

氏 名(本籍) なか じま たつ お
 中 島 達 雄

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 523 号

学位授与年月日 平 成 7 年 3 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 新規カリウムチャンネル開口薬の開発研究： N -シアノー- N' -置換-3-ピリジンカルボキシアミジンの合成．薬理．構造活性相関

論文審査委員(主査) 教 授 目 黒 熙
 教 授 山 内 文 男
 教 授 安 元 健
 助教授 大 類 洋

論文内容要旨

<序論>

血管平滑筋細胞膜上のATP感受性カリウムチャンネル（以下、Kチャンネル）が開くと細胞内カリウムイオンが流出して細胞膜が過分極する。これによって電位依存性カルシウムチャンネルが開きにくくなり、カルシウムイオンの細胞内への流入が抑えられると、結果的に細胞内カルシウム濃度が低下して血管平滑筋は弛緩する。

近年、このような作用機序をもつ薬物がKチャンネル開口薬と呼ばれ、その強力な平滑筋弛緩作用に着目した医薬品の開発が国内外の有力製薬会社によって精力的に行われている。特に高血圧症治療薬、狭心症治療薬として開発が進められていると共に、脳血管攣縮、気管支喘息、排尿障害等への適用も試みられている。

このような状況の中、新規な化学構造を有するKチャンネル開口薬を見出すことができれば構造の違いによる新たな薬理活性、あるいは一部の化合物で見られる毒性の低減も期待でき、これまでにない新しいタイプの循環器系用医薬品を提供できるものと考え、1988年、本研究を開始した。これまでにいくつかのタイプのKチャンネル開口薬が見い出されているが、代表的な化合物を図1に示した。現在開発中のKチャンネル開口薬はそのほとんどがベンゾピラン系の化合物であり、特にニコチンアミド系の化合物はニコランジル以外全く開発されていない。

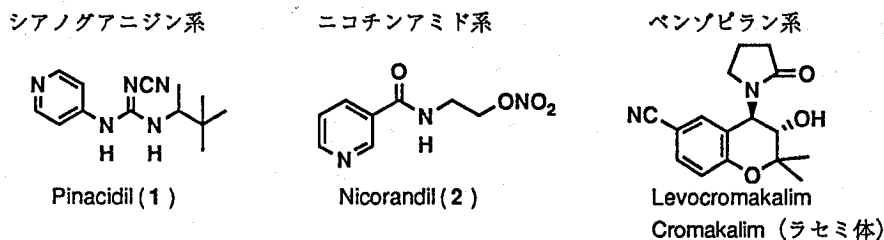


図1. 代表的なKチャンネル開口薬

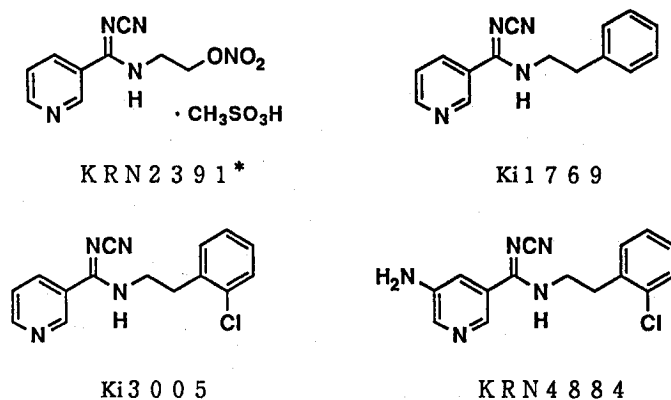


図2. 本研究により見い出された新規Kチャンネル開口薬

*本化合物の開発はメタンスルホン酸塩の形で実施しているため、以後これをKRN2391とし、フリー体をKRN2391Fとして区別する。

<第1章> *N*-置換複素芳香族シアノアミジンの合成と血管弛緩作用
(KRN2391Fの発見)

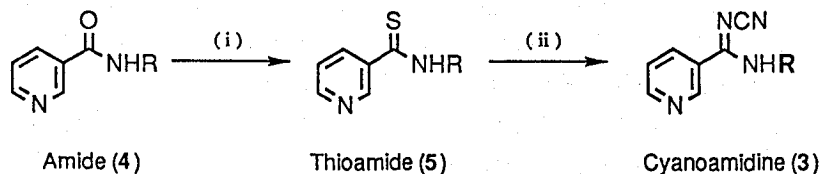
ピナシジル (1) の開発経緯から、その分子内に存在するシアノゲンジンをチオアミドまたはアミドにするとその活性が順次低下すること、また、アミド構造を有するニコランジル (2) の構造活性相関からニコランジルを上回る化合物が全く見いだされていないこと、以上を鑑み、ピナシジルとニコランジルを融合した *N*-置換複素芳香族シアノアミジンAを分子設計した。



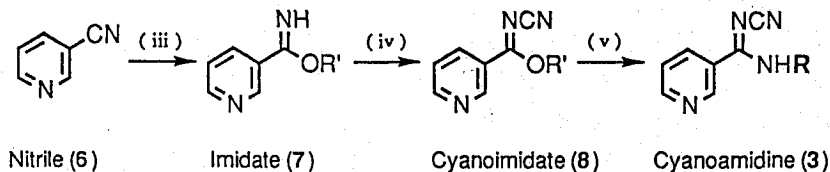
図3. *N*-置換複素芳香族シアノアミジン

複素環部位 (Ar) をピリジンに固定し、それぞれアミド4、またはニトリル6を出発物質とする2つのルートによる *N*-シアノ-*N'*-置換-3-ピリジンカルボキシアミジン3の合成法を検討した。その結果、シアノイミデート8を中間体とする方法が勝れていることを見出した。この方法は複素環部位がピリジン以外のシアノアミジンの合成にも適していた。

チオアミド法



シアノイミデート法



i) Lawesson's reagent, ii) POCl₃, then NH₂CN, iii) cat. NaOMe - R'OH, or excess HCl - R'OH, iv) NH₂CN, v) H₂NR

図4. シアノアミジン3の合成

シアノアミジン3の血管弛緩作用をその張力を指標に評価した結果、*N*-シアノ-*N'*-(2-ニトロキシエチル)-3-ピリジンカルボキシアミジン (KRN2391F) が特に強い活性を示した。

血管平滑筋における K^+ の動きを、そのマーカーである $^{86}Rb^+$ を用い調べたところ、KRN2391Fは強い $^{86}Rb^+$ の流出作用を示し、強力なKチャンネル開口作用を有していることが明らかになった。その活性はリード化合物のピナシジル(1)やニコランジル(2)を上回るのみならず、当時最も強い活性を持つとされていたクロマカリムをも上回った。KRN2391Fは分子内の硝酸エステルによってグアニレートシクラーゼを活性化することが別途明らかにされているが、硝酸エステルはKチャンネル開口作用の発現にも重要であることが構造活性相関の研究から明らかになった。また、KRN2391Fとニコランジルの比較から、シアノアミジン骨格はアミド骨格に比べKチャンネル開口作用を強く発現する骨格であることが示唆された。

KRN2391Fは、引き続き実施された高次の薬効薬理試験の結果、冠血管に対する作用選択性が非常に高く、血圧の下降に比べ顕著に冠血流量を増加させることが明らかにされた。また、第3章で後述するがKRN2391の血管に対する作用は心筋に対する直接作用より強く、薬効を示す用量で心筋に影響を与えないことが予想される。これらの特徴を踏まえ、現在、このメタンスルホン酸塩KRN2391が狭心症を適応症として臨床試験に入っている。

<第2章> N-アリルアルキル-N'-シアノ-3-ピリジンカルボキシアミジンの合成とその薬理活性 (Ki1769, Ki3005, KRN4884の発見)
KRN2391Fを見出す過程でシアノアミジン構造はアミド構造に比べてKチャンネル開口作用が強いこと、また硝酸エステルを持たないN-アルキル-N'-シアノ-3-ピリジンカルボキシアミジンの中にも血管弛緩作用を示すものがあることが明らかになっている。このような知見からシアノアミジンのN-置換基をさらに探索すれば、硝酸エステルを持たない化合物の中から強いKチャンネル開口作用を示す化合物が見出せるものと考え、検討を再開した。その結果、KRN2391Fのニトロキシル基をフェニル基に置換したN-シアノ-N'-フェネチル-3-ピリジンカルボキシアミジン (Ki1769) に強い血管弛緩作用が認められた。これはニトロキシアルキル基以外にも血管弛緩作用発現に有効な置換基が存在することを示すものであり、さらなる活性の向上が期待できた。

Ki1769の血管弛緩機序を各種アゴニストを前処置した摘出血管を用いて調べた結果、ATP感受性Kチャンネルの開口によることが示唆された。Kチャンネル開口作用は別途 $^{86}Rb^+$ の流出を促進させたことから示された。

次にKi1769のフェネチル基のベンゼン環ならびにピリジン環の置換基を導入し、活性の向上を目指した。その結果、ベンゼン環の2位に塩素原子を導入したN-[2-(2-クロロフェニル)エチル]-N'-シアノ-3-ピリジンカルボキシアミジン (Ki3005) はその血管弛緩作用が著しく高まることを見出した。

次にKi3005のピリジン環に置換基を導入し、直接 *in vivo* における降圧作用を指標に評価した。5位にアミノ基を導入した5-アミノ-N-[2-(2-クロロフェニル)エチル]-N'-シアノ-3-ピリジンカルボキシアミジン (KRN4884) はKi3005の約3倍の降圧作用を示した。また、経口投与の結果から、KRN4884

は勝れた経口吸収性のみならず、高い持続性をも有していることが明らかになった。

$^{86}\text{Rb}^+$ の流出実験により、Ki3005およびKRN4884の両化合物ともKチャンネル開口作用を示した。

KRN4884の作用は代表的なベンゾピラン系Kチャンネル開口薬であるレボクロマカリムの作用を上回った。別途実施された各種 *in vitro* 及び *in vivo* 実験結果から、KRN4884を高血圧症治療薬として開発することが決定され、臨床試験を目指した研究を実施中である。

<第3章> N-シアノ-3-ピリジンカルボキシアミジンとその関連誘導体の薬理的比較

N-置換複素芳香族シアノアミジンAは新規な化学構造を有するKチャンネル開口薬で、KRN2391Fとニコランジルとの比較からシアノアミジン構造はアミド構造に比べてKチャンネル開口作用を強く発現することが示唆された。そこでKRN2391、Ki1769、Ki3005をこれらに対応するアミド、チオアミド誘導体と *in vitro*、*in vivo* の両面から比較した。また、作用機序の検討も併せ行った。

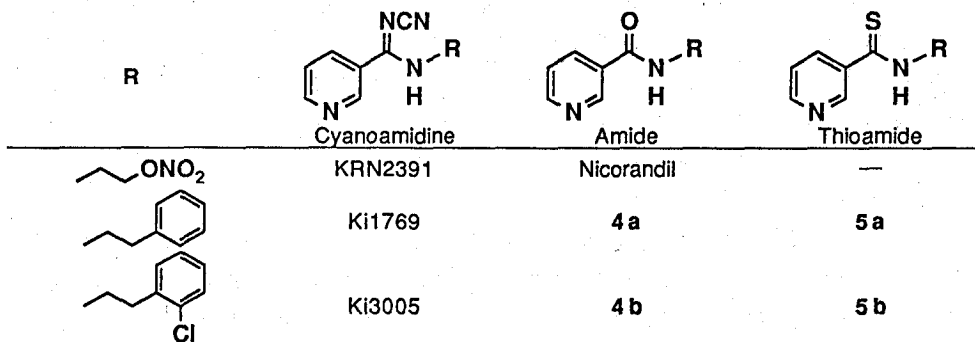
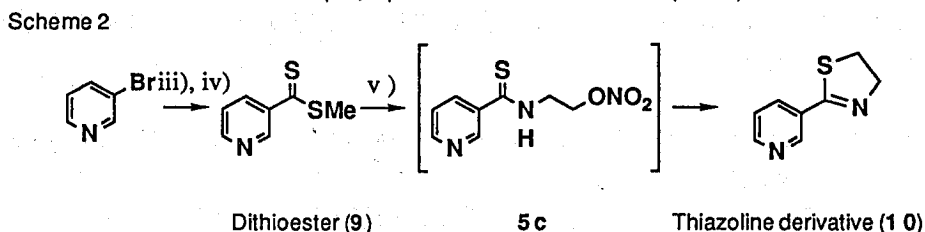
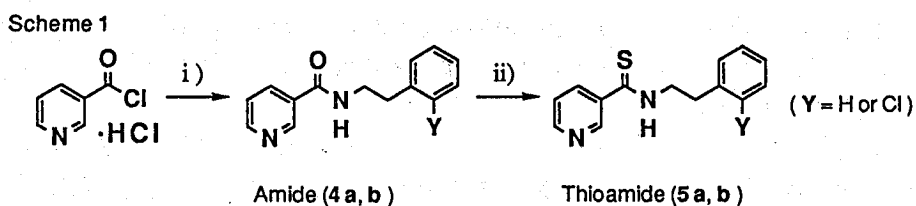


図5. シアノアミジンとその関連化合物

アミド4a, b、およびチオアミド5a, bはスキーム1に示す方法で合成した。ニコランジルのチオアミド体5cはこの方法で合成出来なかった。別途ジチオエステル9から合成を試みたが、チオアミド5cは得られず、チアゾリン10を単一生成物として得た。この反応は、一旦系内で目的とする5cが生成した後、求核性の高いチオアミドのイオウ原子と脱離能を有するニトロキシル基に隣接するメチレン基との間で分子内環化反応が進行し、チアゾリンを形成したものとする(スキーム2)。



i) 2-(2-substituted phenyl)ethylamine, ii) Lawesson's reagent, iii) BuLi, iv) CS₂, then MeI, v) H₂N(CH₂)₂ONO₂ · HCl

1) *in vitro* 薬理活性

シアノアミジンとアミド、チオアミドの血管、および心筋に対する作用を調べた。同じN-置換基を持つ化合物同志を比較すると、その血管弛緩作用の強さはシアノアミジン>チオアミド>アミドの順であった。また2-(2-クロロフェニル)エチル基を持つ3化合物は対応するフェネチル体よりいずれも高い活性を示した。これらの結果は2つの部位、すなわちピリジン環に直接結合した官能基とN-置換基が血管弛緩作用の発現に重要であることを示している。

心筋に対する作用は心拍数の指標である変時作用と収縮力の指標である変力作用を調べることにより評価した。その結果、心筋に対する作用の強さと構造の関係は、血管平滑筋におけるものと同様の傾向を示した。しかし、これらの化合物の心筋に対する作用は血管に対する作用よりも弱く、3-ピリジン化合物群は血管選択性の高い薬物であることが明らかになった。

2) *in vivo* 薬理活性

シアノアミジンとアミドの *in vivo* における血圧下降を比較した。また、Kチャンネル阻害剤であるグリベンクラミドを前投与することによって降圧機序を調べた。

降圧作用の強さは Ki3 0 0 5 > KRN 2 3 9 1 > Ki1 7 6 9 > ニコランジル > 4a の順で、*in vitro* 試験における血管弛緩活性の強さに相関する結果が得られた。N-置換基とピリジン環に直結した官能基に関する構造と降圧活性の相関関係も *in vitro* における血管弛緩作用の場合と同様、シアノアミジンは同じN-置換基を持つアミドより強く血圧を下降させた。

シアノアミジンおよびアミドの降圧作用はグリベンクラミドを前投与することによって抑制された。このことから、これらの血圧下降にはいずれもKチャンネル開口作用が関与していることが示唆された。

以上、第1章～第3章で得た実験データから、シアノアミジンの構造活性相関を図6に示した。

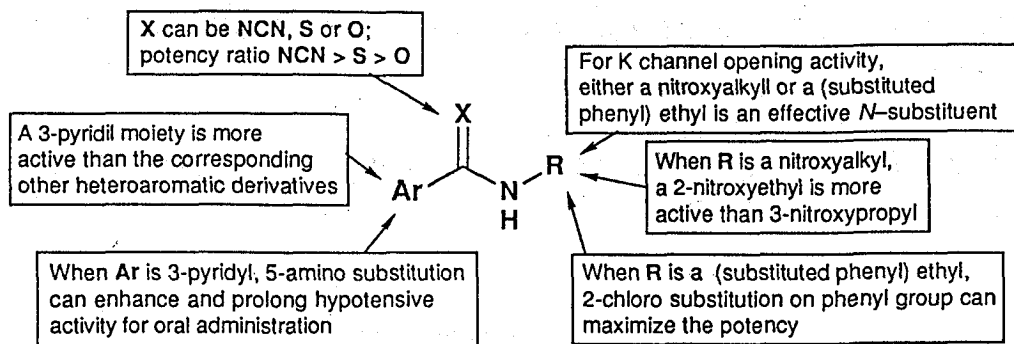


Fig. 6. Structure-activity feature of the cyanoamidine.

<第4章> 狭心症治療薬KRN2391の開発

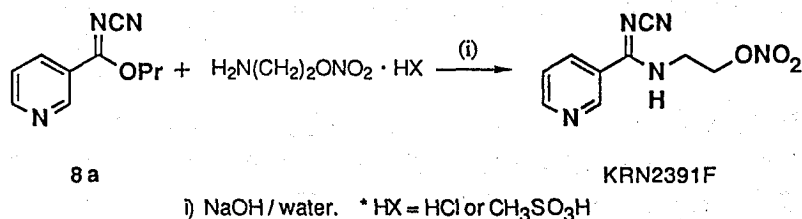
1) 安定性向上の検討

KRN2391Fは熱的に不安定で、そのまま開発するには困難が予想された。そこで安定性の向上を目指し、研究を実施した。各種酸付加塩を調製した結果、スルホン酸塩は明らかにフリー体に比べて熱安定性が向上した。なかでもメタンスルホン酸塩が最も優れた性質を示したことから、これをKRN2391として開発することに決定した。

2) 大量合成のためのプロセス研究

KRN2391Fが硝酸エステル化合物であることを考慮し、製造プロセスを検討した。その結果、水を溶媒として用いると安全性が向上する上、シアノイミデート8aとニトロキシエチルアミンの反応も速やかに進行し、かつ生成物が直接水溶液中から析出することを見出した。現在、この方法で合成したKRN2391Fにメタンスルホン酸塩を作用させKRN2391を製造している。

Scheme 3



3) 血中濃度微量測定法開発のためのハプテンの合成

KRN2391の血中濃度を測定する方法として免疫化学的反応による高感度測定法(EIA法)を開発するため、ハプテンの合成を検討した。KRN2391の主代謝物は硝酸エステルが加水分解されたアルコールであることから、硝酸エステルを抗原決定基

として認識し、かつその代謝物中の水酸基を認識しないように、これらの基から離れたピリジン環に架橋用の官能基を導入したハプテン11、12を合成した(図7)。その結果、ハプテン11(n=3)、12を用いることによってKRN2391のEIAによる定量測定法が開発され、定量感度は必要とされる100 pg/ml オーダーを確保することが可能になった。

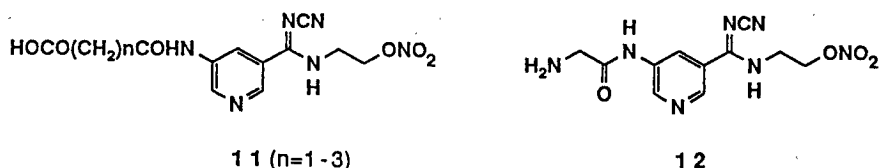


図7. KRN2391誘導体(ハプテン)

<第5章> 高血圧治療薬KRN4884の開発

1) ハプテンの合成

KRN4884のEIAによる血中濃度測定法を開発するため、ハプテンの合成を検討した。KRN4884はピリジン環の5位アミノ基で代謝を受けることが予想されることから、架橋用官能基は5位アミノ基から離れたN-置換基中のベンゼン環に導入することにした。また、キャリアー蛋白質との結合の際に、このアミノ基と区別できるようにカルボキシル基を架橋用官能基として選んだ。

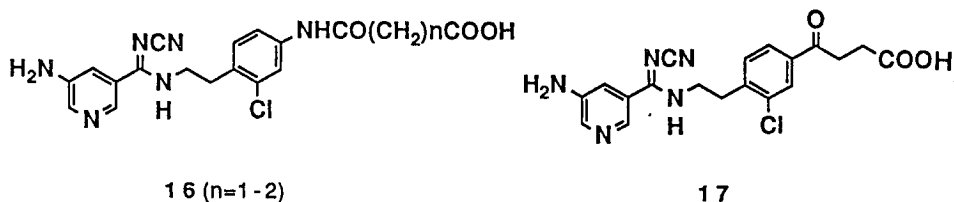


図8. KRN4884誘導体(ハプテン)

合成したハプテン16、17を用い、現在EIAによる定量測定法を開発中である。

以上、シアノイミデートを中間体とする簡便な複素芳香族シアノアミジンの合成法を確立した。合成したN-シアノ-N'-置換-3-ピリジンカルボキシアミジンは新規な骨格を有するKチャンネル開口薬であることを明らかにした。スクリーニングで見出したKRN2391およびKRN4884は、共に強い血管弛緩作用を有し、それぞれの薬理学的特徴からKRN2391は狭心症を、またKRN4884は高血圧症を適応症として現在開発が進められている。

論文審査の要旨

ATP感受性カリウムチャンネル(Kチャンネル)が開くとカリウムチャンネルが開きにくくなり、カルシウムイオンの細胞内の流入が抑えられ、結果として、血管平滑筋の弛緩、血管の拡張をもたらせる。この性質を利用し、Kチャンネル開口を引き起こす化合物を高値圧症治療薬として利用することが試みられている。

本論文はこれまでにない新しいタイプのKチャンネル開口薬、芳香族シアノアミジンの分子設計を行い、これにもとづき一群の新規化合物を合成したものである。

シアノアミジンは、従来より用いられているシアノグアニジン系のピナツジルとニコチンアミド系ニコランジルの二つの化合物を一つの分子内に融合したもので、強い効果が期待された。今回合成された化合物群中で特に芳香環にピリジン環を有するN-シアノ-N¹- (2-ニトロキシエチル)-3-ピリジカルボキシアミジン(RN2391)は強い活性を示した。また、分子内の硝酸エステルがKチャンネル開口作用の発現に大きな働きをすることも明らかにされた。同化合物は薬理試験の結果、冠血管に対する作用選択性が非常に高く血圧の下降に顕著に冠血流量を増加させることが明らかにされた。

実用の医薬としてRN-2391は安定性を増すためにメタンスルホン塩酸として開発され、生体内での血中濃度の測定のためハプテンの合成を行い、定量測定法として検討を行った。

また、第二の化合物としてシアノ基をもち、硝酸エステルを持たない化合物としてN-アリアルキル-N¹-シアノ-3-ピリジカルボキシアミジンが強い血管弛緩作用を示した。その他にも、芳香環をかえた多くの化合物群はそれぞれ強弱はあるものの、同様の効果を示した化合物も確認された。

以上の合成にあたり、シアノイミデートを中間体とする簡便な複素芳香族シアノアミジン合成法を開発し、同試薬の工業化、実用化への道を切り開いた。

これらの研究は、高度の有機化学的手法を用い新しい医薬の開発を行ったもので、生物学的にも優れた内容を持っており、博士(農学)の学位にふさわしいものと考えられる。