

## 論文の内容の要旨

論文題目 三環性JAK阻害剤の合成と構造活性相関に関する研究

氏 名 山岸 尋亮

【研究背景】臓器移植後の拒絶反応を抑制することは、移植臓器の生着率を向上させる上で極めて重要である。拒絶反応の抑制には、タクロリムスやシクロスポリンといったカルシニューリン阻害剤 (CNI)、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ (IMPDH) 阻害剤であるミコフェノール酸モフェチル (MMF) が用いられる。しかしながら、CNIには腎障害や神経障害、MMFには消化管障害の副作用があることから、临床上しばしば問題となる<sup>1</sup>。そのため副作用が低減された新たな免疫調節剤が切望されている。

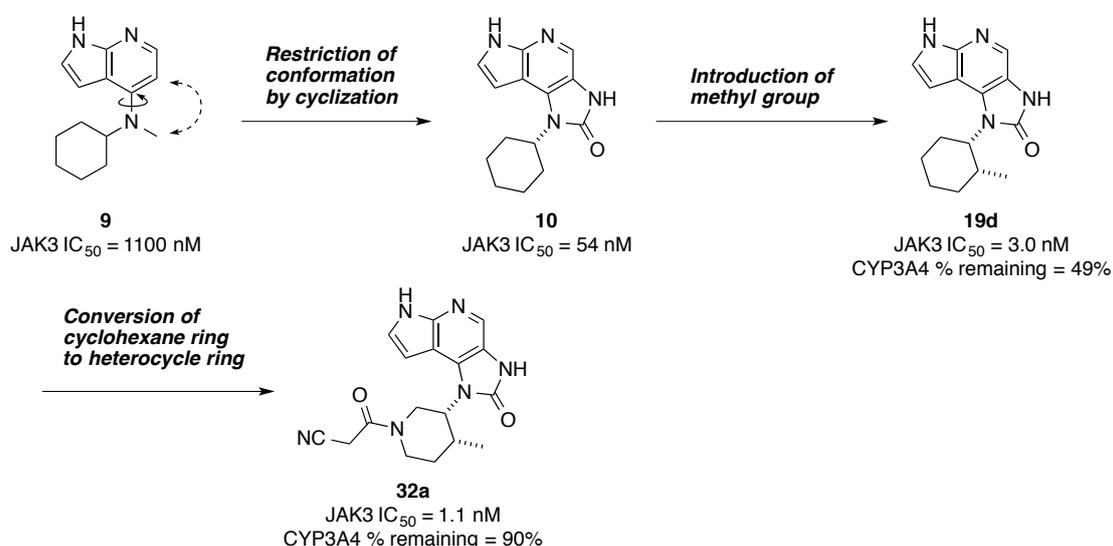
Janus Kinase (JAK) はサイトカイン伝達系において重要な役割を担っている。サイトカインが受容体に結合すると細胞内の JAK が活性化され、転写因子 STAT がリン酸化される。そして核内移行することで、炎症性遺伝子の転写が促進される。JAK には JAK1、JAK2、JAK3、TYK2 の 4 種類のサブタイプが存在するが、そのうち JAK1 と JAK3 は IL-2 のシグナル伝達を通して T 細胞の分化・増殖に関与している。そのため JAK1 及び JAK3 を阻害することが拒絶反応の抑制につながると考えられる。とくに、JAK3 はリンパ球に多く発現していることから、その阻害剤は副作用の低減につながる可能性がある。JAK 阻害剤としては、ファイザー社より tofacitinib<sup>2</sup> (**5**, JAK3 IC<sub>50</sub> = 0.80 nM) が関節リウマチを適応として上市されているが、拒絶反応抑制を適応とした臨床開発は、易感染性等の副作用により中断したままである<sup>3</sup>。筆者らは、**5** の活性を上回り同時併用される CNI や MMF の総投与量を低減できれば、副作用が低減された拒絶反応抑制剤となりうると考え研究に着手した。

【リード化合物からの展開】初期探索により、リード化合物であるピロロピリジン **9** を見出した<sup>4</sup> (Figure 1)。**9** は JAK3 に対し IC<sub>50</sub> = 1100 nM の阻害活性を示すものの、その活性は **5** と比較し 1000 倍以上低活性であった。そこで、JAK3 阻害活性を向上させるべく、X 線共結晶の情報<sup>5</sup>を用いた化合物デザインを行うこととした。

JAK3 の ATP-binding site は hinge 領域及び疎水性領域から構成されている。**9** とのドッキング解析において、ピロロピリジン環が hinge 領域と、シクロヘキサン環が疎水性

領域と相互作用することが推定された。**9** はピロロピリジン環とシクロヘキサン環の間に自由回転可能な結合を有しているため、シクロヘキサン環がより効果的に疎水性領域と相互作用するには、適切に配置される必要がある。そこでコンフォメーションを固定させるべく環化させ、三環性イミダゾピロロピリジノン骨格を有する **10** をデザインした。**10** は JAK3 IC<sub>50</sub> = 54 nM の阻害活性を示した。そして、シクロヘキサン環上へメチル基を導入した **19d** においては、JAK3 IC<sub>50</sub> = 3.0 nM と大幅な阻害活性の向上を示した。これは、導入したメチル基が疎水性ポケットと適切に相互作用したためと考えられる。

**Figure 1.** Modification of tricyclic imidazo-pyrrolopyridinone derivatives.

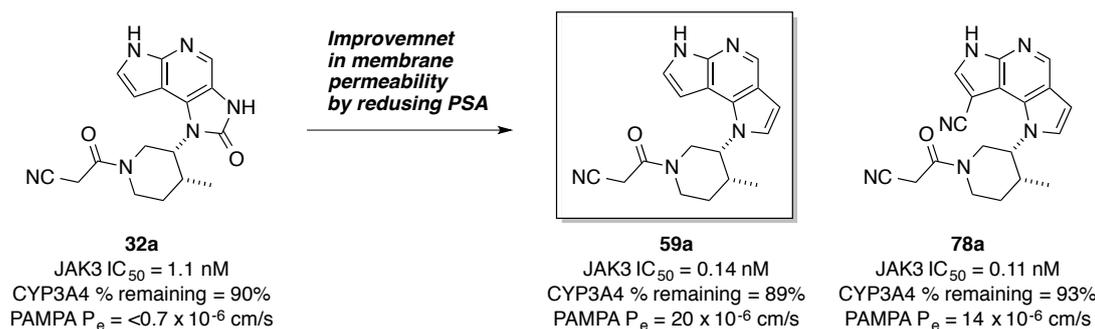


JAK 阻害剤は、CNI や MMF などの薬剤と併用されることを想定していることから、CYP3A4 阻害による薬物間相互作用の回避が临床上必須である。そこで、CYP3A4 阻害試験を行ったところ、**19d** は時間依存的阻害 (time dependent inhibition, TDI) を示すことが判明した。TDI は化合物それ自身の代謝物が CYP3A4 を不可逆的に阻害することが原因である。そこで、代謝部位と推定されたシクロヘキサン環の脂溶性を下げ、TDI の回避を目指した。そして、シクロヘキサン環をヘテロ環に変換する検討を行い、高活性かつ TDI を回避した **32a** を見出すことに成功した。

【経口吸収性向上に向けた検討】**32a** の薬物動態試験を行ったところ、経口吸収性に問題があることが判明した。人工脂質膜を用いた膜透過性試験である parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) にて、Permeability (P<sub>e</sub>) が検出限界以下であったことより、膜透過性の低さが低経口吸収性の原因であると考えられた。そこで、膜透過性を改善するために、極性表面積 (polar surface area, PSA) を低減させることとした。PSA は水素結合ドナー (HBD) と水素結合アクセプター (HBA) の総数と相関すること

が知られているため<sup>6</sup>、HBD と HBA を低減させる構造変換を行うことにした。そして三環性骨格の変換を行った結果、高活性かつ良好な膜透過性を有する、ジピロロピリジン **59a** を見出した (Figure 2)。また、ジピロロピリジン骨格への置換基導入の検討を行い、同じく良好なプロファイルを示す **78a** の創出にも成功した。

**Figure 2.** Modification of tricyclic ring core.

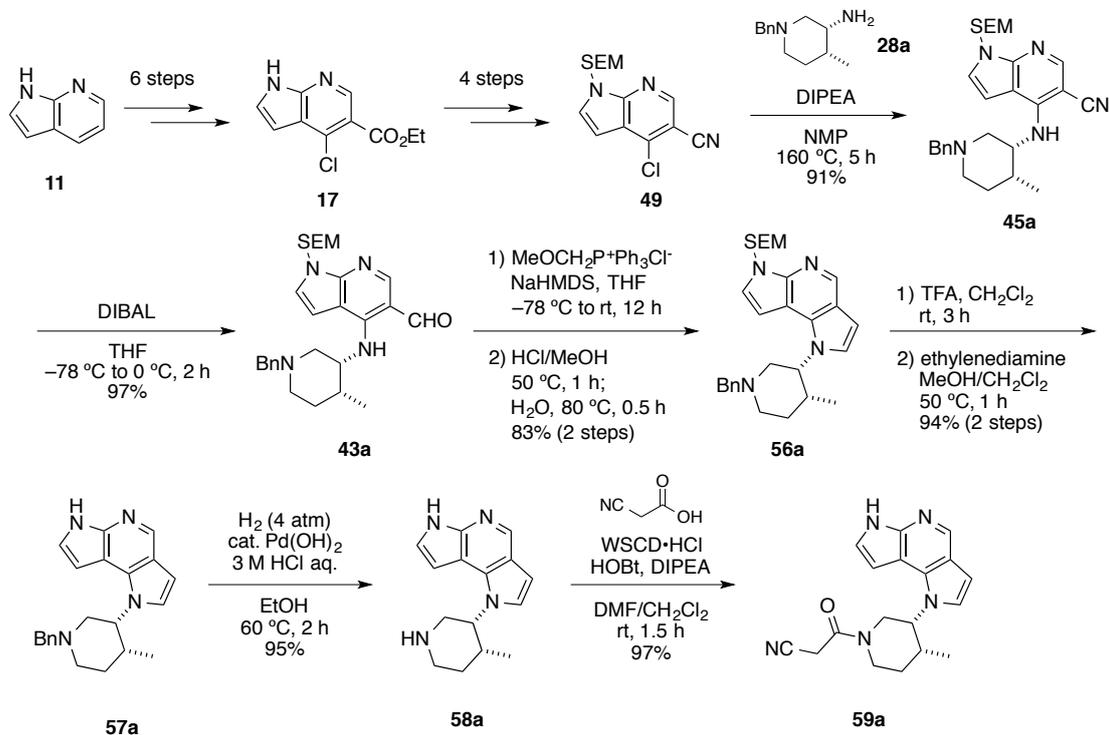


【薬物動態試験及びキナーゼ選択性評価】 **59a** 及び **78a** に関して薬物動態試験を行った。その結果、両化合物ともに、**32a** と比較し大幅な経口吸収性の改善を示した。以上の結果より、PSA 低減を指向した化合物デザインを行うことで、膜透過性を改善し経口吸収性の改善を行うことができたといえる。キナーゼ選択性評価にて両化合物を比較したところ、**59a** が **78a** と比較し良好なキナーゼ選択性を示したため、**59a** を動物モデルにて薬効評価を行う化合物として選択した。

【ラット心移植モデルでの評価】 **59a** の拒絶反応抑制効果を評価すべく、ラット心移植モデルでの評価を行った。本モデルでは、Lewis ラットの腹部に ACI ラットの心臓を移植した後、移植心臓の拍動の有無を 28 日間観察することで拒絶反応が抑制されたか否かを判定する。薬物非投与の場合には生着期間中央値 (median survival time, MST) は 5 days であるが<sup>7</sup>、タクロリムスを 0.02 mg/kg 筋肉内投与した場合には MST = 10 days となった。一方、タクロリムス併用下、**59a** を 0.25 mg/kg および 0.5 mg/kg 経口投与した場合には、MST = 21 days と生着延長効果を示した<sup>8</sup>。

【**59a** の合成】 **59a** の合成ルートを Scheme 1 に示す。市販のピロロピリジン **11** より 10 工程の変換を行い **49** とした。そして別途合成した **28a** との芳香族求核置換反応を行うことで **45a** とし、シアノ基の DIBAL 還元によりアルデヒド **43a** とした。続いて、Wittig 反応によりエノールエーテルとした後、酸性条件下加熱を行うことで **56a** とした。その後保護基の除去を行い、シアノ酢酸との縮合反応を行うことで **59a** を合成した。

**Scheme 1. Synthesis of 59a.**



【総括】リード化合物 **9** のシクロヘキサン環を JAK3 の疎水性領域と効果的に相互作用させるため環化させた **19d** をデザインし、大幅に阻害活性が向上することを見出した。**19d** においては、TDI の懸念が生じたが、脂溶性を下げるためシクロヘキサン環をヘテロ環に変換することで、TDI を回避し活性を向上させた **32a** を見出した。

その後、**32a** が低経口吸収性を示すことが判明したが、PSA 低減による膜透過性改善効果に注目し、**5** を上回る阻害活性を有し経口吸収性を改善した **59a** 及び **78a** を創出することに成功した。そして、良好なキナーゼ選択性を有し、ラット心移植モデルでの有効性を示した **59a** を臓器移植における拒絶反応抑制を適応とした薬剤の開発候補品として選択した。このように活性を向上させ、経口吸収性を改善させた分子をデザインする手法は創薬化学上有用な知見といえる。

【参考文献】 (1) Gummert, J. F. *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, *10*, 1366. (2) Changelian, P. S. *et al.*, *Science* **2003**, *302*, 875. (3) Vincenti, F. *et al.*, *Am. J. Transplant.* **2012**, *12*, 2446. (4) Nakajima, Y. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **2015**, *63*, 341. (5) Chrencik, J. E. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 413. (6) Veber, D. F. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615. (7) Nakanishi, T. *et al.*, *Int. Immunopharm.* **2010**, *10*, 91. (8) Nakamura, K. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *796*, 69.