OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 選択的Aggrecanase 阻害剤の研究 |
| Author(s) | 塩﨑, 真 |
| Citation | 大阪大学, 2012, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/22993 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【24】

| | |
|---|---|
| 氏名 | 塩崎 真（しおざき まこと） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 第 24995 号 |
| 学位授与年月日 | 平成24年2月1日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文名 | 選択的 Aggrecanase 阻害剤の研究 |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授 藤岡 弘道<br>（副査）<br>教授 田中 徹明　教授 小林 資正　教授 小比賀 聡 |



## 論文内容の要旨

Aggrecanaseは、新しい変形性関節炎治療薬のターゲットとして注目され、2001年、DuPont社によって世界初となる阻害剤が発表されて以来、ヒドロキサム酸型化合物を中心に、その阻害剤研究が活発に行われてきた。ヒドロキサム酸を有する化合物は、亜鉛への強力な結合能ゆえ、aggrecanaseを始め、Znメタロプロテアーゼに対し優れた阻害活性が期待できる一方、経口吸収性が低く、また臨床試験においてしばしば毒性が認められたため、過去幾度となく開発中止を余儀なくされてきた。そこで我々は、こうした問題を回避した、非ヒドロキサム酸型aggrecanase阻害剤の創出を目指して研究をスタートした。当初、社内ケミカルライブラリーを用いて、数十万という化合物のランダムスクリーニングを行ったが、活性を示す化合物は得られなかった。そこで、基質アグリカンを模倣したリード創出に戦略を切り替え、アミノ酸を鋳型に、さまざまなアシル化剤、スルホニル化剤、アルキル化剤を用いて合成を行った結果、$IC_{50}$=0.084 μMの阻害活性を示す化合物**5a**を見出すに至った。**5a**は、Mw=400台前半と比較的小さな分子でありながら、$10^{-5}$オーダーという良好なaggrecanase阻害活性を示し、リード選定のものさしと考えられる膜透過性、溶解性、代謝安定性といった物性指標も極めて良好な化合物であった。また、**5a**とその鏡像体 *ent*-**5a**に活性差が認められ、こうしたわずかな構造の違いが活性向上につながることが示唆されたため、本化合物をリードとして、合成展開を開始した。

**5a**に対し、まず始めに各パートの変換を網羅的に実施したところ、スルホンアミド部、シクロプロパン環部の変換が活性向上に効果的であることがわかった。そこで、両パートについてより詳細な変換を実施したところ、aggrecanase阻害活性が大幅に向上し、中でも**5q**が、$IC_{50}$= 0.0029 μMと、これまでで最強の阻害活性を示した。ところが、**5q**及びそのアナログはaggrecanase特異性が低く、潜在的な毒性が危惧されたことから、続いてaggrecanase選択性改善を目標に合成展開を実施した。修飾場所は、活性に影響するスルホンアミド部、シクロプロパン環上に焦点をしぼり、特にスルホンアミド部に関しては、合成上の有利さに鑑み、スルファミドをスルホンアミドの代替構造に用いることで、より精密な構造変換を実施した。複素環環サイズの変換、ヘテロ原子位置の変換、更にはシクロプロパン環上置換基導入を実施した結果、最終的に活性、選択性、経口吸収性のバランスがとれた開発候補**7b**を見出すことに成功した。

本研究において、**7b**に代表される選択的aggrecanase阻害剤を発見する上で、これまで報告例のない複雑な骨格からなる化合物の合成が不可欠であった。まず、母核であるアミノ酸部分については、1）置換スチレンとマロン酸といった安価な原料から導かれるフェニルシクロプロパンジエステル誘導体を原料として用い、2）立体障害の少ないエステルを選択的に加水分解した後、Curtius転位、加水分解を経て、アミノ酸骨格へと誘導し、3）リジッドな構造的な特徴を活かし、光学分割によって望みの鏡像体を得る、といった一連の戦略に基づいて検討を行い、(1*S*,2*R*,3*R*)-1-amino-2,3-dimethyl-2-phenylcyclopropanecarboxylic acidを始め、さまざまな多置換シクロプロパンアミノ酸を光学活性体として得る実用的な合成法開発に成功した。

また、aggrecanase選択性改善に重要な三環性複素環については、芳香環部をあらかじめ合成し、環状アミン部を後から構築するという戦略に基づいて合成法の検討を実施した。すなわち、pyrazolo[1,5-*a*]pyridine型化合物に関しては、アミノピリジニウムメシチレンスルホネートを出発物質に用いて芳香環部を合成後、Henry反応、還元を経て環状アミン構築に必要な全ての炭素ユニットを揃え、保護、脱保護、アルコールの変換、環化、脱保護を行うことで**61**が有する三環性アミン**51**へと誘導した。Imidazo[1,2-*a*]pyridine型環状アミンについては、2-chloro-3-oxosuccinic acid diethyl esterと2-amino-4-chloropyridineを出発物質に用いて芳香環部を合成後、キレーションコントロールを利用した選択的な還元、アルコール保護、還元を経由することで環状アミン構築に必要な窒素原子の導入を達成し、保護、脱保護、アルコールの変換、環化、脱保護を経て、**6a**を構成する環状アミン**58**へと導いた。又、開発候補**7b**が有する三環性アミン**69**についても、環状アミン**58**合成の際経由した化合物と同様の中間体を調製後、酸化、増炭反応、水素添加、Curtius転位を経て、環状アミン合成に必要な全てのユニットを導入し、脱保護、アルコールの変換、環化、脱保護を行うことで、その合成に至った。

このようにして合成に成功した光学活性シクロプロパンアミノ酸と三環性複素環から、最終目的物であるスルファミド型化合物へと誘導するに際し、さまざまなスルホニル化剤を用いて両者の直接的なカップリングを試みたが、複雑な混合物を与えるのみで目的物を得ることはできなかった。そこで、段階的な操作に切り替え、シクロプロパンアミノ酸から調整される活性中間体を経由し、三環性アミンをカップリングさせた後、エステルの脱保護を行うことで、目的物を良好な収率で得ることに成功した。

一方、aggrecanase阻害剤開発候補**7b**を構成する三環性アミン**69**は、その合成に14工程を要し、総収率も0.5% と探索合成法によるサンプルの大量供給は、事実上不可能な状況にあった。そこで芳香環調製の際、環状アミン構築に必要となる全ての炭素ユニットをあらかじめ導入し、これら官能基の反応性の差を利用しながら、短工程でピペリジン環部を構築するという新たな戦略のもと、工程数の削減と収率の向上を目指して本化合物の工程改良を行った。出発物質である2-amino-4-fluoropyridineに、3-bromo-2-oxopentanedioic acid dimethyl esterを縮合させた後、DAIBAL-Hを用いてimidazo[1,2-*a*]pyridine環上に残った二つのエステルを一気に還元し、生成物であるジオールに過剰量のDPPA、DBUを作用させた。結果、期待した通り反応性の高いアリルアルコールがリン酸エステルを経てアジド基にまで変換され、反応性の低いアルコールはリン酸エステルの状態で留まった環状アミン合成に理想的な中間が一段階で得られることがわかった。この中間体に対しトリフェニルホスフィン作用させた結果、アジド基の還元と共に速やかなピペリジン環閉環反応が進行し、目的物である**69**が原料からわずか四工程で得られることがわかった。こうして三環性アミン**69**についても大量供給が可能となり、開発候補**7b**の実用的合成法を完成させることができた。

## 論文審査の結果の要旨

変形性関節炎（OA）は、関節の痛みを症状とした進行性の骨関節疾患の一つであり、国内で700 万人、欧米日を合わせて 3000 万人以上の患者がいるといわれている。これまでの治療法はいずれも対症療法であり、病態の進行を抑制する薬剤がないのが現状である。Aggrecanase は、1999年に単離同定された亜鉛メタロプロテアーゼの一種であるが、その阻害剤がOA 治療のターゲットとして有望視されている。Aggrecanase 阻害化合物としては、Dupont 社によって見出されたヒドロキサム酸が優れた活性を示すことが報告されているが、亜鉛への強力な結合能から高い阻害活性が期待できる一方、その多くが、毒性等の理由により開発中止においこまれている。そこで現在では、非ヒドロキサム酸型化合物の発表が相次いでいる。

このような背景下、塩崎氏は基質アナログ型化合物でのリード創出戦略に基づき、アミノ酸をテンプレートとして用い、よりバリエーションに富んだ化合物を作るという観点から、さまざまなアシル化剤、スルホニル化剤、アルキル化剤を用いて化合物合成を行った結果、$IC_{50}$ = 0.084 μM という aggrecanase-2 阻害活性を示すスルホンアミド部、シクロプロパン環を持つフェニルシクロプロパンアミノ酸誘導体を見出すことに成功した。さらに周辺化合物を合成した結果、スルホンアミド部、シクロプロパン環上の修飾により、aggrecanase-2 阻害活性が大幅に改善した化合物を見出した。この化合物は MMP-14 を始め同属亜鉛メタロプロテアーゼへの選択性の欠如が判明し、開発中止を余儀な

くされたが、さらに選択性向上を目的とした展開を行い、同属亜鉛メタロプロテアーゼに対しほぼ完璧な選択性を示すとともに、毒性指標であるCYP、hERG 活性、更には経口吸収性というハードルを全てクリアした三環性複素環、光学活性五置換シクロプロパンアミノ酸を持つ開発候補化合物を見出した。またこれらの化合物の合成には、過去報告例のない複雑な骨格の導入、又これに伴った新しいケミストリーの構築が不可欠とされたが、まず官能性多置換シクロプロパンについては、光学活性体として供給できる汎用性の高い合成法を構築することに成功した。さらにaggrecanase-2 選択性発現に不可欠な三環性複素環については、エステル又はアルコールを環上に有するpyrazolo[1,5-*a*]pyridine又は imidazo[1,2-*a*] pyridine を合成し、これらの置換基を足がかりにして環状アミン部を構築することで、開発候補化合物等が有する新規複素環合成を達成することができた。またこれら両新規骨格から最終物への変換は、アミノ酸パートと複素環部をカップリングさせ、脱保護を行うことにより達成し、開発候補化合物を数十グラムオーダーの化合物供給が可能な実用的な合成法を見出すことに成功した。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。