

論文の内容の要旨

論文題目 三環性ファーマコフォアを有する
新規インテグリン $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗薬の創製

氏名 石川 稔

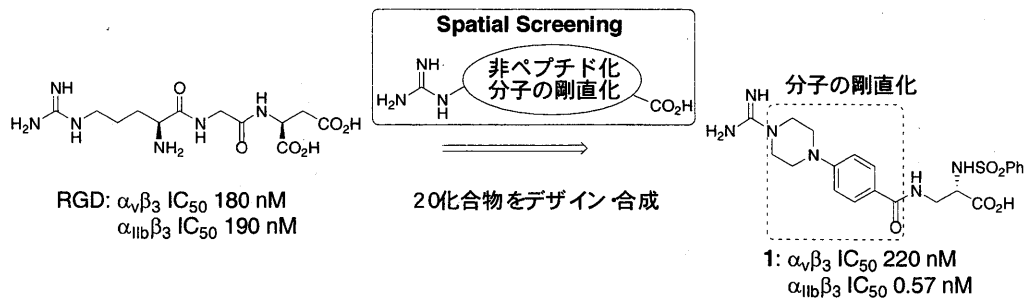
虚血性疾患は、血行不全によって組織が壊死する重篤な疾患である。急性虚血性疾患の治療として再灌流療法がこれまでに開発され、その救命率が格段に向上した。再灌流の際、再閉塞を防ぐ目的から抗血栓薬が投与される。

しかし虚血性疾患急性期の救命率向上により、再灌流の結果としてかえって虚血臓器の細胞障害が増強して梗塞サイズが増大する再灌流障害が新たな問題になっている。術後の長期予後は梗塞サイズに比例することが知られており、梗塞サイズを如何に縮小するかが重要な課題である。再灌流障害を最小限に抑えることができれば、梗塞サイズ縮小に貢献することが十分期待されるが、世界的スタンダードとなる治療法は未だ確立されていない。我々は、抗血栓作用を有し再灌流障害も抑制できる薬剤を再灌流療法時に投与するアプローチが急性虚血性疾患の治療改善に重要であると考えた。再灌流障害の原因と考えられている白血球や内皮細胞による微小循環障害や傷害因子遊離を抑制するメカニズムを調査したところ、接着因子の一種であるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ が白血球や内皮細胞や血管平滑筋細胞の接着や移動に関与しているとの報告があった。インテグリンは細胞の表面に存在し、細胞と細胞外基質および細胞-細胞間の接着を司る細胞接着受容体であり、発生、免疫反応、細胞運動、止血などの生理機能に加えて、自己免疫疾患や癌等の病態への関与が知られている。インテグリンの構造は、 α 鎖と β 鎖の異なる2つのサブユニットからなる膜貫通ヘテロ二量体であり、 α 鎖と β 鎖の組み合わせにより多くの種類が同定されている。抗血栓薬の

一種 tirofiban はインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ 拮抗薬であり、血小板凝集反応の最終段階を阻害する。白血球等の接着や移動に関与する $\alpha_v\beta_3$ と、血小板の凝集に関与する $\alpha_{IIb}\beta_3$ は、 β_3 サブユニットを有している点で共通する。更に $\alpha_v\beta_3$ と $\alpha_{IIb}\beta_3$ はどちらも、リガンドと結合する際にリガンド上のトリペプチド配列 RGD を認識する。そこで、「 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 拮抗作用と $\alpha_v\beta_3$ 拮抗作用を併せ持つ薬剤は、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 拮抗作用に基づく抗血栓作用に加えて、 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗作用に基づく再灌流障害抑制により梗塞サイズも縮小できる新たな急性虚血性疾患の治療薬になりうる」と考え、創薬研究を開始した。なお目指す薬剤は点滴注射剤に設定した。

環状ペプチドを用いた spatial screening は、RGD 配列を含むペプチドの $\alpha_v\beta_3$ 活性、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性を増強させる一手段として Kessler により提唱された。彼らは、RGD 配列を含む剛直な環状ペプチドを数多く合成・評価することにより、 $\alpha_v\beta_3$ 活性や $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性に最適な RGD コンフォメーションと、N 末端から C 末端までの最適距離を見出している。これにより、我々の研究開始当時、 $\alpha_v\beta_3$ または $\alpha_{IIb}\beta_3$ 選択的拮抗作用を有する RGD を含む環状ペプチドが報告されていた。

そこで、「spatial screening の概念を非ペプチド低分子化合物に応用し、N 末端にあるグアニジノ基と C 末端にあるカルボキシル基を適切な空間に配置できる化合物は $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗作用を示す」との作業仮説を立て、剛直な非ペプチド性化合物をデザインした。20 化合物を合成した結果、初めて $\alpha_v\beta_3$ と $\alpha_{IIb}\beta_3$ の両方に対して拮抗作用を有する化合物 1 を得た。この化合物は、RGD と同等の $\alpha_v\beta_3$ 拮抗作用と、RGD と比較して 330 倍強い $\alpha_{IIb}\beta_3$ 拮抗作用を併せ持っていた。



次に、 $\alpha_v\beta_3$ の更なる活性増強を目指して化合物 1 の構造活性相関を解析した。化合物 1 の塩基性部位をテトラヒドロピリミジンに変換した化合物が化合物 1 と同等の活性を示した。以降、塩基性部位をテトラヒドロピリミジンに固定して誘導化を実施した。先に述べた spatial screening から考察すると、化合物 1 の塩基性部位は、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ に対して適した空間に配置されているが、 $\alpha_v\beta_3$ に対しては更に適切な空間が存在することが考えられた。そこで、化合物 1 のピペラジンを含窒素飽和複素環に変換し、両受容体に対して塩基性部位が適切な空間配置を占める化合物を探索した。その結果、ピペラジンを 4-アミノピペリジ

ンに変換したところ、 $\alpha_v\beta_3$ に対する活性が約 100 倍増強され、両受容体に対する IC_{50} 値がナノモルオーダーの三環性ファーマコフォアを有する化合物 **2** が創出された。 $\alpha_v\beta_3$ と $\alpha_{IIb}\beta_3$ のそれぞれに対する細胞評価であるヒト平滑筋細胞接着阻害活性系とヒト血小板凝集抑制活性系で、化合物 **2** を評価した。これにより、**2** が作動物質ではなく拮抗物質であることを確認した。以上により、作業仮説「spatial screening の概念を非ペプチド化合物に応用し、グアニジノ基とカルボキシル基を適切な空間に配置できる化合物は $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗作用を示す」を実証できた。

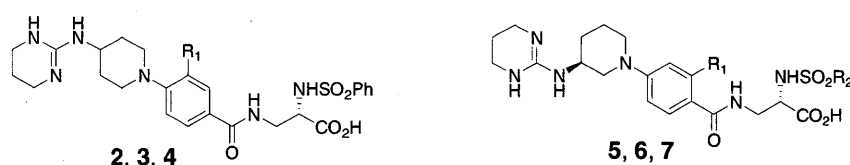
次に、化合物 **2** の更なる活性増強を目指して誘導体合成を実施した。この際、 $\alpha_v\beta_3$ や $\alpha_{IIb}\beta_3$ に対する二次評価として、それぞれヒト平滑筋細胞接着阻害活性と、ヒト血小板凝集抑制活性を測定した。また、物質の水溶性を考察すべく、指標として 10%DMSO 水に対する化合物の溶解性を測定した。化合物 **2** の中央ベンゼン環の 3 位にフッ素原子、またはメトキシ基を導入したところ、活性が増強され溶解性も向上した化合物 **3**、**4** が得られた。

先に得られた化合物 **2** の水溶性は、0.1 mg/mL 以下と低い。そこで、化合物 **2** の誘導化により得られた化合物 **3**、**4** の水溶性を評価した。その結果、化合物 **3**、**4** の水溶性はそれぞれ 0.6、1.3 mg/mL であり、点滴注射剤として許容できる水溶性を有していた。ところで、水溶性は分子の極性に依存すると一般的に言われている。そこで、これら化合物の極性と水溶性の関係を比較したが、一般性に反して水溶性と分子の極性に相関が認められなかった。一方、報告された固体の水溶性予測式には、極性に加えて融点を考慮している例がある。融点は、結晶のパッキングエネルギーと関連すると考察されている。そこで、デュアル拮抗物質 **2**、**3** の融点を測定したところ、水溶性の低い化合物 **2** の融点は、フッ素を導入した化合物 **3** の融点より高い値であった。このことから化合物 **3** は化合物 **2** に比べパッキングエネルギーが低い為水溶性が向上したと考察した。

水溶性の指標として物質の融点を利用できるとの知見が得られたものの、融点を正確に予測する方法は知られておらず、水溶性の予測は依然困難であった。そこで融点に代わる水溶性の指標を探索すべく、化合物 **3** の融点が低い理由を分子構造から考えた。即ち、化合物 **2** の 4-アミノピペリジン-1-イル安息香酸部分是对称構造であるが、化合物 **3** はフッ素原子の導入により非対称性が增大してパッキングエネルギーが低くなったと考えられる。このことから、「化合物を非対称へ誘導化することにより結晶のパッキングエネルギーが低くなり、化合物の融点が低下し水溶性が向上する」との作業仮説を立て、化合物 **2** の 4-アミノピペリジンを非対称な複素環に変換することにより水溶性が向上するか検証した。

化合物 **2** の 4-アミノピペリジンを非対称な含窒素飽和複素環に変換した結果、(3*S*)-アミノピペリジン誘導体 **5** が $\alpha_v\beta_3$ に対して最強の活性を示した。次に得られた化合物 **5** の構造活性相関を解析した。中央ベンゼン環の 2 位にフッ素を導入した化合物 **6** と、ベン

ゼンスルホンアミド部分のベンゼンをチオフエンに変換した化合物 **7** が強い活性と優れた溶解性を有していた。こうして得られた (3*S*) - アミノピペリジン誘導体 **5**、**6**、**7** の水溶性は約 3 mg/mL であり、化合物 **3**、**4** より優れた水溶性を有していた。また、水溶性の優れた化合物 **5** は、化合物 **2** より脂溶性が高く、融点は低かった。よって、作業仮説「化合物を非対称へ誘導化することにより、化合物の融点が低下し水溶性が向上する」を検証することができた。以上の誘導化により、活性と水溶性の優れた $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗物質 **3**、**4**、**5**、**6**、**7** を創出した。



Compound	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)				Water Solubility (mg/mL)
			$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_{IIb}\beta_3$	VSMC ^a	hPRP ^b	
2	H	-	1.3	3.0	190	290	<0.1
3	F	-	0.36	0.21	48	37	0.6
4	OMe	-	0.19	0.44	110	130	1.3
5	H	Ph	0.48	0.56	31	83	3.5
6	F	Ph	0.23	0.78	16	290	2.8
7	H	2-Thienyl	0.25	0.40	52	99	3.3

^a VSMC: ヒト平滑筋細胞接着阻害活性

^b hPRP: ヒト血小板凝集抑制活性

イヌ虚血再灌流モデルで $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗物質 **4** を評価したところ、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 選択的拮抗薬よりも梗塞サイズを有意に縮小し、優れた有効性を示した。よって、仮説「 $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗物質は、抗血栓作用に加えて再灌流障害抑制により梗塞サイズも縮小できる」が動物モデルで検証された。 $\alpha_v\beta_3$ は、骨粗鬆症、癌増殖や転移、リウマチ、再狭窄等の慢性疾患に対する創薬ターゲットとして注目され、経口投与可能な $\alpha_v\beta_3$ 選択的拮抗物質が報告されている。しかし、 $\alpha_v\beta_3$ が白血球等の接着や移動に関与していることに着目し、急性虚血性疾患をターゲットにして水溶性の優れた低分子 $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗物質を目指した例は我々以外に報告が無い。そして我々は、 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗作用により再灌流障害を抑制できる可能性、更に $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗物質が動物モデルで梗塞サイズを著しく縮小することを世界で初めて報告することができた。加えて、創出した $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗物質は、良好なラット動態、安全性を有していた。またこれら化合物は、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 拮抗物質の副作用である出血時間の延長を有効用量では示さなかった。それ故、これらの $\alpha_v\beta_3/\alpha_{IIb}\beta_3$ デュアル拮抗物質は虚血性疾患治療薬として期待され、更なる高次評価に用いられている。