

学位論文題名

5-メチル-4, 5, 6, 7-テトラヒドロチアゾロ

[5, 4-c] ピリジンをS4結合部分として有する活性化凝固

第X因子阻害剤の創製とその結合様式に関する研究

学位論文内容の要旨

[序論]

現在臨床で用いられている唯一の経口抗凝固薬、ワーファリンは、複数の凝固因子の生成を同時に阻害する薬剤であるため、出血の副作用が激しい等の重大な欠点を有している。一方、選択的またはほぼ選択的に凝固因子の機能を阻害する薬剤、すなわちアルガトロバン、ヘパリンおよびペンタサッカライドは経口投与で全くその薬効を発揮しないため、適応疾患の幅が非常に狭い欠点を有している。活性化凝固第X因子（以下ファクターXaと略す）は、血液凝固カスケードにおける内因系と外因系の合流地点に位置する活性化凝固因子である。この因子は2つの系に関与した凝固因子の中で最も上流に位置するため、この因子の機能を阻害することで、最も効率的に凝固カスケードの進行を遮断、さらには血栓の形成を抑制することができる。ファクターXaを選択的に阻害し、かつ経口投与でその効果を発揮する薬剤を創製できれば、現在臨床で用いられている抗凝固薬の現状から考えて、その医療満足度は非常に高くなると考えられている。セリンプロテアーゼであるファクターXaには、S1とS4と呼ばれる2つのサブサイトが明確なポケットとして存在している。第一製薬が開発中のファクターXa阻害剤、DX-9065aについても、そのアミジノナフタレン環はS1結合部分として、ピロリジン環はS4結合部分として機能することが複合体X線結晶構造解析により判明している。しかしながら、DX-9065aを代表とするアミジノ型化合物のバイオアベイラビリティは、アミジノ基の強塩基性（ $pK_a=11-12$ ）が原因で、種々の動物においていずれもほぼ10%以下を示し経口吸収性に乏しいことが判明している。著者は、アストラゼネカ社の非アミジノ型ファクターXa阻害剤クロロナフタレン環が、アミジノ基にかわる新規なS1結合部分として機能するという提唱に着目し、クロロナフタレンスルホニルピペラジン構造に新規なS4結合部分を導入した阻害剤の設計をおこなうことにした。

[第1章：S4結合部分として脂肪族アミンを有するヘテロ縮合環を導入した化合物の設計、合成およびその生物活性]

ヒトファクターXaに関するX線結晶構造解析を用いて、新規なS4結合部分として脂肪族アミンを有するヘテロ縮合環を導入した化合物群を設計、合成した。化合物群の*in vitro* ヒトファクターXa阻害活性を測定し、4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]-1-[(5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ[5,4-c]ピリジン-2-イル)カルボニル]ピペラジン (3) が強いファクターXa阻害作用（ $IC_{50} = 22 \text{ nM}$ ）を有することを見出した。この知見より5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[5,4-c]ピリジン骨格が、S4結合部分として有用であることが判明した。

[第2章：テトラヒドロチアゾロピリジン誘導体の活性向上のための設計と合成およびその生物活性]

強い*in vitro* ファクターXa阻害活性を示す5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[5,4-c]ピリジン体3をリード化合物として、ピペラジン環上にカルバモイル基および*N*-メチルカルバモイル基をそれぞれ導入した2-カルバモイル-4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]-1-[(5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ[5,4-c]ピリジン-2-イル)カルボニル]ピペラジン (4) お

よび 4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]-2-[(*N*-メチル)カルバモイル]-1-[(5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ[5,4-*c*]ピリジン-2-イル)カルボニル]ピペラジン (5) がラット経口投与で良好に吸収され強い *ex vivo* 血漿中ヒトファクターXa 阻害活性と明確な抗凝固活性 (プロトロンビン時間延長作用) を示すことを見出した。特に化合物 5 は、ラット経口投与で **DX-9065a** よりも強いプロトロンビン時間延長作用を示した。また、化合物 3 のテトラヒドロチアゾロピリジン環上の 5-メチル基を 5,5-ジメチル基に変換した 4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]-1-[(5,5-ジメチル-4,5,6,7-テトラヒドロ[5,4-*c*]ピリジン-2-イル)カルボニル]ピペラジン (6) が、化合物 3 を凌駕する非常に強い *in vitro* ファクターXa 阻害活性と *in vitro* 抗凝固活性 (プロトロンビン時間 2 倍延長作用)、さらには高いファクターXa 選択性を示すことを見出した。

[第3章：テトラヒドロチアゾロピリジンの改良合成法の開発]

5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ [5,4-*c*]ピリジン-2-カルボン酸リチウム塩 (7) の 2 つの実用的な改良合成法を開発した。特に容易にかつ安価な原料から合成できる *N*-Boc-4-ピペリドンを出発物質とした合成法については、実際に大量合成が非常に容易であることが証明された。

[第4章：テトラヒドロチアゾロピリジン誘導体の Gla ドメイン欠損ヒトファクターXa に対する結合様式と配座制御の解析]

化合物 4 の Gla ドメイン欠損ヒトファクターXa に対する結合様式を複合体 X 線結晶構造解析により解明し、S1 サブサイトに 6-クロロナフタレンが、S4 サブサイトに 5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ [5,4-*c*]ピリジンが収まることを証明し、ファクターXa に対する新規な結合様式を明らかにした。さらに化合物 4 の 2-カルバモイルチアゾール部位に分子内 S-O 相互作用が存在することを見出した。*ab initio* 分子軌道計算を用いたモデル化合物の配座解析をおこない、2-カルバモイルチアゾール部位に配座制御の性質があることを提唱した。さらに S4 結合部分としてヘテロ縮合環を有する誘導体のファクターXa 阻害活性に関して、結合様式と配座制御の性質に基づく詳細な構造活性相関を解明できた。

[第5章：2-カルバモイルチアゾールとピリジン *N*-オキシドを利用した S4 結合部分の設計と誘導体の生物評価]

化合物 4 と Aventis 社の臨床開発化合物 **FXV673** の複合体 X 線結晶構造解析結果に基づき、チアゾール-5-イルピリジン *N*-オキシド誘導体を設計し、4-[2-[[4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]ピペラジン-1-イル)カルボニル]チアゾール-5-イル]ピリジン-1-オキシド (8) および 4-[2-[[4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]ピペラジン-1-イル)カルボニル]チアゾール-5-イル]-2-メチルピリジン-1-オキシド (9) が、それぞれ非常に強い *in vitro* ファクターXa 阻害活性 (8: IC₅₀ = 8.6 nM, 9: IC₅₀ = 13 nM) を有することを見出した。また、*in vitro* 阻害活性の評価結果からカチオン性を帯びたピリジン環が S4 サブサイトに対し何らかの親和性を示している可能性が示唆された。さらに化合物 8 の結合様式についてモデリングによる検証をおこなった結果、化合物 8 の *N*-オキシドアニオンが、**FXV673** と同様水分子を介してカチオンホールを構成するアミノ酸 Ile 175 残基の主鎖のカルボニル酸素原子と水素結合を形成できる可能性が示唆された。

[結語]

1. S4 結合部分として 5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[5,4-*c*]ピリジンを有する化合物群を設計し、これらが *in vitro* で強いファクターXa 阻害活性と抗凝固活性を示すことを見出した。
2. ラットへの経口投与で **DX-9065a** よりも強い抗凝固活性を示す化合物 5 を獲得した。
3. 5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[5,4-*c*]ピリジンカルボン酸リチウム塩 (7) の実用的な大量合成法を開発した。
4. 化合物 4 とファクターXa の複合体 X 線解析に成功し、その詳細な結合様式を明らかにするとともに、分子内 S-O 相互作用の存在を確認した。2-カルバモイルチアゾールの配座が制御される性質を分子軌道計算により解析し、その配座安定性がテトラヒドロチアゾロピリジンと S4 サブサイトの間の親和性に影響を及ぼす可能性を推測した。
5. 配座制御の性質を利用して、ピリジン *N*-オキシドを 2-カルバモイルチアゾールユニットに導入した化合物を設計し、4-(チアゾール-5-イル)ピリジン-1-オキシド骨格が S4 結合部分として 5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[5,4-*c*]ピリジン骨格よりも優れていることを見出した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松田	彰
副査	教授	小林	淳一
副査	助教授	森田	博史
副査	助教授	周東	智

学位論文題名

5-メチル-4、5、6、7-テトラヒドロチアゾロ

[5、4-c] ピリジンをS4結合部分として有する活性化凝固

第X因子阻害剤の創製とその結合様式に関する研究

現在、臨床で用いられている唯一の経口抗凝固薬であるワーファリンは、複数の凝固因子の生成を同時に阻害するために、出血等の副作用を有している。一方、ほぼ選択的に凝固因子の機能を阻害するアルガトロバンやヘパリンなどは経口投与で全く効果を示さず適応疾患の幅が狭い。活性化凝固第X因子 (fXa) は、血液凝固カスケードの内因系と外因系の合流地点に位置する。この因子は2つの系に関与する凝固因子の中で最上流に位置するため、この機能を阻害することで、最も効率的に血栓形成を抑制できると考えられている。本研究では、経口投与でヒトfXaを阻害できる薬剤創製を目的に、以下に述べる分子設計を行った。セリンプロテアーゼであるfXaには、S1とS4の2つのサブサイトが存在する。既存のfXa阻害剤、DX-9065aのアミジノナフタレン環はS1部位に、ピロリジン環はS4部位に結合することが複合体X線結晶構造解析により判明している。しかし、DX-9065aなどのアミジノ型化合物は、アミジノ基の強塩基性が原因で経口吸収性が乏しい。申請者は、別の既存の非アミジノ型fXa阻害剤のクロロナフタレン環が、これにかわる新規なS1結合部分として機能するという提唱に着目し、クロロナフタレンスルホニルピペラジン構造に新規なS4結合部分を導入した阻害剤の設計を行った。

(1) S4結合部分として脂肪族アミン結合ヘテロ縮合環を持つ化合物の設計・合成・生物活性

ヒトfXaのX線結晶構造解析像を用いて、新規なS4結合部分として脂肪族アミン結合ヘテロ縮合環を持つ化合物群を設計・合成した。4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]-1-[(5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ[5,4-c]ピリジン-2-イル)カルボニル]ピペラジン (3) が強いfXa阻害作用 ($IC_{50} = 22 \text{ nM}$) を有することを見出した。この知見から5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[5,4-c]ピリジン骨格が、S4結合部分として有用であることが判明した。

(2) 活性向上のためのテトラヒドロチアゾロピリジン誘導体の設計・合成

化合物 3 をリード化合物として、ピペラジン環上にカルバモイル基または *N*-メチルカルバモイル基を導入した化合物 4 および 5 を合成した。これらはラット経口投与で良好に吸収され、強い *ex vivo* 血漿中ヒト fXa 阻害活性と明確な抗凝固活性を示した。また、化合物 3 のテトラヒドロチアゾロピリジン環上の 5-メチル基を 5,5-ジメチル基に変換した 4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]-1-[(5,5-ジメチル-4,5,6,7-テトラヒドロ[5,4-*c*]ピリジン-2-イル)カルボニル]ピペラジン (6) が、化合物 3 を凌駕する *in vitro* ヒト fXa 阻害活性と *in vitro* 抗凝固活性、さらには高い fXa 選択性を示した。

(3) テトラヒドロチアゾロピリジン誘導体のヒト fXa に対する結合様式と配座制御解析

化合物 4 の複合体 X 線結晶構造解析から、S1 結合部分に 6-クロロナフタレンが、S4 結合部分に 5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ [5,4-*c*]ピリジンが結合することを明らかにした。さらに化合物 4 の 2-カルバモイルチアゾール部位に分子内 S-O 相互作用が存在することを発見した。*ab initio* 分子軌道計算による配座解析をおこなひ、2-カルバモイルチアゾール部位に配座制御の性質があることを明らかにした。

(4) 2-カルバモイルチアゾールとピリジン *N*-オキシドを利用した S4 結合部分の設計と誘導体の生物評価

化合物 4 と FXV673 の複合体 X 線結晶構造解析結果に基づき、チアゾール-5-イルピリジン *N*-オキシド誘導体を設計し、4-[2-[[4-[(6-クロロナフタレン-2-イル)スルホニル]ピペラジン-1-イル]カルボニル]チアゾール-5-イル]ピリジン-1-オキシド (8) および 2-メチルピリジン-1-オキシド体 9 が、それぞれ強い *in vitro* fXa 阻害活性 (8: IC₅₀ = 8.6 nM, 9: IC₅₀ = 13 nM) を示すことを見出した。また、*in vitro* 阻害活性の評価からピリジニウム環が S4 結合部分に親和性を持つ可能性が示唆された。さらに化合物 8 の結合様式を検討したところ、*N*-オキシドアニオンが、FXV673 と同様に水分子を介してカチオンホールを構成する Ile 175 残基主鎖のカルボニル酸素原子と水素結合を形成できる可能性が示唆された。

以上のように、本研究では、1) S4 結合部分として 5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[5,4-*c*]ピリジンが fXa 阻害活性と抗凝固活性を示すのに有効であったこと、2) ラットへの経口投与で DX-9065a よりも強い抗凝固活性を示す化合物 5 を見出したこと、3) 化合物 4 と fXa の複合体 X 線解析から、分子内 S-O 相互作用の存在を確認した。2-カルバモイルチアゾールの配座が制御される性質を分子軌道計算により解析し、その配座安定性がテトラヒドロチアゾロピリジンと S4 結合部分間の親和性に影響を及ぼす可能性があること、4) 配座制御の性質を利用して、ピリジン *N*-オキシドを 2-カルバモイルチアゾールユニットを持つ化合物を設計し、4-(チアゾール-5-イル)ピリジン-1-オキシド骨格が S4 結合部分として 5-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[5,4-*c*]ピリジン骨格よりも優れていることを見出したことから、博士 (薬学) の学位を授与するに足る内容を持つものと認定した。