

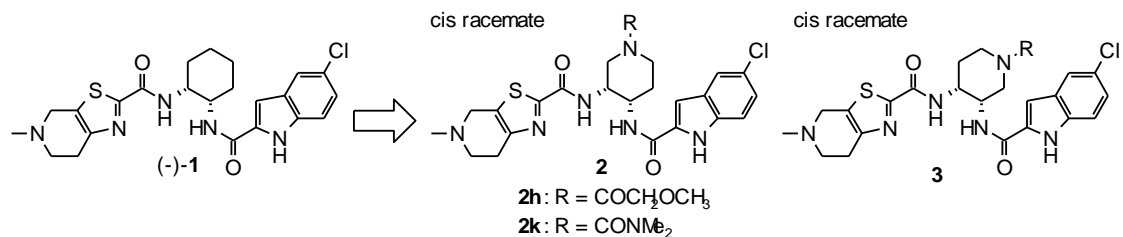
## 論文の内容の要旨

論文題目 活性化血液凝固第十因子阻害剤の合成研究

氏名 望月明慶

血栓症は、致命的結果をも招く重要な疾患である。血栓は、形成部位により動脈血栓と静脈血栓に分かれ、一般に静脈血栓には抗凝固薬が処方される。唯一の経口抗凝固薬であったワルファリンは、様々な問題点を有する事から、安全で使いやすい経口抗凝固薬の登場が待たれてきた。抗凝固薬の創薬標的は、血液凝固カスケード内に複数存在するが、著者らは外因系と内因系の合流点に位置する活性化血液凝固第十因子 (Factor Xa、以下 FXa と省略) に着目し、研究を継続してきた。FXa 阻害剤は、凝固系を効率的に阻害する事ができ、血小板の活性化に直接影響しない事から、出血リスクの低い抗凝固薬に成り得ると考えられる。

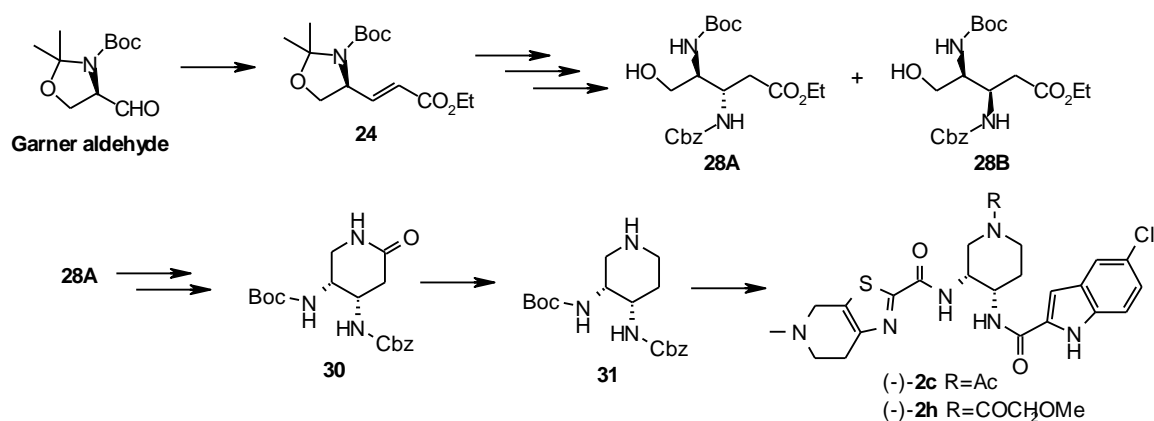
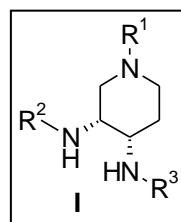
以前、著者らは中央にピペラジンを有する非アミジノ型化合物について誘導体合成を実施しており、SAR の把握や、サイト 1 (S1) 及びサイト 4 (S4) の有望リガンドを獲得したが、抗凝固活性 (プロトロンビンタイム 2 倍延長濃度 (PTCT2)) と経口活性の両立が困難であった。その後、当社の永田らにより、スパーサーの検討がなされ、*cis*-シクロヘキサンジアミド (-)-**1** が見出された。しかし、(-)-**1** は、中性での水への溶解性 (日局二液 (JP2) pH6.8)、活性等が不十分であった事から、著者は二種のピペリジン誘導体 **2**、**3** を考案し、最初にラセミ体での検討を計画した。



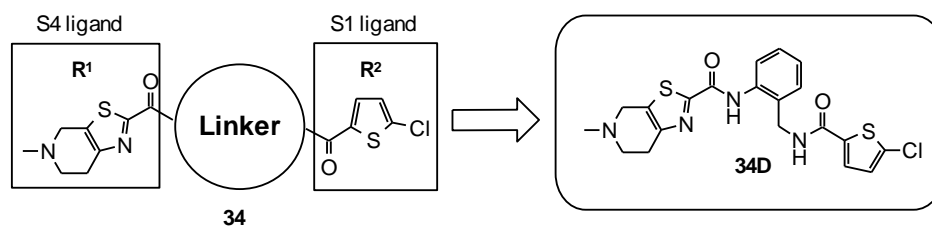
ピペリジン **2**、**3** の誘導体を評価した結果、**2** で大幅に活性、溶解度が向上した誘導体が

複数得られた。一方、**3**では、概して溶解度は改善したが、活性は向上しなかった。ピペリジン**2**について、ピペリジン窒素の置換基の変換を行ったところ、カルバメート、アミド、ウレアとなる置換基で、酵素阻害活性(IC<sub>50</sub>)が大幅に向上した。特にアミド、ウレア体はラセミ体にもかかわらず、開発化合物並みの強さの抗凝固活性を示し、ピペリジン窒素の sp<sup>2</sup> 化に伴う構造の固定化が、高活性に繋がったと考えられた。高活性のアミド及びウレア体に関し、ラット経口投与試験並びにヒト肝ミクロソーム中での代謝安定性を評価した。アミド体で肝ミクロソーム中での半減期が(-)-**1**よりも延長し、ラット試験で**2h**が良好な血中抗 FXa 活性を示した。一方、ウレア体の代謝安定性は、改善しなかったが、**2k**がラット試験で強力な血中抗 FXa 活性を示した。

ピペリジン**2**の高活性体の立体化学は、(-)-**1**と同じであると予想し、最適化研究への活用を考え、保護ピペラジンジアミン中間体**I**を経由する逆合成経路を考えた。Boc-D-セリン由来の Garner アルデヒドを Wittig 反応で α,β 不飽和エステルとし、ベンジルアミンのマイケル付加、保護基の変換後、2種の異性体アルコール**28A**、**28B**をシリカゲルカラムで分離した。分離した**28A**の水酸基をアジド経由でアミンに変換し、分子内環化によりラクタム体**30**を得た。**30**のアミドを還元し、光学活性体での探索に活用できる重要中間体**31**を合成した。**31**より更にピペリジン窒素のアシル化、脱保護とリガンドの導入を繰り返し(-)-**2c**と(-)-**2h**を合成した。両化合物の活性は、ラセミ体の約2倍の強さであり、(3*R*,4*S*)-体が高活性体である事を確認した。



その後著者らは、S1 リガンドのクロロインドール部分の変換を行い、体内動態が向上したシュウ酸ジアミド誘導体を見出し、最終的にエドキサバンを開発化合物に選抜した。著者は、FXa 阻害剤をより確実に上市させるためには、骨格の異なる有望化合物の獲得が必要と考え、短期間での新規リード化合物探索に取り組んだ。これまでの知見、報告から、高活性なリード化合物を獲得するには、有望な S1 と S4 の両リガンドを適切な長さ、角度で L 字型、もしくは V 字型に固定する事が重要であると考えた。塩基性による溶解性確保を考慮して S4 リガンドには、独自のチアゾロピリジンを、S1 リガンドには他社の知見よりクロロチオフェンを選び、両リガンドを 3 炭素程度で結ぶジアミンリンカーをデザインした。

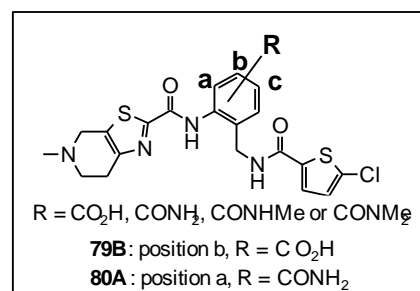


本誘導体の合成展開では、活性の強い化合物は少なく、ベンジルアミン誘導体 **34D** のみが開発品並みの強力な酵素阻害活性、抗凝固活性を示した。**34D** は、ラット及びサル経口投与試験で良好な血中抗 FXa 活性を示し、サルでの血中暴露量も比較的高かった。一方、中性領域での溶解性、ヒト肝ミクロソーム中での代謝安定性の改善が課題であった。

FXa との X 線複合体解析の結果、S4 リガンドは、Phe174, Trp215, Tyr99 との疎水性相互作用、Gly218NH とアミド酸素との水素結合、アミド炭素と Gly216 カルボニル酸素との静電的相互作用が観察された。S1 リガンドは、Ala190, Val213, Tyr228, Gly226 の側鎖で形成されている窪み (cavity) とクロル基との疎水性相互作用、Gly218 カルボニル酸素とアミド NH との水素結合、Ser195 の側鎖水酸基及び Ser214 のカルボニル酸素とリガンドアミド酸素との水を介した水素結合を観察した。

これまでの知見を参考に、**34D** の各部分の骨格を変換した。S1 リガンドのチオフェンを他の芳香環や、リバースアミドと芳香環の変換を同時に実施したが、活性は大幅に低下した。中央スペーサーに関しては、溶解性改善を狙ってシクロヘキサン環、ピリジン環へ変換したが、活性を維持することはできなかった。S4 リガンドについては、他の有望なリガンドやそのリバースアミド体へ変換したところ、モルホリノンフェニル体で高い活性を示したが、リード化合物を超えられず、骨格の変換は困難であった。

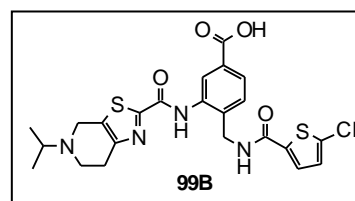
溶解度、代謝安定性改善に向けて、ベンゼン環へ極性基の導入を実施した。X 線構造解析の結果から、カルボキシ基を酵素外側の a、b、c 三箇所に、カルバモイル基を、a、b の二箇所に導入した。活性は、カルボキシ基は b、カルバモイル基は a の位置で高活性であった。物性面は、カルボキシ基は a、b、カルバモイル基は a の位置で溶解性、代謝安定性が向上した。そこで、



で、**b**-カルボン酸体 **79B** と **a**-カルバモイル体 **80A** についてサル経口投与試験を実施した。両化合物ともリード化合物よりも低い AUC、血中抗 FXa 活性であったが、カルボン酸体 **79B** は持続的に活性を示し、24 時間後も血中濃度が確認された。この持続性は、一日一回投与を目指すのに有利であると考え、構造の最適化を進めた。

極性基であるカルボキシ基導入により膜透過性の低下が懸念されたため、S4 リガンドのテトラヒドロチアゾロピリジンの塩基性部分へ脂溶性の付加を実施した。N-メチル部分のエーテル化やアルキル基の延長を実施したところ、N-イソプロピル体 **99B** のみ活性が増強し、置換基の大きさが活性に大きく影響する事を明らかにした。更に、イソプロピル基と

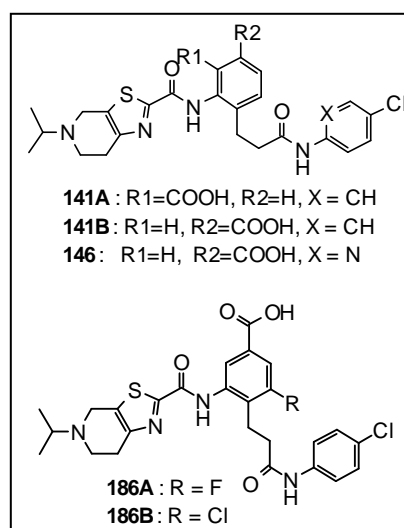
同程度の大きさで、塩基性の異なる置換基へ変換した。フッ素の導入により、活性、特に抗凝固活性は低下傾向にあり、中性の *N*-アセチル、*N*-メタンスルホニルで、活性が大きく低下した事から、塩基性が活性、特に抗凝固活性に大きく影響する事が明らかとなった。そして、高い代謝安定性を示す



**99B** は、サル経口投与試験で、開発化合物に匹敵する高い血中抗 FXa 活性、高い血中暴露を示した。

**S1** リガンドのチオフェン環は、時間依存性 CYP 阻害、求電子性反応性代謝物の生成など代謝、安全性面で懸念のある構造である。チオフェン環の他の芳香環への変換や、リバーアミドとの組み合わせではチオフェン環を回避できなかったが、X 線結晶解析結果を精査した結果、リバーアミドとアルキル鎖の延長を同時に実施すれば、**Gly218** カルボニル酸素との水素結合、クロル基と脂溶性窪みとの相互作用が保持され、チオフェン環の変換が可能と考え、合成した。**S1** リガンド変換体は、強力な *in vitro* 活性と高い代謝安定性を保持し、チオフェン体と同様に、**S4** リガンド末端が *N*-イソプロピル体である **141A**, **141B** が *N*-メチル体よりも抗凝固活性が強かった。また、**S1** リガンド末端の塩素原子をフッ素、臭素原子に変換したが、活性は低下した。

高活性の **141B** と FXa との X 線結晶構造解析の結果、**S1** リガンド側炭素鎖延長によってリンカーであるベンゼン環の酵素外側方向への移動を確認した。この移動により、ベンゼン環脇にアミノ酸脂溶性側鎖で形成されている **S1 β** (Ester binding site) との新たな相互作用の付与が狙えると考え、アルキル基のオルト位ベンゼン環へハロゲン、アルコキシ基等の導入を実施した。**S1 β** との相互作用を狙った化合物は、全般に 1nM 以下の非常に強い酵素阻害活性と高い代謝安定性を示したが、抗凝固活性の向上は限定的であり、LogD (脂溶性) 増大による蛋白結合の増加の影響が予想された。



**S1** リガンドを変換した化合物、及び **S1 β** との相互作用付与により強い活性を示した化合物に関し、サル経口活性、PK を調べた。その結果、**S4** リガンドのメタ位ベンゼン環にカルボン酸を有する **141B**, **146**, **186A**, **186B** で強力、かつ持続的な血中抗 FXa 活性を示し、更に **141B**, **146**, **186B** は高い AUC と比較的高い 24 時間後の血中濃度 ( $C_{24h}$ ) を示した。特に **141B** と **186B** は、 $C_{max}$  と  $C_{24h}$  の差が小さく、なだらかな血中濃度推移であった。血中濃度変動が小さい事は、抗凝固薬にとって確実な薬効、副作用である出血のリスクの軽減が期待され、理想的な薬物動態であると考えられた。