

フチノ コウキ

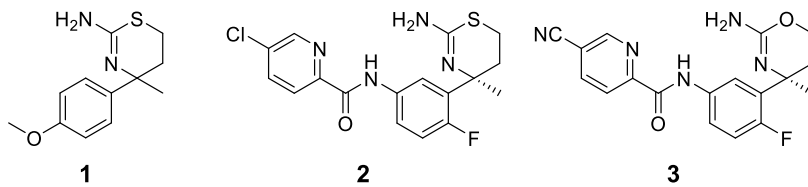
氏名(本籍)	瀧野 光記 (兵庫県)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	論博第 48 号
学位授与年月日	2022 年 3 月 16 日
学位授与の条件	学位規程第 3 条第 2 項該当者
学位論文の題名	塩基性調整による中枢移行性獲得の応用研究 ～BACE1 阻害活性を有する 1, 3-オキサジン誘導体の創製～
論文審査委員	主 査 教 授 上田 昌史 副 査 教 授 奥田 健介 副 査 教 授 大河原 賢一 副 査 教 授 波多野 学

## 論文内容の要旨

### 緒言

創薬研究において、標的とする組織への移行性を考慮することは、効率的に薬効を発現する化合物探索に重要な事柄である。特に中枢神経系に到達するためには、血液-脳関門を透過しなければならず、経細胞的に通過しやすいことを前提として、P-糖たんぱく質 (P-gp) などの排出輸送系トランスポーターの影響を回避する化合物デザインが要求される<sup>1)</sup>。筆者もアルツハイマー病治療薬になりうる BACE1 阻害剤の探索研究を通して、塩基性のリード化合物の最適化に取り組み、これら中枢移行性の課題に直面した。そこで、著者は *in vivo* で有効な薬理作用を示す安全な化合物の探索研究に着手した。

BACE1 阻害剤を見出すため、我々は HTS を実施し、チアジン誘導体 **1** を見出した (Figure 1)。このチアジン **1** を起点に Hit to lead SAR を実施し、良好な細胞活性を示すチアジン **2** を見出した。チアジン誘導体はヒト臨床において、肝障害を引き起こすことが報告されている<sup>2)</sup>。肝障害リスクを軽減するため、硫黄原子を酸素原子に変えたオキサジン **3** を合成し、評価した。オキサジン **3** は良好な細胞活性を示したものの、*in vivo* で薬効を示さなかった。排出系トランスポーターである P-gp の影響を評価を実施した結果、オキサジン **3** は高い P-gp 基質性 (P-gp ER = 36) を有し、そのことが原因で中枢移行性を示さないことが明らかとなった (BrKp(mice) = 0.15)。そこで筆者らは、オキサジン **3** を起点に P-gp 基質性を回避し、*in vivo* で有意な AB 減少を示す安全な BACE1 阻害剤の探索研究に着手した。



BACE1 IC<sub>50</sub>: 73 μM  
Cell Aβ IC<sub>50</sub>: 2.6 μM

BACE1 IC<sub>50</sub>: 6.7 nM  
Cell Aβ IC<sub>50</sub>: 0.84 nM

BACE1 IC<sub>50</sub>: 118 nM  
Cell Aβ IC<sub>50</sub>: 3.7 nM  
P-gp ER<sup>a</sup>: 36  
BrKp (mice)<sup>b</sup>: 0.15  
hERG(5 μM)<sup>c</sup>: 78 %

<sup>a</sup>Efflux ratio measured in MDCK cells transfected with human MDR1 at absorption systems. <sup>b</sup>Total brain-to-plasma ratio determined by *iv* dose at 0.5 h. <sup>c</sup>% inhibition at 3 M measured in CHO cells.

Figure 1. HTS Hit 1 and Initial Leads 2 and 3

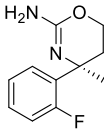
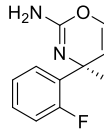
## 本論

### 第1章 オレフィン型オキサジン誘導体の創薬研究

1) 脂溶性が高い塩基性化合物は、P-gp 基質になりやすいと報告されており、塩基性の中枢神経系薬物において、 $pK_a$ を下げると P-gp 基質性が低下することが知られている<sup>3)</sup>。hERG 阻害活性においては、高い塩基性と脂溶性を有する化合物は阻害活性を示しやすいことが報告されていて、hERG 阻害を低減させる有効な方法の一つは塩基性を低下させることである<sup>4)</sup>。高脂溶性化合物は膜透過性には有利に作用するため、P-gp 基質性と hERG 阻害活性の2つの課題を解決する共通した方法として、塩基性の低減を選択した。まず、塩基性を調整するに際し、適切な  $pK_a$  の範囲の設定を試みた。アミジン部位はファーマコフォアの一つであり、その塩基性の程度は活性値に影響すると考え、細胞アッセイの活性値と塩基性の相関を確認した。その結果、 $pK_a$ が 6.5 以下では活性が消失している化合物が多く見られたことから、 $pK_a$ の下限値を 6.5 に設定した。P-gp 基質性においても同様に  $pK_a$ との相関を調査した結果、 $pK_a$ が 8 を超える化合物は高い P-gp 基質性を示したため、目標とする  $pK_a$ を 6.5 から 8.0 に設定した。ジヒドロオキサジン **3** の  $pK_a$ を測定した結果、 $pK_a$ は 9.8 を示した。塩基性の低下を期待して、オキサジン環内に二重結合を導入したオキサジン **B** をデザインした。ACD ソフトウェア<sup>5)</sup>でオキサジン **B** の予測  $pK_a$ は 7.0 であり、設定した至適  $pK_a$ の範囲内であったことから、オキサジン **B** 誘導体の合成に着手した。





**Figure 2.** Design of novel oxazine **B** from dihydrooxazine **A**.

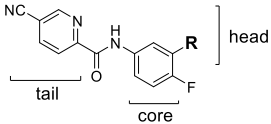
<sup>a</sup>The  $pK_a$  values were calculated with ACD/Percepta as the imine tautomer.

		
	<b>A</b>	<b>B</b>
ACD $pK_a^a$ :	10.1	7.0
$pK_a$ measured:	9.8	this work

2) オキサジン **4** を合成したところ、実際の  $pK_a$ は 7.7 であった (**Table 1**)。細胞活性は、7.9 nM であり、若干の活性低下が見られたが、P-gp 基質性は狙い通りに下げることができた (ER = 7.5)。活性向上を含めたプロファイルの最適化を目指し、オキサジン環上への置換基導入を試みた。6 位にメチル基を導入したオキサジン **5** は活性向上を示した。 $pK_a$ はわずかに向上した程度であったが ( $pK_a = 7.9$ )、P-gp 基質性が悪化した (ER = 33)。P-gp 基質性の改善を目指し、さらなる塩基性の低下を狙って **5** を起点にフッ素原子の導入を試みた。6 位のメチル基にフッ素原子を導入したオキサジン **6** は、活性を維持し (cellular  $IC_{50} = 3.6$  nM)、 $pK_a$ の低下 ( $pK_a = 6.9$ ) を伴って、P-gp 基質性、hERG 活性に改善が見られた (ER = 12、hERG inhib at 5  $\mu$ M = 69%)。

**Table 1.** Exploration of the Head-Part

compd	R	$IC_{50}$ (nM)		P-gp ER	hERG inhib at 5 $\mu$ M	Log D (7.4)	$pK_a$
		BACE1	Cellular A $\beta$				
<b>3</b>		118	3.7	36	78	0.024	9.8
<b>4</b>		218	7.9	7.5	85	2.0	7.7
<b>5</b>		65.6	4.4	33	76	2.2	7.9
<b>6</b>		59.0	3.6	12	69	2.3	6.9

**6**のプロファイルを最適化するために、tail部分の変換を実施した。**6**の血漿中の安定性には改善の余地が残されていた。カルボキシエステラーゼの加水分解によるものと考え、ピリジン環のオルト位への置換基導入を試みた。オルト位に塩素原子を導入した**7**は、狙い通りに半減期は増大したものの、P-gp基質性が高くなった。この原因は、**6**においてはピリジン環の窒素原子が、アミドNHの水素原子と分子内水素結合を形成し、ドナー性プロトンの影響をマスクしていたが、**7**の場合は、オルト位のクロロ基とアミドのカルボニル間の静電的反発からねじれが生じ、**6**で見られたような分子内水素結合が弱くなることで、ドナー性プロトンのマスク効果が減弱したためと考察している。ピラジンへの変換を実施した**8**はhERG阻害活性およびP-gp基質性の改善が見られたが、活性の低下が見られた。結局のところ、Cellular IC<sub>50</sub>、代謝安定性を含め化合物**6**が良好なバランスを示したため、**6**を先の評価に進めた。

**Table 2.** Optimization of the Tail-Part

compd	R	IC <sub>50</sub> (nM)				rat PK				
		BACE1	Cellular A $\beta$	P-gp ER	hERG 5 $\mu$ M (%)	RLM HLM (%)	CL (ml/min/kg)	Plasma t <sub>1/2</sub> (h)	B/P	Log D (7.4)
<b>6</b>		59.0	3.6	12	69	55 88	16.8	20.4	0.90	2.3
<b>7</b>		94.9	12	35	30	49 57	30.6	56.7	0.41	2.5
<b>8</b>		139	31	5.7	40	52 86	34.4	10.5	2.4	2.6

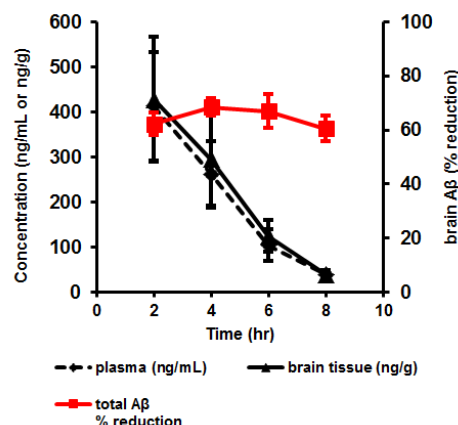
化合物**3**および**6**の中樞移行性を確認するため、P-gpノックアウトマウスを用いて、P-gpの影響を検証した(**Table 3**)。P-gpノックアウトマウスのB/P ratioは両化合物ともに、4を超えていて良好な中樞移行性を示したが、野生型マウスにおける化合物**3**のB/P ratioは0.15、KO/WT ratioは32であり、P-gpの影響で中樞移行性が妨げられていることが示された。化合物**6**のKO/WTは化合物**3**に比べて低いことから、化合物**6**の脳移行性の改善にはP-gpの影響が大きいことが示唆される。ただし化合物**6**のKO/WTは3.6であり、efflux ratioも12であることから、完全にP-gp基質性を回避できたとは言えず、さらなる中枢神経系の薬剤として改善の余地を残している。

**Table 3.** Pharmacokinetic Profiles of **3** and **6** in Wild-type (C57BL/6J) and mdrla(-/-) Mice.

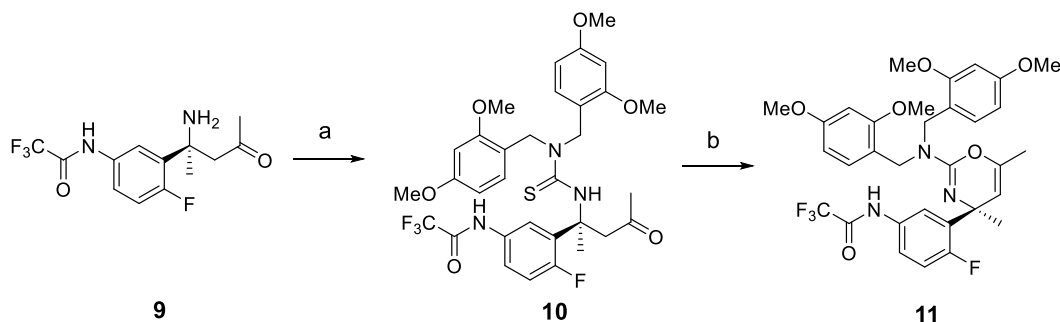
compd	P-gp ER	dose (mg)	mouse	po, 2 or 10 mg/kg, n = 3			
				C <sub>b</sub> (ng/g)	C <sub>p</sub> (ng/ml)	B/P	KO/WT
<b>3</b>	36	2	WT	14.5	102	0.15	32
			KO	546	118	4.7	
<b>6</b>	12	2	WT	92.6	76.1	1.2	3.6
			KO	318	71.5	4.4	

ICR マウス<sup>6)</sup>に **6** を 10mg/kg 経口投与し、脳内の A $\beta$  量を測定した (**Figure 2**)。その結果、4 時間で最大の A $\beta$  減少 69 %を示し、8 時間後も持続的な脳内 A $\beta$  減少を示した。8 時間後の脳内非結合薬物濃度は 6.9 nM であり、IC<sub>50</sub> (3.6 nM) よりも 1.9 倍高く、マウスの持続的な A $\beta$  減少を説明している。

**Figure 2.** Total A $\beta$  reduction in mouse after an oral dose of **6** at 10 mg/kg (n = 4). Compound **6** was dosed as a solution of 20% 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPBCD).



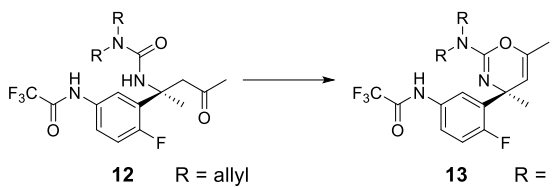
3) 6-メチルオキサジン誘導体 **11** は、**Scheme 1** に示した経路で合成した。キラルなアミン **9** に対し、チオホスゲンを用いてイソチオシアナートとした後に、ビス-ジメトキシベンジルアミンを作用させることで、チオウレア **10** を得た。ヨウ化メチルを用いて、メチルスルフィドとした後に、DIEA を加え加熱することで、目的とするオキサジン **11** を得た<sup>7)</sup>。しかしながら、本反応は 2 工程で 19%と低収率であり、6-*H*オキサジンの合成検討においては、環化前駆体であるアルデヒドの合成を試みたが、チオウレアが原因でチアジン環の形成が進行し、アルデヒドを得ることができなかった。チオウレアを中間体として、6-*H*オキサジンを得ることはできないと判断し、ウレアを中間体とした新規環化反応の開発に着手した。



**Scheme 1.** Synthesis of Oxazine **11**<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)(i) thiophosgene, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, toluene, H<sub>2</sub>O, 0°C, 100%,(ii) bis(2,4-dimethoxybenzyl)amine, THF, rt, 97%; (b) (i) MeI, DIEA, MeCH, rt, 93%, (ii) DIEA, MeCN, reflux, 19%.

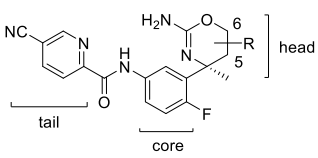
**12** に対して、脱水反応に用いられる条件を検討した (**Table 4**)。P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> を用いた際に望む環化体 **13** が得られた(**Entry 1**)。脱水試薬として Burgess 試薬<sup>8)</sup>を用いた結果、高収率で目的物を得ることができ、室温で実施しても問題なく進行した(**Entry 2,3**)。本反応を用いて、各種オキサジン誘導体の合成を達成した。

**Table 4.** Optimization of the reaction conditions using various dehydration reagents.


Entry	Reagent (equiv)	Solvent	Temp	Yield <b>13</b> (%)
1	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (15)	MeCN	70	54
2	Burgess reagent (2)	THF	80	83
3	Burgess reagent (2)	THF	rt	88

## 第2章 ジヒドロ型オキサジン誘導体の創薬研究

1) p*K*<sub>a</sub>を低減する方法として、電子求引基の導入も知られていて、筆者は電子求引基の導入により *in vivo* で有望な化合物を見出すことも検討した。ロッシュは5位にフッ素原子を導入し、マウスに経口投与することで、有意な Aβ 減少を示すオキサジン **14** を報告した<sup>9)</sup>。P-gp 基質性は低下したものの、hERG 阻害活性は改善しておらず、**14** を起点に探索研究を行った (Table 5)。さらなる塩基性低下を指向して6位にフルオロメチル基を導入した **16** をデザインした。**16** は狙い通りに塩基性が低下し、P-gp 基質性およびhERG 阻害活性は改善したものの、活性の低下が見られた。**16** の立体異性体である **17** を評価した結果、活性が向上した。活性、P-gp 基質性、hERG 阻害活性において良好なプロファイルを示した **17** の更なる最適化に着手した。

**Table 5.** Exploration of the Head-Part


compd	head	R	BACE1 IC <sub>50</sub> (nM)	P-gp ER	hERG inhib at 3 μM	p <i>K</i> <sub>a</sub>
<b>3</b>		H	118	20	66	9.8
<b>14</b>		F	47.6	4.0	68	8.1
<b>15</b>			1170	1.2	85	7.6
<b>16</b>			120	2.2	50	7.1
<b>17</b>			11.9	3.0	55	7.3

高活性で P-gp 基質性が改善した化合物を見出したものの、hERG 阻害活性に関しては改善の余地があり、ピコリンアミド部の最適化を行った (Table 6)。ピリジンをピラジンに変換した **18** は活性を維持し、P-gp 基質性、hERG 阻害活性の改善が見られた。一方で、ヒト代謝安定性の低下が見られた。ヒト代謝安定性の悪化の原因はメトキシ基と考え、フルオロメトキシ基に変換したところ、代謝安定性の改善が見られた。化合物 **19** は活性、P-gp 基質性、hERG 阻害活性において良好なプロファイルを示した。一方で、CYP2D6 阻害活性の低下が見られた。

**Table 6.** Optimization of the Tail-Part

compd	R	IC <sub>50</sub> (nM)					
		BACE1	Cellular A $\beta$	P-gp ER	hERG 3 $\mu$ M (%)	HLM RLM (%)	CYP2D6 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>17</b>		11.9	0.58	3.0	55	110/97	10
<b>18</b>		17.9	1.6	1.9	22	9.4/107	<1.0
<b>19</b>		11.7	1.5	1.4	36	93/107	<1.0

CYP2D6 の阻害活性を回避する方法として、塩基性、あるいは脂溶性を下げることで有効であると報告されている<sup>10)</sup>。6 位の最適化においては検討の余地が残されていたため、**19** を起点に最適化を行った (**Table 7**)。塩基性を下げた **20** は狙い通りに阻害活性が低下した。立体的な効果も CYP2D6 の阻害活性に影響すると仮定し、モノフルオロエチル基に変換した結果、良好なプロファイルを満たす **21** を見出した。

**Table 7.** Optimization of 1,3-Dihydro-Oxazines at the 6-Position

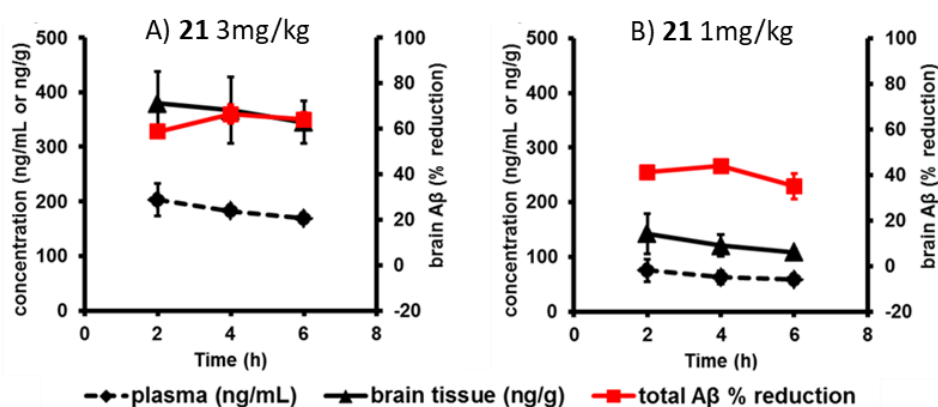
compd	R	IC <sub>50</sub> (nM)						pK <sub>a</sub> LogD
		BACE1	Cellular A $\beta$	P-gp ER	hERG 3 $\mu$ M (%)	HLM RLM (%)	CYP2D6 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
<b>19</b>		11.7	1.5	1.4	36	93/107	<1.0	7.4/1.8
<b>20</b>		8.74	1.9	1.4	25	105/101	5.1	6.5/3.2
<b>21</b>		11.8	1.1	1.8	32	98/105	3.4	7.2/2.3

2) 得られた化合物の薬物動態評価を実施した (**Table 8**)。化合物 **3** は P-gp 基質であり、中枢移行性は 0.29 であったが、塩基性を低減し、P-gp 基質性を低下させた **17** および **21** の中枢移行性は 0.62 および 2.2 であり改善が見られた。

**Table 8.** Pharmacokinetic Properties of Key Compounds for Sprague-Dawley Rat

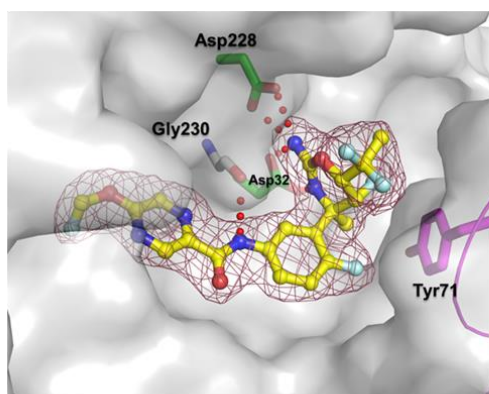
compd	RLM (%)	Serum $f_u$	P-gp ER	rat, iv, 0.5 mg/kg, $n = 2$			rat, po, 1 mg/kg, $n = 2$		
				CL (ml/min/kg)	Vd <sub>ss</sub> (L/kg)	B/P	AUC (ng·h/ml)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	F (%)
3	104	0.41	20	37	6.1	0.29	328	32	73
17	97	0.27	3.0	5.3	4.5	0.62	2390	101	73
19	107	0.33	1.4	8.3	3.5	1.6	885	75	44
20	101	ND	1.4	9.3	5.4	1.9	660	58	35
21	105	ND	1.8	11	6.9	2.2	630	50	43

21 の A $\beta$  減少率を ICR マウスを用いて評価した (Figure 3)。ICR マウスに 3 mg/kg を経口投与した結果、6 時間にわたって A $\beta$  の持続的な低下を示した。C<sub>b,u</sub>/C<sub>p,u</sub> は 0.8 を示し、P-gp の影響は少ないとみられる。

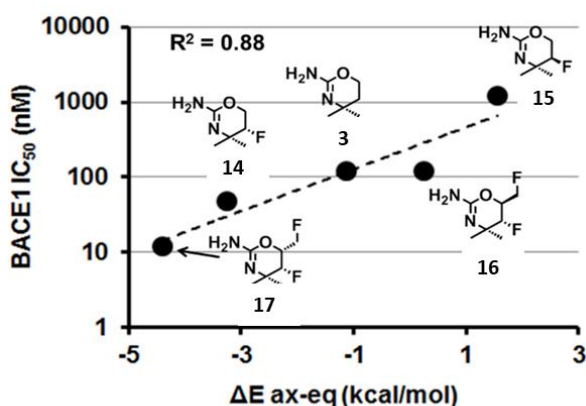


**Figure 3.** Total A $\beta$  reduction of 21 in the brain of male ICR mice ( $n = 4$ ) after oral dosing of 21 as a solution of 20% hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPBCD). A) 21 was dosed at 3 mg/kg. B) 21 at 1 mg/kg.

3) 21 において 6 位の置換基導入で活性が向上した原因を解明するためにコンフォメーション解析を実施した。オキサジン環上の置換基の効果を検証するため、同一の tail を持つ 3, 14, 15, 16 および 17 の最安定コンフォメーションを計算した。3 の最安定コンフォメーションを計算した結果、擬アキシアル構造が最安定であり、複合体構造の 20 のコンフォメーションに近似していた (Figure 4)。一方で、活性が低下した 15 は擬エクアトリアルが最安定コンフォメーションであった。擬アキシアルと擬エクアトリアルの変形エネルギーが活性に関与していると考え、5 化合物の変形エネルギー ( $\Delta E_{ax-eq}$ (kcal/mol)) を算出し、活性との相関を確認した (Figure 5)。その結果、擬アキシアル構造が安定コンフォメーションであり、変形エネルギーが大きい 17 が最も活性が強く、活性と変形エネルギーに相関がみられた。17 においては、擬エクアトリアル構造の際に、6 位のフルオロフェニル基とメチル基との間に 1,3-ジアキシアル相互作用が働くために、擬アキシアル構造が優位となり活性が向上したと説明される。



**Figure 4.** Cocystal structure of compound **20** bound to human BACE1 (PDB: 5YGX).



**Figure 5.** Plots of BACE1  $IC_{50}$  vs  $\Delta E$  for compounds **3**, **14**, **15**, **16** and **17**.

## 結語

中枢神経系の創薬研究において、適切な中枢移行性を有し安全な化合物を探索することが重要である。筆者はアルツハイマー病治療薬を指向し、BACE1 阻害活性を有するリード化合物を見出していたが、低い中枢移行性と hERG 阻害活性も有していた。そこで本研究において、低い中枢移行性の原因は、高い塩基性に起因する P-gp 基質性によるものと特定し、塩基性を下げる構造変換を行うことで、*in vivo* で有意な薬効を示す化合物を同定した。本研究成果は、塩基性が原因で P-gp 基質となっている化合物の最適化デザイン、中枢移行性の獲得に有用な知見を与えるものである。

## (参考文献)

- Rankovic, Z. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2584-2608.
- Kusuhara, H. *Drug Delivery System*, **2012**, *27*, 370-380.
- Koriyama, Y.; Hori, A.; Ito, H.; Yonezawa, S.; Babe, Y.; Tanimoto, N.; Ueno, T.; Yamamoto, S.; Yamamoto, T.; Asada, N.; Morimoto, K.; Einuma, S.; Sakai, K.; Kanazu, T.; Matsuda, A.; Yamaguchi, Y.; Oguma, T.; Timmers, M.; Tritsmans, L.; Kusakabe, K.; Kato, K.; Sakaguchi. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 1873–1888.
- Coi, A.; Massarelli, I.; Testai, L.; Calderone, V.; Bianucci, A, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2479-2488.
- ACD/Percepta, version 14.0.0 (Build 2726); Advanced Chemistry Development, Inc.: Ontario, Canada, 2012.
- The ICR mice were obtained from Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan. <http://www.crj.co.jp/product/domestic/detail/37>
- Ignatova, L. A.; Gekhman, A. E.; Spektor, M. A.; Ovechkin, P. L. Unkovskil, B. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1974**, *10*, 662–665.
- Burgess, E. M.; Penton, H. R., Jr.; Taylor, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5224–5226.
- Hilpert, H.; Guba, W.; Woltering, T. J.; Wostl, W.; Pinard, E.; Mauser, H.; Mayweg, A. V.; Rogers-Evans, M.; Humm, R.; Krummenacher, D.; Muser, T.; Schnider, C.; Jacobsen, H.; Ozmen, L.; Bergadano, A.; Banner, D. W.; Hochstrasser, R.; Kuglstatter, A.; David-Pierson, P.; Fischer, H.; Polara, A.; Narquizian, R. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3980–3995.
- Le Bourdonnec, B.; Leister, L. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 3093–3121.



## 論文審査の結果の要旨

創薬研究において、標的とする組織への移行性を考慮することは、非常に重要である。中枢神経系に到達するためには、血液-脳関門を透過しなければならず、経細胞的に通過しやすいことを前提として、P糖たんぱく質 (P-gp) などの排出輸送系トランスポーターの影響を回避する化合物デザインが要求される。筆者は BACE1 阻害剤の探索研究を通して、ジヒドロ型オキサジンを用いたリード化合物として同定したが、P-gp 基質性に由来する低い脳移行性を示し、*in vivo* 薬効を示さなかった。そこで、ジヒドロ型オキサジンを起点に P-gp 基質性を回避し、*in vivo* で有意な薬効を示す  $\beta$ -セクレターゼ 1 (BACE1) 阻害の探索研究として、P-gp 基質性回避にはアミジン部位の pKa の低減が有効であるとの着想に基づき、以下の 2 つの方法で塩基性の低減を検討した。

1. 分子量を増加させずに塩基性を低下させるために、2重結合をオキサジン環内に導入したオレフィン型オキサジンは、期待通り塩基性が低減し、P-gp 基質性が低減した。最適化を行うことで、*in vivo* で有意な薬効を示す化合物を見出した。また、オレフィン型オキサジンの合成において新規なオキサジン環化反応を見出した。
2. 電子求引基を導入し、アミジン部位の塩基性を調整することで、P-gp 基質性を低減し、有意な *in vivo* 薬効を示す化合物を見出した。また、BACE1 複合体構造解析から、活性コンフォメーションを安定化させることが BACE1 阻害活性の向上につながることを解明した。

本研究成果は、塩基性が原因で P-gp 基質となっている化合物の最適化デザイン、中枢移行性の獲得に有用な知見を与えるものである。

上記の論文は博士 (薬学) 論文として、適当と判定する。