

平成 21 年 6 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790099
研究課題名 (和文) 血小板凝集阻害作用を目指した、低分子偽ペプチド化合物の合成研究
研究課題名 (英文) Synthetic Study of Low Molecular Peptide Mimetics toward Platelet Aggregation Inhibitors
研究代表者 樋口 和宏 (HIGUCHI KAZUHIRO) 明治薬科大学・薬学部・講師 研究者番号：60360195

研究成果の概要：高脂溶性骨格を利用した非ペプチド性低分子化合物の合成研究と活性評価を検討した。入手容易な化合物を出発物質として、第一および第二標的化合物を合成した。アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) トリペプチドは 1mM で 31% 血小板凝集を阻害したのに対し、第一標的化合物は 0.4 mM 以下で 26%血小板凝集を阻害する傾向が見られた。このことから、第一標的化合物は RGD と同等、またはそれ以上の活性をもつことが明らかとなった。交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	0	2,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ペプチドミミック・血小板凝集・インテグリン

1. 研究開始当初の背景

インテグリンはほとんど全ての動物細胞に存在する膜タンパク質で、フィブリノーゲン・フィブロネクチン・ビトロネクチン等の細胞膜外粘着タンパク質と結合する細胞の主要な接着受容体である。現在までにインテグリンには α 鎖と β 鎖との組み合わせによる 24 種類のサブタイプが知られているが、このうち β_3 クラスのインテグリンである $\alpha_{IIb}\beta_3$ (IIb/IIIa またはフィブリノーゲン受容体) と $\alpha_v\beta_3$ (ビトロネクチン受容体) は最近の創薬ターゲットとして特に注目されており【*生体の科学*, **46**, 530-532 (1995)】、その構造研究においては

高木らにより精力的に行われている。彼らは最近の研究により $\alpha_v\beta_3$ は低親和性状態折れ曲がり型を、一方高親和性状態では起き上がり型をとる事が明らかにし【*Cell*, **110**, 599-611 (2002)】、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ においてはリガンドと複合体との X 線結晶構造解析によりファーマコフォアーの様子が明らかした【*Nature*, **432**, 59-67 (2004)】。

一方、蛇毒などから単離されたポリペプチドは直鎖状または環状でも RGD 配列 (Arg-Gly-Asp) を有するものであれば、フィブリノーゲンと $\alpha_{IIb}\beta_3$ との結合を阻害し血小板凝集を抑制する【*Drugs Future*, **19**,

461 (1994)】。そのため RGD 配列を模した低分子化合物は、潜在的な非ペプチド性 $\alpha_{IIb}\beta_3$ アンタゴニストとして抗血液凝固剤になる可能性を秘めている【*Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 2345 (1998)】。

2. 研究の目的

(1) トリペプチドのターン構造の役割を解明する：最近、この様な非ペプチド性の低分子 $\alpha_{IIb}\beta_3$ アンタゴニストの開発が精力的に行われている。それらの構造上の特徴は図 1 に示す様に、アルギニンのグアニジノ基に相当する塩基性部位とアスパラギン酸のカルボキシル基に相当する酸性部位を様々なバックボーン（骨組み）で繋げた構造である。チロフィバン (1, Merck) はチロシンを母核に、ラミフィバン (2, Roche) は鎖状ペプチド、またイプチフィバチド (3, Schering-Plough) と G4120 (4, Genentech) 【*J. Med. Chem.*, **35**, 2040-2048 (1992)】は環状ペプチドがバックボーンであり、分子全体におけるコンフォメーションの柔軟性は高いものと考えられる。

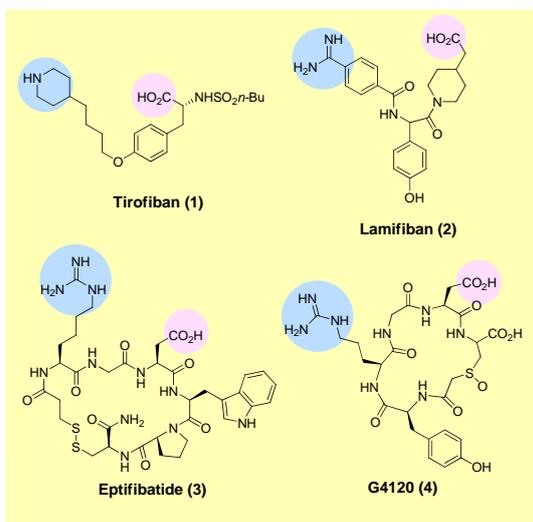
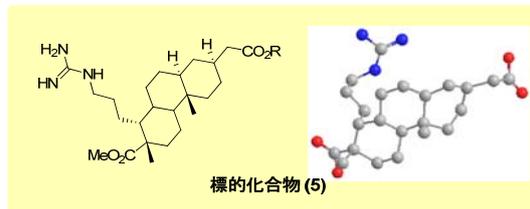


図1 様々な $\alpha_{IIb}\beta_3$ アンタゴニスト

我々は、G4120 の骨格が Cupped-Shape (お椀型) 構造であることに注目し、パーヒドロフェナントレン骨格をバックボーンとして用いれば、RGD のターン構造を立体的に模倣する事ができるのではないかという仮説を立てた。そこで今回我々は、このバック

ボーンに酸性および塩基性官能基を適切に配置した標的化合物 5 を創案した。本化合物を用いて、インテグリンとの相互作用におけるターン構造の役割を明らかにできると考えた。



(2) 極性官能基面積に基いた構造活性相関を解明する（経口バイオアベイラビリティの向上）：現在、欧米で臨床利用されているチロフィバン (1, 商品名：Aggrastat) は静注でしか投与できず、経口バイオアベイラビリティが悪いという欠点がある【*Tetrahedron*, **59**, 2861-2869 (2003)】。一方、イプチフィバチド (3) や G4120 (4) はバックボーンにポリペプチド構造を有するため生体内で加水分解を受け易く、経口投与は困難であると考えられ、このことは患者の QOL 向上のためにも克服すべき点である。そこで我々は、脂溶性部位に対する極性官能基面積の割合すなわち Polar Surface Area (PSA) を減少すれば、分子の脂溶性が増大し、経口アベイラビリティの向上が期待できると考え、標的化合物 5 のバックボーンに脂溶性の高いパーヒドロフェナントレン骨格を利用するという着想に至った。

(3) 効率的合成法の確立と活性評価：標的化合物 5 の大量かつ安定に合成可能なルートを確立し、得られた化合物について血小板凝集作用を ELISA GP II b/III a-フィブリノーゲン受容体アッセイ法【*J. Med. Chem.*, **35**, 2040 (1992)】等で検討を行ない構造最適化する。本合成工程はパーヒドロフェナントレン骨格の様々な部位に親水性官能基を立体選択的に導入し、さらに自由に立体構造を変化させることが必要条件とされる。ペプチド化合物はその立体構造に揺らぎがあると考えられるが、パーヒドロフェナントレン骨格を用いれば分子の立体構造を固

定化でき、NMR や分子構造計算の支援によりファーマコフォーの明確な構造解析が期待できる。

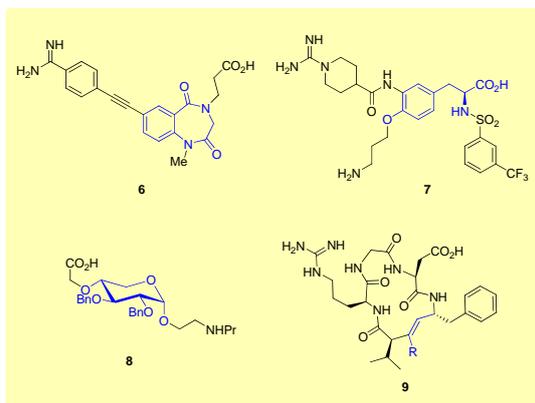
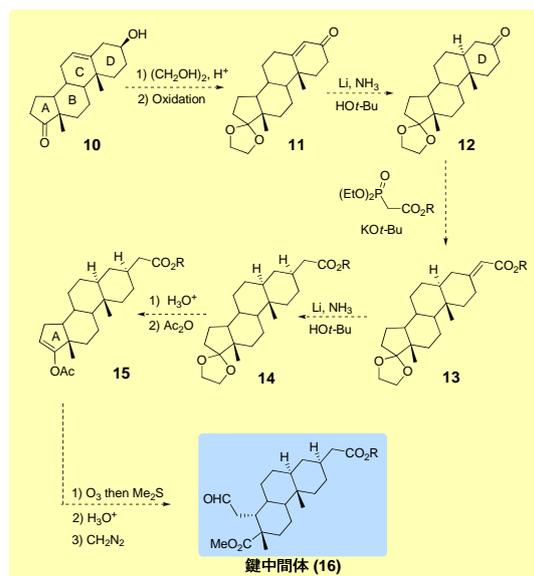


図2 様々なバックボーンを持つRGDミミック化合物群

3. 研究の方法

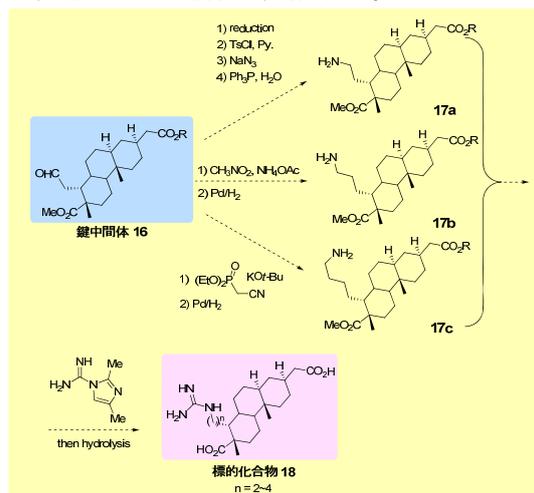
(1) 鍵中間体の合成：パーヒドロフェナントレン骨格への、効率的かつ高立体選択的な官能基導入を行うため、デヒドロエピアンドロステロン(10)を合成原料に用い、RGD 配列のターン構造を模した鍵中間体の合成を計画した。本合成ルートでは親水性の官能基を3箇所を導入することができるため、ステロイド化合物が本来有する親油性を容易にコントロールすることが可能である。

具体的な合成計画を次式に示した(式1)。まず10のA環部のカルボニル基をアセタールで保護し、続いてD環部の水酸基を酸化してエノン体11を得る。11の α, β -不飽和カルボニル基をBirch還元により立体選択的に還元しケトン体12を得る。この反応による水素の付加は、 α 面から進行し熱力学的に安定な化合物が優先して得られると考えられる。続いて、D環部位のカルボニル基に対して、Horner-Emmons反応により第1番目の親水性基であるエステル基を導入し13を得る。生成した α, β -不飽和カルボニル基を再度Birch還元により立体選択的な還元反応を行い化合物14へ導く。酸性条件下でのアセタール部位の脱保護と、カルボニル基のエノール化によりアセチルエノラート15へ導く。最後にA環部のオゾン開裂により第2番目の親水性基となるカルボキシル基を導入し、メチルエステルへと変換して、鍵中間体16を合成する。



式1 鍵中間体16の合成計画

(2) 標的化合物の合成：鍵中間体16にアルギニンのグアニジル基に相当する部位を導入する。この時、塩基性官能基と酸性官能基との間の距離を最適化が必要があると考えられるため、アルギニン側鎖の長さを変えた化合物の合成を計画した(式2)。即ち、鍵中間体16のアルデヒド基に、アジド基・ニトロメチル基・シアノメチル基をそれぞれ導入して、続く還元反応により1級アミノ基へと変換し種々の炭素数を持つアミン体17a-cへ導く。最後に第3番目の親水性基であるグアニジノ基を導入して標的化合物18の合成を完成する。



式2 標的化合物18の合成計画

(3) 様々な塩基性部位を持つ標的化合物群の合成：グアニジル基は非常に塩基性が高く取り扱いが困難であると予想されるた

め、逆相 HPLC による精製や塩酸塩などへの変換が適時必要であると考えられる。そこで、取り扱いの容易さを考え、図 3 のような化合物群を合成すれば、様々な PSA 値を持つ化合物の網羅的な構造活性相関を行うことも可能である。

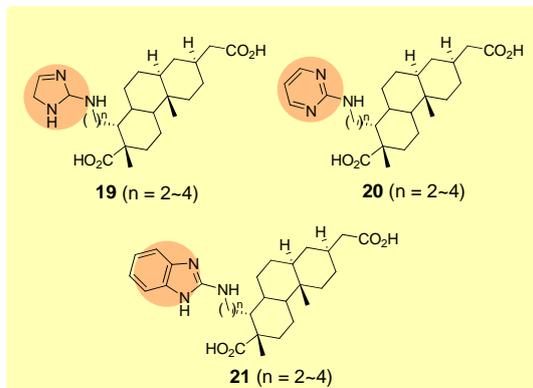


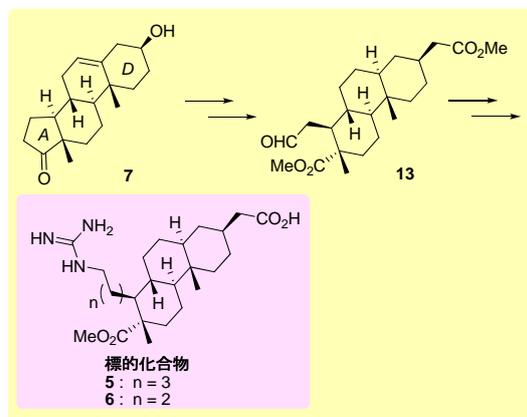
図3 様々な塩基性部位を持つ標的化合物群

また、インテグリン阻害剤は歴史的に多くの蛇毒中から血小板凝集を阻害する生理活性ペプチドとして単離されており、その多くが RGD 配列を持つ事が知られている。しかしながら、インテグリン阻害剤のバルブリンは RGD 配列が KGD (Lys-Gly-Asp) 配列に置換されていて、インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ に対して極めて特異性が高いことが知られている。一方、我々が計画している合成中間体 17a-c はリシン残基に対応する 1 級アミンを持つので、これらの化合物を KGD ミミックとしてインテグリンの阻害作用を検討する。

4. 研究成果

著者は、ペルヒドロフェナントレン骨格を利用した RGD ミメティクスの合成研究を行った。デヒドロエピアンドロステロンを出発物質として、A 環部に立体選択的にアスパラギン酸残基を導入した。D 環の開裂により、合成中間体 13 を経由して、アルギニン残基を導入し、標的化合物 5 を合成した。1 の合成中間体 13 より、アルギニン残基の炭素数が 1 つ少ない標的化合物 6 を合成した。5 について比濁法による血小板凝集抑制活性試験を行った結果、RGD トリペプチドは 1mM で 31% 血小板凝集を阻害したのに対し、5 は 0.4 mM 以下で 26%血小板凝集を阻害する傾

向が見られた。このことから、5 は RGD と同等、またはそれ以上の活性をもつことが予想される。しかし本化合物は難溶解性で、厳密な活性評価を行うには至っていないため、今後、親水性基の導入などを検討し、溶解性の向上を目指す必要があると考えられる。



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

① 血小板凝集阻害活性を指向した RGD ミミックの合成研究

樋口和宏、疋田英樹、小早川奈津、油利大地、川崎知己、第 50 回日本薬学会関東支部大会、2006/10、新潟

② 血小板凝集阻害剤を指向した非ペプチド性 RGD ミメティクスの合成

樋口和宏、疋田英樹、小島滋、油利大地、小早川奈津、川崎知己、第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2007/11、神奈川

[その他]

ホームページ等

<http://www.my-pharm.ac.jp/~seizouhp/top1.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 和宏 (HIGUCHI KAZUHIRO)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60360195