

論文内容の要旨

論文題目 one-pot 鈴木カップリング反応を利用した
血液凝固第七因子阻害剤の合成と構造活性相関に関する研究

氏名 三 浦 理 憲

血栓症の予防及び治療に有効な抗凝固薬であるワーファリンは、現在唯一の経口投与可能な薬剤であるものの、その作用機序のため作用の発現が遅く、出血の副作用、他薬剤との相互作用などから非常に使用しづらい薬剤である。そのため、これらの欠点を克服した薬剤の創製を目指し、現在まで凝固因子を直接阻害する研究が精力的に研究されている。組織因子/血液凝固第七因子複合体（以下 TF/FVIIa と記載）は、病態が引き金となって始動される外因系凝固反応を始動させる役割を担っている。TF/FVIIa 阻害剤は、他の凝固因子阻害剤と比較して、抗凝固作用（主作用）と出血（副作用）の乖離が最も大きい薬剤であることが報告されており、出血の危険性の低い理想的な薬剤と成り得ることから、多くのグループにより注目されている。

1998 年、小野薬品工業のグループより低分子の TF/FVIIa 阻害剤としてアミジン化合物 **1** が報告された。著者は化合物 **1** の強力な活性とビフェニルの 2,2',4-位にカルボニル基が置換する特異な構造に興味を持ち、本研究に着手した。まず、化合物 **1** と TF/FVIIa との相互作用を予測するためドッキングモデル解析を行った結果、Figure に示すように、分子末端部のアミジン部は S1 ポケットの Asp-189 と分子内水素結合していること、分子中央ベンゼン環は S2 ポケット近傍に位置するものの、酵素との明らかな相互作用は認められないこと、分子末端部のイソブチル基は S1' ポケットの疎水性部位と相互作用していること、が推察された。本論文においては、各ポケットの名称に対応して、化合物のベンズアミジン部を P1 部、中央ベンゼン環を P2 部、イソブチル部を P1' 部と定義し、以下に用いる。一般的に、アミジン構造を持つ TF/FVIIa 阻害剤はトロンビン、FXa 及び食物消化酵素トリプシン等のセリンプロテアーゼに対する選択性が低く、また経口吸収性が乏しいことが知られている。実際、化合物 **1** は、強力な TF/FVIIa

阻害活性を示すものの、満足のいく経口吸収性は有しておらず、また同じセリンプロテアーゼである FXa 及びトリプシンに対する選択性も十分なものでは無かった (第一章)。

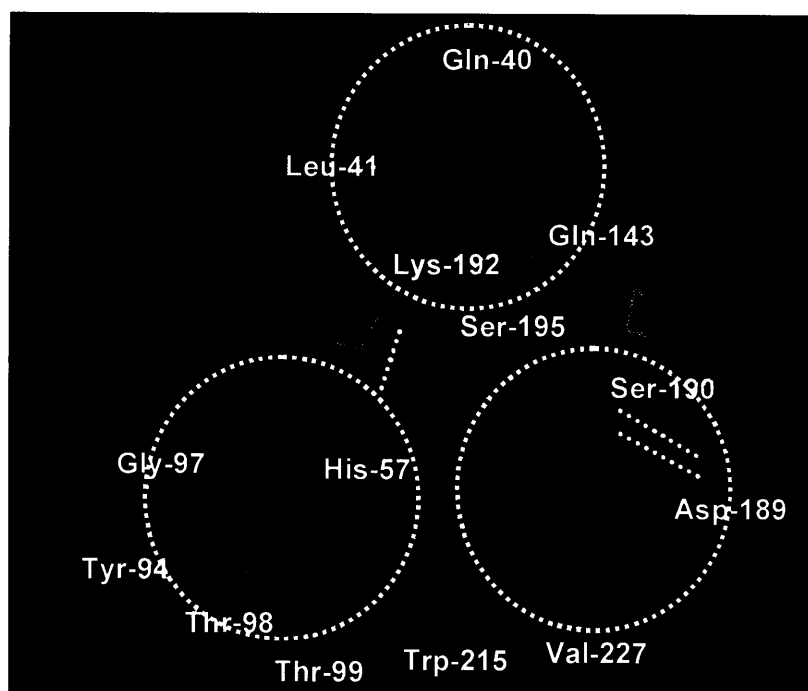


Figure. Docking model of compound **1** in TF/FVIIa. 説明文本分参照。

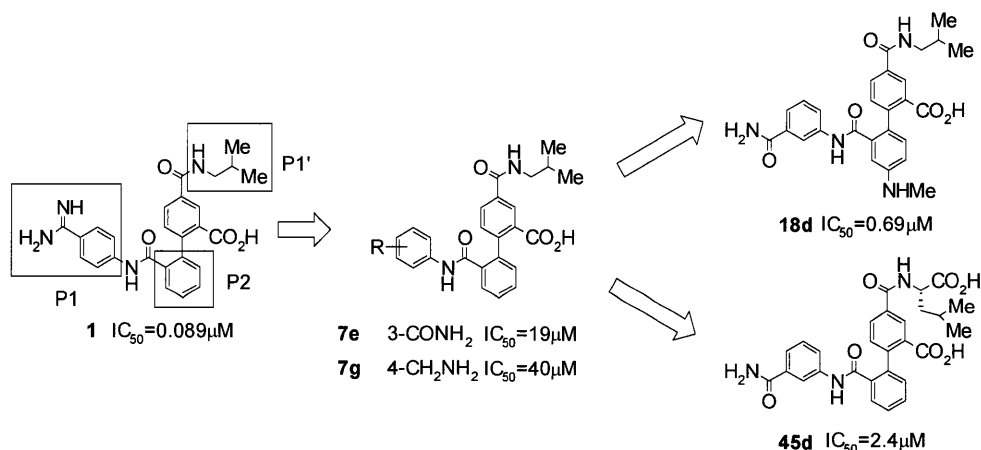
著者は、化合物 **1** の低い経口吸収性と選択性は高極性のアミジン部に起因すると仮定し、まず P1 部の構造変換を試みた。その結果、非アミジン構造を有する化合物 **7e**, **7g** が酵素阻害活性が弱いながらも TF/FVIIa 阻害活性を示すことを見出した。化合物 **7e** の 3-アミノカルボニルフェニル部分は TF/FVIIa の S1 ポケットを占有し、アミノカルボニル酸素原子は Ser-190 と水素結合し、アミノカルボニル窒素原子は水分子を介して Trp-215 及び Val-227 と水素結合していることがドッキングモデル解析により推察された。一方、化合物 **7g** のアミノメチル基は、化合物 **1** のアミジノ基と同様に、Asp-189 と水素結合していることが推察された。

続いて、活性向上を目指し、化合物 **7e** の P2 部及び P1' 部の構造変換をそれぞれ行った。P2 部に関しては、S2 ポケットとの相互作用を期待し種々の置換基を導入した結果、4'位にメチルアミノ基を有する化合物 **18d** が無置換体 **7e** と比較して 28 倍程度活性が向上することを見出した。化合物 **18d** と TF/FVIIa のドッキングモデル解析を行ったところ、P2 部のメチルアミノ窒素原子は結晶構造中に保存された水分子を介して Tyr-94 のフェノール酸素原子及び Thr-98 のカルボニル酸素原子と水素結合し、メチルアミノ基のメチル基は、S2 ポケットの疎水性部分と相互作用していることが推察された。

一方、化合物 **7e** の P1' 部の変換においては、ロイシン構造を有する化合物 **45d** が **7e** と比較して 8 倍程度活性が向上することを見出した。化合物 **45d** と TF/FVIIa のドッキングモデル解析から、ロイシン部のイソブチル基は Gln-40 の炭素鎖近傍に位置し、カルボン酸部のカルボニル基は Gln-143 の窒素原子からプロトンを受容していることが推察された。

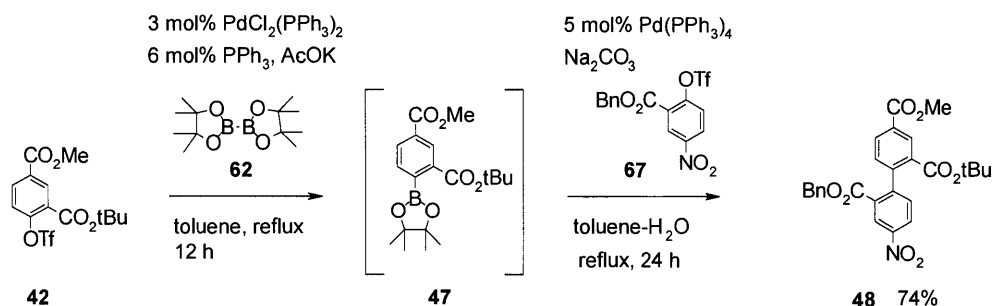
これらのリード化合物 **18d**, **45d** は、アミジン体 **1** よりも他のセリンプロテアーゼに対して高

い選択性を示し、内因系凝固時間延長作用の指標である APTT に大きく影響することなく、外因系凝固時間延長作用の指標である PT に延長作用を有することが示された。化合物 **18d**, **45d** の高い酵素選択性は、FXa に対しては S1 ポケットの、トリプシンに対しては S2 あるいは S1' ポケットの酵素配列の違いが起因していると考えられた。(第二章)。



続いて、これら化合物 **18d**, **45d** の分子 P2 部及び P1' 部において活性発現に有効であった置換基を組み合わせた化合物を効率的に合成するため、中間体 **48** の改良合成法を検討した。2,2'-位に官能基を有する非対称ビアリール構造は、種々の薬理活性を有する化合物や有用な合成中間体に多く認められる構造であるものの、その合成法には、特殊なホスフィンリガンドを必要とする、あるいは導入できる官能基に限られる、等の解決すべき課題が残されていた。一方、宮浦らのグループは、空気、水分、熱に安定な市販品であるビス(ピナコラート)ジボロン (**62**) を用いた鈴木カップリング反応を報告している。本手法は、カップリングさせるトリフラートが種々の官能基を有していても対応するボロン酸エステルを収率良く合成出来、生成物のボロン酸エステルに別のトリフラートを作用させることで非対称ビアリール化合物へと導くことが出来る。さらに、ボロン酸エステルを単離することなく、one-pot で非対称ビアリール体を合成することも出来る。

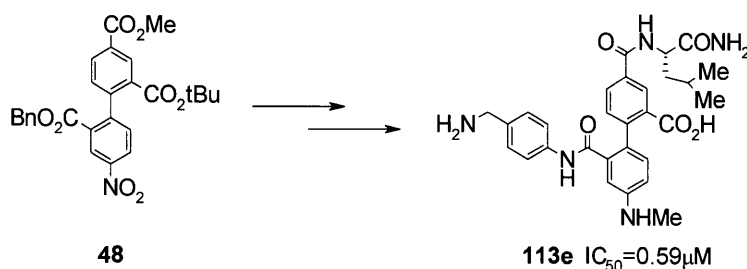
著者は、宮浦らが報告したビス(ピナコラート)ジボロン (**62**) を用いた鈴木カップリング反応を基に塩基及び溶媒を検討したところ、アリールボロン酸エステル **47** とトリフラート **67** の反応において、塩基としては従来法のリン酸カリウムよりも炭酸ナトリウムが、また溶媒については DMF やジオキサンよりもトルエン-水の二層系溶媒が適していることを見出した。さらに宮浦及び Giroux らが報告した one-pot 反応を基に、弱塩基-二層系溶媒を用いて one-pot 反応を試みたところ、目的物 **48** が良好な収率で得られることを見出した。



続いて、本 one-pot 反応の基質一般性を検討した結果、種々のアリールトリフラートをを用いても対応する非対称ビアリール体を収率良く与えることを明らかとした。本手法を用いると既報よりも収率が向上する例も認められた。また、オルト二置換のアリールトリフラートも適用可能であることを明らかとした。次に、本手法の適用範囲を臭化アリールに広げる検討を行ったところ、臭化アリールの反応性の低下に伴ない、対応するビアリール体の収率が低下した。そこで、one-pot 鈴木カップリングの二段階目の反応に相関移動触媒を添加し、種々のアリールハライドに対してカップリング反応を行ったところ、何れも中程度の収率で対応するビアリール体を与えることを見出した。特に、本反応においては、電子吸引基や立体的に嵩高い置換基、あるいは複素環を有する臭化アリールにおいて、既報と比較して対応するビアリール体を収率良く与えることを明らかとした（第三章）。

前記の改良合成法を用いて合成した中間体 **48** を利用し、分子 P1 部、P2 部及び P1' 部の変換を行った結果、強力な活性を示し、且つ酵素選択性の高い TF/FVIIa 阻害剤 **113b**, **113c**, **113e** を見出した。本化合物群は他のセリンプロテアーゼに対して 300 倍以上の良好な選択性を示し、*in vitro* 抗凝固活性において PT のみに強い延長作用を有することが明らかとなった。続いて、これら化合物のマウスにおける薬物動態試験を行ったところ、化合物 **113e** にアミジン体 **1** を大きく上回る良好な血漿中化合物濃度が認められた。

次に、化合物 **113e** の抗凝固作用（主作用）と出血（副作用）の乖離を調べることを目的として、カニクイザルを用いて *ex vivo* 抗凝固活性及び出血時間延長作用を測定した。その結果、化合物 **113e** は、*ex vivo* 抗凝固活性においても、*in vitro* と同様に APTT に大きく影響することなく、PT に強い延長作用を示すことが判明した。さらに、化合物 **113e** は、PT を 3.7 倍延長する最高用量においても出血時間を全く延長しない安全な薬剤であることを明らかとした（第四章）。



以上、酵素選択性及び経口吸収性に優れた血液凝固第七因子阻害剤の探索研究を行い、one-pot 鈴木カップリング反応を利用して、化合物 **1** の P1 部、P2 部及び P1' 部を変換し、当初目的としたプロフィールを有する化合物 **113e** を見出した。