

論文の内容の要旨

論文題目 自己免疫疾患治療薬を指向した新規 ROR γ t 逆作動薬の合成研究

氏名 佐藤 歩

【研究の背景】自己免疫疾患は免疫系が自分自身の細胞を攻撃し、ダメージを与える炎症性の疾患である。従来の薬物療法の中心は非ステロイド性抗炎症薬やステロイド、免疫調整薬や免疫抑制薬であった。近年では TNF- α 阻害薬や、IL-6 阻害薬などの抗体医薬が関節リウマチの治療に用いられ、炎症性サイトカインの抑制が自己免疫疾患の治療に有効であることが示されてきている。しかしながら、ステロイドや免疫抑制剤は副作用が問題となり、抗体医薬は高額な薬剤費や静脈投与のため頻回の通院が必要で、患者への負担となっている。そのため、副作用が低減された経口投与可能な低分子治療薬が切望されている。ROR γ t は T 細胞に発現している核内オーファン受容体であり、IL-17A/F および IL-23 レセプターの発現を調整している¹。ROR γ t ノックアウトマウスは Th17 細胞の分化の不全を引き起こし、潰瘍性大腸炎や実験的自己免疫性脳脊髄炎等の種々の自己免疫疾患モデルに抵抗性であることが示されている。また、ROR γ t は Th17 細胞の分化と活性化の双方に関与することから、その阻害による高い薬効が期待される。筆者は、ROR γ t 逆作動薬が創成できれば、炎症性自己免疫疾患に対する治療薬の新たな選択肢になるものと考え研究に着手した。

【ライブラリ化合物からの展開】ハイスループットスクリーニングより、カルバゾール誘導体 **1** を見出した (Figure 1)。化合物 **1** は結合活性が 7.5 nM と強く、レポーター活性も 92 nM と良好であったため、本化合物を出発点として研究を開始することとした。化合物 **1** はラット経口吸収性が低く、原因として高い脂溶性 (clogP:5.8) に起因する低い溶解度 (JP2: 0.2 μ g/mL) が考えられた。経口吸収性を高めるため、リピンスキー則²、特に clogP<5 を指標に変換を行うことを念頭に、左端カルバゾール環、リンカー部、シアノフェニル基と各部分の構造活性相関を取得し、その情報から活性向上・物性改善を行うこととした。公知の ROR γ t 逆作動薬ジゴキシン³と ROR γ t タンパクとの結晶構造⁴ (PDB:3B0W) を元に化合物 **1** のドッキングモデルを作成したところ、シアノフェニル基が Arg367、カルバゾール環が His479 側に向いていることが推定された。まずリンカー部の検討を行い、ヒット化合物が有していた 3-メチルペンタン-1,5-ジアミド構造が最適であることを確認した。右端のシアノフェニル基部位では、周辺のアミノ酸残基と相互作用を強める目的でシアノ基オルト位にクロロ基を導入した **9f** が、11 nM と強いレポーター活性を示すことを発見した。化合物 **9f** は溶解度に課題があったため (JP2: 0.15 μ g/mL)、カルバゾール環の脂溶性を低減させながら活性発現に必須な相互作用を保つ分子設計を行い、溶解度が改善された **18h** (JP2: 42 μ g/mL) へと導いた。化合物 **18h** のキナゾリジンジオン環上置換基を最適化して活性が向上した **18i** は、ラット EAE モデルにおいて 100 mg/kg でリンパ節 IL-17A mRNA の上昇を抑制した。また、ROR γ t タンパクと **18h** の X 線共結晶構造解析の結果、ジゴキシン等既存

の逆作動薬とは異なる U 字型活性コンフォメーションを取るという知見を得た (Figure 2)。

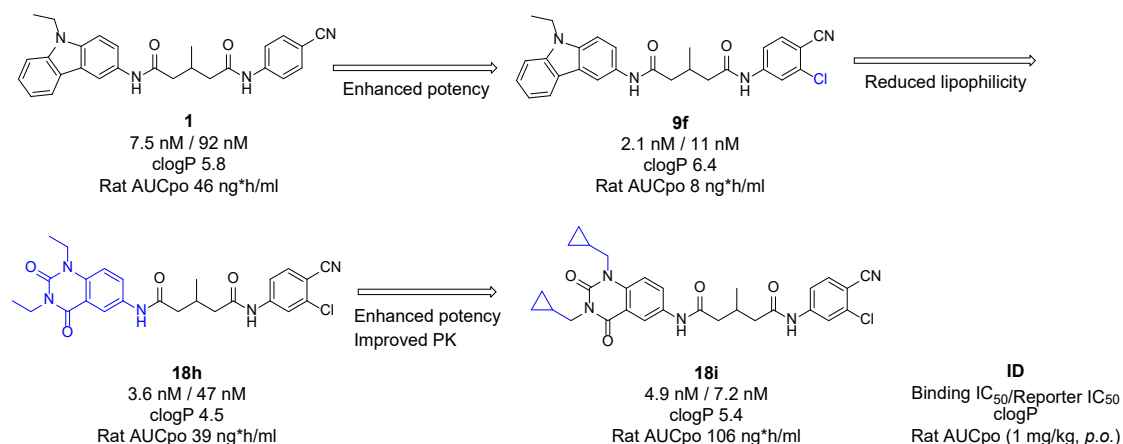


Figure 1. Carbazole hit compound **1** to quinazolinone **18i**.

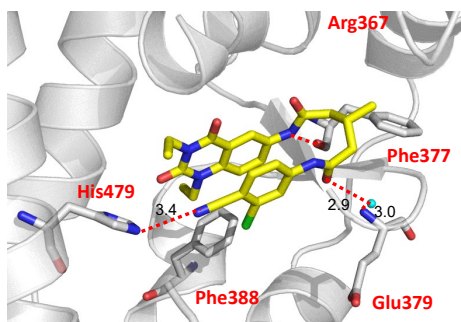


Figure 2. Structure of inverse agonist **18h** complex with the C-terminal truncated ROR γ t protein.

【リード化合物からの展開】化合物 **18i** は薬効試験に用いるマウスでの薬物動態が課題であった。回転可能結合数が少ないほど経口吸収性が良い化合物の割合が高いという報告⁵を参考に、**18h** の U 字型構造を固定化することで薬物動態に優れた化合物を見出すこととした。文献⁶⁻⁷および自社の知見を元に、U 字構造を取りやすいことが期待される化合物をデザインしたところ、シスのシクロペンタン誘導体 **21** およびピペリジン誘導体 **50** が強い活性を示した (Figure 3)。各々について代謝部位ブロックおよび脂溶性低減の戦略を用いて薬物動態改善の検討を行った。シクロペンタン誘導体 **21** をテトラヒドロフラン環へと変換した化合物 **29** では薬物動態が改善されなかった。一方、ピペリジン誘導体 **50** を変換したモルホリン誘導体 **51** において大幅な AUC (Area under the curve) の向上を達成し、さらにエーテル結合をアミド結合へと変換した化合物 **52** でレポーター活性が向上することが判明した。

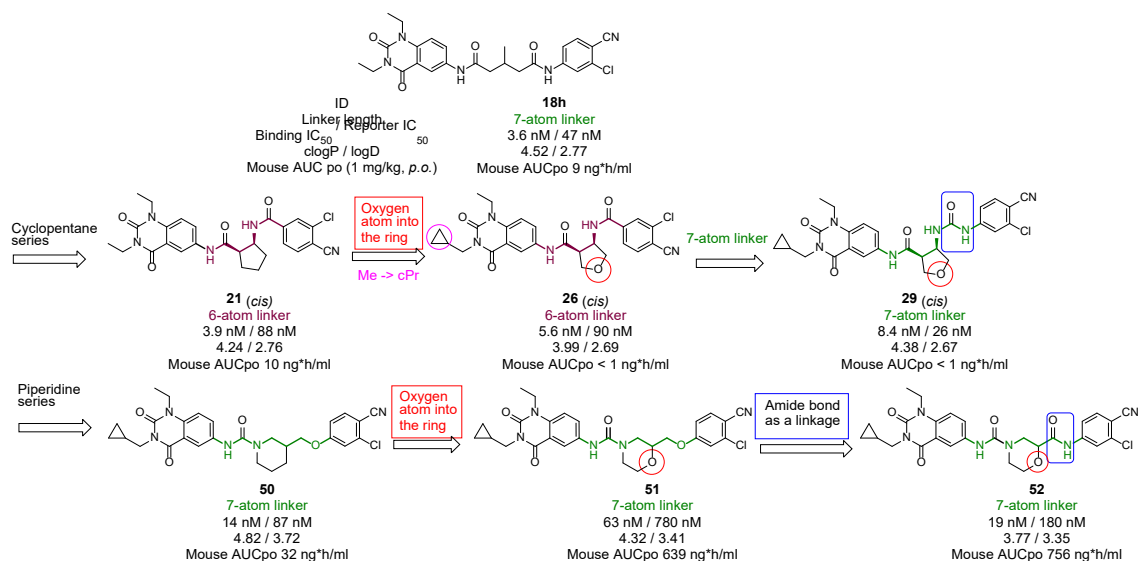


Figure 3. Schematic diagram of scaffold hopping.

【活性向上に向けた SBDD および薬効試験】モルホリンアミド誘導体 **52** はレポーター活性が 170 nM であったため、活性の向上が必要であった。化合物 **18h** のキナゾリジンジオン環 1 位窒素原子上のエチル基と Phe388 が近接することが X 線構造から確認されている。また、この Phe388 との脂溶性相互作用を獲得することで活性が向上するという別系統の化合物の知見を活用し⁸、キナゾリジンジオン環の置換基変換を行い、イソプロピル基を導入した化合物 **56b** でレポーター活性が向上した (Figure 4)。化合物 **56b** を光学分割した *R* 体 **57** は薬物動態も良好であったため、化合物 **57** を自己免疫疾患モデル動物で評価することとした。化合物 **57** は、30 mg/kg の経口投与で IL-17A mRNA の発現を 59%抑制した。

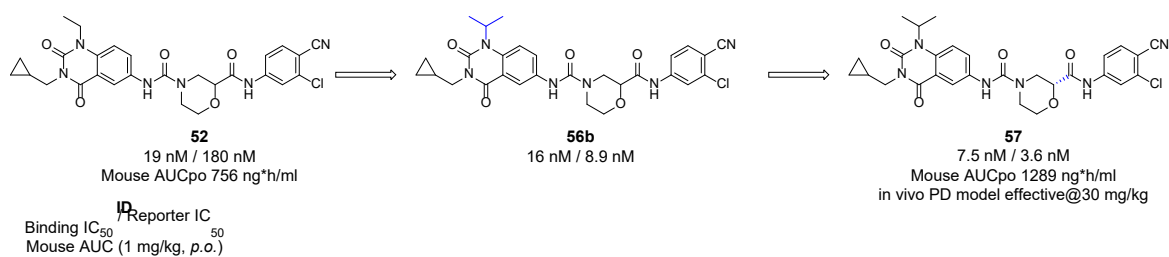


Figure 4. Modification of substituents on the quinazolidinedione ring.

【X 線構造解析】モルホリンアミド体 **57** がリード化合物 **18h** と同様に U 字型活性コンフォメーションを有していた (Figure 5)。またキナゾリジンジオン環上 *i*Pr 基が α 位に分岐したメチル基により、予想通り Phe388 との脂溶性相互作用を獲得していることも確認した。

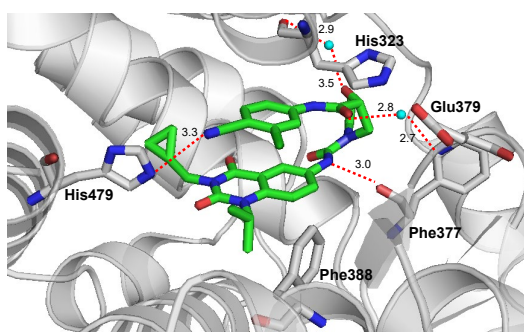


Figure 5. Complex structure of the inverse agonist **57** (green) bound to ROR γ t protein (PDB code:6B32).

【総括】 著者は新規 ROR γ t 逆作用薬を指向し、スクリーニングヒット化合物 **1** の活性増強・薬物動態の改善を目的とした研究を行った。化合物 **1** を 3 つの部分構造に分割、各々の構造活性相関情報を統合し最適な化合物を見出す戦略を立案・実践した。リンカー部は 3-メチルペンタン-1,5-ジアミド構造が最適であり、右端フェニル基へのクロロ基導入により活性が向上することを見出した。また、高い脂溶性を有するカルバゾール環の物性改善を指向した分子設計により溶解度が改善された二環性誘導体へと導き、ラット EAE モデルで薬効を示す化合物を創出した。さらに X 線構造解析より、既知の逆作用薬とは異なる U 字型活性コンフォメーションを示すことを見出した。そこで、U 字型構造の固定化が期待できる複数の環状リンカーを合成し、モルホリンアミド誘導体が優れた薬物動態を示すターンミメティクス分子であることを見出した。加えて、結晶構造を利用した置換基最適化により活性を向上させ、マウス皮膚炎モデルで有効性を示す化合物 **57** を創製した。本研究の学術的な価値を以下に示す。

- 1) 低溶解度の原因と考えられた三環性構造を有するヒット化合物に対し、SAR 及び X 線構造解析から逆作用活性発現や活性向上に重要な相互作用を特定、環の数を削減し脂溶性を低減させながら必須な相互作用を獲得する置換基導入を行った。さらに極性基を適切に配置することにより、活性及び物性に優れた二環性構造に効果的に変換する分子設計法を確立した。
- 2) 安定的に U 字構造を保持する化合物として、リンカー部への環構造導入が有効であることを見出した。環構造導入により化合物変換の幅が広がり、直鎖型リンカーでは難しいヘテロ原子の導入が許容された。ヘテロ原子による代謝部位のブロックおよび脂溶性低減効果により、*in vivo* クリアランスが低下し、薬物動態改善を達成した。
- 3) 経口投与で自己免疫疾患モデルにおいて薬効を示す化合物を創製し、本メカニズムでの自己免疫疾患治療薬の可能性を示した。

【参考文献】 (1) *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 737-43. (2) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26. (3) *Nature* **2011**, *472*, 486-490. (4) *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31409-31417. (5) *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-23. (6) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2997-3001. (7) *ChemMedChem*, **2012**, *7*, 415-424. (8) *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 483-500.