

プロスタグランジン E₂ 受容体である
EP₂/EP₃ 受容体作動薬に関する創薬研究

奈良先端科学技術大学院大学

物質創成科学研究科

木下 晶博

目次

第1章 p.6 - p.15

緒言

- 1-1 プロスタノイドとプロスタグランジン E₂
- 1-2 プロスタグランジン E₂ 受容体である EP₁/EP₂/EP₃/EP₄ 受容体
- 1-3 適応疾患候補と創薬コンセプト
- 1-4 参考文献

第2章 p.16 – p.31

既知 EP₂/EP₄ 作動薬への EP₃ 作動活性付与

- 2-1 緒言
- 2-2 具体的な目標値
- 2-3 EP₂/EP₃/EP₄ 作動薬の設計と合成
- 2-4 結合親和性または作動活性評価方法
- 2-4 化合物の膜透過性と代謝安定性
- 2-5 小括
- 2-6 実験の部
- 2-7 参考文献

第3章 p.32 - p.49

EP₄ 作動活性低下による選択性向上

- 3-1 緒言
- 3-2 EP₄ 作動活性を低下させる化合物設計
- 3-3 EP₂/EP₃ 受容体選択的に作動活性を示す構造への変換

3-4 小括

3-5 実験の部

3-6 参考文献

第4章 p.50 - p.66

経口吸収性を有する化合物の取得

4-1 緒言

4-2 酸化代謝の回避

4-3 TPSA 低下による膜透過性の改善

4-4 薬物動態特性評価結果と考察

4-5. 薬物動態特性評価方法

4-6 小括

4-7 実験の部

4-8 参考文献

第5章 p.67 - p.85

EP₂/EP₃ 作動活性のバランス最適化

5-1 緒言

5-2 ジアステレオマー混合物の分割方法と作動活性評価

5-3 EP₂ 選択的作動薬と EP₃ 選択的作動薬を用いた検証

5-4 EP₂ 受容体と EP₃ 受容体の化合物結合部位の構造比較

5-5 バランス最適化を指向した分子設計と構造活性相関

5-6 薬物動態特性評価結果と考察

5-7 小括

5-8 実験の部

5-9 参考文献

第6章 p.86 - p.87

総括

謝辞 p.88

研究業績リスト p.89- p.90

略語表

ADME: absorption, distribution, metabolism, excretion、吸収、分布、代謝、排泄

AUC: area under the curve、曲線下面積

CL: clearance、クリアランス

DMAP: 4-(dimethylaminopyridine、4-ジメチルアミノピリジン

DMMP: dimethylmethylphosphonate、メチルホスホン酸ジメチル

DME: 1,2-dimethoxyethane、1,2-ジメトキシエタン

DMSO: dimethylsulfoxide、ジメチルスルホキシド

ESI : electrospray ionization、エレクトロスプレーイオン化法

EtOAc : ethyl acetate、酢酸エチル

EtOH : ethanol、エタノール

BA: bioavailability、生物学的利用率

GPCR: G-protein coupled receptor、G タンパク共役型受容体

HPLC: high-performance liquid chromatography、高速液体クロマトグラフィー

i.v.: intravenous、静脈内投与

KSAC: S-potassium thioacetate、チオ酢酸 S-カリウム

LC/MS: liquid chromatography/mass spectrometry、液体クロマトグラフィー/質量分析法

m-CPBA: *meta*-chloro perbenzoic acid、メタクロロ過安息香酸

Ms: methane sulfonyl、メタンスルホニル

NMR: nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴

15-PGDH: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase、プロスタグランジン 15 位水酸基脱水酸酵素

p.o.: *per os* = oral administration、経口投与

PSA : polar surface area、極性表面積

S1P₁: Sphingosine-1-phosphate₁、スフィンゴシン-1-リン酸受容体 1

TBAF: tetrabutylammonium fluoride、テトラブチルアンモニウムフルオリド

TBDPS: *tert*-butyl *di*-phenylsilyl、*tert*-ブチルジフェニルシリル

TBS: *tert*-butyl methylsilyl、*tert*-ブチルメチルシリル

TFA : trifluoroacetic acid、トリフルオロ酢酸

THF : tetrahydrofuran、テトラヒドロフラン

TM: transmembrane domain、膜貫通領域

TMS: *tri*-methylsilyl、*tri*-メチルシリル

TPSA : topological polar surface area、位相幾何学的極性表面積

Ts: *p*-toluene sulfonyl、*p*-トルエンスルホニル

第1章

緒言

1-1. プロスタノイドとプロスタグランジン E₂

プロスタグランジン (PG) は、1930年にヒトの精液中にある子宮平滑筋収縮作用や血圧低下作用を有する物質として、その存在が明らかになった¹⁻⁵。1957年に PGE₁ および PGF₂ の構造が明らかになって以降、プロスタグランジン及びトロンボキサン (TX) から構成されるプロスタノイドと総称される一群の生理活性物質が生体内で様々な生理作用において、非常に重要な役割を果たしていることが報告された。プロスタグランジンはその構造の違いにより、PGA から PGI までの9種類に分類される⁶ (Figure 1-1)。

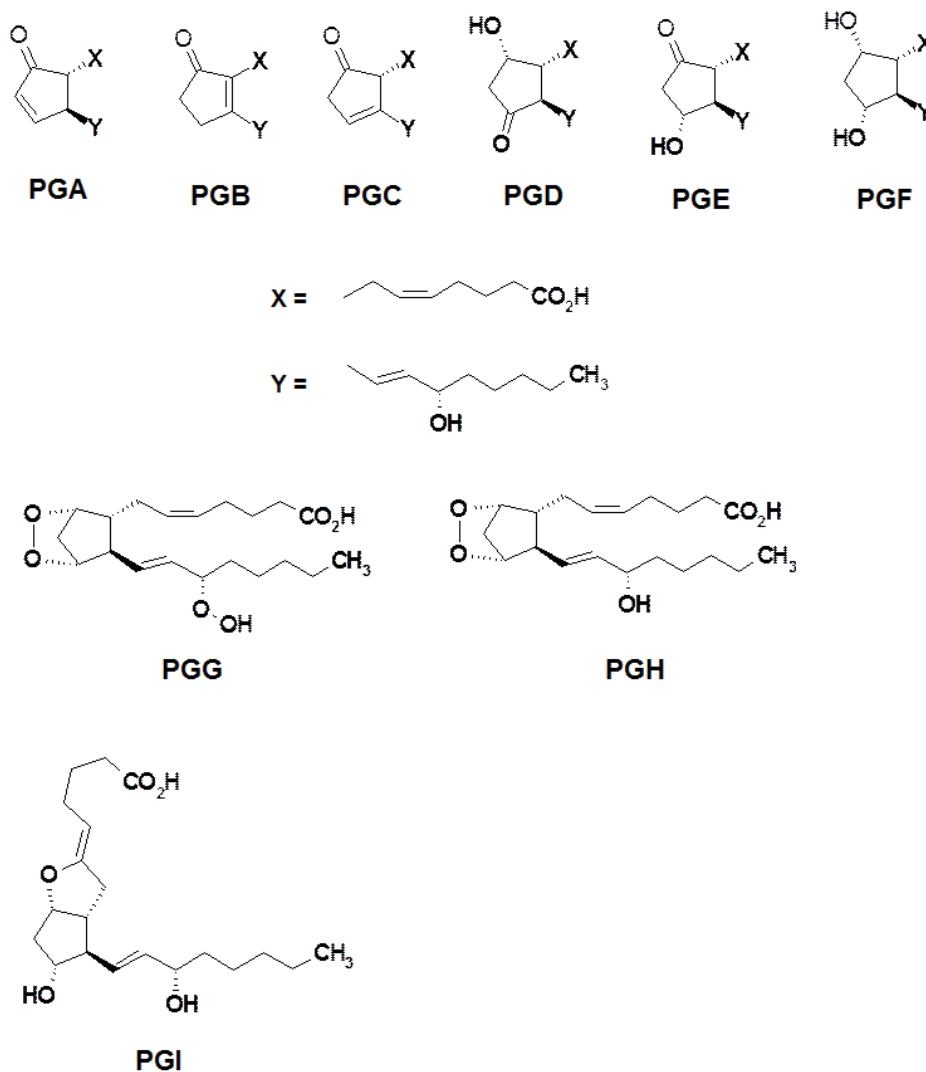


Figure 1-1. プロスタグランジン (PGA から PGI) の構造的分類

主なプロスタグランジンの分子構造は5員環構造と、その5員環から伸びる2つのアルキル側鎖からなる。この2つの側鎖はそれぞれ α 側鎖、 ω 側鎖と名付けられ、 α 側鎖は末端部分にカルボン酸を、 ω 側鎖はアリルアルコール構造を有している。PGG及びPGHは同じ5員環構造を有するが、PGGはPGHの ω 側鎖の15位炭素の水酸基がペルヒドロキシ基になっている。また、PGIは5員環部分と α 側鎖が環化した縮環構造を有している。そのうち、PGEは有する二重結合の数からPGE₁とPGE₂に分類され、生体内で最も豊富に産生されるプロスタグランジンであるPGE₂（プロスタグランジンE₂）は、**Figure 1-2**に示す化学構造を有している。

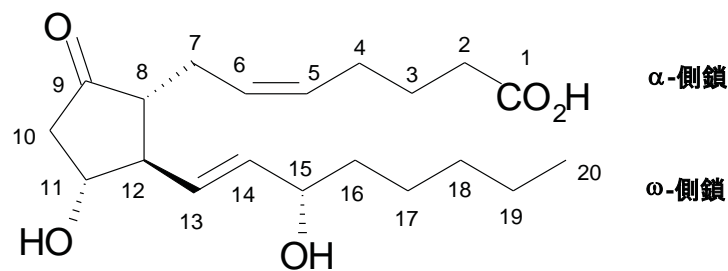


Figure 1-2. PGE₂（プロスタグランジンE₂）の化学構造式

プロスタグランジンはその構造が類似しているにも関わらず、各々が異なる生理作用を示す。その作用機序の解明が進められた結果、各々のプロスタノイドと特異的に相互作用する細胞膜受容体の存在が明らかとなり、PGD、PGE、PGF、PGI および TX に対応する受容体として、DP、EP、FP、IP、TP 受容体の存在が報告された⁷。これら受容体の性質は、1989年のヒト血小板からの TX 受容体の精製および1991年のヒト TX 受容体の cDNA クローニングからである⁸⁻⁹。

前述の通り、PGE₁ と PGE₂ はα側鎖とω側鎖にある二重結合の数から分類されるが、その違いは生合成における原料である炭素数が 20 の不飽和脂肪酸の構造に由来し、PGE₂ はアラキドン酸から生合成される。細胞膜のリン脂質に存在するアラキドン酸は、細胞内刺激を受けて Cyclooxygenase1, Cyclooxygenase2 により PGG₂ または PGH₂ に変換された後、各種プロスタノイドへと変換される。そのうち、PGE₂ は PGE 合成酵素に触媒されることで、生成される¹⁰⁻¹² (Figure 1-3)。

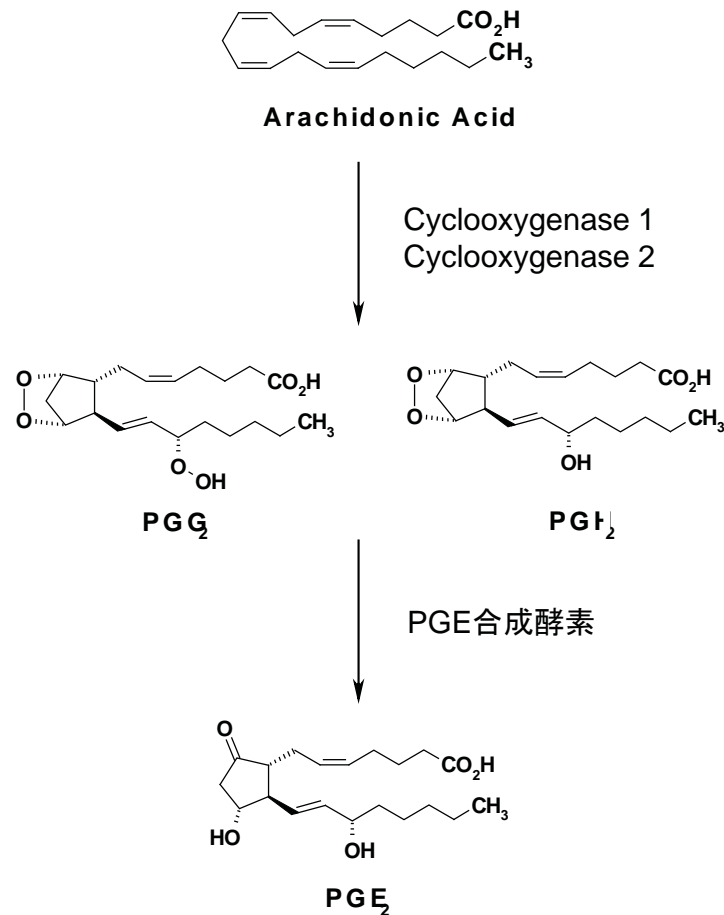


Figure 1-3. アラキドン酸から PGE₂ の生成経路

1-2. プロスタグランジン E₂ 受容体である EP₁/EP₂/EP₃/EP₄ 受容体

PGE₂ の受容体には EP₁ から EP₄ までの 4 種類のサブタイプが存在することが明らかとなり、さらに全てのプロスタノイド受容体の cDNA がクローニングされた¹³⁻¹⁴。これらの受容体はいずれも G-protein coupled receptor (GPCR)¹⁵ であり、7 回膜貫通型領域 (transmembrane domain, TM) を有し G タンパクと共役するロドプシン型の受容体であった。また、それぞれのアミノ酸配列の相同性は情報伝達系と一致しており、アデニル酸シクラーゼを活性化する DP、EP₂、EP₄、IP 受容体、アデニル酸シクラーゼを抑制し、Ca²⁺ 動員系に共役する EP₃ 受容体、アデニル酸シクラーゼには影響しないが、Ca²⁺ 動員系に共役する EP₁、FP、TP 受容体の 3 種類に分類された。つまり、PGE₂ 受容体である EP₁ から EP₄ 受容体に限ると、アデニル酸シクラーゼを活性化することで cAMP (cyclic adenosine monophosphate、環状アデノシンーリン酸) 濃度を上昇させる EP₂/EP₄ 受容体、アデニル酸シクラーゼを抑制し、cAMP 濃度を低下させる EP₃ 受容体、Ca²⁺ 動員系に共役する EP₁ 受容体の 3 つに分類される。これらのうち、特に EP₂ と EP₃ 受容体に関しては、cAMP 濃度の上昇と低下という、全く相反する情報を細胞内で伝達する (Figure 1-4)。

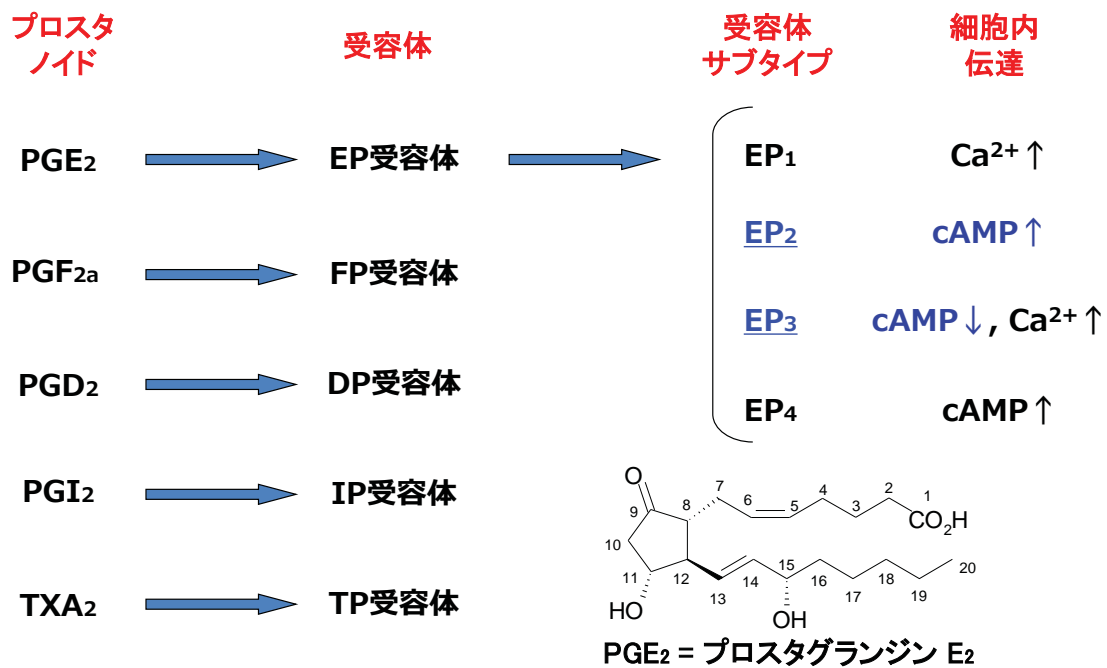


Figure 1-4. 各種プロスタノイドと各 EP 受容体を介した細胞内情報伝達

細胞内で cAMP はプロテインキナーゼ A を活性化し、カスケード的に細胞内の応答を引き起こすことが知られているが、細胞によりその応答は異なり、平滑筋の場合は、弛緩させる。つまり、EP₂/EP₄ 受容体を介した生理作用として代表的なものは血管平滑筋の拡張作用である。EP₁ 受容体を介した作用は Ca²⁺濃度の上昇に伴い、消化管や気管支などの平滑筋収縮作用や神経終末からの神経伝達物質の遊離促進、EP₃ 受容体を介した作用は Ca²⁺濃度の上昇または cAMP の低下に伴うものとして発熱、疼痛、子宮収縮、胃酸分泌抑制、血小板凝集の増強がそれぞれ知られている¹⁶。

各受容体の臓器あるいは組織における発現分布も明らかとなり、EP₁ 受容体は主に腎臓や胃に、EP₂ 受容体は子宮や回腸、尿道に、EP₃ 受容体は子宮、腎臓、膀胱、胃、中枢に、EP₄ 受容体は胸腺、腎臓、回腸、子宮などの組織に多く発現している¹⁷。これらの組織発現の分布と生理作用について **Table 1-1** にまとめて示す。

Table 1-1. 各 EP 受容体の組織発現分布と各種生理作用

受容体 サブタイプ	細胞内 伝達	主な 生理作用	主な発現 組織
EP ₁	Ca ²⁺ ↑	平滑筋収縮作用	腎臓、胃
EP ₂	cAMP↑	平滑筋弛緩作用	子宮、回腸、尿道
EP ₃	cAMP↓, Ca ²⁺ ↑	平滑筋収縮作用	子宮、腎臓、膀胱、 胃、中枢
EP ₄	cAMP↑	平滑筋弛緩作用、 骨吸収作用	胸腺、腎臓、子宮

医薬品への応用として、PGE₁ や PGE₂ といった天然型のプロスタグランジンだけでなく、化学修飾が施された非天然型プロスタグランジン誘導体も医薬品として上市されている。1990年代に、各種プロスタノイド受容体の存在が明らかになるとともに、8種類の全ての受容体の cDNA がクローニングされた¹⁴。この結果、それぞれの受容体を単独に強制発現させた細胞株の入手が可能となり、結合親和性の測定や作動活性・拮抗活性の測定を各受容体ごとで化合物の活性を評価可能となった。したがって、これらの評価系を用いることにより、各受容体に対する選択的な作動薬・拮抗薬の創製が盛んとなった。これらの例として、ONO-8539 (EP₁ 拮抗薬)、ONO-8815 (EP₂ 作動薬)、CP-533536 (Pfizer 社、EP₂ 作動薬)、DG-041 (de CODE 社、EP₃ 拮抗薬)、ONO-4819 (EP₄ 作動薬) 等がこれまでに臨床試験に進んだ化合物として、報告されている¹⁸⁻²²。Figure 1-5 に、これらのうち、代表的な報告例を構造式とともに示す。なお、EP₃ 受容体に対する選択的な作動薬が臨床入りした例は報告されていない。

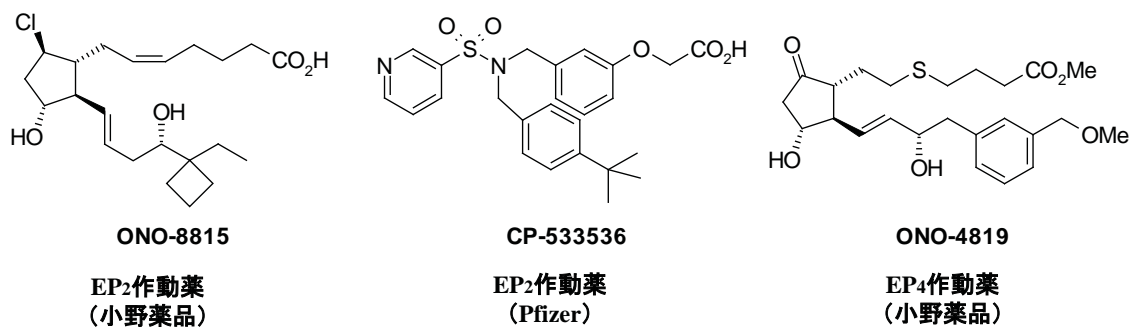
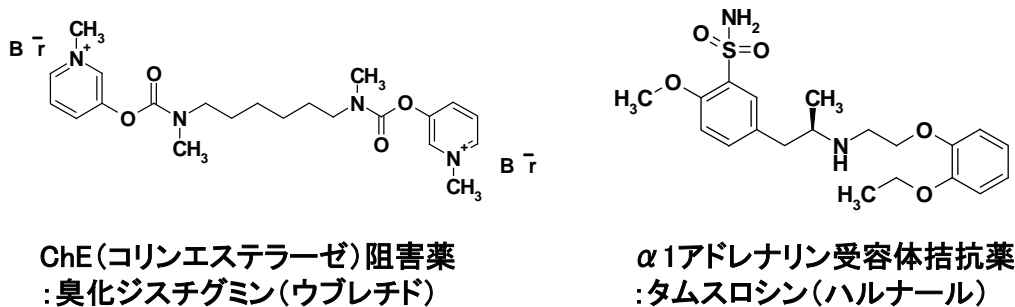


Figure 1-5. 各 EP₂ もしくは EP₄ 受容体作動薬で臨床入りした報告例

1-3. 適応疾患候補と創薬コンセプト

これまでに、PGE₂が結合する各受容体（EP₁、EP₂、EP₃、EP₄受容体）のうち、EP₁及びEP₄受容体には作動活性を示さず、EP₂及びEP₃受容体のみ作動活性を有する医薬品または化合物の報告例は無い。したがって、本論文はEP₂及びEP₃受容体に選択的に作動活性を有する医薬品候補化合物創製の取り組みを初めて報告したものである。また、EP₂及びEP₃受容体に選択的な作動薬は、満たされない医療ニーズである低活動膀胱に対する新規治療薬となり得ることを提唱する。低活動膀胱は、排尿筋収縮力が原因の尿排出障害であり、既存薬としてコリンエステラーゼ阻害薬（ChE 阻害薬）であるウブレチド（臭化ジスチグミン²³）が主に用いられているが、作用機序に基づく副作用のため使用が制限され、十分な有効性が引き出されておらず、本領域での新規治療薬に対するニーズは非常に高いことが明らかとなっている。また、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬であるハルナール（タムスロシン塩酸塩²⁴）が用いられることもあるが、膀胱に対する作用は無く、薬効不足であることから臨床ニーズを満たしていないと考えられた。Figure 1-6 にこれら低活動膀胱の既存薬を構造式とともに示す。



ChE(コリンエステラーゼ)阻害薬
:臭化ジスチグミン(ウブレチド)

$\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬
:タムスロシン(ハルナール)

Figure 1-6. 低活動膀胱に対する既存薬（ウブレチド、ハルナール）の構造式

第1章2項にて述べたように、膀胱 (Bladder) には EP₃ 受容体が発現し、尿道 (Urethral) には EP₂ 受容体が発現していることが知られている。したがって、薬理作用として EP₃ 受容体を介して膀胱平滑筋を収縮させ、EP₂ 受容体を介して尿道平滑筋を弛緩させることができれば、低活動膀胱に対して、膀胱もしくは尿道にのみ作用する既存薬よりも優れた有効な治療薬になると考えた。Figure 1-7 に低活動膀胱治療薬を目指した EP₂/EP₃ 作動薬の創薬コンセプトを示す。つまり、非天然型プロスタグランジン誘導体の化学構造と活性や物性との相関を考察しつつ、強力な EP₂/EP₃ 作動活性を有しながら他のサブタイプ受容体に対する作動活性との選択性を示し、望ましい薬物動態特性を兼ね備えた医薬品候補化合物を取得することを本研究の目的とする。

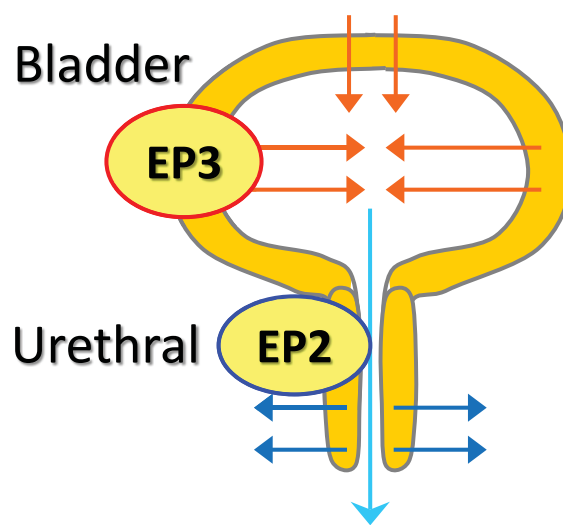


Figure 1-7. EP₂/EP₃ 作動薬の創薬コンセプト

1-4. 参考文献

1. Kurzrok, R.; Lieb, C. C. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.*, **1930**, 28, 268.
2. 杉本幸彦, 根岸学, 牛首文隆, 成宮周, 市川厚, 「生化学」, **1995**, 67, 1351.
3. 杉本幸彦, 根岸学, 市川厚, 「薬局」, **1997**, 48, 102.
4. Narumiya S.; Sugimoto, Y.; Ishikubi, F. *Physiological Reviews*, **1999**, 79, 1193.
5. Tsuboi, K.; Sugimoto, Y.; Ichikawa, A. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **2002**, 68, 535.
6. Bergstorm, S.; Sjoval, J. *Acta. Chem. Scand.* **1957**, 11, 1086.
7. Kennedy, I.; Coleman, R. A.; Humphrey, P. P.; Levr, G. P.; Lumley, P. *Prostaglandins* **1982**, 2, 667.
8. Ushikubi, F.; Nakajima, M.; Hirata, M.; Okuma, M.; Fujiwara, M.; Narumiya, S. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 16496.
9. Hirata, M.; Hayashi, Y.; Ushikubi, F.; Yokota, Y.; Kaggeyama, R.; Nakanishi, S.; Narumiya, S. *Nature*, **1991**, 349, 617.
10. Murakami, M.; Naraba, H.; Tanioka, T.; Semmyo, N.; Nakatani, Y.; Kojima, F.; Ikeda, T.; Fueki, M.; Ueno, A.; Oh, S.; Kudo, I. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 32783.
11. Kamei, D.; Yamakawa, K.; Takegoshi, Y.; Mikami, N.; Nakanishi, M.; Nakatani, Y.; Ohishi, S.; Yasui, H.; Azuma, Y.; Hirasawa, N.; Ohuchi, K.; Kawaguchi, H.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Uematsu, S.; Akira, S.; Murakami, M.; Kudo, I.; *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 33684.
12. Naraba, H.; Yokoyama, C.; Tago, N.; Murakami, M.; Kudo, I.; Fueki, M.; Ohishi, S.; Tanabe, T. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 28601.
13. Coleman, R. A.; Grix, S. P.; Levy, G. P.; Sheldrick, R. L. G. *Prostaglandins* **1994**, 47, 151.
14. Coleman, R. A.; Smith, W. L.; Narumiya, S. *Pharmacol. Rev.* **1994**, 46, 205.
15. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.; Trong, I.; Teller, D.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; Yamamoto, M.; Miyano, M., *Science*, **2000**, 739.
16. Ushikubi, F.; Segi, E.; Sugimoto, Y.; Murata, T.; Matsuoka, T.; Kobayashi, T.; Hizaki, H.; Tsuboi, K.; Katsuyama, M.; Ichikawa, A., *Nature*, **1998**, 395, 281.
17. 杉本幸彦, 「生化学」, **2006**, 78, 1039.
18. Sorbera, L. A. ; Bozzo, J. ; Rosa, E. ; Dulsat, C., *Drugs Future* **2008**, 33, 455.
19. Breyer, M. D.; Hebert, R. L.; Breyer, R. M.; *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2003**, 4, 1343.
20. Paralkar, V. M.; Borovecki, F.; Ke, H. Z.; Cameron, K. O.; Lefker, B.; Grasser, W. A.; Owen, T. A.; Li, M.; DaSilva-Jardine, P.; Zhou, M.; Dunn, R. L.; Dumont, F. Korsmeyer, R.; Krasney, P.; Brown, T. A.; Plowchalk, D.; Vukicevic, S.; Thompson D. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 6736.
21. Singh, J., Zeller, W.; Zhou, N. *ACS. Chem. Biol.* **2009**, 4, 115.
22. Ohta C.; Kuwabe, S.; Shiraishi, T.; Shinohara, I.; Araki, H.; Sakuyama, S.; Makihara, T.;

Kawanaka, Y.; Ohuchida, S.; Seko, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8298.

23. 第十五改正日本薬局方解説書に収載.

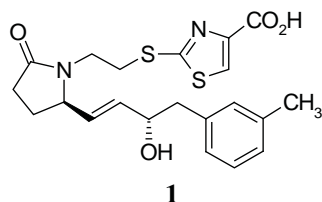
24. 第十六改正日本薬局方解説書に収載.

第2章

既知 EP₂/EP₄ 作動薬への EP₃ 作動活性付与

2-1. 緒言

本研究を始めるにあたって、第1章3項にて示したように、PGE₂の各受容体のうち、EP₁及びEP₄受容体には作動活性を示さず、EP₂及びEP₃受容体のみに作動活性を有する化合物の報告は無いが、EP₁及びEP₃受容体には強い結合活性を示さず、EP₂及びEP₄受容体に対して強い作動活性を有する化合物**1**は論文報告済であった (Figure 2-1)¹。化合物**1**の*in vitro*活性は、マウス発現細胞を用いた結合親和性 (K_i 値) およびラット発現細胞を用いた作動活性 (EC₅₀ 値) の結果が示されており、望ましい EP₂ 受容体に対する作動活性を示していること、及び望ましい EP₃ 受容体に対する結合活性を弱いながら示していることから、本研究の出発点とする上で、ふさわしいのではないかと考えた。そこで化合物**1**の構造を変換し、強力な EP₃ 作動活性の付与を目指すこととした。また、化合物**1**は、局所投与を目指して分子設計されていることから、物性面を調整し、経口投与可能な構造に変換することが必要と考えられた。すなわち、生体内において良好な代謝安定性を有するだけでなく、良好な膜透過性も併せ持つ構造を設計する必要がある。

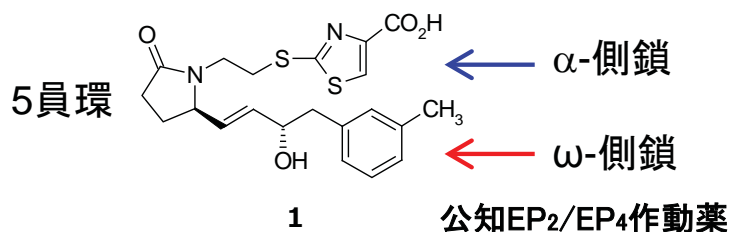


	EP ₁	EP ₂	EP ₃	EP ₄
Mouse Binding Assay				
K _i (nM)	>10 ⁴	9.3	540	0.41
Rat Functional Assay				
EC ₅₀ (nM)	-	90	-	0.79

Figure 2-1. 既知 EP₂/EP₄ 作動薬の化学構造式とプロファイル¹

2-2. 具体的な目標値

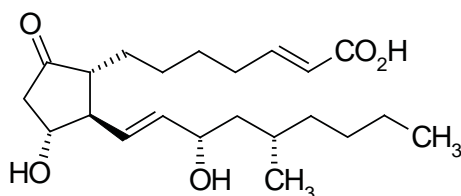
既知化合物 **1** を出発化合物として、低活動膀胱に対する治療薬として望ましい医薬品候補化合物を取得する上で必要な具体的な目標を **Figure 2-2** に示す。第1の目標は、望ましい EP₃ 作動活性を付与し、なおかつ望ましくない EP₄ 作動活性を低下させることである。第2の目標は、経口投与可能な薬物動態特性を有することである。これらの目標を達成するための分子設計における戦略として、第1の目標に対しては、 ω 側鎖や5員環構造の部分構造の変換によって、望ましい *in vitro* 活性プロファイルを示す構造に導くことであり、第2の目標に対しては、物性調整により膜透過性を向上させ、なおかつ生体内で代謝を受けにくい構造に導くことである。標的である EP₂ 受容体、EP₃ 受容体のアミノ酸一次配列情報も踏まえた考察を行い、一般的に薬物動態特性を改善するための適切な分子設計を活用することとした。なお、プロスタグランジン E₂ 誘導体で経口剤の上市薬は、血管平滑筋拡張作用を有し、腰部脊柱管狭窄症等を適応としている Limaprost (**Figure 2-3**) 等、ごくわずかである²。そこで、医薬品候補化合物の取得を目指す上で具体的な目標値として、EP₂ 及び EP₃ 受容体のみにも 10 nM 以下の作動活性を有し、その他 EP₁ 及び EP₄ 受容体と 100 倍以上の選択性を有すること、静脈投与時に対する経口投与時の血中曝露量比率である Bioavailability が 10% 以上と設定した。



目標

1. EP₃作動活性を付与し、EP₄作動活性を低下
2. 経口投与可能とする

Figure 2-2. 公知 EP₂/EP₄ 作動薬 **1** の構造式と本研究における目標



適応: 腰部脊柱管狭窄症等

Figure 2-3. Limaprost (上市済プロスタグランジン誘導体) の化学構造式

2-3. EP₂/EP₃/EP₄ 作動薬の設計と合成

分子設計にあたって、上市済のプロスタグランジン誘導体の医薬品構造を導入することを計画した。Figure 2-4 に示す Gemeprost は、子宮を収縮させる作用を有し、妊娠中期における治療的流産等を適応として臨床において注射剤として使用されている³。この子宮を収縮させる作用は、ヒト EP₃ 作動活性を介したものであると考えられた。また、小野薬品工業株式会社で保有するプロスタグランジン誘導体を含む脂質化合物ライブラリ情報から、Gemeprost と全く同じ ω 鎖構造を有する化合物（構造非開示）がマウス EP₃ 受容体に対して、非常に強い結合活性 ($K_i = 2.4 \text{ nM}$) を示し、なおかつヒト EP₃ 受容体に対して、非常に強い作動活性 ($EC_{50} = 0.8 \text{ nM}$) を示すことも分かっている。したがって、望ましい EP₃ 作動活性を付与する目的を達成するために、Gemeprost の部分構造を化合物 1 に導入することが効果的ではないかと考えた。

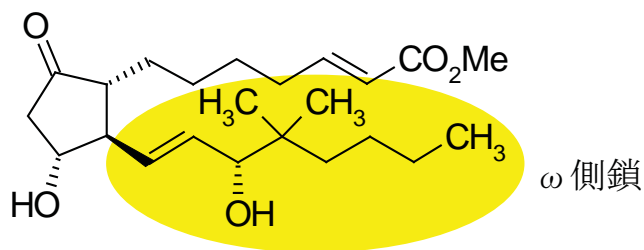
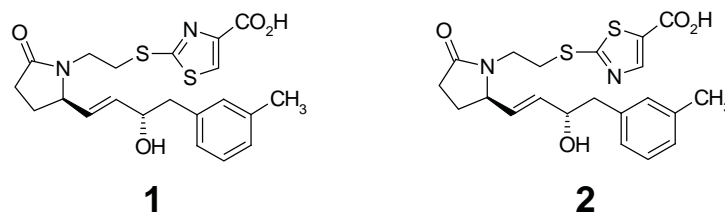


Figure 2-4. Gemeprost (上市済プロスタグランジン誘導体) の化学構造式

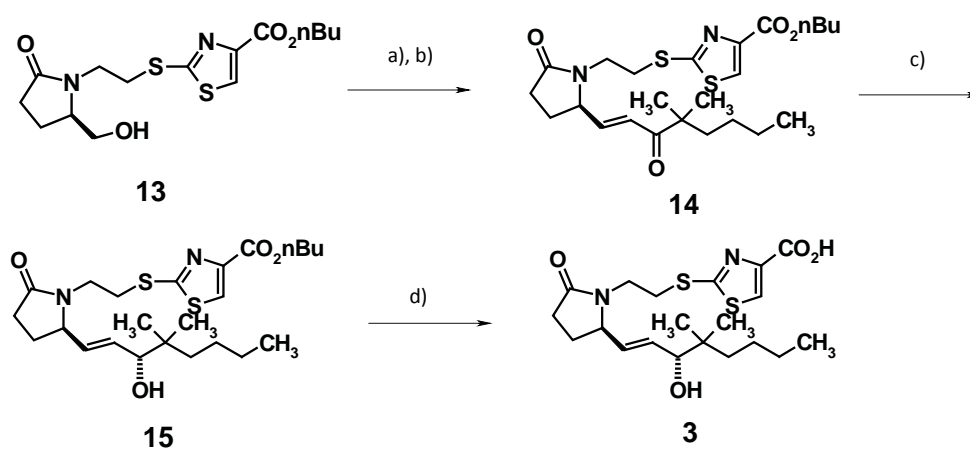
ただし、Gemeprost は 11 位炭素上の水酸基が脱離しやすい化学的に不安定な β -ヒドロキシケトン構造を有することが分かっている。また、化合物 **1** の論文報告¹より、EP₂受容体に対する作動活性については化合物 **1** の α 側鎖に含まれる 2-mercaptothiazole-4-carboxylic acid 構造が必須と考えられた。その理由として、マウス EP₂受容体の結合親和性に与える影響について、化合物 **1** が含まれる論文にて紹介されている一部の構造活性相関を **Table 2-1** に示す。この結果から、チアゾールの硫黄原子と窒素原子が入れ替わった化合物 **2** の構造（カルボン酸の置換位置の移動）に変換するだけで EP₂受容体に対する結合活性が 30 倍程度低下してしまうことから、2-mercaptothiazole-4-carboxylic acid 構造は望ましい EP₂結合親和性に非常に有利な構造であると考察した。つまり、2-mercaptothiazole-4-carboxylic acid 構造は保持すべきであると考察した。

Table 2-1. 化合物 **1** の周辺構造とマウス EP 受容体に対する結合親和性¹



Mouse Binding Assay				
K _i (nM)				
Compound	mEP ₁	mEP ₂	mEP ₃	mEP ₄
1	>10 ⁴	9.3	540	0.41
2	>10 ⁴	320	>10 ⁴	5.5

これらをふまえて、化合物 **1** の ω 側鎖のみ、Gemeprost の構造に置き換えた化合物 **3** を設計した。化合物 **3** の合成法は以下の通りである (Scheme 2-1)。アルコール体 **13** は化合物 **1** の報告論文¹中に記載されている合成中間体であり、論文と同様の方法により合成した。得られた **13** を $\text{SO}_3\text{-Py}$ 酸化によりアルデヒドに変換し、Horner-Emmons 反応⁴⁵により dimethyl (3,3-dimethyl-2-oxoheptyl)phosphonate を用いてエノン体 **14** を得た。次に、(*S*)-Me-CBS を触媒としたボラン還元⁶により立体選択的にアルコール体 **15** を得た。得られた収率が 14% と良好ではなかった原因として、16 位の立体的なかさ高さにより、還元反応が進行しにくいためと考察している。得られた **15** に対するアルカリ条件下における加水分解により、化合物 **3** を得た。



- (a) $\text{SO}_3\text{-Py}$, DMSO, EtOAc, TEA, r.t.;
 (b) NaH, THF, dimethyl (3,3-dimethyl-2-oxoheptyl)phosphonate, r.t. y. 67% (for 2 steps);
 (c) (*S*)-CBS, BH_3/THF , THF, 0°C , y. 14%;
 (d) 2N NaOH aq., MeOH, r.t., y. 58%

Scheme 2-1. 化合物 **3** の合成法

次に、合成中間体として得られた化合物 **15** の 15 位不斉炭素の立体配置に関する考察を行った。**Figure 2-5**に示すように、エノン体 **14** のカルボニル基の両置換基を相対的に大きいものと小さいものに分けた場合、ジメチル基を有する方が相対的に大きいことは明らかであり、そのかさ高さを避ける形で(*S*)-Me-CBS と BH₃ の錯体が反応し、不斉還元反応が起きたと考えている。

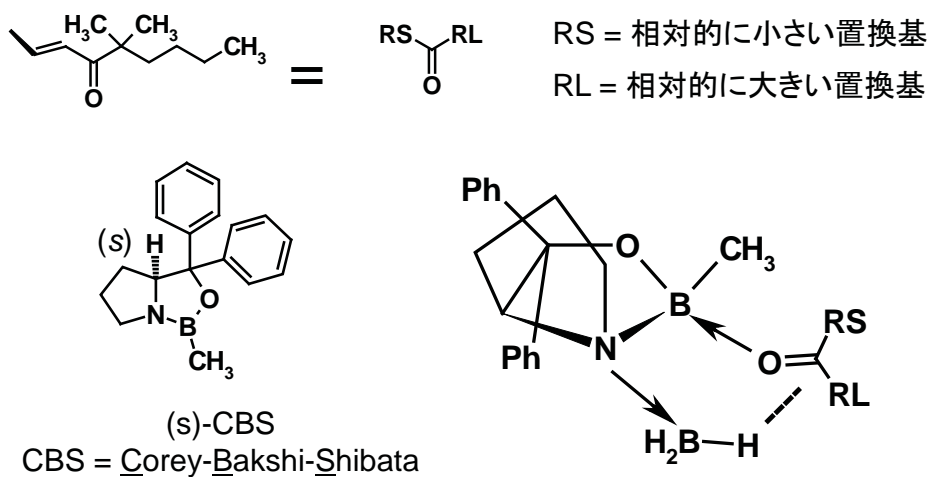


Figure 2-5. (*S*)-Me-CBS による不斉還元による 15 位炭素の立体配置の推定

臨床で応用できる医薬品候補化合物を目指していることから、ヒト EP₂ 受容体/EP₃ 受容体/EP₄ 受容体がそれぞれ発現した細胞を用いて、化合物 **3** の *in vitro* 活性を評価した。第 2 章 4 項に記載した方法にて評価した結果、Figure 2-6 に示すように、化合物 **3** は狙い通り、強い EP₂/EP₃ 作動活性を示し、第一の目的である EP₃ 作動活性の付与に成功した。

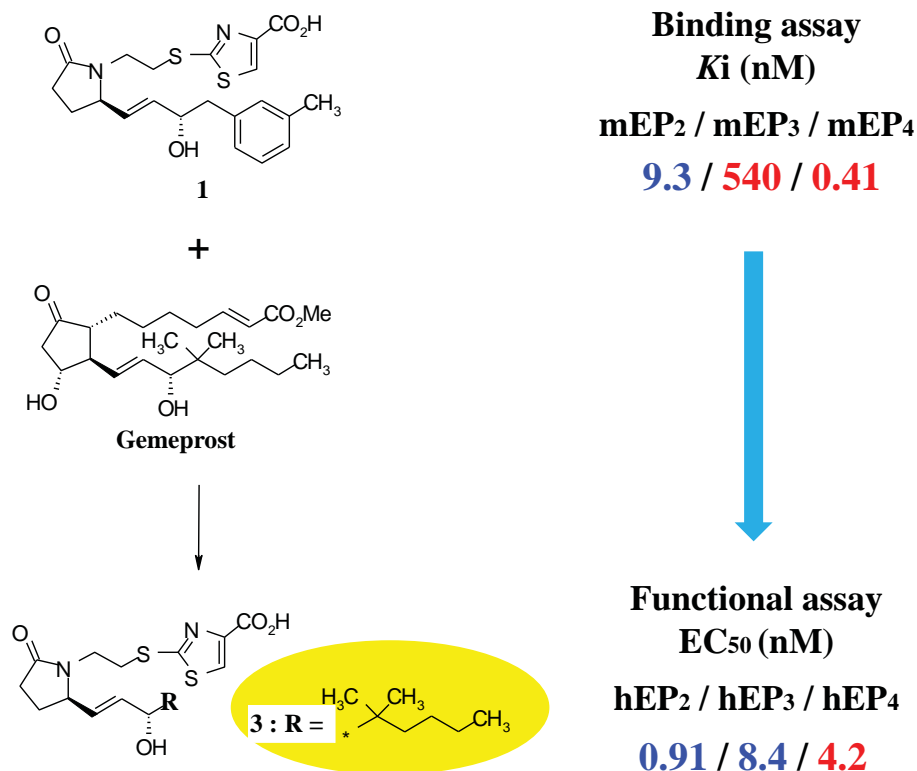


Figure 2-6. Gemeprost の ω 鎖構造を導入した化合物 **3** の化学構造式とプロフィール

その原因を考察すると、報告論文¹より、ω 鎖上のベンゼン環を直鎖構造に変換し、生体内リガンドであるプロスタグランジン E₂ の構造に対する類似度が向上したことにより、EP₃ 受容体に対する作動活性が向上したと考えられた。ただし、当然のことながら、化合物 **1** が元来有していた、望ましくない EP₄ 受容体に対する強い作動活性も合わせ持ってしまうことから、この化合物 **3** から EP₄ 作動活性を低下させることが次の課題となる。なお、化合物 **3** のヒト EP₁ 受容体に対する結合活性 (K_i 値) は 245 nM であることも確認し、EP₁ 受容体に対する結合活性はさほど強くないことが分かった。つまり、その後の構造変換において、ヒト EP₁ 受容体に対する結合活性強度 (K_i 値) を随時確認する必要があるが、主に EP₂/EP₃/EP₄ 受容体に対する作動活性強度を評価し、構造と活性の相関を考察することとした。

2-4. 結合親和性または作動活性評価方法

in vitro 活性として、結合親和性 (K_i 値) および作動活性 (EC_{50} 値) を評価した方法を示す。結合親和性はターゲット受容体との相互作用の強度を示すものである。その評価方法は各 EP 受容体を単独で強制発現させた CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞の膜画分を用いて、放射性標識リガンドである [3 H]-PGE₂ に対する被検化合物の結合阻害率をシンチレーションカウンターで測定し、50% 阻害濃度 (IC_{50} 値) を求めた。この IC_{50} 値より阻害定数 (K_i 値) を算出した⁷。

結合親和性の評価のみでは作動活性か拮抗活性かは判定できないため、作動活性を評価した。EP₂ 及び EP₄ 受容体に関しては、EP₂ または EP₄ 受容体を強制発現させた CHO 細胞を用いて、PGE₂ によって引き起こされる細胞内 cAMP 濃度の上昇に対して、50% の濃度上昇に必要な化合物の濃度を EC_{50} 値として算出した。EP₁ 及び EP₃ 受容体に関しては、EP₁ または EP₃ 受容体を強制発現させた CHO 細胞を用いて、PGE₂ によって引き起こされる細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇に対して、50% の濃度上昇に必要な化合物の濃度を EC_{50} 値として算出した。

2-5. 化合物の膜透過性と代謝安定性

化合物が経口投与を経て全身循環されるためには、投与後に消化管を通過後に肝臓において受ける代謝に対して安定である必要があるため、ヒト肝マイクロソーム中における代謝安定性を評価した⁸。また、消化管への良好な吸収性を示す上では必須となる膜透過性を評価する試験（Caco-2 試験：Caco-2 培養細胞を用いた化合物の透過性速度試験）に関しても実施した。得られた化合物 **3** の結果を以下の **Table 2-2** に示す。

Table 2-2. 化合物 **3** の膜透過性とヒト肝マイクロソーム中安定性

Compound	Caco-2 ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Stability in liver
		microsomes % remaining in HLM ^{a)}
3	0.78	100

^{a)} HLM : human liver microsomes;
concentration of test compounds, 1 μ M; liver microsomes, 1 mg/mL

ヒト肝マイクロソーム中における化合物 **3** の残存率は非常に高値であり、少なくとも肝臓中においては代謝されにくい構造であることが分かった。ただし、膜透過性に関しては非常に低いことが分かった。通常、経口剤に求められる膜透過速度として、 1.0×10^{-6} cm/s 以下は非常に低い値と考えられている。つまり、化合物 **3** は経口投与可能な物性プロファイルを有しておらず、**第2章3項**にて挙げられた *in vitro* 活性の課題だけでなく、物性面においても課題を有していることが分かった。なお、肝臓中にて代謝を受けにくい構造であっても、全身循環へと移行し、肺中で 15-PGDH によって、プロスタグランジン 15 位炭素上の 2 級水酸基が酸化代謝を受けてケトン構造に変換されることも知られており⁹、今後の展開において 15 位水酸基を有する部分構造を変換し、肝臓での代謝を受けにくく、全身循環に移行後も生体内で安定な構造に変換する必要があると考察した。

2-5. 小括

以上のように、既知 EP₂/EP₄ 作動薬である公知化合物 **1** に EP₃ 作動活性を付与するために構造変換を行った。化合物設計の方針として、化学的に安定な 5 員環ラクタム構造及び EP₂ 作動活性に大きく寄与する α 側鎖の構造は保持し、EP₃ 受容体に作用する上市済プロスタグランジン誘導体である Gemeprost の部分構造を化合物 **1** に導入した。具体的には Gemeprost の ω 側鎖構造のみを導入した結果、望ましい EP₃ 作動活性の付与に成功した。望ましくない EP₄ 受容体に対する作動活性も有していたが、今後の構造変換により、化合物 **3** から EP₄ 作動活性のみ減弱させることができれば、EP₂/EP₃ 受容体に選択的な作動薬に導くことが可能と考察した。また、経口投与可能とするためには、物性面において、特に膜透過性の改善が必要と考えられた。そのための評価として、Caco-2 培養細胞を用いた化合物の透過性速度試験を用いることが適切であると考えた。

2-6. 実験の部

General Procedure

Analytical samples were homogeneous as confirmed by TLC, and afforded spectroscopic results consistent with the assigned structures. Proton nuclear magnetic resonance spectra (^1H NMR) were taken on a Varian Mercury 300 spectrometer, Varian GEMINI-200 or VXR-200s spectrometer using deuterated chloroform (CDCl_3), deuterated methanol (CD_3OD) and deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d_6) as the solvent. Carbon nuclear magnetic resonance spectra (^{13}C NMR) were taken on a Varian Mercury 300 spectrometer using deuterated chloroform (CDCl_3) as the solvent. Fast atom bombardment (FABMS, HRMS) and electron ionization (EI) mass spectra were obtained on a JEOL JMS-DX303HF spectrometer. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) mass spectra were determined on a HITACHI MI200H spectrometer. Infrared spectra (IR) were measured in a Perkin-Elmer FT-IR 1760X spectrometer. Optical rotations were measured using a 2 mL cell with a 1 dm path length on a JASCO DIP-1000. Column chromatography was carried out on silica gel [Merck Silica Gel 60 (0.063 – 0.200 μm), Wako gel C-200, or Fuji Silysia FL60D]. Thin layer chromatography was performed on silica gel (Merck TLC or HPTLC plates, Silica Gel 60 F₂₅₄). The following abbreviations for solvents and reagents are used; diethyl ether (Et_2O), *tert*-butyl methyl ether (MTBE), *N,N*-dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol (EtOH), ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH), tetrahydrofuran (THF), methanol (MeOH), dichloromethane (CH_2Cl_2), chloroform (CHCl_3), dimethoxyethane (DME), acetonitrile (CH_3CN), hexamethylphosphoramide (HMPA), *N,N'*-dimethylpropyleneurea (DMPU), 1,3-dimethyl-2-imidazolinone (DMI), sulfur trioxide/pyridine complex ($\text{SO}_3\text{-Py}$), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), tetrabutylammonium fluoride (TBAF).

***n*-Butyl 2-[(2-[(2*R*)-2-[(1*E*)-4,4-dimethyl-3-oxo-1-octenyl]-5-oxo-1-pyrrolidinyl]ethyl)sulfanyl]-1,3-thiazole-4-carboxylate (14)**

To a solution of the compound **13^{ref}** (414 mg) in dimethylsulfoxide (3.00 mL)/ethyl acetate (6.00 mL) were added triethylamine (0.97 mL) and sulfur trioxide-pyridine complex (550 mg) at 10°C and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. To the reaction solution was added 1N hydrochloric acid and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give crude aldehyde. The compound was used in the next reaction without purification. To sodium hydride (62.7 % in oil) (60.0 mg) was added slowly a solution of dimethyl (3,3-dimethyl-2-oxoheptyl)phosphonate (403 mg) in anhydrous tetrahydrofuran (4.30 mL) at 0°C and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. To the reaction solution was added slowly a solution of the obtained crude aldehyde (412 mg) in anhydrous tetrahydrofuran (4.00 mL) at room temperature and the solution was stirred for 2 hours. To the reaction solution was added 1N hydrochloric acid at 0°C and the solution was

extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane:ethyl acetate=1:1) to give compound **14** as colorless oil (501 mg, 67% yield in 2steps).

TLC : Rf 0.73 (ethyl acetate);

NMR (CDCl₃) : δ 0.83 (m, 12H), 1.39 (m, 8H), 1.70 (m, 4H), 2.34 (m, 2H), 3.09 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 4.33 (m, 3H), 4.50 (m, 1H), 6.64 (m, 2H), 8.01(s, 1H).

***n*-Butyl 2-[(2-[(2*R*)-2-[(1*E*,3*R*)-3-hydroxy-4,4-dimethyl-1-octenyl]-5-oxo-1-pyrrolidinyl)ethyl)sulfanyl]-1,3-thiazole-4-carboxylate (**15**)**

To a solution of the compound **14** (501 mg) in THF (5.20 mL) was added (*S*)-CBS in toluene (1.10 mL), BH₃ THF in THF 1.0M (1.10 ml) at 0°C and the solution was stirred for 1 hour. To the reaction solution was added ethanol and water. The solution was extracted with ethyl acetate and washed with water and brine. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane:ethyl acetate=2:3) to give compound **15** as colorless oil (72.4 mg, 14% yield).

TLC : Rf 0.26 (hexane: ethyl acetate =1:2);

NMR (CDCl₃) : δ 0.85 (m, 12H), 1.42 (m, 8H), 1.66 (m, 4H), 2.44 (m, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.44 (m, 1H), 4.35 (m, 3H), 4.55 (m, 1H), 6.62 (m, 2H), 8.04(s, 1H).

2-[(2-[(2*R*)-2-[(1*E*,3*R*)-3-hydroxy-4,4-dimethyl-1-octenyl]-5-oxo-1-pyrrolidinyl)ethyl)sulfanyl]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (3**)**

To a solution of the compound **15** (72.4 mg) in methanol (1.00 mL) was added an aqueous solution of 2N sodium hydroxide (0.15 mL) at 0°C and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. To the reaction solution was added an aqueous solution of 2N hydrochloric acid (0.15 mL). The solution was extracted with ethyl acetate and washed with water and brine. The reaction solution was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give compound **3** as white paste (36.0 mg, 58% yield).

TLC : Rf 0.54 (ethyl acetate:methanol:acetic acid=8:1:1);

APCI, Neg. : 425 (M - H)-.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 0.89 (m, 9 H) 1.27 (m, 6 H) 1.81 (m, 1 H) 2.34 (m, 3 H) 3.41 (m, 3 H) 3.83 (m, 2 H) 4.17 (m, 1 H) 5.57 (dd, J=14.92, 8.33 Hz, 1 H) 5.84 (dd, J=14.92, 6.30 Hz, 1 H) 8.09 (s, 1 H).

Measurement of hEP₁ receptor binding assay

Competitive binding studies were conducted using radiolabeled ligands and membrane fractions prepared from Chinese hamster ovary (CHO) cells, which stably express the prostanoid receptors hEP₁. Membranes from CHO cells expressing prostanoid receptors were incubated with a radiolabeled ligand (i.e. 2.5 nM [³H]PGE₂) and test compounds at various concentrations in an assay buffer (i.e. 10 mM KH₂PO₄-KOH buffer containing 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂ and 0.1 mM NaCl, pH 6.0). Incubation was carried out at 25 °C for 60 min, with the exception of mEP₁, which was incubated for 20 min. Incubation was terminated via filtration through a Whatman GF/B filter. The filter was subsequently washed with ice-cold buffer (10 mM KH₂PO₄-KOH buffer containing 0.1 mM NaCl, pH 6.0), and the radioactivity on the filter was measured in a 6 mL liquid scintillation (ACSI) mixture with a liquid scintillation counter. Non-specific binding was achieved by adding excess amounts of unlabeled PGE₂ in the assay buffer. The concentration that causes 50% of inhibition (IC₅₀ value) was estimated from the regression curve. The K_i value (M) was calculated according to the following equation: $K_i = IC_{50} / (1 + [L]/K_d)$, where [L] is the concentration of radiolabeled ligand and K_d is the dissociation constant of radiolabeled ligand for the prostanoid receptor of interest.

Measurement of cAMP production for hEP₂ receptor or hEP₄ receptor agonistic activity

Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing human EP₂ or EP₄-receptor were cultured in 24-well plates (1 × 10⁵ cells/well). After 2 days, the media were removed and cells were washed with 500 μL of Minimum Essential Medium (MEM) and incubated for 10 min in 500 μL of buffer (MEM containing 2 μM of diclofenac) at 37 °C. After the removal of buffer via suction, cells were pre-incubated in 450 μL of assay medium (containing 1% of BSA) for 10 min at 37 °C. The reaction was started with the addition of each test compound in 50 μL of assay buffer. After incubation for 10 min at 37 °C, the reaction was terminated by adding 500 μL of ice-cold 10% trichloroacetic acid. cAMP production was determined via a cAMP radioimmunoassay kit (Amersham).

Measurement of Ca²⁺ production for hEP₃ receptor agonistic activity

To measure human EP₃ agonistic activities, 100 μL loading medium (medium containing 5 μmol/L fura-2-AM solution, 2.5 mmol/L probenecid, 20 μmol/L indomethacin, and 10 mmol/L HEPES) was added, and the cells were incubated for about 60 minutes at 37 °C in a CO₂ (5% CO₂, 95% air) incubator to incorporate the fura-2. An assay buffer [120 μL HBSS containing 1 w/v% albumin from bovine serum (Sigma-Aldrich Corp.), 2.5 mmol/L probenecid, 2 μmol/L indomethacin, and 20 mmol/L HEPES] was added. The intracellular calcium level was determined using a Fluorescence Drug Screening System (FDSS-3000, Hamamatsu Photonics KK). Then, 2.45 min after the start of measurement at 37°C, compound (0.03 to 300 nmol/L for EP₃) and PGE₂ (0.03 to 300 nmol/L for

EP₃) were added. Measurements were taken at approximately 3-sec intervals, and the indicator of the change in intracellular calcium level was the change in the fluorescence intensity ratio (f340/f380) at 500 nm during irradiation with two alternating wavelengths of excitation light (340 nm, 380 nm).

Measurement of Caco-2 membrane permeability assay

Grow Caco-2 cells on a 12-well Costar Transwell plate (with a collagen-coated fine porous polycarbonate membrane) until a confluent monolayer is formed. Prepare buffer for permeability assay using 10 mM HEPES and Hank's balanced salt solution containing 15 mM glucose and 0.2 mM Lucifer yellow with the pH being adjusted at 7.4. Add the test substance solution to the apical side (for the A-to-B permeability) or the basolateral side (for the B-to-A permeability) of the Caco-2 cell monolayer at a final concentration of 1 μ M, and then incubate the plate in a humidified incubator (5% CO₂, 37 °C). Two h later, take aliquots from the receiver chambers. Each determination was performed in duplicate. The flux of co-dosed lucifer yellow was also measured for each monolayer to ensure no damage was inflicted to the cell monolayers during the flux period. Determine test substance concentrations in the samples by LC/MS/MS.

The apparent permeability coefficient (P_{app}) is calculated according to the following equation:

$$P_{app} = (dCr/dt) \times V_r / (A \times C_0)$$

dCr/dt: slope of compound accumulation in the receiver compartment over time (μ M/s)

V_r: volume of the receiver compartment (cm³)

A: area of the cell monolayer (1.13 cm² for 12-well Transwell plate)

C₀: initial normality of the buffer (μ M)

The involvement of efflux transporter(s) such as P-gp is suspected if the ratio of the B-to-A P_{app} to the A-to-B P_{app} is 2 or more.

Measurement of human microsome stability assessments

The test compound (5 μ L, 10 mM in DMSO) was diluted in 995 μ L of 50% acetonitrile in water to make a 50 μ M solution. Phosphate buffer (0.1 M, 245 μ L) containing 1 mg/mL human liver microsomes and NADPH-co-factor was added into a reaction container, pre-warmed to 37 °C in a water bath, and incubated for 5 min. The reaction was initiated by the addition of 5 μ L of the solution containing the test compound (in 0.975% acetonitrile with 0.05% DMSO, final concentration of 1 μ M). Immediately after the initiation of the reaction, a 20 μ L aliquot was taken from the solution and transferred into 180 μ L of acetonitrile containing the internal standard (candesartan) to terminate the reaction. A 20 μ L aliquot of the mixture was mixed with 180 μ L of 50% acetonitrile on a plate with a filter for deproteinization and filtered by suction. The filtrate was used as a standard sample. After incubation for 60 min, a 20 μ L aliquot was taken from the solution and then underwent the abovementioned procedure to obtain a reaction sample. The obtained

samples were measured on an LC-MS/MS system. The percent remaining (%) was calculated by dividing the peak area ratio (i.e., test compound/I.S.) for the reaction sample by the peak area ratio for the standard sample and multiplying by 100.

2-7. 参考文献

1. Kambe, T.; Maruyama, T.; Nakai, Y.; Yoshida, H.; Oida, H.; Maruyama, T.; Abe, N.; Nishiura, A.; Nakai, H.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2235.
2. 松本公一郎, 「日薬理誌」, **1981**, 78, 231.
3. 第十七改正日本薬局方解説書に収載.
- 4.. Horner, L.; Hoffmann, H. M. R.; Wippel, H. G.; *Ber.* **1958**, *91*, 61.
5. Wadsworth, W. S., Jr.; Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1733.
6. Corey, E. J.; Bakshi, R. K.; Shibata, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5551.
- 7 Kiriya, M.; Ushikubi, F.; Kobayashi, T.; Hirata, M.; Sugimoto, Y.; Narumiya, S. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 217.
8. Komura, H.; Shigemoto, Y.; Ano, R.; Moriwaki, T.; Matsuda, K.; Kawahara, I.; Murayama, Y.; Yoshida, N. *J. Pharm. Soc.*, **2005**, *125*, 131.
9. Anggaard, E.; Samuelsson, B. *Prostaglandins*, **1966**, *25*, 293.

第3章

EP₄作動活性低下による選択性向上

3-1. 緒言

第2章で見出した化合物3は強いEP₄作動活性を示したことから、強いEP₂/EP₃作動活性を保持しながら、EP₄作動活性のみを低下させる必要があった。そこで、Figure 3-1に示すように、公知EP₁/EP₂/EP₃/EP₄受容体のアミノ酸残基の一次配列情報¹及び類似のGPCRであるスフィンゴシン1リン酸-1受容体(=S1P₁受容体)と低分子の複合体X線結晶構造²を基に考察した。なお、EP₁/EP₂/EP₃/EP₄受容体に関しては、現時点で低分子リガンドとの複合体X線結晶構造情報が公知ではないことから、計算化学に基づいてドッキングスタディを行い、化合物3のEP受容体との結合様式を推定した。その結果、α鎖末端のカルボン酸部分については酸性結合領域と呼ばれる受容体構造に位置し、5員環ラクタム構造及びω鎖については、脂溶性結合領域と呼ばれる受容体構造に位置するものと推定された。

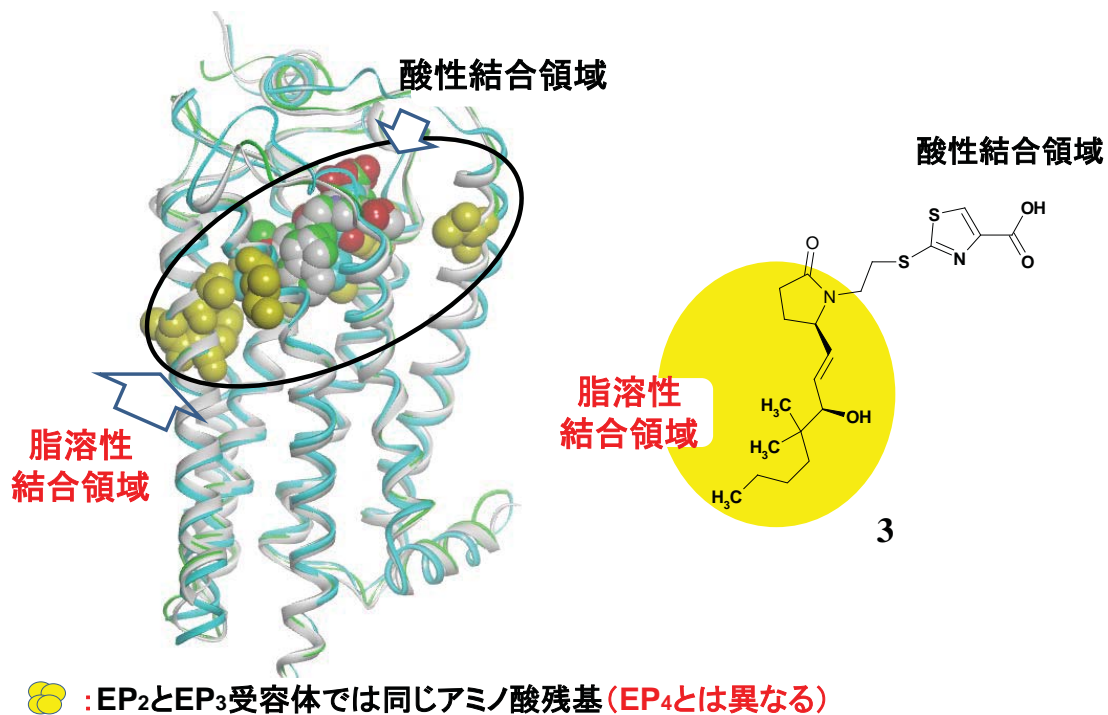


Figure 3-1. 受容体と化合物3の推定結合状態

アミノ酸残基の一次配列情報より、EP₂及びEP₃受容体では同じであるが、EP₄受容体とは異なるアミノ酸残基を有する構造情報を7つのTM(transmembrane domain、膜貫通領域)ごとに抽出した結果をFigure 3-2からFigure 3-8に示す。その結果、TM3とTM5の脂溶性結合領域に特にEP₄受容体とのアミノ酸一次配列の違いが多いことが分かった。この領域には、化合物3の環状ラクタム構造及びω側鎖構造が位置すると推察されたため、課題であるEP₂/EP₃選択性の向上に対しては、これら5員環ラクタム構造またはω鎖側鎖構造の変換が効果的ではないかと推察した。

TM1

EP ₂	-	W18	L19	P20	P21	G22	E23	S24	P25	A26	I27	S28	S29	V30	M31	F32	S33	A34	G35	V36	L37	G38	N39	L40	I41	A42	L43	A44	L45	L46	A47	R48	R49
EP ₃	-	E45	D46	C47	G48	S49	V50	S51	V52	A53	F54	P55	I56	T57	M58	L59	L60	T61	G62	F63	V64	G65	N66	A67	L68	A69	M70	L71	L72	V73	S74	R75	S76
EP ₄	S13	P14	D15	R16	L17	N18	S19	P20	V21	T22	I23	P24	A25	V26	M27	F28	I29	F30	G31	V32	V33	G34	N35	L36	V37	A38	I39	V40	V41	L42	C43	K44	S45

- : 化合物が結合していると推察される領域
 ■ : EP₂受容体とEP₃受容体では同じだが、EP₄受容体は異なるアミノ酸

Figure 3-2. EP₂/EP₃/EP₄受容体のアミノ酸一次配列情報 (TM1)

TM2

EP ₂	R60	R61	S62	S63	L64	S65	L66	F67	H68	V69	L70	V71	T72	E73	L74	V75	F76	T77	D78	L79	L80	G81	T82	C83	L84	I85	S86	P87	V88	V89	L90	A91	S92	Y93	A94	R95	N96
EP ₃	-	-	-	-	-	K86	S87	F88	L89	L90	C91	I92	G93	W94	L95	A96	L97	T98	D99	L100	V101	G102	Q103	L104	L105	T106	T107	P108	V109	V110	I111	V112	-	-	-	-	-
EP ₄	-	-	-	-	-	T52	T53	F54	Y55	T56	L57	V58	C59	G60	L61	A62	V63	T64	D65	L66	L67	G68	T69	L70	L71	V72	S73	P74	V75	T76	I77	A78	T79	Y80	M81	-	-

- : 化合物が結合していると推察される領域
 ■ : EP₂受容体とEP₃受容体では同じだが、EP₄受容体は異なるアミノ酸

Figure 3-3. EP₂/EP₃/EP₄受容体のアミノ酸一次配列情報 (TM2)

TM3

EP ₂	L102	A103	P104	E105	S106	R107	A108	C109	T110	Y111	F112	A113	F114	A115	M116	T117	F118	F119	S120	L121	A122	T123	M124	L125	M126	L127	F128	A129	M130	A131	L132	E133	R134	Y135	L136	S137	H138	G139	H140
EP ₃	I123	D124	P125	S126	G127	R128	L129	C130	T131	F132	F133	G134	L135	T136	M137	T138	V139	F140	G141	L142	S143	S144	L145	F146	I147	A148	S149	A150	M151	A152	V153	E154	R155	A156	L157	A158	I159	R160	A161
EP ₄	-	-	-	G88	Q89	P90	L91	C92	E93	Y94	S95	T96	F97	I98	L99	L100	F101	F102	S103	L104	S105	G106	L107	S108	I09	I110	C111	A112	M113	S114	V115	E116	R117	Y118	L119	A120	H21	N122	H123

- : 化合物が結合していると推察される領域
 ■ : EP₂受容体とEP₃受容体では同じだが、EP₄受容体は異なるアミノ酸

Figure 3-4. EP₂/EP₃/EP₄受容体のアミノ酸一次配列情報 (TM3)

TM4

EP ₂	S149	R150	S151	G152	G153	L154	A155	V156	L157	P158	V159	I160	Y161	A162	V163	S164	L165	L166	F167	C168	S169	L170	P171	L172	L173	D174	Y175
EP ₃	K170	T171	R172	A173	T174	R175	A176	V177	L178	L179	G180	V181	W182	L183	A184	V185	L186	A187	F188	A189	L190	L191	P192	V193	L194	G195	-
EP ₄	D132	K133	R134	L135	A136	G137	L138	T139	L140	F141	A142	V143	Y144	A145	S146	N147	V148	L149	F150	C151	A152	L153	P154	N155	M156	-	-

□ : 化合物が結合していると推察される領域

■ : EP₂受容体とEP₃受容体では同じだが、EP₄受容体は異なるアミノ酸

Figure 3-5. EP₂/EP₃/EP₄受容体のアミノ酸一次配列情報 (TM4)

TM5

EP ₂	-	-	-	-	T194	A195	Y196	L197	Q198	L199	Y200	A201	T202	L203	L204	L205	L206	L207	I208	V209	S210	V211	L212	A213	C214	N215	F216	S217	V218	I219	L220	N221	L222	I223	R224	M225	H226	R227	R228	S229	R230	R231	S232	R233	C234	G235	
EP ₃	-	-	-	-	F229	F230	A231	S232	A233	F234	A235	F236	L237	G238	L239	L240	A241	L242	T243	V244	T245	F246	S247	C248	N249	L250	A251	T252	I253	K254	A255	L256	V257	S258	R259	C260	R261	A262	K263	A264	T265	-	-	-	-	-	-
EP ₄	V178	T179	A180	H181	A182	A183	Y184	S185	Y186	M187	Y188	A189	G190	F191	S192	S193	F194	L195	I196	L197	A198	T199	V200	L201	C202	N203	V204	L205	V206	C207	G208	A209	L210	L211	R212	M213	H214	R215	Q216	F217	M218	R219	R220	T221	S222	L223	

□ : 化合物が結合していると推察される領域

■ : EP₂受容体とEP₃受容体では同じだが、EP₄受容体は異なるアミノ酸

Figure 3-6. EP₂/EP₃/EP₄受容体のアミノ酸一次配列情報 (TM5)

TM6

EP ₂	-	-	R253	V254	S255	M256	A257	E258	E259	T260	D261	H262	L263	I264	L265	L266	A267	I268	M269	T270	I271	T272	F273	A274	V275	C276	S277	L278	P279	F280	T281	I282	F283	A284	Y285	M286	N287	E288	T289	S290	-	-	-	-			
EP ₃	-	-	A271	Q272	W273	G274	R275	I276	T277	T278	E279	T280	A281	I282	Q283	L284	M285	G286	I287	M288	C289	V290	L291	S292	V293	C294	W295	S296	P297	L298	L299	I300	M301	M302	L303	K304	M305	I306	F307	N308	Q309	T310	S311	-	-	-	-
EP ₄	-	-	R261	R262	I263	A264	G265	A266	E267	I268	Q269	M270	V271	I272	L273	L274	I275	A276	T277	S278	L279	V280	V281	L282	I283	C284	S285	I286	P287	L288	V289	V290	R291	V292	F293	V294	N295	Q296	L297	Y298	-	-	-	-			

□ : 化合物が結合していると推察される領域

■ : EP₂受容体とEP₃受容体では同じだが、EP₄受容体は異なるアミノ酸

Figure 3-7. EP₂/EP₃/EP₄受容体のアミノ酸一次配列情報 (TM6)

TM7

EP ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K295	W296	D297	L298	Q299	A300	L301	R302	F303	L304	S305	I306	N307	S308	I309	I310	D311	P312	W313	V314	F315	A316	I317	L318	R319	P320	P321	V322	L323	R324	L325	M326	R327	S328	V329	L330	-	-	-	-			
EP ₃	T317	H318	T319	E320	K321	Q322	K323	E324	C325	N326	F327	F328	L329	I330	A331	V332	R333	L334	A335	S336	L337	N338	Q339	I340	L341	D342	P343	W344	V345	Y346	L347	L348	L349	R350	K351	I352	L353	L354	R355	K356	F357	C358	Q359	I360	R361	Y362	-	-	-	-		
EP ₄	-	-	-	-	R304	E305	V306	S307	K308	N309	P310	D311	L312	Q313	A314	I315	R316	I317	A318	S319	V320	N321	P322	I323	L324	D325	P326	W327	I328	Y329	I330	L331	L332	R333	K334	T335	V336	L337	S338	K339	A340	I341	E342	K343	I344	K345	C346	L347	-	-	-	-

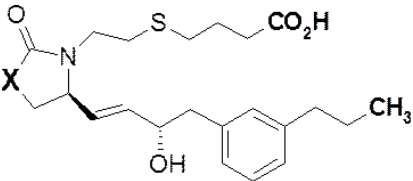
□ : 化合物が結合していると推察される領域

■ : EP₂受容体とEP₃受容体では同じだが、EP₄受容体は異なるアミノ酸

Figure 3-8. EP₂/EP₃/EP₄受容体のアミノ酸一次配列情報 (TM7)

3-2. EP₄作動活性を低下させる化合物設計

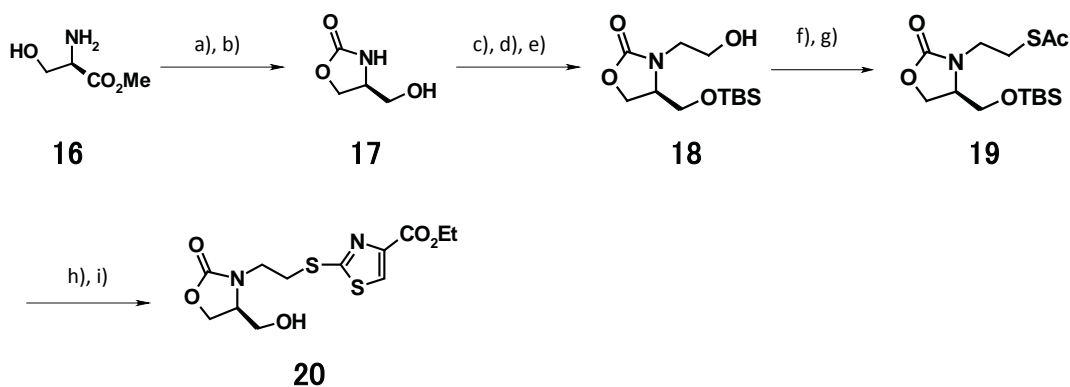
前項にて、受容体の脂溶性領域に位置する構造の変換により、EP₄作動活性のみ低下させる可能性について考察した。タンパク構造の違いに基づく考察に加えて、公知 EP₂/EP₄ 作動薬の報告論文³中に記載されている構造活性相関情報も活用することとした。第2章で述べた化合物 **1** (EP₂/EP₄ 作動薬) を見出す過程において、環状カーバメート構造と環状ラクタム環のラット EP₄ 受容体に対する作動活性を比較 (**Figure 3-9**) しており、環状カーバメート構造の方が環状ラクタム構造に比べて、約 40 倍低い活性を示すことを報告している。そこで、5員環部分の 10 位炭素原子を酸素原子へ変換すれば、望ましくない作用である EP₄ 作動活性を低下できるのではないかと考えた。



Functional Assay EC ₅₀ (nM)			
Compound	Rat EP ₂	Rat EP ₃	Rat EP ₄
X = CH₂	-	-	2.3
X = O	-	-	93

Figure 3-9. 環状カーバメート構造への変換と EP₄ 作動活性との相関³

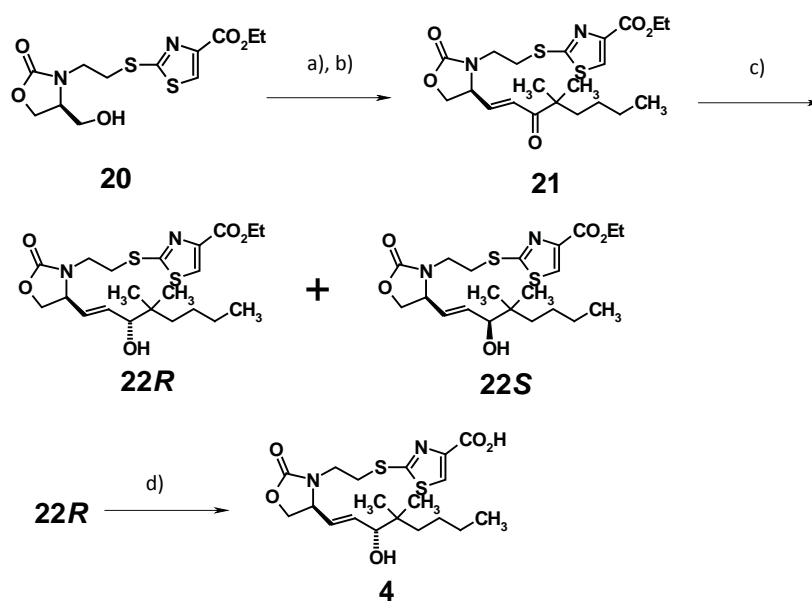
5員環部分の10位炭素原子を酸素原子へ変換する構造の合成に必要となる中間体 **20** の合成法を **Scheme 3-1** に示す。*D*-serine methyl ester **16** をトリホスゲンで処理して環状カーバメート構造に変換し、 NaBH_4 を用いて還元したアルコール体 **17** を得た後、水酸基を TBS にて保護し、環状カーバメート上の窒素原子から Bromo ethyl acetate を用いてアルキル化、 NaBH_4 を用いてエステル基を還元し、アルコール体 **18** を得た。水酸基を Ms 化した後、チオ酢酸 S-カリウムを用いて求核脱離反応を行い、チオアセテート体 **19** を得た。塩基性条件下にて ethyl 2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate と反応させることでチアゾールエステル構造を導入後、TBAF にて TBS 基を脱保護することでアルコール体 **20** を中間体として得た。



- a) K_2CO_3 , water, triphosgene, toluene, 0°C , b) NaBH_4 , EtOH, r.t., y. 51% (for 2 steps)
 c) TBSCl, imidazole, DMF, r.t., d) bromoethyl acetate, KO^tBu , THF, r.t.
 e) NaBH_4 , THF-EtOH, r.t., y. 89% (for 3 steps), f) MsCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C ,
 g) KSAc, DMF, r.t., y. 99% (for 2 steps), h) ethyl 2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate, tributylphosphine, K_2CO_3 , EtOH, 50°C , i) TBAF, THF, r.t., y. 76% (for 2 steps)

Scheme 3-1. 中間体 **20** の合成法

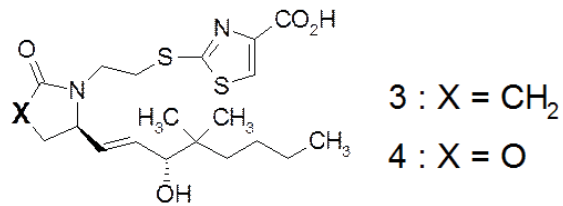
得られた合成中間体 **20** から、SO₃-Py を用いた DMSO 酸化、Horner-Emmons オレフィン化^{4,5}、エノンの還元後にカラム精製によるジアステレオマー分割を行い、加水分解を行うことで、化合物 **3** の 10 位炭素原子を酸素原子に変換した化合物 **4** を得た(Scheme 3-2)。なお、中間体 **22R** はジアステレオマー分割体のうち、高極性体であり、その立体配置は推定である。この立体配置を推定した理由は、中間体 **22R** 及び **22S** をそれぞれ加水分解して得られたカルボン酸の作動活性を評価した結果を参考とした。つまり、より強い EP₂ 並びに EP₃ 受容体に対する作動活性を中間体 **22R** から導かれた化合物 **4** が示したため、中間体 **22R** の立体配置はプロスタグランジン E₂ の 15 位炭素原子に置換した水酸基と同じではないかと考察している。



- a) SO₃-Py, Et₃N, DMSO, EtOAc, 10°C,
 b) NaH, dimethyl (3,3-dimethyl-2-oxoheptyl)phosphonate,
 THF, 0°C, y. 59% (for 2 steps), c) NaBH₄, MeOH, AcOH, -78°C,
 then separation by silica gel column chromatography,
 more polar : **22R**, less polar : **22S**,
 d) NaOHaq., MeOH, 0°C, y. 44% (for 2 steps)

Scheme 3-2. 化合物 **4** の合成法

その結果、**Figure 3-10** に示すように、化合物 **4** は、ヒト EP₂/EP₃ 受容体に対する作動活性は約 7 倍程度減弱する傾向にあったものの、ヒト EP₄ 受容体に対しては、約 80 倍減弱した。したがって、望ましい選択性プロファイルを有する化合物として、取得できた。この結果から、EP₄ 受容体は EP₂/EP₃ 受容体に比較して、特に脂溶性が低い化学構造に対して許容度が低い。言い換えると、脂溶性の高い化学構造が EP₄ 受容体に化合物が結合しやすいのではないかと考察した。この結果と前項にて述べた推察は概ね矛盾しないと考えられた。



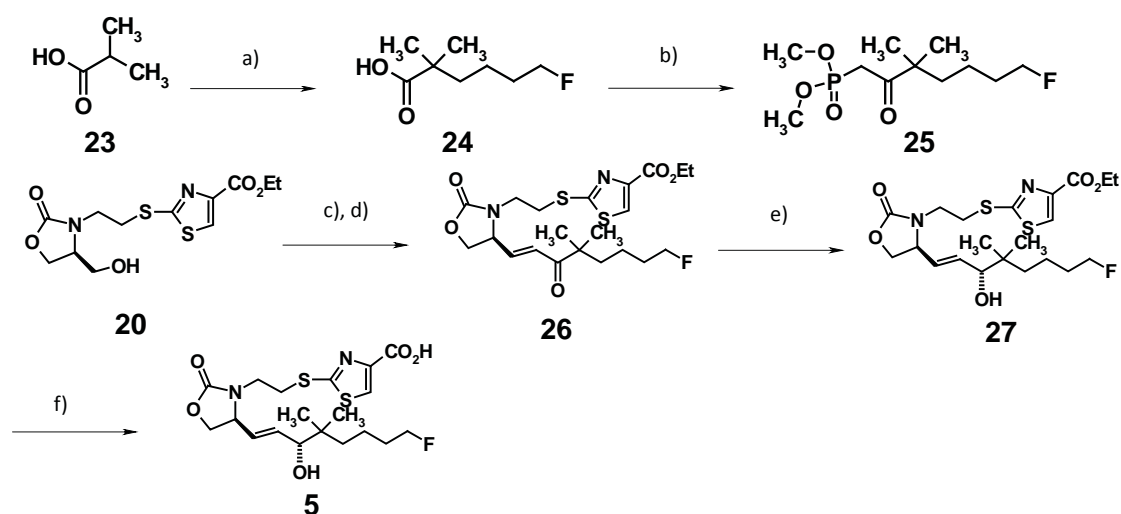
Compound	Functional Assay EC ₅₀ (nM)		
	hEP ₂	hEP ₃	hEP ₄
3	0.91	8.4	4.2
4	7.4	50	320

Figure 3-10. 環状カーバメート構造への変換と EP₂/EP₃/EP₄ 作動活性

3-3. EP₂/EP₃受容体選択的に作動活性を示す構造への変換

前項で得られた化合物 **4** の周辺誘導体を合成することで、さらにヒト EP₂/EP₃ 受容体選択的に作動活性を示す構造を探索することとした。化合物 **5** は、化合物 **4** の ω 鎖末端 20 位にフッ素原子を導入した化合物であり、フッ素原子を導入した目的は ω 側鎖部分が EP₂/EP₃ 受容体の脂溶性結合領域に対する構造であるため、脂溶性を少しでも高めるとともに、代謝位置をブロックすることにより、代謝安定性を向上させることであった。フッ素原子導入による代謝安定性向上の効果については、医薬品候補化合物の創製の過程において、多くの例が報告されている⁶。

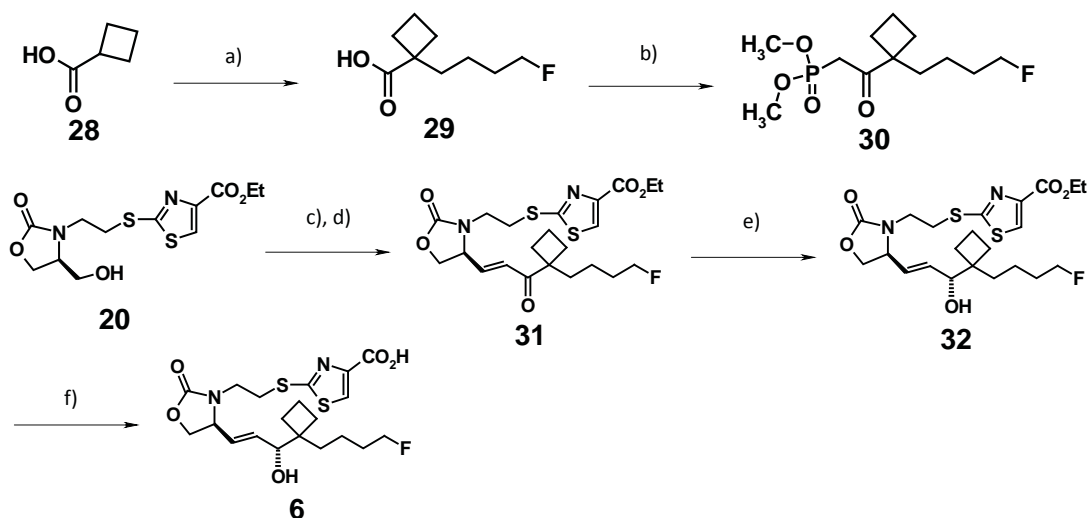
化合物 **5** は以下のように合成した(Scheme 3-3)。対応するホスホネート **25** は市販の Isobutyric Acid をアルキル化し、酸クロライドとした後、ジメチルホスホン酸メチルのリチウム塩と反応させることで合成した。その後は中間体 **20** から化合物 **4** と同様の方法により、合成した。15 位の立体配置の推定方法は化合物 **4** と同様であり、ケトン体 **26** の還元反応後、高極性アルコール体 **27** の方から導いた化合物 **5** の方が分割精製後に除去された低極性アルコール体から別途カルボン酸体に導いた化合物よりも EP₂ 作動活性、EP₃ 作動活性ともに強い結果であった。



- a) 1-Bromo-4-Fluorobutane, Diisopropylamine, *n*-BuLi in hexane, THF, r.t.,
b) SOCl₂, reflux and then, *n*-BuLi in hexane, DMMP, THF, -78°C, y.67% (for 2 steps)
c) SO₃-Py, DMSO, EtOAc, TEA, r.t., d) NaH, THF, **25**, r.t., y.67% (for 2 steps),
e) NaBH₄, MeOH, AcOH, -78°C, then separation by silica gel column chromatography,
f) 2N NaOH aq., MeOH, y.38%(for 2 steps)

Scheme 3-3. 化合物 **5** の合成法

次に設計した化合物 **6** は、化合物 **5** の 16 位のジメチル基をシクロブタン環に変換した化合物であり、以下のように合成した(Scheme 3-4)。対応するホスホネート **30** は市販の Cyclobutane carboxylic acid から **25** と同様の方法により、それぞれ合成した。その後は中間体 **20** から化合物 **4** と同様の方法により、合成した。15 位の立体配置の推定方法は化合物 **4** と同様であり、ケトン体 **31** の還元反応後、高極性アルコール体 **32** の方から導いた化合物 **6** の方が分割精製後に除去された低極性アルコール体から別途カルボン酸体へ導いた化合物よりも EP₂ 作動活性、EP₃ 作動活性ともに強い結果であった。

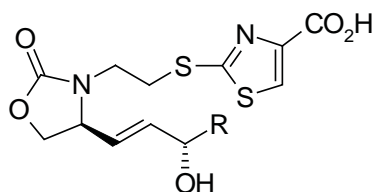


- a) 1-Bromo-4-Fluorobutane, Diisopropylamine, *n*-BuLi in hexane, THF, r.t.,
 b) SOCl₂, reflux and then, *n*-BuLi in hexane, DMMP, THF, -78°C, y.59% (for 2 steps)
 c) SO₃-Py, DMSO, EtOAc, TEA, r.t., d) NaH, THF, **30**, r.t., y.65% (for 2 steps),
 e) NaBH₄, MeOH, AcOH, -78°C, then separation by silica gel column chromatography,
 f) 2N NaOH aq., MeOH, r.t., y.35%(for 2 steps)

Scheme 3-4. 化合物 **6** の合成法

合成したこれら 3 化合物について、活性と構造との相関を考察した。構造と *in vitro* 活性の結果を **Table 3-1** にまとめて示す。その結果、EP₂ 作動活性の保持に加えて、EP₃ 作動活性の約 10 倍の向上が認められた。EP₄ 受容体については数倍の作動活性低下が認められた上に、EP₁ 受容体に対する結合活性も数倍低下していた。化合物 **6** は、化合物 **5** と比較すると EP₂ 及び EP₃ 作動活性の保持に加えて、EP₄ 受容体については数倍の作動活性低下が認められた。EP₁ 受容体に対する結合活性についても低下が認められた。これらの結果から、 ω 鎖末端 20 位にフッ素原子を導入し、なおかつ 16 位のジメチル基をシクロブタン環に変換することにより、ヒト EP₂/EP₃ 受容体作動活性には影響を与えずに、ヒト EP₁ 受容体との結合活性を約 10 倍低下したことが分かる。この結果から、EP₁ 受容体は ω 鎖末端の脂溶性が高い化学構造に対する許容度が低いことが分かる。つまり、EP₂/EP₃ 受容体と EP₁ 受容体では、結合する分子の脂溶性 (ω 鎖末端部分構造) の認識しやすさに違いがあるのではないかと考察した。現時点では、いずれの EP 受容体においても複合体 X 線結晶構造を取得できていないが、今後の X 線結晶構造解析技術の進展により、取得に成功すれば、結合様式に関するより深い考察も可能ではないかと期待される。

Table 3-1 環状カーバメート誘導体のヒト EP₂/EP₃/EP₄ 作動活性とヒト EP₁ 結合活性



compd	R	Human Functional Assay EC ₅₀ (nM)			Human Binding Assay K _i (nM)
		EP ₂	EP ₃	EP ₄	EP ₁
4		7.4	50	320	120
5		5.7	4.7	1220	431
6		2.9	10	195	1080

3-4. 小括

化合物 **3** から EP₄ 作動活性のみ減弱させることを狙いとして、EP₂ 受容体と EP₃ 受容体では同じだが、EP₄ 受容体とは異なるアミノ酸構造が多い脂溶性構造を認識する領域に位置する部分構造を変換することとした。5 員環部分の 10 位炭素原子を酸素原子へ変換した化合物 **4** について合成した結果、ヒト EP₄ 受容体に対する活性が約 80 倍減弱した。さらにその誘導体から、EP₁ との結合活性を約 10 倍減弱させた化合物 **6** を取得できた。構造と活性の相関から、EP₄ 受容体は 5 員環部分の脂溶性低下、EP₁ 受容体は ω 側鎖部分の脂溶性向上が EP₂/EP₃ 作動活性を保持した上でのそれぞれの受容体に対する選択性向上に寄与すると考察した。以上のように、強力かつ、選択的な EP₂/EP₃ 作動薬の創製に成功したため、化合物 **6** の薬物動態特性を評価し、本研究の目的である経口投与可能な化合物かどうかを確認することとした。

3-5. 実験の部

General Procedure is same as described in chapter 2-7.

(4S)-4-(hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-one (17)

D-serine methylester hydrochloride (5.76 g) was dissolved in water (52.0 mL). To the reaction solution was added potassium bicarbonate (4.08 g) and the solution was stirred for 10 minutes. To the reaction solution were added potassium bicarbonate (5.63 g) and a solution of triphosgen (14.3 g) in toluene (26.0 mL) at 0°C and the solution was stirred for 2 hours. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and the water layer was concentrated. The obtained residue was extracted with methylene chloride, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. To a solution of the obtained residue in ethanol (73.0 mL) was added sodium borohydride (1.34 g) and the solution was stirred for 3 hours. To the reaction mixture was added saturated ammonium chloride at 0°C and the solution was stirred 30 minutes at room temperature. The reaction mixture was filtrated and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (ethyl acetate : methanol=4:1), to give **17** (2.28 g, 51% yield).

TLC : R_f 0.29 (ethyl acetate:methanol=10:1); NMR (CDCl₃) : δ 3.62 (dd, *J*=11.44, 5.77 Hz, 1 H), 3.73 (m, 1 H), 4.01 (m, 1 H), 4.23 (m, 1 H), 4.49 (t, *J*=8.70 Hz, 1 H), 5.99 (s, 1 H).

(4R)-4-({tert-butyl(dimethyl)silyloxy}methyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1,3-oxazolidin-2-one (18)

To a solution of **17** (2.28 g) in dimethylformamide (20.0 mL) were added imidazole (1.60 g) and tert-butyldimethylsilyl chloride (3.09 g) and the solution was stirred at room temperature over night. The reaction solution was poured into ice and extracted with ethyl acetate. The obtained organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. To a solution of the obtained residue in anhydrous tetrahydrofuran (45.0 mL) was added tert-butoxy potassium (2.41 g) under cooling with ice and the solution was stirred for 10 minutes. Bromo ethyl acetate (2.40 mL) was added dropwise to the reaction solution, which was stirred at room temperature for 3 hours. To the reaction mixture was added saturated ammonium chloride and the solution was extracted with ethyl acetate. The obtained organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. To a solution of the obtained residue in tetrahydrofuran/ethanol (7:1) (46.0 mL) was added sodium borohydride (2.22 g) and the solution was stirred at room temperature for 2 hours. The reaction mixture was poured into ice/saturated ammonium chloride and extracted with ethyl acetate. The obtained organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give **18** (4.62 g).

TLC R_f : 0.35 (hexane:ethyl acetate=1:2); NMR (CDCl₃) : δ 0.09 (s, 6 H), 0.90 (s, 9 H), 2.76 (s, 1 H), 3.45 (m, 2 H), 3.83 (m, 5 H), 4.13 (dd, *J*=8.60, 5.68 Hz, 1 H), 4.38 (dd, *J*=8.79, 8.60 Hz, 1 H).

S-{2-[(4*R*)-4-([*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy)methyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl}ethyl} ethanethioate (19**)**

Methanesulfonyl chloride (1.43 mL) was added dropwise to a solution of **19** (4.58 g) and triethylamine (3.50 mL) in methylene chloride (32.0 mL) under cooling with ice and the solution was stirred at 0°C for 1 hour. To the reaction solution was added water and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with 1N hydrochloric acid, water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. To a solution of the obtained residue in dimethylformamide (17.0 mL) was added potassium thioacetate (1.91 g) and the solution was stirred at room temperature for 2 hours. To the reaction solution was added water and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give **19** (5.56 g, 99% yield).

TLC : R_f 0.76 (hexane:ethyl acetate=1:2); NMR (CDCl₃) : δ 0.08 (s, 6 H), 0.89 (s, 9 H), 2.35 (s, 3 H), 3.07 (m, 2 H), 3.31 (m, 1 H), 3.57 (m, 1 H), 3.68 (dd, J=10.80, 4.03 Hz, 1 H), 3.79 (m, 1 H), 3.93 (m, 1 H), 4.12 (m, 1 H), 4.33 (t, J=8.70 Hz, 1 H).

Ethyl 2-({2-[(4*S*)-4-(hydroxymethyl)-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]ethyl}thio)-1,3-thiazol-4-carboxylate (20**)**

To a solution of **19** (5.56 g), ethyl 2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate (4.34 g) and tributylphosphine (0.46 mL) in ethanol (36.0 mL) was added potassium carbonate (3.70 g) under cooling with ice and the solution was stirred at room temperature for 1 hour and subsequently at 50°C overnight. To the reaction solution was added water and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. To a solution of the obtained residue in tetrahydrofuran (18.0 mL) was a solution of 1M tetrabutylammonium iodide in tetrahydrofuran (18.4 mL) at 0°C and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. To the reaction solution was added water and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane : ethyl acetate =2:3), to give **20** (4.29 g, 76% yield).

TLC : R_f 0.43 (ethyl acetate); NMR (CDCl₃) : δ 1.39 (m, 3 H), 3.66 (m, 6 H), 4.14 (m, 2 H), 4.39 (m, 3 H), 8.02 (s, 1 H).

Ethyl 2-[(2-[(4*S*)-4-[(1*E*)-4,4-dimethyl-3-oxo-1-octenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylate (21**)**

To a solution of **20** (338 mg) in dimethylsulfoxide (3.40 mL)/ethyl acetate (6.80 mL) were added triethylamine (1.00 mL) and sulfur trioxide-pyridine complex (650 mg) at 10°C and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. To the reaction solution was added 1N hydrochloric acid and

the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. To sodium hydride (60.0 % in oil) (49.0 mg) was added slowly a solution of dimethyl (3,3-dimethyl-2-oxoheptyl)phosphonate (332 mg) in anhydrous tetrahydrofuran (7.30 mL) at 0°C and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. To the reaction solution was added slowly a solution of the obtained residue (336 mg) in anhydrous tetrahydrofuran (2.90 mL) at room temperature and the solution was stirred for 2 hours. To the reaction solution was added 1N hydrochloric acid at 0°C and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane:ethyl acetate =3:2), to give **21** (211 mg, 59% yield).

TLC : Rf 0.50 (hexane:ethyl acetate=1:1); NMR (CDCl₃) : δ 0.83 (t, J=7.14 Hz, 3 H), 1.11 (m, 10 H), 1.43 (m, 5 H), 3.32 (m, 1 H), 3.53 (m, 2 H), 3.80 (m, 1 H), 4.03 (m, 1 H), 4.41 (m, 3 H), 4.76 (m, 1 H), 6.71 (m, 2 H), 8.01 (s, 1 H).

Ethyl 2-[(2-[(4S)-4-[(1E,3R)-3-hydroxy-4,4-dimethyl-1-octenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylate (22R)

To a solution of **21** (124 mg) in anhydrous methanol (1.40 mL) were added sodium borohydride (10.4 mg) and a catalytic amount of acetic acid at -78°C and the solution was stirred at the same temperature for 1 hour. After return to room temperature, to the reaction solution was added water and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane:ethyl acetate=1:1), to give the more polar compound **22R** (87.2 mg).

TLC : Rf 0.25 (hexane:ethyl acetate=1:1); NMR (CDCl₃) : δ 0.84 (m, 9 H), 1.26 (m, 6 H), 1.39 (t, J=7.14 Hz, 3 H), 3.54 (m, 4 H), 3.85 (d, J=6.04 Hz, 1 H), 3.99 (m, 1 H), 4.40 (m, 4 H), 5.66 (m, 1 H), 5.92 (m, 1 H), 8.02 (s, 1 H).

2-[(2-[(4S)-4-[(1E,3R)-3-hydroxy-4,4-dimethyl-1-octenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]ethyl)sulfanyl]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (4)

To a solution of **22R** (84.0 mg) in methanol (1.00 mL) was added an aqueous solution of 2N sodium hydroxide (0.19 mL) at 0°C and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. To the reaction solution was added an aqueous solution of 2N hydrochloric acid (0.30 mL). The solution was extracted with ethyl acetate and washed with water and brine. The reaction solution was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give compound **4** (78.8 mg, 44% yield).

TLC : Rf 0.80 (ethyl acetate:methanol:acetic acid=8:1:1); NMR (CDCl₃) : δ 0.88 (m, 9 H), 1.23 (m, 6 H), 3.56 (m, 6 H), 3.91 (d, J=5.95 Hz, 1 H), 4.00 (m, 1 H), 4.43 (m, 2 H), 5.64 (dd, J=15.10, 7.60 Hz, 1 H), 5.96 (dd, J=15.10, 5.95 Hz, 1 H), 8.12 (s, 1 H).

6-fluoro-2,2-dimethylhexanoic acid (24)

To a solution of Diisopropylamine (3.50 ml) in THF (27.0 ml) were added *n*-BuLi in hexane 1.58 M (15.8 ml) at 0°C and the solution was stirred at same temperature for 0.5 hour. To the reaction solution was added a solution of **23** (1.00 g) in THF (10.0 ml) at 0°C and the solution was stirred at same temperature for 0.5 hour. To the reaction solution was added 1-Bromo-4-Fluorobutane (1.40 ml) at 0°C and the solution was stirred at room temperature for 2 hour. To the reaction solution was added 2N hydrochloric acid at 0°C and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give **24** (1.84 g).

TLC : Rf 0.34 (hexane:ethyl acetate:acetic acid=8:2:1); NMR (CDCl₃) : δ 0.85 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 1.35 (m, 4H), 1.79 (m, 2H), 3.53 (m, 2H).

dimethyl (7-fluoro-3,3-dimethyl-2-oxoheptyl)phosphonate (25)

To **24** (1.84 g) were SOCl₂ (6.0 ml) and the solution was stirred at reflux for 0.5 hour. The reaction solution was concentrated to give acid chloride. To a solution of dimethyl methylphosphonate (2.0 g) in THF (27.0 ml) were added *n*-BuLi in hexane 1.58 M (10.0 ml) at -78°C and the solution was stirred at same temperature for 0.5 hour. To the reaction solution was added acid chloride at -78°C and the solution was stirred at same temperature for 1 hour. To the reaction solution was added acetic acid at 0°C and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane:ethyl acetate=3:7), to give **25** (1.73 g, 57% yield).

TLC : Rf 0.30 (ethyl acetate); NMR (CDCl₃) : δ 0.85 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 1.01(m, 6H), 1.35 (m, 4H), 1.79 (m, 2H), 3.32 (m,2H), 3.53 (m, 2H).

Ethyl 2-[(2-[(4S)-4-[(1E)-8-fluoro-4,4-dimethyl-3-oxo-1-octen-1-yl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)ethyl]thio]-1,3-thiazole-4-carboxylate(26)

Starting from compound **20** following the same procedure as compound **21** using compound **25** instead of dimethyl (3,3-dimethyl-2-oxoheptyl)phosphonate provided compound **26**.

TLC : Rf 0.63 (hexane:ethyl acetate=1:2); NMR (CDCl₃) : δ 0.88 (s, 3H), 0.94 (m, 6H), 1.34 (m, 4H), 1.60 (m, 2H), 3.33 (m, 3H), 3.59 (m, 3H), 3.97 (m, 2H), 4.42 (m, 3H), 5.66 (dd, J=15.00, 8.84 Hz, 1H), 5.94 (dd, J=15.00, 5.65 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H).

Ethyl 2-[(2-[(4S)-4-[(1E,3R)-8-fluoro-3-hydroxy-4,4-dimethyl-1-octen-1-yl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)ethyl]thio]-1,3-thiazole-4-carboxylate(27)

Starting from compound **26** following the same procedure as compound **22R** provided compound **27**. TLC : Rf 0.54 (hexane:ethyl acetate=1:2); NMR (CDCl₃) : δ 0.87 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 1.35 (m, 4H), 1.68 (m, 2H), 3.37 (m, 4H), 3.53 (m, 3H), 3.97 (m, 2H), 4.40 (m, 3H), 5.64 (dd, J=15.00, 8.54 Hz, 1H), 5.98 (dd, J=15.00, 5.60 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H).

2-[(2-[(4S)-4-[(1E,3R)-8-fluoro-3-hydroxy-4,4-dimethyl-1-octen-1-yl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl)ethyl]thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid(5)

Starting from compound **27** following the same procedure as compound **4** provided compound **5**.

HRMS (ESI, pos.) C₁₉H₂₇N₂O₅S₂ (M + H)⁺, Obs. 447.1426, Calc. 447.1424. TLC : Rf 0.54 (ethyl acetate : methanol : acetic acid=15:1:1); NMR (CDCl₃) : δ 0.85 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 1.34 (m, 4H), 1.65 (m, 2H), 3.43 (m, 5H), 3.69 (m, 1H), 3.97 (m, 2H), 4.45 (m, 4H), 5.66 (dd, J=15.10, 8.88 Hz, 1H), 5.95 (dd, J=15.10, 5.70 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H).

1-(4-fluorobutyl)cyclobutanecarboxylic acid (29)

To a solution of LDA 2.0M (31.5 ml) in THF (60.0 ml) were added a solution of **28** (3.00 g) in THF (15.0 ml) at 0°C and the solution was stirred at same temperature for 0.5 hour. To the reaction solution was added 1-Bromo-4-Fluorobutane (5.1 g) at 0°C and the solution was stirred at room temperature for 2 hour. To the reaction solution was added 2N hydrochloric acid at 0°C and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give **29** (5.22 g).

TLC : Rf 0.34 (hexane:ethyl acetate:acetic acid=8:2:1); NMR (CDCl₃) : δ 1.25 (m, 6H), 1.69 (m, 2H), 3.43 (m, 2H).

Dimethyl {2-[1-(4-fluorobutyl)cyclobutyl]-2-oxoethyl}phosphonate(30)

To **29** (1.84 g) were SOCl₂ (18.0 ml) and the solution was stirred at reflux for 0.5 hour. The reaction solution was concentrated to give acid chloride. To a solution of dimethyl methylphosphonate (1.5 g) in THF (12.0 ml) were added *n*-BuLi in hexane 1.58 M (7.63 ml) at -78°C and the solution was stirred at same temperature for 0.5 hour. To the reaction solution was added acid chloride at -78°C and the solution was stirred at same temperature for 1 hour. To the reaction solution was added acetic acid at 0°C and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane:ethyl acetate=4:1), to give **30** (1.23 g, 51% yield).

TLC : Rf 0.55 (ethyl acetate); NMR (CDCl₃) : δ 1.09(m, 8H), 1.27 (m, 4H), 1.74 (m, 2H), 3.35 (m,2H), 3.43 (m, 2H).

Ethyl 2-((2-[(4S)-4-[(1E)-3-[1-(4-fluorobutyl)cyclobutyl]-3-oxo-1-propen-1-yl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]ethyl)thio)-1,3-thiazole-4-carboxylate(31)

Starting from compound **20** following the same procedure as compound **21** using compound **30** instead of dimethyl (3,3-dimethyl-2-oxoheptyl)phosphonate provided compound **31**.

TLC : Rf 0.33 (hexane:ethyl acetate=1:1); NMR (CDCl₃) : δ 0.99 (m, 6H), 1.54 (m, 6H), 1.67 (m, 2H), 3.30 (m, 3H), 3.58 (m, 3H), 3.93 (m, 2H), 4.22 (m, 3H), 5.64 (dd, J=15.00, 8.80 Hz, 1H), 5.96 (dd, J=15.00, 5.62 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H).

Ethyl 2-((2-[(4S)-4-[(1E,3R)-3-[1-(4-fluorobutyl)cyclobutyl]-3-hydroxy-1-propen-1-yl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]ethyl)thio)-1,3-thiazole-4-carboxylate(32)

Starting from compound **31** following the same procedure as compound **22R** provided compound **32**.

TLC : Rf 0.11 (hexane:ethyl acetate=1:1); NMR (CDCl₃) : δ 1.45 (m, 6H), 1.69 (m, 2H), 3.27 (m, 4H), 3.63 (m, 3H), 3.99 (m, 2H), 4.39 (m, 3H), 5.66 (dd, J=15.00, 8.44 Hz, 1H), 5.88 (dd, J=15.00, 5.70 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H).

2-((2-[(4S)-4-[(1E,3R)-3-[1-(4-fluorobutyl)cyclobutyl]-3-hydroxy-1-propen-1-yl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]ethyl)thio)-1,3-thiazole-4-carboxylic acid(6)

Starting from compound **32** following the same procedure as compound **4** provided compound **6**.

HRMS (ESI, pos.) C₂₀H₂₇FN₂O₅S₂ (M + H)⁺, Obs. 459.1430, Calc. 459.1424. TLC : Rf 0.72 (ethyl acetate : methanol : acetic acid=8:1:1); NMR (CDCl₃) : δ 1.28 (m, 12H), 3.39 (m, 3H), 3.61 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 4.15(d, J=5.63 Hz, 1H), 4.33 (m, 4H), 5.70 (dd, J=15.37, 7.23 Hz, 1H), 5.94 (dd, J=15.37, 5.63 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H).

3-6. 参考文献

1. Isberg, V., *Nucleic Acids Research*, **2016**, *44*, 356.
2. Hanson, M, Roth, C., Jo, E., Griffith, M., Scott, F., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S., Schuerer, S., Sanna, M., Han, G., Kuhn, P., Rosan, H., Stevens, R. *Science*, **2012**, *335*, 851.
3. Kambe, T.; Maruyama, T.; Nakai, Y.; Yoshida, H.; Oida, H.; Maruyama, T.; Abe, N.; Nishiura, A.; Nakai, H.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 2235.
4. Horner, L.; Hoffmann, H. M. R.; Wippel, H. G. *Ber.*, **1958**, *91*, 61.
5. Wadsworth, W. S., Jr.; Emmons, W. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 1733.

第4章

経口吸収性を有する化合物の取得

4-1. 緒言

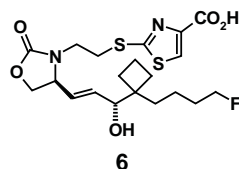
第3章までにEP₂受容体とEP₃受容体のみを選択的な作動薬である化合物6の創製について述べた。本章では、化合物6の薬物動態特性の評価結果及び経口投与可能な化合物の設計について述べる。まずは第2章3項で示したEP₂/EP₃/EP₄作動薬である化合物3と比較する形で化合物6の膜透過性とヒト肝ミクロソーム中安定性のプロファイルについてTable 4-1に示す。その結果、化合物6はヒト肝ミクロソーム中では安定であるが、膜透過性が非常に低い性質を有することが分かった。次に、ラット薬物動態特性評価を行った結果をFigure 4-1に示す。第4章5項にその評価方法について記載した。この結果から、経口吸収性の指標である生物学的利用率 (bioavailability, BA)が2.5%と、非常に低い化合物であることが確認できた。また、全身クリアランス (CL_{tot}) が大きいと代謝等の要因で生体内での消失が早く、血中濃度の維持が困難となるが、肝臓中で安定であっても、肺中でω鎖15位炭素上の水酸基が15-PGDH(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase)¹により、酸化代謝を受ける可能性が考えられた。

Table 4-1. 化合物3と化合物6の膜透過性とヒト肝ミクロソーム中安定性

Compound	Caco-2 (×10 ⁻⁶ cm/s)	Stability in liver
		microsomes % remaining in HLM ^{a)}
3	0.78	100
6	0.56	97

^{a)} HLM : human liver microsomes;

concentration of test compounds, 1 uM; liver microsomes, 1 mg/mL



静脈内投与 (0.01 mg / kg)		経口投与 (1 mg / kg)	
クリアランス (mL/min/kg)	半減期 (hr)	AUC (µg·h/mL)	Bioavailability (%)
9.5	4.4	0.041	2.5

Figure 4-1. 化合物6のラット薬物動態特性評価結果

つまり、化合物 **6** の経口投与時の血漿中濃度が低い原因を考察した結果、2 点が挙げられた。1 点目は化合物 **6** の二級水酸基が酸化代謝を受ける可能性であり、2 点目は、化合物の極性表面積が大きく、消化管に対する透過性が低いことから、そもそも吸収されにくい性質を有しているためと考えられた。これらの原因を克服するための化合物設計の方針として、①2 級水酸基から 3 級水酸基への変換、②TPSA (Topological Polar Surface Area : 位相幾何学的極性表面積)²を低下させることによる膜透過性向上の 2 点を挙げた。これまでに経口吸収性の優れた EP 受容体作動薬の報告例は無く、良好な経口吸収性と強力かつ選択的な EP₂/EP₃ 作動活性を両立させた化合物の取得は非常に困難と考えられたが、これら 2 つの方針の下、課題の解決に取り組むこととした。

4-2. 酸化代謝の回避

前項にて挙げた 2 点の方針のうち、まずは 2 級水酸基の 3 級水酸基の変換を行うこととした。3 級水酸基に変換すれば、ケトン体への酸化代謝を受けることは無い。ただし、15 位炭素上のまま、3 級水酸基に変換するには 16 位のシクロブチル基の立体的かさ高さ等から合成上、困難であった。そこで、16 位の立体的なかさ高さを保持したままで水酸基を 16 位に移動されることで 3 級水酸基に変換できると考えた。また、既知の非天然型プロスタグランジン誘導体の上市薬として、非ステロイド性消炎鎮痛剤の長期投与時にみられる胃潰瘍及び十二指腸潰瘍を適応とした Misoprostol が知られている³。Misoprostol はプロドラッグを指向したメチルエステル体であるが、その加水分解物であるカルボン酸活性本体に関して、EP₂ 受容体、EP₃ 受容体、EP₄ 受容体に対する作動活性を評価した結果、強い活性を示すことが確認された（非開示データ）。したがって、15 位炭素から 16 位炭素に水酸基を移しても、おそらく EP₂/EP₃ 作動活性は保持されると推察した。また、少しでも膜透過性を改善するために、脂溶性を向上させる観点からフッ素原子を炭素原子に変換した化合物 7 を設計した（Figure 4-2）。

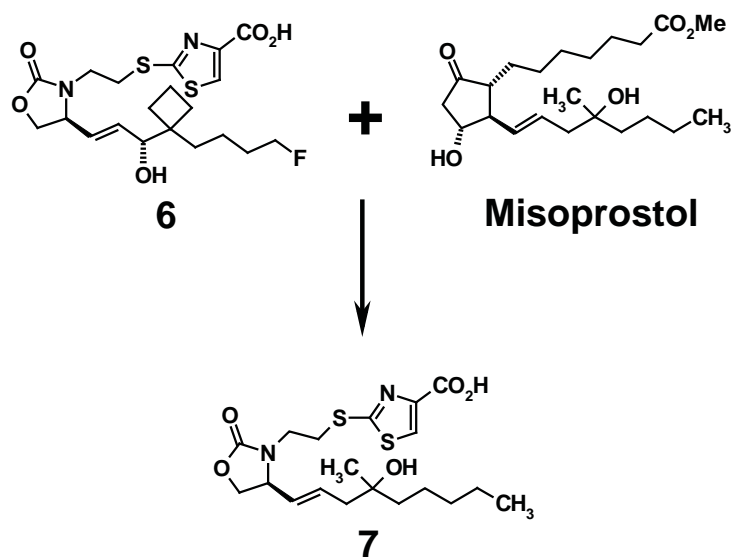
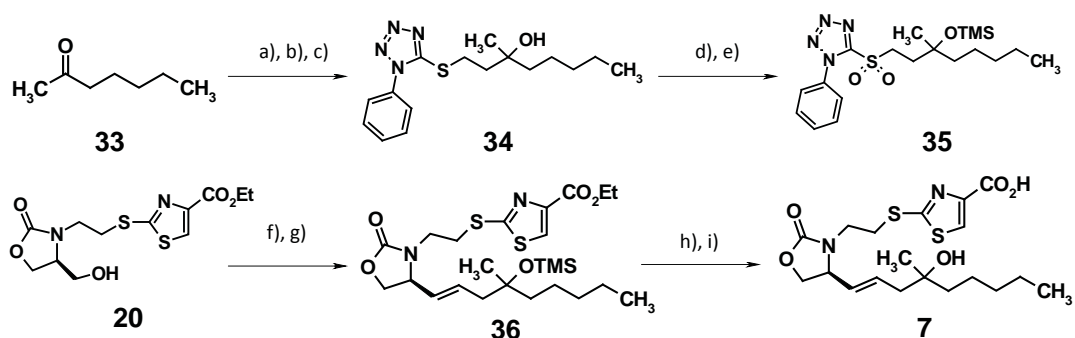


Figure 4-2. Misoprostol の化学構造と化合物 6 の酸化代謝を回避する化合物設計

化合物 **7** は以下のように合成した(Scheme 4-1)。市販の **33** を Reformatsky 反応⁴により ethyl bromoacetate と反応させた後、LiAlH₄ で還元し、生じた一級水酸基を層間移動触媒の存在下で Ts 化し、1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiol と反応させることでスルフィド **34** を合成した。*m*-CPBA で酸化し、三級水酸基を TMS 保護し、スルホン **35** を合成した。その後は中間体 **20** を酸化して得られたアルデヒド体とスルホン **35** を用いて Julia olefination 反応⁵により、**36** を合成した。酸性条件下で TMS 基を脱保護し、アルカリ加水分解することで化合物 **7** を合成した。なお、環状カーバメート上の不斉炭素は単一の立体配置であるが、水酸基を有する炭素原子はラセミ混合物であることから、化合物 **7** はジアステレオマー混合物である。



- a) ethylbromo acetate, zinc, iodine, dioxane, 0°C, b) LiAlH₄, THF, 0°C, y.70% (for 2 steps),
 c) 5N NaOHaq., *n*-Bu₄NBr, TsCl, toluene, 0°C., then 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiol,
 60°C, y. 80%, d) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, r.t., e) TMSCl, imidazole, CH₂Cl₂, y.82% (for 2 steps),
 f) SO₃-Py, Et₃N, DMSO, EtOAc, 10°C, g) KHMDS, **35**, DME, -78°C, y.26% (for 2 steps),
 h) 4N HCl aq., EtOAc, 0°C, i) 2N NaOH aq., EtOH, 0°C, y.65% (for 2 steps)

Scheme 4-1. 化合物 **7** の合成法

合成した化合物 **7** のヒト EP₂/EP₃/EP₄ 作動活性と Caco-2 膜透過性試験、肝ミクロソーム中安定性を化合物 **6** と比較した結果を **Table 4-2** に示す。3 級水酸基に変換したため、少なくとも 15-PGDH による肺での酸化代謝は避けられただけでなく、化合物 **7** は肝ミクロソーム中安定性が高い性質も保持していることを確認できた。Caco-2 膜透過性に関しては、やや改善する傾向が見られた。これは極性官能基である水酸基が 2 級から 3 級になったことで、極性を有する水酸基部位が立体的なメチル基のかさ高さにより、遮蔽されたためではないかと考察した。

また、ヒト EP₂/EP₃ 作動活性についてはほぼ差は無かった上に、EP₄ 作動活性の低下が認められた。この原因については不明であるが、水酸基部位が遮蔽されたことで EP₄ 受容体のアミノ酸残基との水素結合作用が弱くなったためではないかと考察している。

Table 4-2. 化合物 **6** と **7** のヒト EP₂/EP₃/EP₄ 作動活性と膜透過性、代謝安定性

Compound	Functional Assay、 EC ₅₀ (nM)			Caco-2 × 10 ⁻⁶ (cm/s)	Stability in liver microsomes % remaining in HLM
	hEP ₂	hEP ₃	hEP ₄		
6	2.0	10	195	0.56	97
7	2.1	3.3	3380	1.0	100

4-3. TPSA 低下による膜透過性の改善

次に、第4章1項にて挙げた2点の方針のうち、TPSA (Topological Polar Surface Area : 位相幾何学的極性表面積) を低下させることによる膜透過性向上を指向した化合物設計を行った。化合物が経口投与時に良好な吸収を示すには、TPSA 値をできるだけ低くすることが望ましいと考察した。TPSA については、極性表面積の指標であり、PSA (極性表面積) の近似計算法で算出される。PSA は分子輸送特性 (腸管吸収) 解析に有用な記述子の1つであり、極性原子 (酸素、窒素、硫黄、リン) の数が増えるにつれて大きな値を示す。Novartis 社の Ertl らにより、構造式の二次元情報から三次元構造に基づく表面積計算値を予測する TPSA が提案された²。その後、Veber らにより、値が 140 以下であることが経口剤として必要であり、より小さい TPSA を示す化合物の方が良好な膜透過性が期待できると報告⁶されている。

これらの情報を踏まえて、化合物の分子全体の極性を下げる構造変換が膜透過性の向上に繋がり得ると考察し、化合物 7 の 5 員環上のヘテロ原子である窒素原子と酸素原子を両方とも炭素原子に変換した化合物 8 を設計した。化合物 8 の有するシクロペンタノン構造は、PGE₂ の構造とも類似しており、主活性についても十分な活性を示すことができると考えた。また、PGE₂ と異なり、11 位炭素原子上に 2 級水酸基を有さないため、脱水反応に伴う化学的な不安定性を回避可能であると考えた。

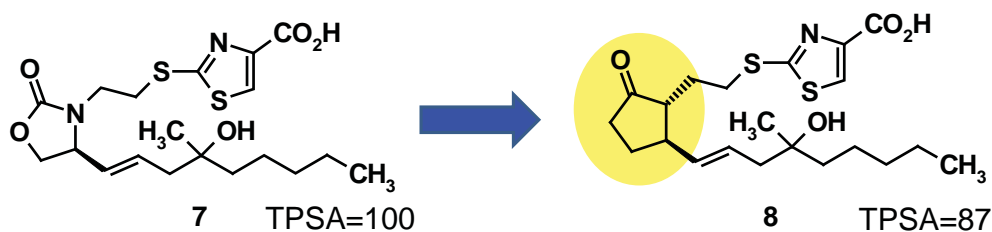
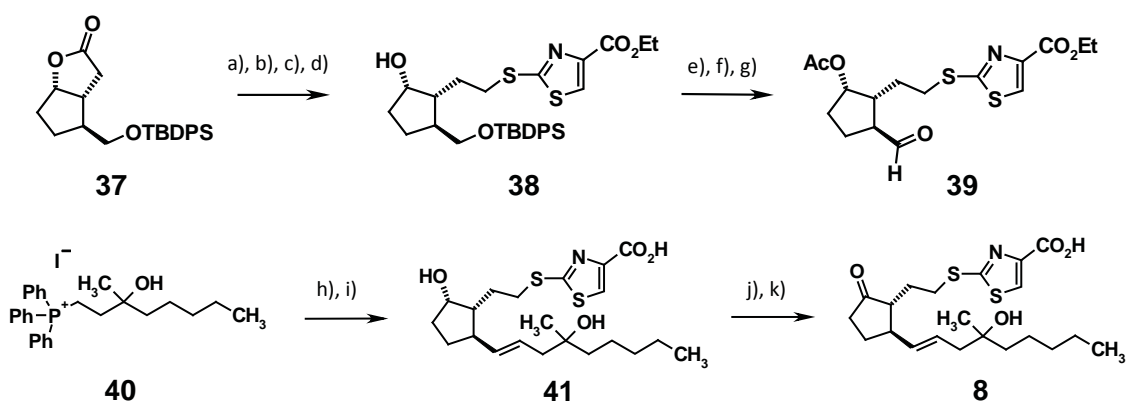


Figure 4-3. 化合物 7 の TPSA を下げる化合物設計

化合物 **8** は以下のように合成した(Scheme 4-2)。Corey lactone の TBDPS 保護体である **37** を LiAlH_4 で還元し、生じた一級水酸基を Ms 化し、二級水酸基を TMS 保護した後、チオ酢酸 S-カリウムと塩基性条件下で反応させ、塩基性条件下にて ethyl 2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate と反応させ、酸性条件下で TMS 基を脱保護し、**38** を合成した。二級水酸基をアセチル基で保護した後、TBAF にて TBDPS 基を脱保護し、生じた一級水酸基を酸化したアルデヒド **39** とした。トランス選択的な Wittig 反応⁷ をホスホニウム塩 **40** を用いて行った後、アルカリ加水分解条件にて、アセチル基の脱保護とエチルエステルの加水分解を行って **41** とした。カルボン酸を一時的に TBS 保護した後、二級水酸基を酸化し、化合物 **8** を合成した。なお、出発物質である Corey lactone の TBDPS 保護体である **37** は単一の光学活性体(キラル体)であるが、3級水酸基を有する炭素原子は二つの光学異性体の混合物(ラセミ体)であるため、化合物 **8** は2種類のジアステレオマー混合物である。



- a) LiAlH_4 , THF, 0°C , b) MsCl, DIPEA, THF, -5°C , then TMSCl, AcSK, K_2CO_3 , DMF, 50°C ,
c) ethyl 2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate, tributylphosphine, K_2CO_3 , EtOH, 50°C ,
d) 1N HCl aq., THF, 0°C , y.38% (for 4 steps), e) Ac_2O , Py, DMAP, r.t., f) TBAF, THF, r.t.,
g) $\text{SO}_3\text{-Py}$, Et_3N , DMSO, EtOAc, 10°C , y.97% (for 3 steps), h) *n*-BuLi, **39**, THF, -78°C ,
i) 2N NaOH aq., MeOH, r.t., y.37% (for 2 steps), j) TBSCl, TEA, Toluene, r.t.,
k) $\text{SO}_3\text{-Py}$, DIPEA, DMSO, EtOAc, 0°C , y.62% (for 2 steps)

Scheme 4-2. ジアステレオマー混合物 **8** の合成法

次に、化合物 **8** のヒト EP₂/EP₃/EP₄ 作動活性と Caco-2 膜透過性試験、肝ミクロソーム中安定性試験の結果を化合物 **6** 及び **7** と比較した結果を **Table 4-3** に示す。まず、肝ミクロソーム中の安定性が高い性質を確認した。Caco-2 膜透過性に関しては、TPSA の低下によると考えられる約 4 倍の改善が認められた。なお、Caco-2 膜透過性に関しては、一般的に 3.0×10^{-6} cm/s 以上であれば、消化管を吸収しやすくなり、良好な経口吸収性を示すことが知られている⁸⁻¹⁰。

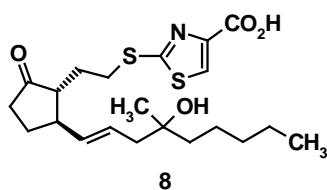
ヒト EP₃ 作動活性については化合物 **8** と化合物 **7** の間ではほぼ差は無かったが、EP₂ 作動活性の向上が認められた。ヒト EP₄ 作動活性については 37 倍向上しており、第 1 章にて設定した 100 倍以上の選択性という目標を満たしていない。第 3 章において 10 位炭素原子から酸素原子への変換は EP₄ 作動活性の減弱を指向して行った変換であり、逆に炭素原子に戻す構造変換により、EP₄ 作動活性が向上してしまうのは必然と考えられた。したがって、医薬品候補化合物を目指す上では EP₄ 作動活性をさらに低下させる必要があることが分かった。そこで次に、良好な膜透過性と代謝安定性を両立した強力かつ選択的な EP₂/EP₃ 作動薬である化合物 **8** のラット薬物動態特性を評価し、その結果と構造との相関を考察することとした。

Table 4-3. 化合物 **6-8** のヒト EP₂/EP₃/EP₄ 作動活性と膜透過性、代謝安定性

Compound	Functional Assay, EC ₅₀ (nM)			Caco-2 × 10 ⁻⁶ (cm/s)	Stability in liver microsomes % remaining in HLM
	hEP ₂	hEP ₃	hEP ₄		
6	2.0	10	195	0.56	97
7	2.1	3.3	3380	1.0	100
8	0.48	2.7	91	4.1	100

4-4. 薬物動態特性評価結果と考察

化合物 **8** のラット薬物動態特性評価を行った結果を **Figure 4-4** に示す。その結果、生物学的利用率 (BA) は化合物 **6** よりも向上し、40%と良好な値を示した。したがって、第 4 章第 2 項にて挙げた 2 つの方針に基づく化合物設計 (水酸基の変換による酸化代謝の回避とヘテロ原子の削減による膜透過性の向上) が経口投与可能な EP₂/EP₃ 作動薬の取得に繋がったと考えられた。ただし、化合物 **8** はクリアランス値が前述の化合物 **6** とほぼ同等であり、改善が認められていない。そこで、化合物 **8** の良好な膜透過性は保持しつつ、生体内における安定性を向上させる必要があると考察した。



静脈内投与 (0.1 mg / kg)		経口投与 (1 mg / kg)	
クリアランス (mL/min/kg)	半減期 (hr)	AUC (μg·h/mL)	Bioavailability (%)
13	9.1	0.51	40

Figure 4-4. 化合物 **8** のラット薬物動態特性評価結果

4-5. 薬物動態特性評価方法

化合物を投与した後の薬物動態特性を評価した方法を示す。化合物をラットに静脈内 (iv)あるいは経口(po)投与後、経時的に採血しその血中濃度を測定することにより、その化合物の血中薬物濃度一時間曲線を作成した。このデータから各種パラメーターを算出し、薬物動態特性として評価した。代表的なパラメーターについて以下に示す。

1. 全身クリアランス (CL_{tot})

単位時間あたりに体内から除去される薬物量、即ち生体はその薬物を処理する能力を表し、mL/min/kgの単位で表わされる。 CL_{tot} が大きいと代謝等の要因で化合物の生体内での消失が早く、血中濃度の維持が困難となる。

2. 生物学的利用率 (bioavailability, BA)

経口投与された化合物が全身循環(血中)へ移行する比率を表す。ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) と呼ばれる吸収、分布、代謝、排泄を経て、薬物が体内に行き渡るが、生物学的利用率が低い化合物は、その吸収過程もしくは代謝安定性に問題があることが多い。Bioavailability は同一投与量での静脈内投与時の AUC (area under the curve、血中薬物濃度の時間積分)と、経口投与時の AUC の比で表わされ、単位は%である。経口投与された化合物は血中に曝露されるまでに消化管で吸収され、肝臓を通過する段階を経る必要があるため、消化管から吸収する際の膜透過性と肝臓での代謝安定性の両方が生物学的利用率に影響を与える重要な要因となる。また、全身循環血流中においては、プロスタグランジン誘導体においては、肺中での 15-PGDH による代謝等も AUC に影響を及ぼすのではないかと考察している。

4-6. 小括

第3章までに得られた化合物**6**の肺での15-PGDHによるケトン体への酸化代謝の回避を狙いとして、2級水酸基を3級水酸基に変換するとともに、16位に水酸基の位置を移動させた化合物**7**は肝ミクロソーム中安定性が高い性質を示した。また、極性表面積の低下による膜透過性改善を狙いとして、化合物**7**の5員環上の2つのヘテロ原子を炭素原子に変換したシクロペンタノン構造への変換により、40%の良好なラット生物学的利用率を示す化合物**8**を取得できた。化合物**8**は強いEP₂/EP₃作動活性も示したため、経口投与可能なEP₂/EP₃作動薬の創製に成功した。ただし、化合物**8**は2種類のジアステレオマー混合物であること、EP₄作動活性との選択性が100倍未満であることから、医薬品候補化合物の取得という目的の達成には至っていないことが明らかとなった。

4-7. 実験の部

General Procedure is same as described in chapter 2-7.

3-methyl-1-[(1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]-3-octanol (34)

To a solution of 2-heptanone (10.1 mL) in 1,4-dioxane (150 mL) were added ethyl bromoacetate (9.6 mL), zinc (8.5 g) and iodine (3.7 g) at room temperature. The reaction mixture was sonicated for 2 hours, then carefully treated with 1N hydrochloric acid, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. The residue compound (13.86 g) in tetrahydrofuran (100 mL) was added dropwise to a suspension of lithium aluminum hydride (3.9 g) in tetrahydrofuran (100 mL) at 0 °C. After 35 minutes, the reaction was diluted with ethyl acetate at 0°C and quenched with 5N hydrochloric acid (20 mL) until the evolution of gas ceased. The solution temperature was raised to room temperature and the solution was stirred overnight. The reaction solution was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtrated through Celite and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography (*n*-hexane : ethyl acetate = 1:1) to give diol compound (10.31 g). To a solution of the diol compound (8.05 g) in toluene (98 mL) were added tetrabutylammonium bromide (1.62 g) and 2N sodium hydroxide (98 mL) at 0°C. The resulting mixture was treated with a suspension of tosyl chloride (10.5 g) in toluene (40 mL). The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 hour, followed by treatment with a solution of 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiol (10.74 g) in toluene. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 3.5 hours, and extracted with *tert*-butoxymethyl ether. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane : ethyl acetate = 81 : 19) to give **34** (14.15 g, 86% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.42 (m, 6H), 1.57 (m, 2H), 1.65 (s, 1H), 2.04 (m, 2H), 3.57 (m, 2H), 7.73 (m, 5H).

5-({3-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]octyl)sulfonyl}-1-phenyl-1H-tetrazole (35)

To a solution of **34** (14.0 g) in methylene chloride (200 mL) was added *meta*-chloroperbenzoic acid (27.3 g) at 0 °C. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred overnight. The reaction was quenched with an aqueous saturated sodium bicarbonate, evaporated to remove methylene chloride and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with an aqueous saturated sodium bicarbonate solution and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated to give sulfone compound (15.4 g). To a solution of the sulfone compound (15.4 g) in methylene chloride (87 mL) were added imidazole (8.92 g) and trimethylsilyl chloride (11.1 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 1 hour, and then treated with water, and extracted with

ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography (*n*-hexane : ethyl acetate = 25 : 1), to give compound **35** (16.95 g, 82% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.12 (s, 9 H), 0.90 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.39 (m, 9H), 1.58 (m, 2H), 2.20 (m, 2H), 3.94 (m, 2H), 7.86 (m, 5H).

2-[(2-[(4*S*)-4-[(1*E*)-4-hydroxy-4-methyl-1-nonen-1-yl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (7)

To a solution of **20** (3.38 g) in dimethylsulfoxide (34.0 mL)/ethyl acetate (68.0 mL) were added triethylamine (10.0 mL) and sulfur trioxide-pyridine complex (6.50 g) at 10 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour, then treated with 1N hydrochloric acid, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give aldehyde. To a solution of **35** (1.01 g) in dimethoxyethane (7.9 mL) was slowly added dropwise potassium hexamethyldisilazide (0.5M in toluene, 4.75 mL) at -78 °C. The reaction mixture was stirred at -78 °C for 1 hour, and treated with a solution of the obtained aldehyde (0.98 g) in dimethoxyethane (7.9 mL). After stirring at -78 °C for 25 minutes, the reaction mixture was warmed to 0 °C and stirred for 50 minutes. The reaction was quenched with an aqueous saturated sodium bicarbonate solution, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with an aqueous saturated sodium bicarbonate solution and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtrated through Celite and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by column chromatography (*n*-hexane : ethyl acetate = 84 : 16) to give **36** (0.662 g, 26% yield). To a solution of **36** (6.53 g) in ethyl acetate (114 mL) was slowly added dropwise 4N hydrogen chloride/ethyl acetate solution (14 mL) at 0 °C and the resulting solution was stirred for 10 minutes. An aqueous saturated sodium bicarbonate solution was slowly added dropwise to the reaction solution, followed by extraction with ethyl acetate. The organic layer was washed with an aqueous saturated sodium bicarbonate solution and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The obtained residue in methanol (37 mL) was added dropwise 2N aqueous sodium hydroxide solution (11 mL) at 0 °C. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 45 minutes. After cooling to 0 °C, 2N hydrochloric acid was added thereto and the solution was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography (*n*-hexane : ethyl acetate = 1 : 1) to give compound **7** (2.95 g, 65% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.02 (m, 3H), 1.64 (m, 11H), 2.47 (m, 2H), 5.07 (m, 9H), 5.57(m, 1H), 6.24 (m, 1H), 8.33 (m, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 14.05, 18.70, 22.62, 22.63, 23.55, 26.68, 26.90, 30.93, 30.99, 32.28, 32.30, 41.42, 41.50, 41.84, 42.29, 44.40, 44.44, 67.05, 67.07, 72.84, 72.97, 76.55, 76.49, 127.51, 127.54, 128.99, 134.96, 134.98, 146.37, 157.63, 161.30, 161.44, 165.16, 165.20. ; HRMS (ESI, pos.) $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}_2$ (M + H)⁺, Obs. 429.1512, Calc. 429.5740.

Ethyl 2-((2-[(1R,2S,5S)-2-({*tert*-butyl(diphenyl)silyl]oxy)methyl]-5-hydroxycyclopentyl]ethyl)thio)-1,3-thiazole-4-carboxylate (38)

To a solution of **37** (1.00 g) in anhydrous tetrahydrofuran (9.00 mL) was added lithium aluminum hydride (97.0 mg) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 20 minutes, and treated with water, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with an aqueous saturated solution of sodium tartrate and brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure. A mixed solution of the obtained residue and diisopropylethylamine (1.29 mL) in anhydrous tetrahydrofuran (9.00 mL) was added at -5 °C to a solution of methanesulfonyl chloride (0.23 mL) in anhydrous tetrahydrofuran (5.00 mL). The reaction mixture was stirred for 20 minutes, and then quenched with anhydrous methanol (43.0 μL) at -5 °C for 15 minutes. The resulting mixture was treated with trimethylsilyl chloride (0.49 mL) at -5 °C, stirred at room temperature for 10 minutes, subsequently treated with potassium carbonate (1.10 g), potassium thioacetate (578 mg) and anhydrous dimethylformamide (20.0 mL), and further stirred at 50 °C for 5 hours. The reaction mixture was poured into iced water, extracted with *tert*-butyl methyl ether, washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. To a solution of the obtained residue in ethanol (13.0 mL) were added tri-*n*-butylphosphine (0.07 mL), ethyl 2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate (657 mg) and potassium carbonate (770 mg). The mixture was stirred at room temperature for 1 hour, and subsequently stirred at 50 °C overnight. The reaction mixture was diluted in ethyl acetate, and washed with an aqueous saturated solution of ammonium chloride, water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. The obtained residue was dissolved in tetrahydrofuran (8.60 mL), cooled to 0 °C, and treated with 1N hydrochloric acid (1.86 mL). The resulting mixture was stirred for 30 minutes at room temperature, then diluted in ethyl acetate, washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 4 : 1) to give **38** (624 mg, 38% yield).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.05 (s, 9H), 1.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.77 (m, 8H), 2.82 (m, 1H), 3.20 (s, 1H), 3.58 (m, 3H), 4.41 (m, 3H), 7.41 (m, 6H), 7.65 (m, 4H), 7.96 (s, 1H).

Ethyl 2-((2-[(1*R*,2*S*,5*S*)-2-(acetyloxy)-5-formylcyclopentyl]ethyl)thio)-1,3-thiazole-4-carboxylate (39)

To a solution of compound **38** (42.2 g) in pyridine (75 mL) were continuously added at 0 °C acetic anhydride (13 mL) and 4-*N,N*-dimethylaminopyridine (453 mg). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours, and then diluted in ethyl acetate. The organic layer was removed, washed with 1N hydrochloric acid and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was dissolved in tetrahydrofuran (140 mL) and treated with 1M tetrabutylammonium fluoride in tetrahydrofuran (110 mL) at 0 °C. After stirring at room temperature for 1 hour, the reaction was quenched with water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 7 : 3) to give alcohol (27.0 g). The obtained alcohol (2.95 g) was dissolved in dimethyl sulfoxide (20 mL) and ethyl acetate (30 mL), treated with triethylamine (7.8 mL) and sulfur trioxide-pyridine complex (4.5 g) at 10 °C, and stirred at room temperature for 1 hour. To the reaction solution was added 1N hydrochloric acid and the resulting mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated to give compound **39** (2.93 g, 97% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.49 (m, 3H), 2.15 (m, 9H), 2.51 (m, 1H), 2.84 (m, 1H), 3.31 (m, 2H), 4.48 (m, 2H), 5.37 (m, 1H), 8.02 (s, 1H), 9.67 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H).

2-[(2-[(1*R*,2*S*,5*R*)-2-hydroxy-5-[(1*E*)-4-hydroxy-4-methyl-1-nonen-1-yl]cyclopentyl]ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (41)

To a solution of (3-hydroxy-3-methyloctyl)(triphenyl)phosphonium iodide **40** (800 mg) in anhydrous tetrahydrofuran (9.00 mL) was added *n*-butyllithium (1.60M in hexane, 1.90 mL) at room temperature. After stirring for 1 hour, the resulting solution was treated with a solution of **39** (349 mg) in anhydrous tetrahydrofuran (6.00 mL) at -78 °C and then stirred for 2 hours. The reaction mixture was warmed to room temperature, and poured into ice water, followed by extraction with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 4 : 1). The obtained product was dissolved in methanol (1.00 mL) and treated with 2N aqueous sodium hydroxide solution (0.19 mL) at 0 °C. The resulting solution was stirred at room temperature for 1 hour and acidified with an aqueous solution of 2N hydrochloric acid (0.30 mL), followed by extraction with ethyl acetate. The extract liquid was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give compound **41** (148 mg, 37% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.30 (m, 12H), 1.79 (m, 2H), 2.02 (m, 3H), 2.40 (m, 1H), 2.88 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.45 (m, 1H), 8.02 (s, 1H).

2-[(2-[(1*R*,2*R*)-2-[(1*E*)-4-hydroxy-4-methyl-1-nonenyl]-5-oxocyclopentyl]ethyl)sulfanyl]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (8**)**

To a solution of compound **41** (325 mg) in toluene (3.80 mL) were added triethylamine (0.12 mL), *t*-butyl dimethyl silyl chloride (130 mg) at 0 °C and the solution was stirred for 1 hour. Ethyl acetate was added to the reaction solution, which was filtered and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was dissolved in dimethylsulfoxide (1.20 mL)/ethyl acetate (2.40 mL) and then treated with diisopropylamine (0.80 mL) and sulfur trioxide-pyridine complex (363 mg) at 0 °C, followed by stirring for 30 min. The reaction mixture was diluted with water, poured into 1N hydrochloric acid, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with an aqueous saturated ammonium chloride solution, water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 1 : 1) to give compound **8** as yellow oil (199 mg, 62% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.59 (m, 21H), 3.75 (m, 4H), 5.51 (dd, *J* = 15.0, 9.0 Hz, 1H), 5.77 (m, 1H), 8.10 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 14.06, 22.66, 23.56, 26.54, 27.62, 28.25, 31.98, 32.34, 37.54, 41.95, 44.57, 46.34, 53.77, 72.95, 127.39, 127.44, 136.08, 146.41, 161.03, 166.10, 219.11. ; HRMS (ESI, pos.) C₂₁H₃₂O₄NS₂ (M + H)⁺, Obs. 426.1767, Calc. 426.6131.

4-8. 参考文献

1. Anggaard, E.; Samuelsson, B. *Prostaglandins*, **1966**, 25, 293.
2. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3714
3. Walt, R.P.; *N, Engl., J. Med.*, **1992**, 327, 1575.
4. Reformatsky, S., *Ber. Deutsch.. Chem. Ges.*, **1887**, 20, 1210.
5. Julia, M.; Paris, J. M., *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 14, 4833.
6. Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D., *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615.
7. T, Miroslav; K, Vaclav; P, Jaroslav. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1997**, 62, 1325.
8. Wang Z., *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35; 71.
9. Zhao, Y.H., *J. Pharmaceut. Sci.*, **2001**, 90; 749.
10. Kansy, M.; Testa, F., *Pharmacokinetic Optimization in Drug Reseach*, **2001**, 20, 447.

第5章

EP₂/EP₃ 作動活性のバランス最適化

5-1. 緒言

EP₂/EP₃ 作動活性のバランスの取れた化合物への最適化にあたって、第4章4項で述べたように、化合物 **8** は 16 位の炭素のみ、両異性体の混合物であることから、8 位や 12 位と合わせて、16 位の不斉炭素原子が単一の立体配置の化合物として、**Figure 5-1** に示す化合物 **8S** (16 位 *S* 体) と化合物 **8R** (16 位 *R* 体) に分割することを計画した。その分割手法として、16 位の水酸基とチアゾール上のカルボン酸を山口法にてマクロラクトン化¹ することで、2 種類のジアステレオマーの極性の差を大きくすることである。

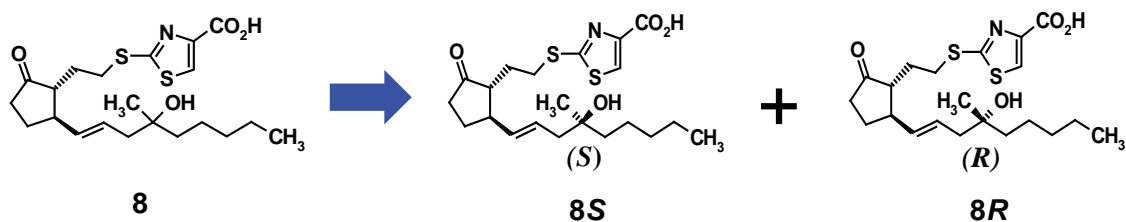
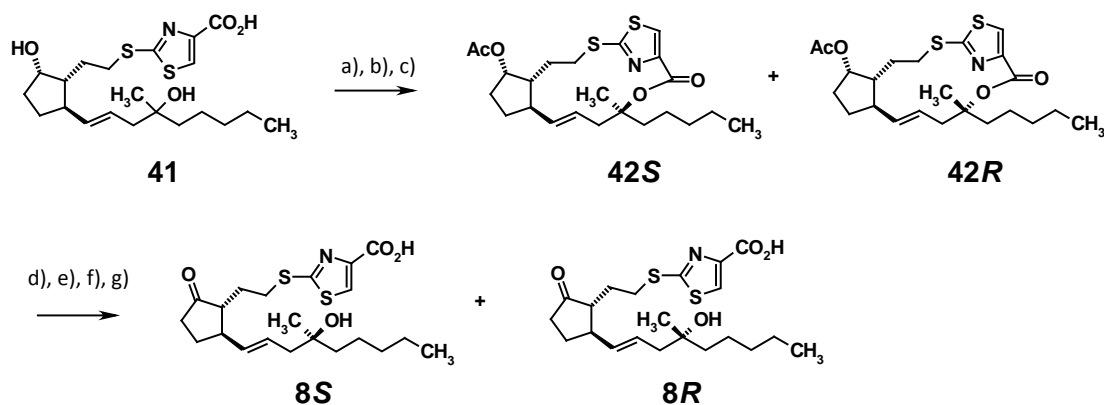


Figure 5-1. 化合物 **8** のジアステレオマー分割体である化合物 **8S** と **8R** の構造式

5-2 ジアステレオマー混合物の分割方法と作動活性評価

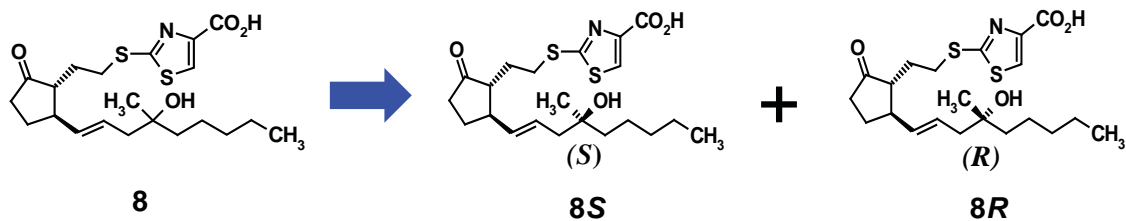
化合物 **8S** および **8R** は以下のように合成した(Scheme 5-1)。化合物 **8** の合成中間体 **41** の二級水酸基をアセチル化した後、山口法にてマクロサイクル化反応を行い、生じた二種類のジアステレオマー**42S** (低極性体) および **42R** (高極性体) をカラムクロマトグラフィーで分割精製することで得た。それぞれアルカリ加水分解条件下にて脱アセチル化とともに開環した後、ethyl iodide を用いてエチルエステル体に変換後、二級水酸基を酸化し、アルカリ加水分解条件下にてカルボン酸に導くことで化合物 **8S** および **8R** をそれぞれ得た。



a) Ac_2O , pyridine, r.t., b) 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, DMAP, toluene, 100°C , c) separation by silica gel column chromatography, y.35% (for **42S**), y.25% (for **42R**) (for 3 steps), d) 2N NaOH aq., THF/MeOH, r.t., e) ethyl iodide, K_2CO_3 , DMF, r.t., f) $\text{SO}_3\text{-Py}$, DIPEA, DMSO, EtOAc, 0°C , g) LiOH, DME/ H_2O , y.80% (for **8S**), y.72% (for **8R**) (for 4 steps).

Scheme 5-1. 化合物 **8S**, **8R** の合成法

上記の方法により、分割した化合物 **8S** 及び化合物 **8R** のヒト EP₂/EP₃/EP₄ 作動活性を **Figure 5-2** に示す。その結果、化合物 **8S** の方が全ての受容体にて高活性であることが分かった。特に活性強度の差が大きかった化合物 **8S** と化合物 **8R** の EP₂ 受容体のホモロジーモデルとのドッキングスタディーを行った結果、それぞれ約 10 種類ものコンフォメーションが得られたため、化合物 **8S** と化合物 **8R** の活性の違いを分子構造レベルで説明することができなかった。ホモロジーモデルの精度が低い可能性も考えられるため、複合体 X 線結晶構造の取得が必要と考察している。なお、さらに高活性かつ高選択的かつ、バランスの取れた EP₂/EP₃ 作動薬を目指すにあたって、化合物 **8S** の懸念される点を明らかにした上で、16 位は *S* 体に固定の上、さらに ω 鎖末端の部分構造を修飾した分子設計を行うとともに、活性と構造の相関を考察しつつ、本研究の目的である医薬品候補化合物の取得を目指すこととした。



compound	Functional assay EC ₅₀ (nM)		
	hEP ₂	hEP ₃	hEP ₄
8S	0.086	0.91	146
8R	6.8	16	2540

Figure 5-2. 化合物 **8** の分割体とヒト EP₂/EP₃/EP₄ 作動活性

5-3. EP₂ 選択的作動薬と EP₃ 選択的作動薬を用いた検証

EP₂ 受容体と EP₃ 受容体に対する強力な作動活性を有していても、EP₂ 作動活性が強すぎると降圧作用、EP₃ 作動活性が強すぎると昇圧作用のリスクがあると考えられた。つまり、EP₂ 受容体を介した血管平滑筋弛緩作用（降圧作用）を EP₃ 受容体を介した血管平滑筋収縮作用（昇圧作用）で相殺できる EP₂/EP₃ 作動活性のバランスを有する化合物が望ましいと考えた。なお、創薬標的の副作用リスクをもう一つの創薬標的の副作用リスクで相殺するという考え方は、過去の医薬品創製において、かつてない試みである。化合物 8S の EP₂ 作動活性は EP₃ 作動活性の約 10 倍であり、EP₂ 作動活性が強すぎると降圧作用（血管平滑筋弛緩作用）のリスクがあると考えられた。したがって、循環器系リスクを回避するために、EP₂/EP₃ 作動活性のバランスが取れた化合物に構造を変換する必要があると考えた。

そこで、上記の仮説が正しいかどうかを検証するために、EP₂ 受容体のみ選択的に作動活性を有する化合物（構造非開示）と EP₃ 受容体のみ選択的に作動活性を有する化合物（構造非開示）をラットに持続的静脈内投与を行い、血圧変動を測定した。両化合物のラットに対する EP₂ 受容体または EP₃ 受容体に対する作動活性値や投与量はほぼ同等である。その結果、Figure 5-3 に示すように、EP₂ 選択的作動薬のみを投与した場合、投与後すみやかに降圧作用を示したが、EP₂ 選択的作動薬と EP₃ 選択的作動薬を同時に投与した場合には、生理食塩水（Saline）を投与した場合と同じく、ほぼ血圧が変動しなかった。これらの結果から、単一の化合物で EP₂/EP₃ 作動活性のバランスを取り、全身循環への副作用リスクを低くすることが可能ではないかと考察した。

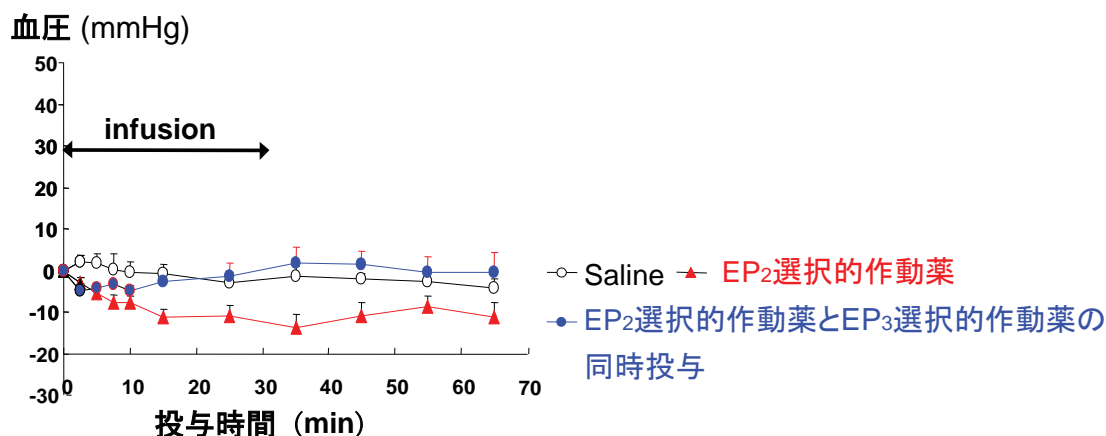


Figure 5-3. EP₂ または EP₃ 選択的に作動活性を有する化合物を用いた検証

5-4. EP₂受容体とEP₃受容体の化合物結合部位の構造比較

次に、ほぼ同等の活性強度のEP₂/EP₃作動活性のを有する化合物に構造を変換するにあたって、各受容体と化合物が結合する部位の一次アミノ酸²を比較した。両受容体のホモロジーモデルを作成し、化合物が結合する部位のタンパク構造を比較した結果を**Figure 5-4**に示す。モデル構造の鋳型として、ヒトS1P1受容体(PDBID:3V2Y)を利用し、参考情報として、ロドプシン(PDBID:1HZ)、アデノシンA2a受容体(PDBID:3EML)、β2アドレナリン受容体(PDBID:2RH1)、ヒスタミンH1受容体(PDBID:3RZE)、CXCR4受容体(PDBID:3OE6)を用いた。次に、化合物が結合すると推定される部位の中にあるアミノ酸で、EP₂受容体とEP₃受容体では異なるアミノ酸を有する箇所を調査したところ、EP₂受容体ではPhe280(フェニルアラニン)とLeu304(ロイシン)である箇所がEP₃受容体ではLeu298(ロイシン)とAla335(アラニン)であることが分かった。つまり、どちらも立体的にEP₂受容体の方がかさ高いアミノ酸構造であることから、化合物の構造の立体許容性に違いがあり、より立体的にかさ高くすることで、EP₂作動活性のみを弱められること、つまり化合物7SのEP₂/EP₃作動活性のバランスを適切に調整することができるのではないかと考察した。

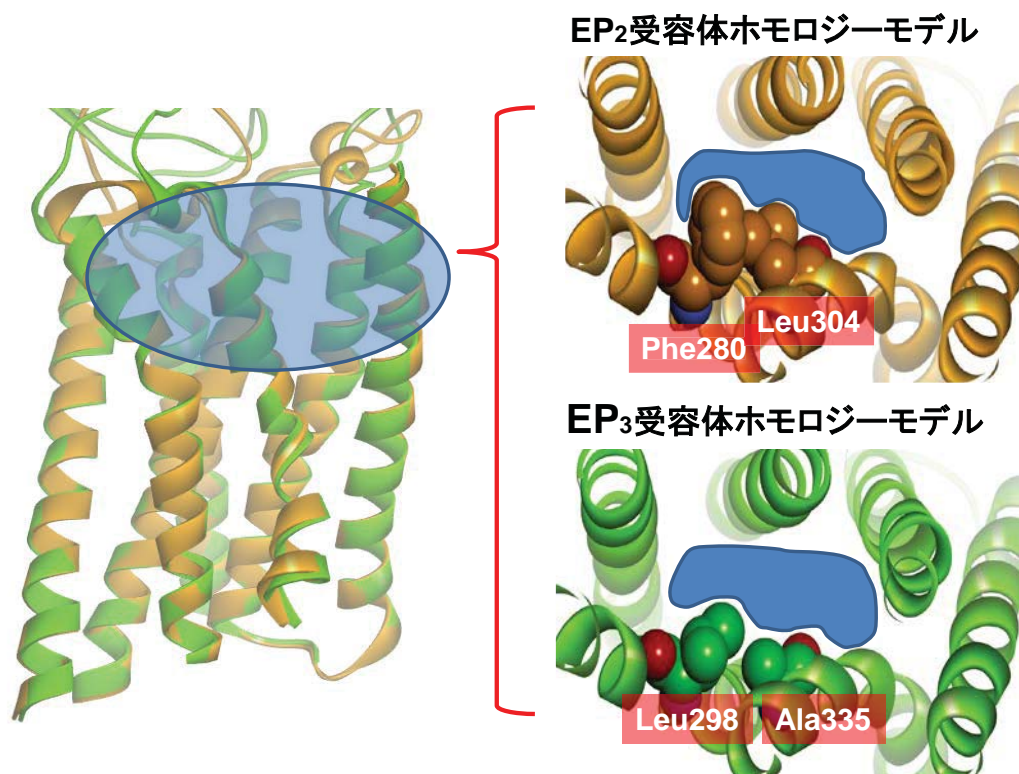
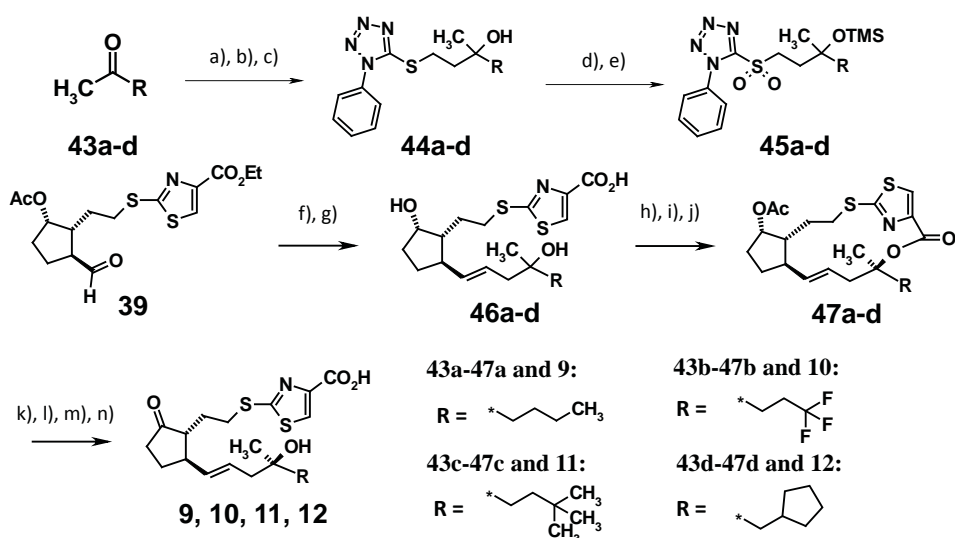


Figure 5-4. EP₂またはEP₃受容体の化合物結合部位比較 (ホモロジーモデル)

5-5. バランス最適化を指向した分子設計と構造活性相関

第5章3項で述べた考察に基づき、化合物 **8S** の EP₂/EP₃ 作動活性のバランスを鎖末端部分で最適化することを目指した。その合成法については、Scheme 5-2 に示す。化合物 **9**、**10**、**11**、**12** に対応するスルホン **45a-d** は Scheme 4-1 と同様の方法³にて、それぞれ合成した。化合物 **8** の合成中間体 **39** と Julia olefination 反応⁴をした後、アルカリ加水分解および酸性条件下での TMS 基の脱保護を行い、**46a-d** を合成した。その後は Scheme 5-1 にて示した化合物 **8S** と同様の方法にて、マクロラクトン低極性体 **47a-d** を經由して高極性体のジアステレオマー異性体と分割し、単一の化合物とした。その後も同様の方法にて、化合物 **9**、**10**、**11**、**12** を合成した。



a) ethyl bromoacetate, zinc, iodine, dioxane, 0°C, b) LiAlH₄, THF, 0°C, y.50-70% (for 2 steps), c) 5N NaOH aq., *n*-Bu₄NBr, TsCl, toluene, 0°C, then, 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiol, 60°C, y.80-86%, d) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, r.t., e) TMSCl, imidazole, CH₂Cl₂, r.t., y.75-82% (for 2 steps), f) KHMDS, **45a-d**, DME, -78°C, g) 2N NaOH aq., EtOH, r.t., then 1N HCl aq., y.64-77% (for 2 steps), h) Ac₂O, Pyridine, r.t., i) 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, DMAP, toluene, 100°C, j) separation by silica gel column chromatography, y.20-35% (for less polar lactone for 3 steps), k) 2N NaOH aq., THF/MeOH, r.t., l) ethyl iodide, K₂CO₃, DMF, r.t., m) SO₃-Py, DIPEA, DMSO, EtOAc, 0°C, n) LiOH, DME/H₂O, y.68-79% (for 4 steps).

Scheme 5-2. 化合物 **9**、**10**、**11**、**12** の合成法

これら化合物の 16 位の立体配置を *S* 体と推定した理由を次に述べる。Figure 5-5 に示すように、化合物 **42R** の類縁体として、 ω 鎖末端にシクロヘキシル基を有する化合物の低分子 X 線結晶構造の取得に成功し、本化合物の立体配置を決定することができた。本化合物はマクロラクトン体合成時の高極性体であり、本化合物の類縁体の **42R** についても、同じく 16 位不斉炭素の立体が *R* であると推定した。したがって、これら ω 鎖末端が異なっても、マクロラクトンの立体配置と分子の極性には影響を及ぼさないと推察し、化合物 **8S**、**9**、**10**、**11**、**12** の 16 位の立体配置を *S* 体と推定した。なお、最終体に導いた後で、16 位不斉炭素が *S* 体の方が *R* 体の化合物よりも高活性を示す (EP_2 および EP_3 作動活性) ことも確認しており、これら立体配置を推定した。

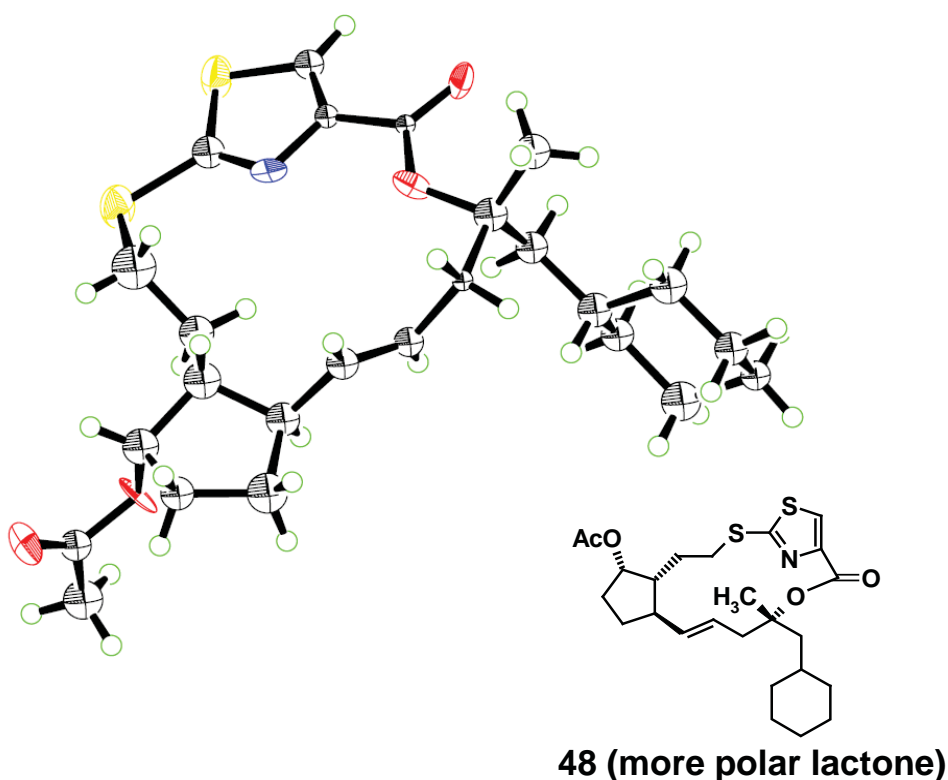
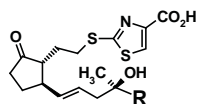


Figure 5-5. 類似環化体 **48** の低分子 X 線結晶構造

分子構造と活性との相関を **Table 5-1** に示す。まず、化合物 **8S** の ω 鎖末端の炭素鎖を一炭素減らした化合物 **9** は、ほぼ同等の EP₂/EP₃ 作動活性を示したため、EP₂/EP₃ バランスに与える影響がないことが分かった。次に、化合物 **9** の ω 鎖末端の炭素原子上の水素原子を全てフッ素原子に置き換えた化合物 **10** は、EP₂/EP₃ 作動活性がともに減弱する結果となり、同じく EP₂/EP₃ バランスに与える影響はなかった。次に、化合物 **9** の ω 鎖末端の炭素原子上の水素原子を全て炭素原子に置き換えた化合物 **11** は、EP₂/EP₃ 作動活性がともに減弱したが、特に大きく EP₂ 作動活性が減弱した結果となり、EP₂/EP₃ バランスが逆転し、EP₃ 作動活性の方が強い化合物となった。この結果は **第5章4項** で述べた立体的に EP₂ 受容体の方が立体許容性が狭いことと矛盾しないと考察した。そこで、かさ高い構造に変換する必要があるが、適度な立体構造としてシクロペンタン環を導入した化合物 **12** を合成した結果、EP₂/EP₃ 作動活性がともに 1 nM 程度であり、優れた EP₂/EP₃ 作動活性のバランスを示した。なおかつ、EP₄ 作動活性との選択性は 2000 倍以上であった。なお、念のためヒト EP₁ 受容体に対する作動活性も確認したところ、2000 nM であったため、EP₂/EP₃ 受容体に対して非常に強力かつ、選択的な作動薬であることを確認した。

Table 5-1. 化合物 **8S** 誘導体の構造活性相関 (EP₂/EP₃ 作動活性バランスの最適化)



cmpd	R	Functional assay EC ₅₀ (nM)			EP ₄ selectivity vs EP ₂ / vs EP ₃	Balance of EP ₂ / EP ₃
		hEP ₂	hEP ₃	hEP ₄		
8S		0.086	0.91	146	1698 / 160	0.095
9		0.068	0.80	26	382 / 33	0.085
10		0.37	3.5	127	343 / 36	0.11
11		31	3.4	>10000	>323 / >2941	9.1
12		1.1	1.0	2636	2396 / 2636	1.1

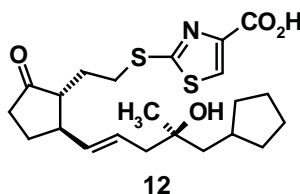
5-6. 薬物動態特性評価結果と考察

第2章3項で示した本研究の出発点である化合物3と比較する形で化合物12の膜透過性とヒト肝ミクロソーム中安定性のプロファイルについてTable 5-2に示す。化合物3と比較して、化合物12は大幅に膜透過性が高いことが分かった。ただし、肝ミクロソーム中安定性に関しては、脂溶性の向上に伴い、やや低下していることが分かった。そこで、ラット薬物動態試験を行い、生物学的利用率等を確認した。Figure 5-6に示すように生物学的利用率に関しては6%であり、化合物3と比較して数倍の向上に留まった。つまり、化合物8で認められたほどの良好な生物学的利用率は示さなかった。この原因については、脂溶性の増加に伴い、代謝酵素に対して認識されやすくなり、生体内での安定性がやや低下してしまったためと考えられた。化合物12の生体内での半減期は3.5時間であり、化合物8で認められた9.1時間と比べると血中濃度を持続できていないことが分かった。

Table 5-2. 化合物3と化合物12の膜透過性とヒト肝ミクロソーム中安定性

Compound	Caco-2 ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Stability in liver
		microsomes % remaining in HLM ^{a)}
3	0.78	100
12	6.5	60

a) HLM : human liver microsomes;
concentration of test compounds, 1 μ M; liver microsomes, 1 mg/mL



静脈内投与 (0.1 mg / kg)		経口投与 (0.1 mg / kg)	
クリアランス (mL/min/kg)	半減期 (hr)	AUC (μ g·h/mL)	Bioavailability (%)
20	3.5	5.0	5.8

Figure 5-6. 化合物12のラット薬物動態特性評価結果

その後、 ω 鎖末端の構造をさらに修飾することで生体内の安定性を改善し、EP₂/EP₃受容体に対してほぼ同程度の活性を示した **ONO-8055** (構造非開示) に導くことに成功している。**ONO-8055** は低活動膀胱のサル病態モデルにおいて、0.3 ng/kg/min の静脈内持続投与により、薬効 (残尿量の減少) を確認することができた⁵。なお、欧州では既に Phase I 試験を終了しており、少なくとも 700 μ g、1 日 2 回投与において、循環器系に全く作用を示さないことを確認できている。つまり、ヒトにおいて EP₂ と EP₃ 作動活性のバランスが優れていると、血圧に影響を与えないことを証明した。今後のさらなる臨床開発が期待される。

5-7. 小括

第4章で得られた化合物 **8** の 16 位ジアステレオマーを分割し、高活性体を明らかにしたが、EP₂ 作動活性が EP₃ 作動活性に対して強すぎるため、副作用として、降圧作用のリスクが懸念された。EP₂/EP₃ 受容体構造の違いから、立体的なかさ高さが必要と考察し、 ω 鎖末端へシクロペンタン構造を導入することで、EP₂/EP₃ 作動活性のバランスの最適化に成功した。

得られた化合物 **12** は非常に優れた膜透過性を示しながらも、生物学的利用率には改善の必要があることが明らかとなった。さらに生体内における代謝安定性を向上する分子設計を行い、本化合物の類似構造を **ONO-8055** として、サル病態モデルで薬効を確認した上で低活動膀胱を適応とした臨床段階に進めることができた。なお、欧州では既に Phase I 試験を終了しており、少なくとも 700 μ g、1 日 2 回投与において、循環器系に全く作用を示さないことを確認できており、全く新規の作用機序で優れた薬効を示す低活動膀胱治療薬として、今後の臨床開発の進展が期待される。

5-8. 実験の部

General Procedure is same as described in chapter 2-7.

(5R,6S,9R,10E,13S)-13-methyl-15-oxo-13-pentyl-14-oxa-2,18-dithia-19-azatricyclo[14.2.1.0~5,9~]nonadeca-1(19),10,16-trien-6-yl acetate (42S)

Acetic anhydride (0.06 mL) was added to a pyridine solution (1.5 mL) of **41** (134 mg) under ice cooling, followed by stirring at room temperature overnight. The reaction mixture was poured into 1N hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated to give acetate (131 mg). A solution of the acetate (131 mg) in toluene (53 mL) was treated with 4,4-dimethylaminopyridine (323 mg) at room temperature and then heated to 100 °C. 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (0.25 mL) was added thereto. After stirring for 15 min at 100 °C, the reaction mixture was cooled to room temperature, then poured into a saturated aqueous solution of sodium hydrogen carbonate, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried with anhydrous sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane : ethyl acetate = 15 : 1) to obtain compound **42S** (less polar lactone, 49 mg, 35%). **42R** (more polar lactone, 35 mg, 25% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.46 (m, 13H), 2.16 (m, 8H), 2.39 (m, 1H), 2.68 (m, 1H), 2.88 (m, 2H), 3.32 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.43 (m, 1H), 5.62 (m, 1H), 7.94 (s, 1H).

(5R,6S,9R,10E,13R)-13-methyl-15-oxo-13-pentyl-14-oxa-2,18-dithia-19-azatricyclo[14.2.1.0~5,9~]nonadeca-1(19),10,16-trien-6-yl acetate (42R)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.66 (m, 20H), 2.38 (m, 3H), 2.92 (m, 2H), 3.24 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.43 (m, 1H), 5.58 (m, 1H), 7.94 (s, 1H).

2-[(2-[(1R,2R)-2-[(1E,4S)-4-hydroxy-4-methyl-1-nonen-1-yl]-5-oxocyclopentyl]ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (8S)

42S (183 mg) was dissolved in a mixed solvent of methanol (1.3 mL) and tetrahydrofuran (2.6 mL), and treated with a 2N aqueous solution of sodium hydroxide (0.59 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, subsequently poured into 1N hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated to give diol carboxylic acid (187 mg). Potassium carbonate (218 mg) and ethyl iodide (0.064 mL) were added to a dimethylformamide solution (2.0 mL) of diol carboxylic

acid (174 mg), followed by stirring at room temperature overnight. The reaction solution was poured into water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated to give ethyl ester (173 mg). Diisopropylethylamine (0.51 mL) and sulfur trioxide-pyridine complex (286 mg) were added to a dimethyl sulfoxide (1.2 mL)/ethyl acetate (2.4 mL) solution of ethyl ester compound (173 mg) under ice cooling, followed by stirring for 15 min. The reaction was quenched with water, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with 1N hydrochloric acid, water and brine, dried with anhydrous sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane : ethyl acetate = 3 : 2) to give keto ethyl ester (110 mg). The keto ethyl ester (110 mg) was dissolved in 1,2-dimethoxyethane (2.0 mL)/water (1.0 mL), and treated with lithium hydroxide (16.0 mg) under ice cooling, followed by stirring at room temperature for 2 hours. The reaction mixture was poured into a 5% aqueous solution of potassium hydrogen sulfate and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and brine, dried with anhydrous sodium sulfate, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane : ethyl acetate = 1 : 1 → methanol : ethyl acetate = 1 : 10) to provide compound **8S** (90.5 mg, 80% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (m, 3H), 2.59 (m, 21H), 3.75 (m, 4H), 5.52 (dd, *J* = 15.0, 7.8 Hz, 1H), 5.77 (m, 1H), 8.11 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 14.06, 22.65, 23.55, 26.54, 27.62, 28.25, 31.98, 32.33, 37.54, 41.95, 44.57, 46.35, 53.77, 72.95, 127.38, 127.44, 136.09, 146.41, 161.03, 166.10, 219.11.; HRMS (ESI, pos.) C₂₁H₃₂O₄NS₂ (M + H)⁺, Obs. 426.1767, Calc. 426.6131.

2-[(2-[(1*R*,2*R*)-2-[(1*E*,4*R*)-4-hydroxy-4-methyl-1-nonen-1-yl]-5-oxocyclopentyl)ethyl]thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (8R**)**

Starting from **42R** following the same procedure as compound **8S** provided compound **8R**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (m, 3H), 2.58 (m, 21H), 3.67 (m, 4H), 5.53 (dd, *J* = 15.0, 8.2 Hz, 1H), 5.77 (m, 1H), 8.11 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 14.07, 22.63, 23.55, 26.53, 27.62, 28.22, 31.98, 32.31, 37.55, 41.92, 44.57, 46.34, 53.77, 72.94, 127.38, 127.42, 136.09, 146.41, 161.01, 166.11, 219.11.; HRMS (ESI, pos.) C₂₁H₃₂O₄NS₂ (M + H)⁺, Obs. 426.1767, Calc. 426.6131.

3-methyl-1-[(1-phenyl-1*H*-tetrazol-5-yl)thio]-3-heptanol (44a**)**

Starting from 2-hexanone following the same procedure as compound **34** provided **44a**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.34 (m, 4H), 1.52 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 7.57 (m, 5H).

5-({3-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]heptyl)sulfonyl}-1-phenyl-1H-tetrazole (45a)

Starting from **44a** following the same procedure as **35** provided compound **45a**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.12 (s, 9H), 0.92 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.30 (m, 7H), 1.56 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 7.76 (m, 5H).

2-[(2-{{(1R,2S,5R)-2-hydroxy-5-[(1E)-4-hydroxy-4-methyl-1-octen-1-yl]cyclopentyl}ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (46a)

Starting from **45a** following the same procedure as **41** provided **46a**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.91 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.42 (m, 12H), 2.02 (m, 3H), 2.45 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 5.36 (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 8.08 (s, 1H).

(5R,6S,9R,10E,13S)-13-butyl-13-methyl-15-oxo-14-oxa-2,18-dithia-19-azatricyclo[14.2.1.0~5,9~]nonadeca-1(19),10,16-trien-6-yl acetate (47a)

Starting from compound **46a** instead of **42S** following the same procedure as **41** provided **47a**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.91 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.36 (m, 11H), 2.06 (m, 7H), 2.38 (m, 1H), 2.66 (m, 1 H), 2.88 (m, 2 H), 3.32 (m, 2 H), 5.31 (m, 1 H), 5.43 (m, 1 H), 5.60 (m, 1 H), 7.94 (s, 1 H).

2-[(2-{{(1R,2R)-2-[(1E,4S)-4-hydroxy-4-methyl-1-octen-1-yl]-5-oxocyclopentyl}ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (9)

Starting from compound **47a** instead of **42S** following the same procedure as compound **8S** provided compound **9** as colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.37 (m, 4H), 1.53 (m, 2H), 1.77 (m, 1H), 2.27 (m, 7H), 2.59 (m, 2H), 3.51 (m, 2H), 5.50 (dd, *J* = 15.0, 8.0 Hz, 1H), 5.77 (m, 1H), 8.09 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 14.12, 23.22, 26.08, 26.55, 27.60, 28.24, 32.00, 37.54, 41.71, 44.57, 46.34, 53.75, 72.92, 127.37, 127.43, 136.10, 146.44, 161.04, 166.08, 219.10.; HRMS (ESI, pos.) C₂₀H₃₀O₄NS₂ (M + H)⁺, Obs. 412.1611, Calc. 412.5865.

6,6,6-trifluoro-3-methyl-1-[(1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]-3-hexanol (44b)

Starting from 2-hexanone following the same procedure as compound **34** provided **44b**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.24 (s, 3H), 1.56 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 2.31 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 7.57 (m, 5H).

1-phenyl-5-((6,6,6-trifluoro-3-methyl-3-((trimethylsilyl)oxy)hexyl)sulfonyl)-1H-tetrazole (45b)

Starting from **44b** following the same procedure as **35** provided compound **45b**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.12 (s, 9H), 1.34 (m, 3H), 1.58 (m, 2H), 2.09 (m, 2H), 2.31 (m, 2H), 3.80 (m, 2H), 7.75 (m, 5H).

2-[(2-((1R,2S,5R)-2-hydroxy-5-

[(1E)-7,7,7-trifluoro-4-hydroxy-4-methyl-1-hepten-1-yl]cyclopentyl)ethyl)thio]-

1,3-thiazole-4-carboxylic acid (46b)

Starting from **45b** following the same procedure as **41** provided **46b**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.15 (s, 3H), 1.48 (m, 8H), 2.05 (m, 3H), 2.33 (m, 2H), 2.46 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 3.59 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 5.35 (m, 1H), 5.46 (m, 1H), 8.09 (s, 1H).

(5R,6S,9R,10E,13S)-13-methyl-15-oxo-13-(3,3,3-trifluoropropyl)-14-oxa-2,18-dithia-

19-azatricyclo[14.2.1.0~5,9~]nonadeca-1(19),10,16-trien-6-yl acetate (47b)

Starting from compound **46b** instead of **42S** following the same procedure as **41** provided **47b**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.36 (m, 7H), 2.06 (m, 7H), 2.38 (m, 3H), 2.68 (m, 1H), 2.85 (m, 2H), 3.31 (m, 2H), 5.34 (m, 1H), 5.45 (m, 1H), 5.63 (m, 1H), 7.95 (s, 1H).

2-[(2-((1R,5R)-2-oxo-5-[(1E,4S)-7,7,7-trifluoro-4-hydroxy-4-methyl-1-hepten-1-yl]cyclopentyl)ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid (10)

Starting from compound **47b** instead of **42S** following the same procedure as compound **8S** provided compound **10** as colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.19 (s, 3H), 1.81 (m, 3H), 2.31 (m, 9H), 2.57 (m, 2H), 3.37 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 5.53 (dd, *J* = 15.1, 7.6 Hz, 1H), 5.75 (m, 1H), 8.10 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 26.39, 27.55, 28.12, 28.46, 31.83, 33.43, 33.45, 37.50, 44.97, 46.18, 53.62, 71.25, 126.36, 127.50, 136.89, 146.12, 161.04, 166.25, 218.98.; HRMS (ESI, pos.) C₁₉H₂₅O₄NF₃S₂ (M + H)⁺, Obs. 452.1172, Calc. 452.5313.

3,6,6-trimethyl-1-[(1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]-3-heptanol(44c)

Starting from 5,5-dimethylhexane-2-one following the same procedure as compound **34** provided **44c**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (s, 9H), 1.23 (s, 3H), 1.33 (m, 2H), 1.54 (m, 2H), 2.04 (m, 2H), 3.46 (m, 2H), 7.57 (m, 5H).

1-phenyl-5-({3,6,6-trimethyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]heptyl)sulfonyl}-1H-tetrazole(45c)

Starting from **44c** following the same procedure as **35** provided compound **45c**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.12 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.30 (m, 5H), 1.55 (m, 2H), 2.07 (m, 2H), 3.80 (m, 2H), 7.76 (m, 5H).

2-[(2-{{(1R,2S,5R)-2-hydroxy-5-[(1E)-4-hydroxy-4,7,7-trimethyl-1-octen-1-yl]cyclopentyl}ethylthio)-1,3-thiazole-4-carboxylic acid(46c)

Starting from **45c** following the same procedure as **41** provided **46c**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (s, 9H), 1.15 (s, 3H), 1.24 (m, 2H), 1.39 (m, 6H), 1.88 (m, 2H), 2.10 (m, 3H), 2.44 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 5.37 (m, 1H), 5.46 (m, 1H), 8.06 (s, 1H).

(5R,6S,9R,10E,13S)-13-(3,3-dimethylbutyl)-13-methyl-15-oxo-14-oxa-2,18-dithia-19-azatricyclo[14.2.1.0~5,9~]nonadeca-1(19),10,16-trien-6-yl acetate(47c)

Starting from compound **46c** instead of **42S** following the same procedure as **41** provided **47c**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (s, 9H), 1.30 (m, 7H), 2.06 (m, 9H), 2.39 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.88 (m, 2H), 3.32 (m, 2H), 5.31 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.62 (m, 1H), 7.95 (s, 1H).

2-[(2-{{(1R,2R)-2-[(1E,4S)-4-hydroxy-4,7,7-trimethyl-1-octen-1-yl]-5-oxocyclopentyl}ethylthio)-1,3-thiazole-4-carboxylic acid(11)

Starting from compound **47c** instead of **42S** following the same procedure as compound **8S** provided compound **11** as yellow viscous oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.89(s, 9H), 1.33(m, 5H), 1.53(m, 2H), 1.77(m, 1H), 2.30(m, 7H), 2.58(m, 2H), 3.35(t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 5.54(dd, *J* = 15.7, 8.2 Hz, 1H), 5.76(m, 1H), 8.11(s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 26.66, 27.52, 28.24, 29.35, 30.02, 31.97, 36.55, 37.56, 37.62, 44.38, 46.21, 53.72, 72.90, 127.32, 127.37, 136.06, 146.38, 160.87, 166.10, 219.15.; HRMS (ESI, pos.) C₂₂H₃₄O₄NS₂ (M + H)⁺, Obs. 440.1924, Calc. 440.6397.

1-cyclopentyl-2-methyl-4-[(1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]-2-butanol(44d)

Starting from 4-cyclopentyl-2-butanone following the same procedure as compound **34** provided **44d**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.16 (m, 4H), 1.27 (s, 3H), 1.60 (m, 5H), 1.88 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 3.48 (m, 2H), 7.56 (m, 5H).

5-({4-cyclopentyl-3-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]butyl)sulfonyl}-1-phenyl-1H-tetrazole(45d)

Starting from **44d** following the same procedure as **35** provided compound **45d**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.12 (s, 9H), 1.35 (m, 8H), 1.66 (m, 6H), 2.06 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 7.76 (m, 5H).

2-[(2-[(1R,2R,5S)-2-[(1E)-5-cyclopentyl-4-hydroxy-4-methyl-1-penten-1-yl]-5-hydroxycyclopentyl]ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid(46d)

Starting from **45d** following the same procedure as **41** provided **46d**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.15 (s, 3H), 1.49 (m, 8H), 1.88 (m, 5H), 2.08 (m, 2H), 2.20 (m, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.93 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 5.37 (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 8.07 (s, 1H).

(5R,6S,9R,10E,13S)-13-(cyclopentylmethyl)-13-methyl-15-oxo-14-oxa-2,18-dithia-19-azatricyclo[14.2.1.0~5,9~]nonadeca-1(19),10,16-trien-6-yl acetate(47d)

Starting from compound **46d** instead of **42S** following the same procedure as **41** provided **47d**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.20 (m, 4H), 1.66 (m, 8H), 1.89 (m, 5H), 2.22 (m, 6H), 2.37 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 3.34 (m, 2H), 5.31 (m, 1H), 5.45 (m, 1H), 5.62 (m, 1H), 7.95 (s, 1H).

2-[(2-[(1R,2R)-2-[(1E,4S)-5-cyclopentyl-4-hydroxy-4-methyl-1-penten-1-yl]-5-oxocyclopentyl]ethyl)thio]-1,3-thiazole-4-carboxylic acid(12)

Starting from compound **47d** instead of **42S** following the same procedure as compound **8S** provided compound **12** as yellow viscous oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.32(m, 22H), 2.59(m, 2H), 3.09(m, 2H), 3.36(t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.51(dd, *J* = 15.0, 6.0 Hz, 1H), 5.70(dt, *J* = 15.0, 7.4 Hz, 1H), 8.10(s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 25.00, 25.06, 27.09, 27.61, 28.24, 31.99, 34.50, 34.56, 36.00, 37.54, 45.37, 46.34, 48.04, 53.75, 73.33, 127.43, 127.50, 136.09, 146.40, 161.06, 166.11, 219.14.; HRMS (ESI, pos.) C₂₂H₃₂O₄NS₂ (M + H)⁺, Obs. 438.1767, Calc. 438.6238.

Measurement of blood pressure

The blood pressures and heart rates of female Wistar rats were measured in accordance with the following procedure. On the day of measurement, indwelling of catheters for blood pressure-heart rate measurement was carried out under anesthesia with ether. The back of the neck of each rat was incised; a feeding catheter (Atom Medical Corporation) filled with heparinized physiological saline was introduced from the back of the neck; the catheter was inserted into the common carotid artery; and the surgical incision was closed. The measurements were carried out in a Bollmann cage under the conscious state, and the evaluations were carried out after confirming that the individual parameters were stabilized. After confirming the stabilization of blood pressure and heart rate, the test compound which was prepared using injectable water containing equimolar NaOH was orally administered at a dose of 5 mL/kg.

The catheter drawn from the back of the neck was connected to a pressure transducer (DX-200, NIHON KOHDEN CORP.), and the blood pressures were measured using an amplifier for pressure measurement (Gould Instrument). The blood pressures were recorded using a recorder (LINEARCORDERWR3320, GRAPHTEC). For each individual, rates of increase and decrease in average blood pressure before administration and 30, 60, 120, and 180 min after administration were calculated with respect to the values of each individual before administration. Changes in blood pressure before and after administration of the test compound were evaluated.

5-9. 参考文献

1. Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1979**, *52*, 1989.
2. Isberg, V., *Nucleic Acids Research*, **2016**, *44*, 356.
3. Reformatsky, S., *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **1887**, *20*, 1210.
4. Julia, M.; Paris, J. M., *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *14*, 4833.
5. Matsuya H; Sekido N.; Kida J.; Mashimo H.; Wakamatsu D.; Okada H., *LUTS*, **2017**, *in press*.

第6章

総括

第1章では、本研究の背景であるプロスタグランジン E₂ の各受容体と創薬概念等に関して概略を述べた。また本研究の目的として、非天然型プロスタグランジン誘導体の化学構造と活性や物性との相関を考察し、望ましい EP₂/EP₃ 作動活性強度、バランス、他のサブタイプとの選択性、血中動態を有する医薬品候補化合物を取得することであることを述べた。

第2章では、既知の EP₂/EP₄ 受容体に選択的な作動薬に EP₃ 作動活性を付与させることを狙いとして、EP₃ 受容体に作用するプロスタグランジン誘導体である Gemeprost の部分構造を導入した。化合物設計の方針として、化学的に安定な 5 員環ラクタム構造及び EP₂ 作動活性に大きく寄与する α 側鎖の構造は保持し、Gemeprost の ω 側鎖構造のみを導入した結果、望ましい EP₃ 作動活性の付与に成功した。さらに EP₄ 作動活性のみ減弱させることができれば、EP₂/EP₃ 受容体に選択的な作動薬に導くことが可能と考察した。

第3章では、EP₄ 受容体と異なるアミノ酸構造の領域に位置する 5 員環構造を変換した。その結果、EP₄ 作動活性のみ減弱させることに成功し、さらにその誘導体から、EP₁ との結合活性を減弱させた化合物を取得できた。EP₄ 受容体は脂溶性低下、EP₁ 受容体は脂溶性向上がそれぞれの活性低下に寄与していると考察した。これらは各受容体の脂溶性を認識する部位のアミノ酸一次配列構造が EP₂/EP₃ 受容体では共通し、EP₁/EP₄ 受容体では異なることが原因であると考察した。

第4章では、前章までに見出した化合物の経口吸収性が低いことを確認し、その原因について考察した。その結果、酸化代謝の回避と膜透過性向上の両立を目指した化合物設計が必要であると考察した。酸化代謝の回避を狙いとして、二級水酸基を三級水酸基に変換するとともに、15 位から 16 位の炭素原子上に位置を移動させた。また、分子全体の極性表面積の低下による膜透過性改善を狙いとしてヘテロ原子数を削減したシクロペンタノン構造への変換により、経口投与可能な化合物の取得に成功した。

第5章では、前章までに見出した化合物が 16 位不斉炭素のみ混合物であったため、分割体を合成し、高活性体を明らかにした。ただし、EP₂ 作動活性が EP₃ 作動活性に対して強すぎるため、副作用として、降圧作用リスクが懸念された。EP₂/EP₃ 受容体の一次アミノ酸配列から、結合する化合物の立体的な許容性に違いがあると考察し、ω 鎖末端部位にシクロペンタン構造を導入することで、EP₂/EP₃ 作動活性バランスの最適化に成功した。また、第3章にて得られた化合物に対して、数倍の経口吸収性の向上を確認した。

以上のように、プロスタグランジン EP₂ と EP₃ 受容体に選択的な作動活性を示し、膜透過性や代謝安定性に優れた化合物の創製に成功した。ただし、本化合物には薬物動態特性の課題が残されており、その後の部分構造変換において、代謝安定性向上に成功した構造の取得に成功した。開発番号である **ONO-8055** として臨床段階に進められ、現在も開発中

である。本研究を通じて得られた EP₂ と EP₃ 受容体に対する知見が、低活動膀胱を始めとして、医療ニーズを満たす有用な治療薬へとつながることが強く期待される。また、各受容体のアミノ酸配列構造と結合する化合物の構造を活性と照らし合わせて考察することにより、プロスタグランジン E₂ の各受容体に対する知見や関連する脂質研究の進展にも非常に寄与することが期待できる。

謝辞

本論文をまとめるに当たり、終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学研究室 垣内喜代三教授に深く感謝し、心からお礼を申し上げます。

また、本論文を作成するに当たり有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 廣田俊教授、榎本裕志教授、森本積准教授に心から感謝申し上げます。

本研究は、小野薬品工業株式会社 水無瀬研究所において行われました。本研究および本論文の投稿に当たり終始懇切なご指導とご助言を賜りました大元和之博士に深く感謝申し上げます。

本研究の推進に当たり、有益な議論を通して薬理的評価において奮闘していただきました松屋秀和氏、岡田啓希博士に深く感謝申し上げます。

本研究の推進に当たり、有益な議論を通して多くの化合物を合成し、合成法の開発においても奮闘していただきました東野勝人博士、吉田孝司氏、荒谷祥之氏、角内章人博士、花田圭介氏、武田博之博士、長縄厚志博士に深く感謝申し上げます。

また、X線結晶構造解析を行って頂いた故小田垣良彦博士と、ホモロジーモデリングや計算化学面において有益なご助言を頂きました江頭啓氏に深く感謝申し上げます。

紙面の都合上ここには記載しきれませんが、本研究の推進に当たり、有益なご助言を賜りました、水無瀬研究所の多くの諸先輩方、同僚、後輩の研究員の皆様に厚く御礼申し上げます。

本論文を終えるに当たり、これまでお世話になった全ての家族・友人・関係者に感謝するとともに、本論文の作成中に負担をかけた妻 千春、一緒にいる時間が少なくなってしまった娘 凜乃、本論文の作成終了直後に誕生した息子 葵葉に心から感謝します。

研究業績リスト

学位論文の主たる部分を公表した論文

1. Discovery of highly potent dual EP₂ and EP₃ agonists with subtype selectivity,
Akihiro Kinoshita, Masato Higashino, Yoshiyuki Aratani, Akito Kakuuchi, Hidekazu Matsuya,
and Kazuyuki Ohmoto,
Bioorg. Med. Chem. Lett. **2016**, 26, 1016-1019.
2. Synthesis and Evaluation of a Potent, Well-balanced EP₂/EP₃ Dual Agonist,
Akihiro Kinoshita, Masato Higashino, Koji Yoshida, Yoshiyuki Aratani, Akito Kakuuchi, Keisuke
Hanada, Hiroyuki Takeda, Atsushi Naganawa, Hidekazu Matsuya, Kazuyuki Ohmoto,
Bioorg. Med. Chem. **2017**, 26, 200-214.

学位論文記載の構造を含む出願特許

1. BLOOD FLOW PROMOTERS FOR CAUDA EQUINA TISSUES,
Kazuyuki Ohmoto, Akihiro Kinoshita, Yoshihisa Kamanaka, and Hidekazu Matsuya,
US7833995B2, WO/2005/053707 (国際出願)
—日本, 米国, 欧州の各国等で成立済み
発明寄与度 30%、寄与率 2 位
2. AGENT FOR REGENERATION AND/OR PROTECTION OF NERVES,
Kazuyuki Ohmoto, Akihiro Kinoshita, and Hidekazu Matsuya,
US7863263B2, WO/2006/129788 (国際出願)
—日本, 米国, 欧州の各国等で成立済み
発明寄与度 35%、寄与率 2 位
3. COMPOUND HAVING DETRUSOR MUSCLE-CONTRACTING ACTIVITY AND
URETHRAL SPHINCTER MUSCLE-RELAXING ACTIVITY
Kazuyuki Ohmoto, Akihiro Kinoshita, Hidekazu Matsuya, Hiroki Okada
US8410281B2, WO/2010/143661 (国際出願)
—日本, 米国, 欧州の各国等で成立済み
発明寄与度 25%、寄与率同率 1 位

学位論文内容を含む学会発表

1. 日本薬学会第 137 回春季年会中, 第 3 回国際創薬シンポジウム (平成 29 年 3 月)
表題 ; Synthesis and Evaluation of Potent, orally available, well-balanced EP₂ and EP₃ Dual
Agonists (Oral Presentation & Poster)
Akihiro Kinoshita, Masato Higashino, Koji Yoshida, Yoshiyuki Aratani, Akito Kakuuchi, Keisuke
Hanada, Hiroyuki Takeda, Toshihiko Nishiyama, Hidekazu Matsuya, Kazuyuki Ohmoto

その他, 学位論文内容に含まれない参考論文

1. Discovery of Novel Seven-Membered Prostacyclin Analogs as Potent and Selective Prostaglandin FP and EP₃ Dual Agonists,
Isamu Sugimoto, Tohru Kambe, Tomotaka Okino, Tetsuo Obitsu, Nobukazu Ohta, Taihei Nishiyama, Akihiro Kinoshita, Taku Fujimoto, Hiromu Egashira, Shinsaku Yamane, Satoshi Shuto, Kousuke Tani, and Toru Maruyama,
ACS Medicinal Chemistry Letters **2017**, *8*, 107-112.
2. Catalytic asymmetric Nozaki-Hiyama reactions with a tridentate bis(oxazoliny)carbazole ligand,
Masahiro Inoue, Takahiro Suzuki, Akihiro Kinoshita, and Masahisa Nakada,
Chem Rec. **2008**, *8*, 169-181.
3. A New Asymmetric Tridentate Carbazole Ligand: Its Preparation and Application to Nozaki-Hiyama Allylation,
Takahiro Suzuki, Akihiro Kinoshita, Hatsuo Kawada, and Masahisa Nakada,
Synlett. **2003**, *4*, 570-572.

その他, 学位論文内容に含まれない出願特許

1. AMINE SALT AND CRYSTALS THEREOF,
Kousuke Tani, Akihiro Kinoshita, Keisuke Hanada, Yoshiyuki Aratani, Takahiro Nekado, and Atsushi Shimabukuro,
US9643940B2, WO2014/034902 (国際出願)
—日本、米国、欧州の各国等で成立済み

以上