ₆ H ₄	Ni-Pr ₂	46d	4.8
5	4-MeC ₆ H ₄	NH <i>i</i> -Pr	46e	7.7

Scheme 11. Novel candidates for anti-hPIV-1 agents.

H. Conclusion

Structural modification of sialic acids is a useful strategy for evaluating structure-activity relationships for the development of new drug candidates. This article disclosed recent progress, including our own, in the synthesis of 2-deoxy-2,3-didehydro sialic acid analogs and their inhibitory activities against hPIV-1 sialidase. We demonstrated that among compounds modified on the C-4 position of **2**, a new analog, **36d**, had the most potent inhibitory activity towards hPIV-1 sialidase (Scheme 11). Inhibition is considerably improved compared with that of the parent 4-hydroxy

H. 結論

シアル酸の構造修飾は新しい医薬品候補開発のための構造活性相関を評価するうえで非常に有用な戦略である。この総説では、このように hPIV-1 シアリダーゼに対して阻害活性をもつ 2-デオキシ-2,3-ジデヒドロ-シアル酸誘導体の合成について我々の研究を含む最近の進展を述べた。今回我々は、**2** の 4-OH 体を修飾した化合物の中で **36d** がこれまでに知られている中で最も強い hPIV-1 シアリダーゼ活性をもつことを証明した (スキーム 11)。この化合物は、母骨格 4-OH 体 **2** と

compound **2**. This suggests that analogs of Neu5Ac2en modified at the C-4 are very useful in the development of anti-human parainfluenza virus medicines.

比較してかなり阻害活性が向上した。この知見は、C-4 位を修飾した Neu5Ac2en 誘導体が抗パラインフルエンザウイルス治療薬の開発に非常に有用であることを示している

Acknowledgements

We would like to express our deep gratitude to emeritus Professor Kazuo Achiwa (University of Shizuoka) and Dr. Kimio Furuhashi (Kitasato University) for guidance on carbohydrate chemistry, and thank Professor Takashi Suzuki (University of Shizuoka) for warm and continuous support of our research.

References

1. a) Schauer, R. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 485–499; b) Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97–130.
2. a) von Itzstein, M., and Kiefel, M. J. (1997) In *Carbohydrates in Drug Design* (Witczak, Z. J., and Nieforth, K. A., eds.) pp. 39–82, Marcel Dekker, New York; b) Kiefel, M. J., and von Itzstein, M. (2002) *Chem. Rev.* **102**, 471–490.
3. a) Collins, P. L., Chanock, R. M., and McIntosh, K. (1996) Parainfluenza viruses. In *Fields Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M. eds.) pp. 1205–1241, Lippincott-Raven, Philadelphia; b) Murphy, B. R. (1988) Parainfluenza viruses. In *Infectious Diseases* (Gorbach, S. L., Bartlett, J. G., and Blacklow, N. R., eds.) pp. 2155–2131, W. B. Saunders Company, Philadelphia.
4. Kiefel, M. J., and von Itzstein, M. (1999) *Prog. Med. Chem.* **36**, 1–28.
5. von Itzstein, M., and Thomson, R. J. (1997) *Curr. Med. Chem.* **4**, 185–210.
6. von Itzstein, M., Wu, W.-Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., Phan, T. V., Smythe, M. L., White, H. F., Oliver, S. W., Colman, P. M., Varghese, J. N., Ryan, D. M., Woods, J. M., Bethell, R. C., Hotham, V. J., Cameron, J. M., and Penn, C. R. (1993) *Nature* **363**, 418–423.
7. a) Mack, H., and Brossmer, R. (1987) *Tetrahedron Lett.* **28**, 191–194; b) Kok, G. B., Campbell, M., Mackey, B., and von Itzstein, M. (1996) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2811–2815.
8. McClellan, K., and Perry, C. M. (2001) *Drugs* **61**, 263–283.
9. Honda, T., Kubo, S., Masuda, T., Arai, M., and Kobayashi, Y. (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2938–2940.
10. Crennell, S., Takimoto, T., Portner, A., and Taylor, G. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1068–1074.
11. Alymova, I. V., Taylor, G., Takimoto, T., Lin, T.-H., Chand, P., Babu, Y. S., Li, C., Xiong, X., and Portner, A. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1495–1502.
12. Lawrence, M. C., Borg, N. A., Streltsov, V. A., Philling, P. A., Epa, V. C., Varghese, J. N., Mckimm-Breschkin, J. L., and Colman, P. M. (2004) *J. Mol. Biol.* **335**, 1343–1357.
13. a) Varsanyi, T. M., Kövamees, J., and Norrby, E. (1991) *J. General Virology* **72**, 89–95; b) Merson, J. R., Hull, R. A., Estes, M. K., and Kasel, J. A. (1988) *Virology* **167**, 97–105.
14. a) Ikeda, K., Sano, K., Ito, M., Saito, M., Hidari, K., Suzuki, T., Suzuki, Y., and Tanaka, K. (2001) *Carbohydr. Res.* **330**, 31–41; b) Suzuki, T., Ikeda, K., Koyama, N., Hosokawa, C., Kogure, T., Takahashi, T., Hidari, K., Miyamoto, D., Tanaka, K., and Suzuki, Y. (2001) *Glycoconjugate J.* **18**, 331–337.
15. Malet, C., and Hindsgaul, O. (1996) *J. Org. Chem.* **61**, 4649–4654.
16. Ikeda, K., Konishi, K., Sano, K., and Tanaka, K. (2000) *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 163–165.
17. Ikeda, K., Sato, K., Nishino, R., Aoyama, S., Suzuki, T., and Sato, M. (2008) *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 6783–6788.
18. Rosen, T. Lico, I. M., and Chu, D. T. W. (1998) *J. Org. Chem.* **53**, 1580–1582.
19. Ikeda, K., Sato, K., Kitani, S., Suzuki, T., Maki, N., Suzuki, Y., and Sato, M. (2006) *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 7893–7897.
20. Tindal, D. J., Dyason, J. C., Thomson, R. J., Suzuki, T., Ueyama, H., Kuwahara, Y., Maki, N., Suzuki, Y., and von Itzstein, M. (2007) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 1655–1658.
21. Sato, K., Ikeda, K., Suzuki, T., Aoyama, S., Maki, N., Suzuki, Y. and Sato, M. (2007) *Tetrahedron* **63**, 7571–7581.
22. Sonogashira, K. (2002) *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis*, Vol. 1 (Negishi, A. and Meijere, D., eds.) pp. 493–529, Wiley-Interscience.
23. Siebeneicher, H., and Doya, S. (2002) *Eur. J. Org. Chem.* 1213–1220.
24. Bemis, G. W., and Murcko, M. A. (1996) *J. Med. Chem.* **39**, 2887–2893.
25. Furuhashi, K. (2004) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **16**, 143–169.
26. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., and Sharpless, K. B. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2596–2599.
27. a) Yoo, E. J., Bae, I., Cho, S. H., Han, H., and Chang, S. (2006) *Org. Lett.* **8**, 1347–1350; b) Bae, I., Han, H., and Chang, S. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2038–2039.
28. a) Ugi, I., Domling, A., and Werner, B. (2000) *J. Heterocycl. Chem.* **37**, 647–658; b) Huang, Z., Schneider, K. C., Benner, S. A. (1991) *J. Org. Chem.* **56**, 3869–3882.
29. Nishino, R., Ikeda, K., Hayakawa, T., Takahashi, T., Suzuki, T., and Sato, M. (2011) *Bioorg. Med. Chem.* in press, doi:10.1016/j.bmc.2011.02.010

Profile of the Author

Kiyoshi Ikeda is Professor of the Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences at Hiroshima International University. He graduated from the School of Pharmaceutical Sciences at University of Shizuoka (1979) and received Ph.D. degree (1984) from the same university, under the supervision of the late Professor Minoru Sekiya and Professor Kazuo Achiwa. He joined the department of Synthetic Organic Chemistry at the University of Shizuoka as Assistant Professor, and was promoted to Lecturer (1991–1999) and then Associate Professor at the same university (2000–2009). In 2010, he moved to Hiroshima International University as a Professor. He worked as a postdoctoral fellow at the Scripps Research Institute under the direction of Professor K. C. Nicolaou (1991–1992). His research interests are in the area of synthesis of biological active sugars, especially sialic acids, and their applications in medicinal chemistry.