

学位論文内容要旨

氏 名 平山 重人 印

題目「1,3,5-トリオキサアザトリキナン骨格を有するオピオイドリガンドの合成とその薬理作用」

<背景・目的>

ツイン薬とは分子内に2つのファーマコフォア単位を有する化合物のことであり、これまで創薬化学領域において多くのツイン薬が報告されている。ツイン薬には同一のファーマコフォア単位を有する対称ツイン薬と異なるファーマコフォア単位を有する非対称ツイン薬がある。対称ツイン薬は同一標的タンパク複合体の結合部位に同時に結合し、単一化合物と比べ活性増強や選択性の向上が期待できる。一方、非対称ツイン薬は二つの異なる標的タンパクに結合し、デュアル作用を示すと考えられている。また、ツイン薬はより効果的でより安全な医薬品を得るために、複合薬理学 (polypharmacology) の観点から多標的薬 (designed multiple drug) の設計戦略として医薬品開発において注目されている^{1,2)}。当研究室では1,3,5-トリオキサアザトリキナン骨格をリンカーとし、ツイン薬および同一ファーマコフォア単位を3つ有する対称トリプレット薬を合成し、その興味深い薬理作用について報告している³⁾。オキシモルホン単位を2つ有するツイン薬 KNT-123 と3つ有するトリプレット薬 KNT-93 (Figure 1) はマウス酢酸ライジング試験において、いずれも μ オピオイド受容体 (MOR) を介した用量依存のかつ有意な鎮痛効果を示し、この効果は代表的なオピオイド鎮痛薬であるモルヒネの効果より、各々3倍、20倍強力であった^{4,5)}。このように1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導体が興味ある作用を示したが、いずれの化合物もモルヒナン骨格という大きな構成単位を有していた。そこで1,3,5-トリオキサアザトリキナン骨格に導入する構成単位をモルヒナン骨格から芳香環に変換することにより、構造の単純化を試みた。芳香環を有する1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導体はフェネチルアミン単位を内在している。フェネチルアミン単位はエンケファリン、ダイノルフィン等の内因性オピオイドペプチドに限らず、モルヒネやナルトレキソン等のモルヒナン誘導体にも含まれている重要な構造単位である (Figure 2)。実際、MOR アンタゴニストであるナルトレキソンとフェニル基を有する1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導体を重ね合わせると、各々の窒素原子(赤)とフェニル基(オレンジ)は空間的に近い位置に存在する。さらに、フェニル基の *m* 位にヒドロキシ基を導入すると、ナルトレキシソンの3位のヒドロキシ基(青)を模倣することが出来る (Figure 3)。モルヒナン骨格の窒素原子、フェニル基およびフェノール性ヒドロキシ基はオピオイド受容体との結合に重要な官能基として知られており、*m*-ヒドロキシフェニル基を有する1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導

体はモルヒナン骨格とは全く異なる構造であるにもかかわらず、オピオイド受容体と結合することが期待される。そこでヒドロキシフェニル基を1から3個有する誘導体を合成し、それらの化合物の薬理学的特徴に関して評価することにした。

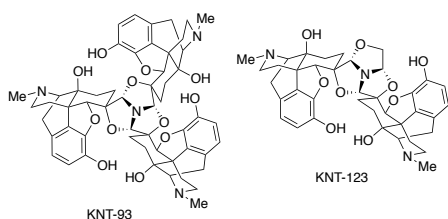


Figure 1. KNT-93、123 の構造

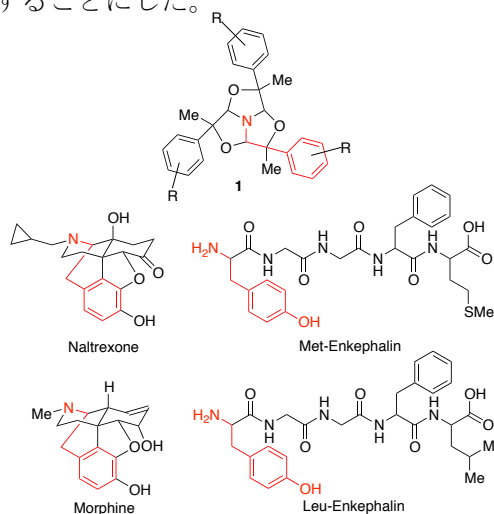


Figure 2. フェネチルアミン構造を有するオピオイドリガンド

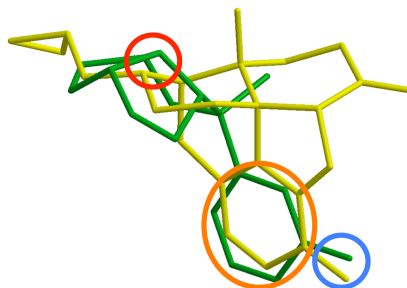


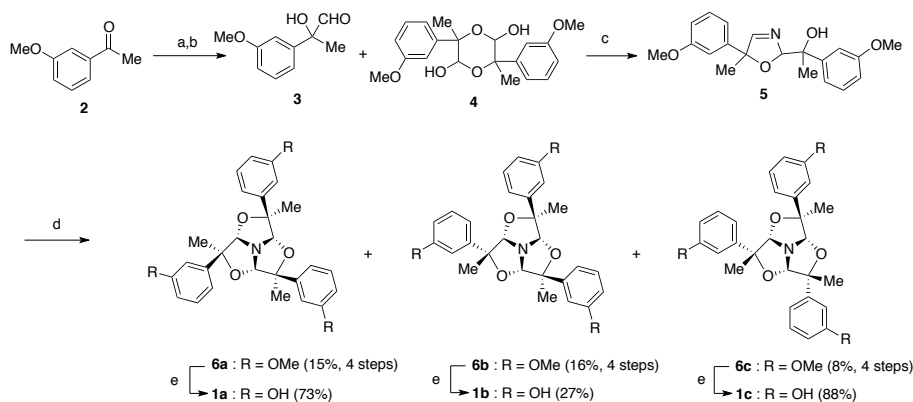
Figure 3. ナルトレキソンと *m*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサトリキナン誘導体の重ね合わせ図

<本論>

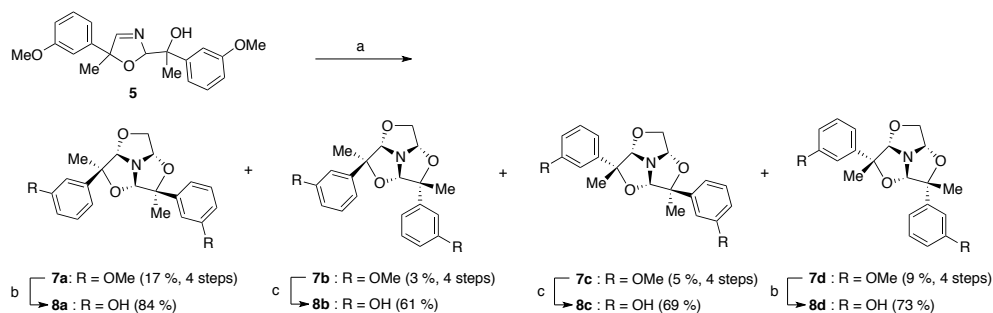
1-1. *m*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導体の合成

m-メトキシアセトフェノン (**2**) より導いた α -ヒドロシアルデヒド **3** およびそのヘミアセタールダイマー **4** の混合物を塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム存在下、メタノール中で還流させることにより鍵中間体オキサゾリン **5** を合成した。オキサゾリン **5** と、 α -ヒドロシアルデヒド **3** およびそのヘミアセタールダイマー **4** の混合物とを酸性条件下反応させることにより、3 つの *m*-メトキシフェニル基を有する化合物 **6a-c** (3 種の立体異性体) を得た (Scheme 1)。また、鍵中間体 **5** とグリコールアルデヒドダイマーを酸性条件下反応させる事により、2 つの *m*-メトキシフェニル基を有する **7a-d** (4 種の立体異性体) を合成した (Scheme 2)。 *m*-メトキシフェニル基を 1 つ有する 1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導体は、**3** と **4** の混合物に塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム存在下、グリコールアルデヒドダイマーを反応させオキサゾリン **9** とした後、酸性条件下、グリコールアルデヒドダイマーを反応させる事により合成した (Scheme 3)。得られた 1,3,5-トリオキサアザトリキナ

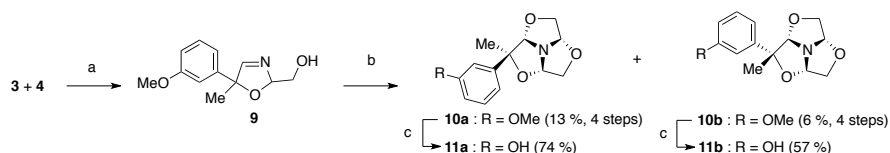
ン誘導体のアニソール部位はカリウムチオラートにより脱メチル化し、活性サンプルとした (Schemes 1-3)。なお、2つのメトキシ基のうち一方のみが脱メチル化された **12a**、**b** は用いるカリウムチオラートの等量規制により合成した (Scheme 4)。



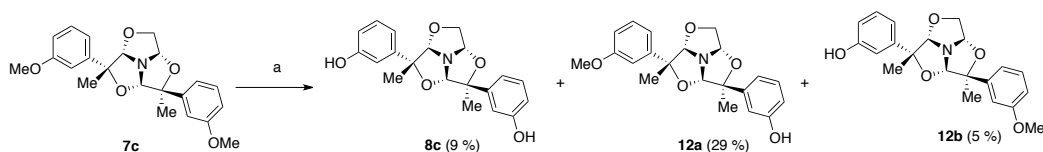
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) TosMIC, K_2CO_3 , MeOH, rt; (b) 2 M HCl aq, THF, rt; (c) NH_4Cl , AcONa, MeOH, reflux; (d) **3**, **4**, CSA, $CHCl_3$, reflux; (e) BBr_3 , CH_2Cl_2 , 0 °C to rt



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) glycolaldehyde dimer, CSA, $CHCl_3$, rt; (b) 1-dodecanethiol, *t*-BuOK, DMF, 130 °C; (c) 1-propanethiol, *t*-BuOK, DMF, 130 °C



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) glycolaldehyde dimer, NH_4Cl , AcONa, MeOH, rt; (b) glycolaldehyde dimer, CSA, $CHCl_3$, rt; (c) 1-dodecanethiol, *t*-BuOK, DMF, 130 °C



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) 1-propanethiol, *t*-BuOK, DMF, 130 °C

1-2. *m*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導体の受容体結合試験

Schemes 1-4 にて合成した化合物の受容体結合試験の代表的な結果を Table 1 に示す。合成したほとんどの化合物はオピオイド受容体に結合しなかったが、**1b**、**1c** および **8a** は MOR のみ、または MOR と κ オピオイド受容体 (KOR) の両方に弱いながらも結合親和性を示した。一方、化合物 **8c** は強く KOR と結合し (K_i 値=6.09 nM)、その結合親和性は代表的な KOR アゴニストである U-69,593 や U-50,488 とほぼ同等であった。化合物 **8c** を光学

分割し、それぞれの異性体について結合能を評価した結果、(+)-体は受容体にほとんど結合しなかったが、(-)-体は KOR に対し強く結合し (K_i 値=4.63 nM)、(-)-体がユートマーである事が明らかとなった。**8c** と同じ立体配置である **7c** および **12a**、**b** の受容体結合能を比較すると、エキソ側に *m*-ヒドロキシフェニル基を有する **12a** のみが KOR に結合した。これは、KOR との結合にはエンド側の *m*-ヒドロキシフェニル基が重要であるという当初の推測 (Figure 3) とは異なった結果であった。

Table 1. *m*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導体の受容体結合試験^a

	K_i (nM)		
	MOR ^b	DOR ^c	KOR ^d
U-69,593	>1000	>1000	1.37
U-50,488	>1000	>1000	1.67
1b	652	>1000	667
1c	928	>1000	>1000
8a	735	>1000	793
8c	>1000	>1000	6.09
(-)- 8c	>1000	>1000	4.63
(+)- 8c	293	651	>1000
7c	>1000	>1000	>1000
12a	>1000	>1000	52.8
12b	>1000	>1000	>1000

^a Binding assays were carried out in duplicate (KOR: cerebellum of guinea pig; MOR and DOR: whole brain without cerebellum of mouse). ^b [³H] DAMGO was used. ^c [³H] DPDPE was used. ^d [³H] U-69,593 was used.

1-3. [³⁵S]GTPγS 結合試験を用いた **8c**、(-)-**8c** の作動活性の評価

KOR に対し、十分な結合能が認められた **8c** および (-)-**8c** の作動活性を [³⁵S]GTPγS 結合試験により評価した (Table 2)。その結果、**8c** および (-)-**8c** は KOR 選択的な作動活性を示した。

Table 2. [³⁵S]GTPγS 結合試験を用いた **8c**、(-)-**8c** の作動活性の評価^a

	EC ₅₀ (Emax)		
	MOR	DOR	KOR
U-69,593	N.T.	N.T.	12.0 nM (100 %)
8c	N.D.	N.D.	97.5 nM (98.2 %)
(-)- 8c	N.D.	N.D.	50.3 nM (96.8 %)

^a [³⁵S]GTPγS binding assays were carried out in duplicate using human MOR, DOR, or KOR expressed in CHO cells. DAMGO, DPDPE, or U-69,593 was used as the standard MOR, DOR, or KOR agonist, respectively. N.T.: not tested; N.D.: not determined.

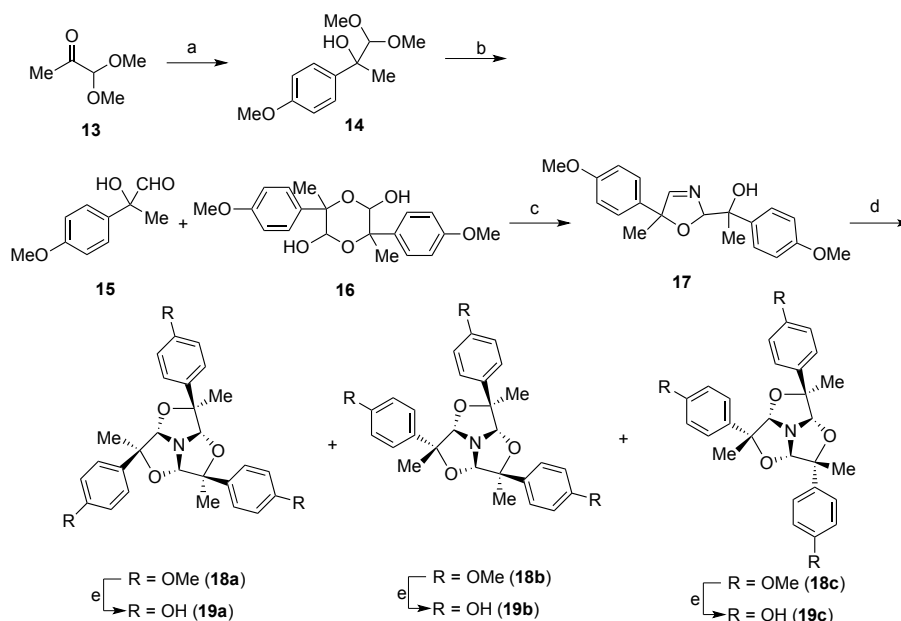
1-4. マウス酢酸ライジング試験を用いた (-)-**8c** の鎮痛作用の評価

マウス酢酸ライジング試験を用いて KOR 作動活性が認められた (-)-**8c** の鎮痛効果の有無を検討した。その結果、(-)-**8c** は用量依存的かつ有意な鎮痛効果を示し、EC₅₀ 値は 3.5 mg/kg, s.c.であった。また、(-)-**8c** による鎮痛効果は KOR 選択的アンタゴニストである

nor-BNI の前処置によってのみ拮抗された。

2-1. *o*-または *p*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサザトリキナン誘導体の合成

合成した *m*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサザトリキナン誘導体の中で、**8c** が KOR 選択的なアゴニストであることが明らかとなった。そこで、フェニル基上のヒドロキシ基の置換位置が受容体結合能および選択性に及ぼす影響を検討する目的で、*o*-または *p*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサザトリキナン誘導体を合成し、結合能および作動活性について評価した。*o*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサザトリキナン誘導体は *m*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサザトリキナン誘導体合成と同様の方法を用いて *o*-ヒドロキシフェニル基を 1 から 3 個有する誘導体を合成した。一方、*p*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサザトリキナン誘導体に関しても同様の方法で合成を試みたが、合成の第一段階である *p*-メトキシアセトフェノンと *p*-トルエンスルホン酸メチルイソシアニド (TosMIC) との反応が全く進まなかった。そこで、ピルビンアルデヒドジメチルアセタール (**13**) に臭化 *p*-メトキシフェニルマグネシウムを付加させ、続いて加水分解を行うことで α -ヒドロキシアルデヒド **15** およびヘミアセタールダイマー **16** を合成した。*p*-メトキシフェニル基を 1 または 2 個有する誘導体は **15** および **16** から Schemes 2、3 と同様の方法で合成できたが、*p*-メトキシフェニル基を 3 個有する誘導体 **18a-c** については Scheme 1 と同様の方法では合成できず、オキサゾリン **17** を酸性条件下、室温にて長時間反応させる事によって合成した (Scheme 5)。



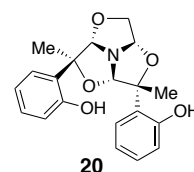
Scheme 5. Reagents and conditions; (a) *p*-methoxyphenyl magnesium bromide, THF, 0 °C to rt; (b) AcOH, H₂O, reflux; (c) NH₄Cl, AcONa, MeOH, reflux; (d) CSA, CHCl₃, rt, 2 weeks, **18a**: 7%, **18b**: 10%, **18c**: 8% from **13**; (e) 1-propanethiol, *t*-BuOK, DMF, 130°C, **19a**: 73% from **18a**, **19b**: 73% from **18b**, **19c**: 67% from **18c**.

2-2. *o*-または *p*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサザトリキナン誘導体の受容体結合試験

合成した化合物の受容体結合試験の代表的な結果を Table 3 に示す。ほぼ全ての化合物はオピオイド受容体に結合能を示さず、**8c** と同じ立体配置を有する誘導体も結合しなかった。しかし、*o*-ヒドロキシフェニル基を 2 つ有する **20** のみがオピオイド受容体に結合し、MOR、DOR に対しては中程度の結合能を示し (K_i 値(MOR) = 20.5 nM、 K_i 値(DOR) = 88.8 nM)、KOR に対しては強力な結合能を示した (K_i 値 = 9.17 nM)。

Table 3. *o*-または *p*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサザトリキナン誘導体の受容体結合試験^a

	K_i (nM)		
	MOR ^b	DOR ^c	KOR ^d
DAMGO	0.83	N.T. ^e	N.T. ^e
DPDPE	N.T. ^e	0.90	N.T. ^e
U-69,593	> 1000	> 1000	1.37
8c	> 1000	> 1000	6.09
20	20.5	88.8	9.17



^a Binding assays were carried out in duplicate (MOR and DOR: whole brain without cerebellum of mouse, KOR: cerebellum of guinea pig). ^b [³H]DAMGO was used. ^c [³H]DPDPE was used. ^d [³H]U-69,593 was used. ^e N.T.: not tested.

2-3. [³⁵S]GTPγS 結合試験を用いた **20** の作動活性の評価

オピオイド受容体に対し結合能を示した **20** の作動活性を [³⁵S]GTPγS 結合試験により評価した (Table 4)。その結果、**20** は全てのオピオイド受容体に対して作動活性を示し、オピオイド受容体ユニバーサルアゴニストである事が明らかとなった。特に KOR 作動活性は **8c** よりも efficacy、potency 共に強力であった。

Table 4. [³⁵S]GTPγS 結合試験を用いた **20** の作動活性の評価^a

	EC ₅₀ (E _{max})		
	MOR	DOR	KOR
DAMGO	7.57 nM (100%)	N.T.	N.T.
DPDPE	N.T.	9.29 nM (100%)	N.T.
U-69,593	N.T.	N.T.	8.03 nM (100%)
8c	N.D.	N.D.	97.5 nM (98.2%)
20	57.6 nM (89.2%)	52.7 nM (73.6%)	9.95 nM (131%)

^a [³⁵S]GTPγS binding assays were carried out in duplicate using human MOR, DOR, or KOR expressed CHO cells. DAMGO, DPDPE, or U-69,593 was used as the standard MOR, DOR, or KOR agonist, respectively. N.T.: not tested. N.D.: not determined.

3-1. 化合物 **20** とトリエチルアミンに含まれる窒素の塩基性

1,3,5-トリオキサザトリキナン骨格は中心に窒素原子を有しているが、3 つの酸素原

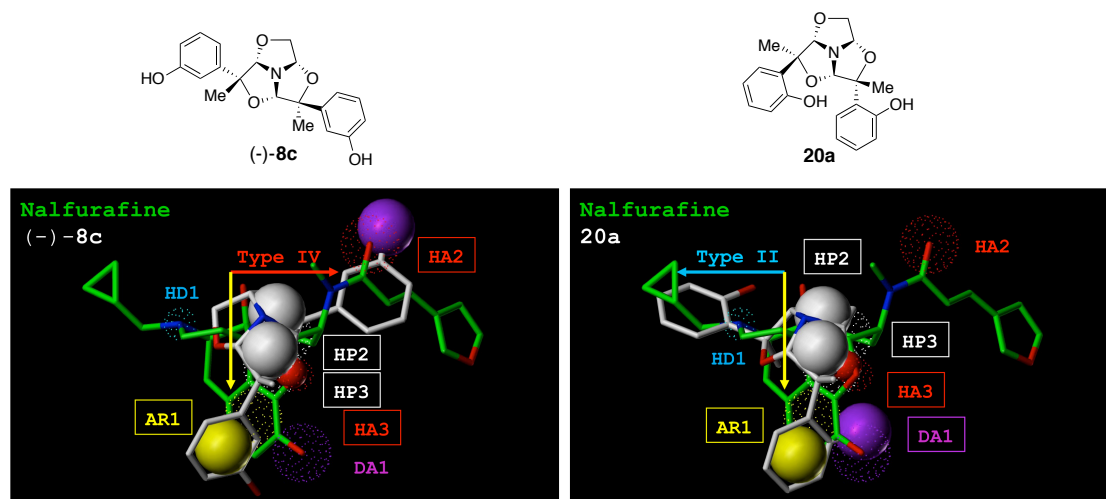
子の電子求引効果により、塩基性が低いと予想される。そこで、ADMET predictor、Epik、Marvin Beans の 3 つの酸性度予測プログラムを用い、 pK_a 値の計算を行った (Table 5)。トリエチルアミンと比較し、**20** の窒素原子はほとんど塩基性を示さなかったことより、**20** と同じ 1,3,5-トリオキサアザトリキナン骨格を有する **8c** も、塩基性窒素を持たないオピオイドアゴニストであると考えられる。

Table 5. **20** とトリエチルアミンに含まれる窒素の pK_a 値

Compounds	pK_a		
	ADMET Predictor	Epik	Marvin Beans
20	3.42	1.059	-0.93
Triethylamine	10.82	9.500	10.21

3-2. KOR アゴニストの 3D ファーマコフォアモデルを用いた (-)-**8c** と **20** の比較

我々は既に、種々の KOR アゴニストに適用できる 3D ファーマコフォアモデル⁶⁾を発表しており、これによると、I から IV の 4 種の結合様式が存在する。立体配置が異なるにもかかわらず、共に KOR 作動活性を示した (-)-**8c** と **20** がいずれの結合様式で KOR と結合しているかを検討した。その結果、(-)-**8c** はタイプ IV に、ラセミ体 **20** のうちのユートマーと推測された **20a** はタイプ II に分類され、(-)-**8c** と **20** は結合様式が異なることが示唆された。



<結論>

フェネチルアミン構造を内在した *o*-, *m*-または *p*-ヒドロキシフェニル基を有する 1,3,5-トリオキサアザトリキナン誘導体を合成し、*in vitro* における評価を行った。その結果、合成したほとんどの化合物がオピオイド受容体に結合親和性を示さなかったが、*m*-ヒドロキシフェニル基を 2 つ有する **8c** および (-)-**8c** が KOR に対し強力な結合親和性を、*o*-ヒドロキシフェニル基を 2 つ有する **20** が MOR および DOR に対して中程度の、KOR に対して強力な結合親和性を示した。これらの化合物の作動活性を評価したところ、**8c** と (-)-**8c**

は KOR 選択的アゴニスト、**20** はオピオイドユニバーサルアゴニストであることが明らかとなった。なお、(-)-**8c** はマウス酢酸ライジング試験において KOR を介した用量依存的かつ有意な鎮痛効果を示した。また、立体配置が異なるにもかかわらず、共に KOR 作動活性を示す (-)-**8c** と **20** の KOR に対する結合様式を KOR アゴニストの 3D ファーマコフォアモデルを用いて検討したところ、(-)-**8c** と **20** は異なる結合様式を示した。さらに、1,3,5-トリオキサアザトリキナン骨格に含まれる窒素の塩基性を計算したところ、ほとんど塩基性を示さなかったことから **8c**、(-)-**8c** および **20** は塩基性窒素を持たない KOR 選択的アゴニスト、オピオイドユニバーサルアゴニストであると考えられる。得られた (-)-**8c** および **20** は共に構造的に興味深いオピオイドアゴニストであり、特に **20** のオピオイド受容体への結合様式を検討することでオピオイドアゴニストにおける塩基性窒素の役割や必要性を解明でき、今後のオピオイド創薬の一助になり得ると考える。

<参考文献>

1. *Designing Multi-Target Drugs*; Morphy, J.R.; Harris, C.J., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2012**.
2. *Polypharmacology in Drug Discovery*; Peters, J.U., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, **2012**.
3. Nagase, H.; Watanabe, A.; Harada, M.; Nakajima, M.; Hasebe, K.; Mochizuki, H.; Yoza, K.; Fujii, H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 539.
4. Nagase, H.; Watanabe, A.; Nemoto, T.; Nakajima, M.; Hasebe, K.; Mochizuki, H.; Fujii, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4023.
5. Nagase, H.; Koyano, K.; Wada, N.; Hirayama, S.; Watanabe, A.; Nemoto, T.; Nakajima, M.; Nakao, K.; Mochizuki, H.; Fujii, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6198.
6. Yamaotsu, N.; Fujii, H.; Nagase, H.; Hirono, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4446.