プロゲステロンレセプターアゴニスト およびアンタゴニストの創製—微生物 代謝産物 PF1092C からの展開—

栗原 健一*
新榮 麗英
小此木恒夫

*Discovery of Progesterone Receptor Agonists and Antagonists inspired
by the Fungal Metabolite PF1092C*

Ken-ichi Kurihara*, Rie Shinei, and Tsuneo Okonogi

In the course of our microbial screening studies to find novel nonsteroidal PR ligands, the fungal metabolites PF 1092 A, B and C were isolated from extracts of cell cultures of the rare fungus *Penicillium oblatum* PF 1092. We initially sought to identify the minimal pharmacophore by totally synthetic methods, and then clarified the structure-activity relationships (SAR) of PF 1092 (tetrahydronaphthofuranone) derivatives. SAR studies revealed that substituents at the 6- and 7-positions were critical for PR binding affinity and for agonist or antagonist activity. Furthermore, we synthesized tetrahydrobenzindolones possessing a lactam ring, which are chemically more stable than tetrahydronaphthofuranones and generally showed higher PR binding affinity than the corresponding tetrahydronaphthofuranones. The effects of representative antagonists, **37d** and **49f**, and representative agonists, **51c** and **53a** were confirmed in *in vivo* tests. In this report, we mainly describe the synthesis and SAR of these derivatives, as new nonsteroidal PR ligands.

Key words: PF 1092 A, PF 1092 B, and PF 1092 C, progesterone, nonsteroidal progesterone receptor (PR) ligands, tetrahydronaphthofuranone, tetrahydrobenzindolone

はじめに

プロゲステロンはステロイドホルモンに分類される女性ホルモンの一種であり、月経周期や妊娠・出産などの女性の生理機能だけでなく、子宮内膜症・乳がんなどの女性ホルモン依存的な疾患への関与、効果が示唆されている。しかしながら、プロゲステロンの代謝は極めて速く、そのまま薬剤として用いることは不可能であった。そのため、1960年代にはプロゲステロンの生体内での安定性を改善するための研究が盛んになり、経口投与の可能な合成プロゲステロンが医薬品として開発され、今日では臨床の場で医療に貢献している。例えば、ノルエチステロンは女性ホルモンの一種であるエストロゲンと組み合わせた避妊薬として、また酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)はエストロゲンの作用を抑えることにより、子宮内膜症・乳がんなどの婦人科疾患治療薬として使用されている¹⁾(図1上段)。

プロゲステロンが結合するプロゲステロンレセプター(PR)は、他のステロイドホルモンレセプターと同様に核内レセプターに分類され、1980年代後半に cDNA の

クローニングが成功したこと、その機能や生体内での分布などが次々と明らかにされた。さらに1990年代には、様々な核内レセプターとともに、そのリガンド結合領域のX線結晶構造解析がなされ、情報伝達機構の研究も大きく進展した。リガンドであるプロゲステロンがPRに結合することにより、まずレセプターが二量体化した複合体を形成した後、さらにその複合体が核内の標的DNA配列に結合し、遺伝子の発現を調節していることが解明された。これらの研究の結果、PRは子宮内膜・卵巣・乳腺などの女性生殖系系に多く発現していること、PRそのものがプロゲステロン依存的な転写制御因子として働くことにより、月経周期の調節、子宮内膜や乳腺の発達、妊娠の維持などの重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

しかし、生体内におけるPRの機能に関してはまだ不明な点が数多く残されていることから、薬理的な解明をさらに進めるため、PRに対する特異的なアゴニストやアンタゴニストの開発研究が継続的に行われている。そして1980年代にはミフェプリストン(RU 486)²⁾、オナプリストン³⁾に代表されるPRアンタゴニスト(PRの作用を抑制するリガンド)が見出された(図1中段)。

しかしながら、前述のように臨床で使用されているPRアゴニスト(合成プロゲステロン)やPRアンタゴニストは、すべてステロイド骨格を有しているため、他の

* 明治製菓株式会社 創薬研究部門

()
* Pharmaceutical Research Department, Meiji Seika Kaisha, Ltd. ()

Fig. 1 Progesterone receptor ligands.

ステロイドホルモンレセプターにも影響を与え、中でも男性ホルモン(アンドロゲン)レセプターあるいは副腎皮質ホルモン(グルココルチコイド)レセプターに対する親和性が副作用の一因となっている。そのため、1990年代中頃からこのような副作用を軽減した婦人科疾患治療薬の開発を目指し、ステロイド骨格を持たないPRアゴニスト/アンタゴニストに関する研究が活発となった。これまでにLG 100128, LG 120746, RWJ 26819等が報告され、タナプロジェットは現在臨床開発中であるが(図1下段)、未だ非ステロイド性PRリガンドは上市に至っていない⁴⁻⁷⁾。

このような背景から、我々は他のステロイドレセプターに影響しない非ステロイド性PRリガンド(アゴニスト/アンタゴニスト)の開発が、生体内におけるPRの機能・役割の解明に役立つだけでなく、PRが関与する婦人科疾患に対し、既存のステロイド系薬剤が有する副作用を持たない新しい治療薬の創出に結びつくと考え、本研究に着手した。

1. PF1092物質のファーマコフォアの解明

1.1 PF1092物質の発見

PF 1092物質(A, BおよびC)は1994年、明治製菓においてPRリガンドの探索を目的とした微生物代謝産物スクリーニングにより、真菌 *Penicillium oblatum* の固体培養抽出物から単離された新規エレモフィラン型セスキテルペンである^{8,9)}(図2)。本物質はステロイドと全く異なる構造であるにも関わらず、特にPF 1092 Aはステロイドレセプターの中でもPRに対して選択的であり、かつ高い親和性を有していた。また、PF 1092物質の基

本骨格はテトラヒドロナフトフラノンであるが、その4a, 5位のメチル基および6, 7位の水酸基がすべて *cis* 配置をとる極めて珍しい構造的特徴を持ち、天然物化学および微生物代謝産物からの創薬という観点から、非常に興味深いものであった。そこで、非ステロイド性PRリガンドの開発にあたり、我々はPF 1092物質が魅力的なプロファイルを有していると考え、本物質を活用した探索研究を開始した。

Fig. 2 Structure of PF 1092 A, B and C.

1.2 (±)-PF1092A および (±)-7-デオキシ PF1092A の合成^{10,11)}

我々はまず始めに、PF 1092物質のPR親和性発現に必要な基本構造(ファーマコフォア)の解明が必要であると考えた。そこで、種々の誘導体合成が可能なルートを開発する目的で、(±)-PF 1092 Aの全合成に着手した(スキーム1)。

これまでに多くのエレモフィラン型セスキテルペンの全合成について報告されているが、その中で山川, Bohlmannらは、ジメチルフェノールから得られるラセミ化合物1をセスキテルペンの全合成における鍵中間体として活用している¹²⁻¹⁴⁾。我々はこれらの報告を応用し、まずラセミ体1にピルビン酸メチルを作用させ縮合体2へと導いた。次いで、トシル酸を用いた脱ケタール

Scheme 1 Synthesis of (±)-PF 1092 A and C.

化を行ったところ、環化反応も同時に進行したオキソ体 3 を得ることができた。続く NaBH₄ 還元は、4 a, 5 位メチル基との立体障害により、望む β 配置のアルコール体 4 を優先的に与えた。さらに、7 位へ立体選択的に水酸基を導入するため種々検討した結果、二酸化セレンを用いた場合にのみ水酸化反応^{15,16}が進行することを見出し、目的とする *cis*-ジオール体を合成することに成功した。得られた (±)-PF 1092 C の各種スペクトルデータは、旋光度を除いて天然物と完全に一致した。さらに (±)-PF 1092 C の 6 位をアセチル化することにより、目的とする (±)-PF 1092 A の合成および全合成ルートの開発を達成した。また、中間体として得られたデオキシ体 4 についてもアセチル化し、(±)-7-デオキシ PF 1092 A 5 へと変換した。

ヒト PR が発現している T47D (ヒト乳がん細胞) を用いてヒト PR 結合親和性評価系を確立し、先のラセミ体を評価した。その結果、合成した (±)-PF 1092 A の親和性は天然物 PF 1092 A の約 1/2 であり、その対掌体が PR 親和性を持たないことを明らかにした。一方、(±)-7-デオキシ体 5 は 7 位水酸基がないにも関わらず、(±)-PF 1092 A とほぼ同等の親和性を示したことから、7 位水酸基は、必ずしも親和性発現に必要な官能基ではないと推察した。

続いて我々は、天然物 PF 1092 物質の A-C 環上の新たな置換基が PR 親和性に及ぼす影響を探り、その後の探索研究に用いるファーマコフォアを決定するために、テトラヒドロナフトフラノン骨格の A-C 環上へ、種々の置換基を導入した化合物の合成を計画した (図 3)。先の結果において、化合物 5 が (±)-PF 1092 A とほぼ同等の親和性を示したことから、この構造を用いれば最終

Fig. 3 Synthetic design for racemic derivatives.

水酸化工程の省略が可能と判断し、(±)-7-デオキシ PF 1092 A 5 を基本構造とした各種誘導体を合成して親和性の比較を行うこととした。

1.3 A 環、B 環および C 環の修飾

A 環の修飾として、始めにテトラヒドロナフトフラノン骨格 7 位へのメチル基導入を行った (スキーム 2)。まず、ラセミ体 1 をケタールの掛け替えにより化合物 7 へと変換した¹⁷。メチル化においては 2 つのメチル基との立体障害により α -メチル体を選択的に与え、続く LiBH₄ 還元により β 配置を有するアルコール体 8 を得た。脱ケタール化、水酸基の保護を行った後、ピルビン酸メチルとの縮合体 9 へと変換した。トシル酸を用いて環化と脱 MEM 化が進行した化合物 10 へと導き、アセチル化により目的とする 7 α -メチル体 11 を合成した。

次に、スキーム 3 に示した方法で 5 位メチル基の変換を行った。(±)-Wieland-Miescher ketone 12 のエノン低温下で選択的に保護し、Rubottom らの方法¹⁸により合成したアルコール体 (13a : 13b = 1 : 7) から、 β -アルコール体 13b のみを単離した後、TBDMS 保護体 14 へと導いた。LiBH₄ 還元により水酸基に変換した後、Barton 反応を用いたラジカル的なデオキシ化¹⁹により 15a, メチル化²⁰により 15b を得た。それぞれを脱ケタール化した後、ピルビン酸メチルとの縮合体 16a, b へと導いた。次いで、トシル酸を用いて環化と脱 TBDMS 化が進行した閉環体 17a, b へと変換した後、それぞれをアセチル化することにより、目的とする 5-デメチル体 18a および 5-メトキシ体 18b を得た。

さらに、スキーム 4 に示した方法により、B 環および C 環の修飾を行った。ラセミ体 19 と 20 の Robinson 環化反応²¹により縮環体 21, 続いてメチル基を導入した 22 へと変換した。それぞれに対してピルビン酸メチル、2-オキソ酪酸メチル、グリオキシル酸を縮合させ 24a-d とした後、トシル酸による環化、脱ケタール化を行い、オキソ体 25a-d へと導いた。続くカルボニル基の NaBH₄ 還元ではいずれも望む β 配置のアルコール体 26a-d を優先的に与え、それぞれをアセチル化すること

Scheme 2 Modification of A-ring (1).

Scheme 3 Modification of A-ring (2).

により目的とする 27a-d を得た。

1.4 (±)-7-デオキシ PF1092A 誘導体の構造活性 相関

テトラヒドロナフトフラン骨格の A-C 環上に種々の置換基を導入した前述の化合物群について、前項 1.2 と同様にヒト PR 親和性を評価した。ここでは (±)-7-デオキシ PF 1092 A 5 を基本構造としていることから、化合物 5 の PR 親和性 (IC₅₀ = 0.7 μM) に対する相対値 (RBA) を、各化合物の PR 親和性の評価結果として示した。すなわち、大きい RBA 値は高い PR 親和性を意味する (表 1)。

A 環の修飾において、5-デメチル体 18a の親和性は著しく低下したが、5β-メトキシ体 18b は化合物 5 と同等の親和性を保持していたことから、5β 位の置換基の必要性を確認した。また、7α-メチル体 11 が最も高い親和性を示したことにより、(±)-PF 1092 A の 7β 位水酸基も含めた 7 位置換基の重要性を確認することができた。

B 環の修飾では、9-メチル体 27a の親和性が著しく低

下する一方で、4α-メチル体 27d は親和性を保持したことから、オレフィン部位への置換基導入は親和性の低下を招くが、4α 位への置換基導入は許容されることが示唆された。

C 環については、3-デメチル体 27c の親和性が向上したのに対し、3-エチル体 27b では低下したことから、3 位置換基はメチル基が限度であり、それ以上かさ高い置換基の導入は親和性の低下をもたらすことを明らかにした。

これらの結果から、PR と結合するためのファーマコフォアは 3-デメチル-7-デオキシ PF 1092 A 27c であり、さらに PR 親和性を向上させる手段として、テトラヒドロナフトフラン骨格の 7 位の修飾が有効であることを明らかにした。

以上の検討をふまえ、我々はより高い PR 親和性を有する非ステロイド性 PR リガンドの探索を開始するにあたり、必要構造を満たしている上に光学活性体であること、また微生物培養による原料供給が可能であることな

Scheme 4 Modification of B- and C-rings.

Table 1 Human PR binding affinities of (±)-7-deoxy-PF 1092 A derivatives.

Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	RBA*
5	Me	H	Me	H	H	100
(±)-PF1092A	Me	H	Me	β-OH	H	125
11	Me	H	Me	α-Me	H	200
18a	Me	H	H	H	H	10
18b	Me	H	OMe	H	H	88
27a	Me	H	Me	H	Me	9
27b	Et	H	Me	H	H	25
27c	H	H	Me	H	H	150
27d	Me	Me	Me	H	H	100

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
 RBA = (IC₅₀ of **5** / IC₅₀ of test compound) x 100.

どから、天然物である PF 1092 C を出発物質として、その 6, 7 位水酸基の化学修飾を集中的に行うことが最も効率的であると判断し、その誘導体の合成を開始した。

2. テトラヒドロナフトフラノン誘導体からの PR アンタゴニストの探索²²⁾

2.1 PF1092A 誘導体の構造活性相関

誘導体の展開にあたり、6-アセチル体 PF 1092 A と

7-アセチル体 PF 1092 B との比較から、PF 1092 A の 6 位アセチル基が PR 親和性発現に必須であり、さらに先の検討から、PR 親和性の向上に 7 位置換基の最適化が有効なことを明らかにしてきた。そこで我々は、6, 7 位の立体構造を含む詳細な構造活性相関を調べるため、始めに PF 1092 A 誘導体の合成を開始した(スキーム 5)。

まず、PF 1092 C とトシル酸を反応させることにより、7 位水酸基が脱水した 6-エノール体を経由して、互変異性化した 6-オキソ体 28 を得た。NaBH₄ 還元では 6β-ヒドロキシ体を主生成物、立体異性体である 6α-ヒドロキシ体を副生成物として与えたため、それぞれをアセチル化して 29a, b へと導いた。また、PF 1092 C をメシル化した後、さらにアルカリ処理により 6, 7-エポキシ中間体とし、次いで酢酸との反応により、目的とする 7α-アセチル体 31b を得た。

これらの誘導体について、前項 1.2 と同様にヒト PR 親和性を評価した。ここでは PF 1092 A を基本構造としていることから、PF 1092 A の PR 親和性(IC₅₀=0.28 μM)に対する相対値(RBA)として、その結果を示した(表 2)。

6β-アセチル体 29a は 7 位水酸基がないにも関わらず、その親和性が PF 1092 A と同等以上であったのに対し、立体異性体である 6α-アセチル体 29b の親和性は著しく低下した。また、6 位が水酸基である 31b および PF 1092 B では、7 位アセチル基の立体に関わらず親和

Scheme 5 Syntheses of PF 1092 A derivatives.

Table 2 Human PR binding affinities of PF 1092 A derivatives (1).

Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	RBA*
29a	AcO	H	H	H	133
29b	H	AcO	H	H	5
PF1092B	HO	H	AcO	H	8
31b	HO	H	H	AcO	<3
PF1092A	AcO	H	HO	H	100

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
 $RBA = (IC_{50} \text{ of PF1092A} / IC_{50} \text{ of test compound}) \times 100$.

性が大幅に低下した。これらの結果から、6位アシル基は天然型の β 配置が望ましいことを確認した。

2.2 リード化合物の探索

さらにリード化合物になり得るファーマコフォアを探索すべく、スキーム5に示した方法を用いてPF 1092 Aの7位水酸基について展開を図った。まず7 β -置換体としては、アリル位で反応性に富む7位水酸基を先にアセチル化あるいはメチル化して32a, bへと変換し、それぞれの6位水酸基をアセチル化して目的とする33a, bを得た。7 α -置換体については、6, 7-エポキシ中間体と水、あるいはメタノールとのS_N2反応により、7 α -ヒドロキシ体30、あるいは7 α -メトキシ体34aへと変換した後、必要に応じて7位水酸基の保護・脱保護を行い、それぞれの6位水酸基をアセチル化して目的とする35a, 36a, bを合成した。

ヒトPR親和性を測定したところ、PF 1092 Cのジアセチル体33aはPF 1092 Aおよび29aとほぼ同等の親和性を示した(表3)。また、7-メトキシ体については β 体33bが親和性を失ったにも関わらず、対応する α 体35aはPF 1092 Aの1/2程度の親和性を保持していた。

Table 3 Human PR binding affinities of PF 1092 A derivatives (2).

Compound	R ¹	R ²	RBA*
29a	H	H	133
PF1092A	HO	H	100
36a	H	HO	32
33a	AcO	H	115
36b	H	AcO	20
33b	MeO	H	5
35a	H	MeO	41

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
 $RBA = (IC_{50} \text{ of PF1092A} / IC_{50} \text{ of test compound}) \times 100$.

一方、これまでのPF 1092 A誘導体合成において、その構造に由来する化学的性質が明らかとなった。1つは7位水酸基がない7-デオキシ体29aは酸化を受けやすいこと、もう1つは7 β -ヒドロキシ体であるPF 1092 Aが6, 7位の間でアシル転位することである。

そこでこれらの性質を考慮し、化学的安定性が高く、かつ水酸基の保護・脱保護工程が不要である7 α -メトキ

シ体を基本構造として選択し、非ステロイド性PRリガンドの探索を進めた。

2.3 非ステロイド性PRアンタゴニストの創出

冒頭に述べたミフェプリストン(RU 486)は臨床試験において乳がん、子宮筋腫、髄膜腫に対する有用性を示したPRアンタゴニストであるが、そのステロイド骨格に由来する副作用も臨床で認められている。そこで我々はこれまでの研究結果をふまえ、非ステロイド性PRアンタゴニストの創出を目指して、テトラヒドロナフトフラン誘導体の合成展開を図ることとした。

これまでの結果から、PR親和性の発現には6位置換基のカルボニル基が重要であると考察し、7 α -メトキシ体34aの6位水酸基に導入する置換基の結合様式を種々検討した(スキーム6)。まず6位のエステル体35b-dおよび炭酸エステル体36a,bを合成した。また、1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)を作用させたイミダゾリル中間体と、各種アミンを反応させることにより、目的とする6-カルバメート体37a-fへ導いた。

合成した誘導体の*in vitro*有効性評価にあたっては、ヒトPR親和性測定系の他に、ルシフェラーゼを導入したT47D細胞を用いてPRを介した転写活性を測定するPRアゴニスト-アンタゴニスト判別系(LUCアッセイ)を新たに用いて、各化合物のPRアゴニスト-アンタゴニスト作用を以下の4タイプに分類した。

・タイプa; アンタゴニスト作用が90%以上, アゴニスト作用が10%未満

・タイプb; アンタゴニスト作用が90-75%, アゴニスト作用が10-25%

・タイプc; アンタゴニスト作用が74-25%, アゴニスト作用が26-74%

・タイプd; アンタゴニスト作用が25%未満, アゴニスト作用が75%以上

前述の誘導体について、ヒトPR親和性およびその転写活性を測定したところ、6位水酸基の結合様式を変換することにより、PR親和性だけでなくPRアゴニスト-アンタゴニスト作用も様々に変化(タイプa-d)することを確認した(表4)。これらの中で、目的とするアンタゴニスト作用(タイプa)を示す誘導体として、6-カルバメート体37bおよび37dを見出した。

PRアンタゴニストとして見出されたカルバメート体についてさらなる最適化を図るため、6位置換基をPR親和性の高いプロピルカルバモイル基およびシクロプロピルカルバモイル基として、7位の変換を行った(スキーム6)。PF 1092 Cの6,7-エポキシ中間体から7 α -ヒドロキシ体30、あるいは種々のアルコールと反応させ7 α -アルコキシ体34へと変換した後、イミダゾリル中間体を経て目的とする6-カルバメート体38a-c, 39a,bへと導いた。

先の誘導体と同様に評価したところ、7位置換基の高い38bを除き、いずれもヒトPR親和性とアンタゴニスト作用(タイプa)が保持されていることを確認した(表5)。特に、37dはアンタゴニスト作用を有する誘導

Scheme 6 Syntheses of PF 1092 C derivatives.

Table 4 Human PR binding affinities and activities of PF 1092 C derivatives.

Compound	R ¹	RBA*	LUC assay
35b	Et	90	c
35c		97	c
35d		346	d
36a	EtO	52	b
36b	PhO	47	a
37a	MeNH	38	c
37b	ⁿ PrNH	82	a
37c	PhNH	19	a
37d		215	a
37e		483	c
37f		175	c
PF1092A		100	c

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
RBA = (IC₅₀ of PF1092A / IC₅₀ of test compound) x 100.

体の中で最も高い親和性を示しただけでなく、ウサギを用いた *in vivo* 有効性評価において、10 mg/kg の皮下投与により子宮腺の発達を抑制し、PR アンタゴニストとしての作用を示すことを明らかにした²³⁾。

Table 5 Human PR binding affinities and activities of 6-carbamate derivatives.

Compound	R ¹	R ²	RBA*	LUC assay
39a	<i>n</i> -Pr	H	165	b
37b	<i>n</i> -Pr	Me	82	a
38a	<i>n</i> -Pr	Et	140	a
38b	<i>n</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	19	a
39b		H	85	a
37d		Me	215	a
38c		Et	78	a
PF1092A			100	c

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
RBA = (IC₅₀ of PF1092A / IC₅₀ of test compound) x 100.

以上のように、天然物である PF 1092 C を出発物質とし、テトラヒドロナフトフラノン骨格の 6,7 位水酸基を最適化することにより、*in vivo* 有効性を示す非ステロイド性 PR アンタゴニスト 37d を見出すことができた。

3. テトラヒドロベンズインドロン誘導体からの PR アゴニスト/アンタゴニストの探索²⁴⁾

3.1 新規ファーマコフォア：テトラヒドロベンズインドロンの発見

我々は前項のテトラヒドロナフトフラノン誘導体による PR アンタゴニストの探索過程において、PF 1092 C のラクトン環がラクタム環に変化した非常に興味深い化合物を見出しており、詳細な構造解析によってテトラヒドロベンズインドロン骨格を有する 40a であることを解明した(図 4)。さらに、構造的に対応するテトラヒドロナフトフラノン誘導体 34a との比較により、塩基性条件下における化学的安定性が非常に高いことを確認した。

Fig. 4 Stability of tetrahydrobenzindolone 40a and tetrahydronaphthofuranone 34a at pH 11.5.

そこで我々は、テトラヒドロベンズインドロン骨格の非ステロイド性 PR リガンドとしての有用性を判断するため、本骨格に関する検討を開始した。

まず、テトラヒドロベンズインドロン骨格の効率的合成法を確立するため、化合物 40a を得た反応を中心に各反応を詳細に解析した。その結果、PF 1092 C をメシル化して 7 位水酸基の脱離能を高めた後に、メチルアミンを作用させると、一度ラクトンが開環したジエノン体を生じ、さらにラクタムへと再閉環してテトラヒドロベンズインドロン骨格が構築された中間体となることを突き止めた。続いて、求核剤として酢酸を加えることにより、7 位の選択的 S_N2' 型置換反応が進行し、7α-アセトキシ体 42 へと収率よく変換できることを見出した(スキーム 7)。

この 7α-アセトキシ基は高い反応性を有するため、酸触媒存在下求核剤を作用させることにより、α 配置を保持した置換反応が生じ、種々のアルコールにより 7α-アルコキシ体 40a, 40c-g、水により 7α-ヒドロキシ体 40b へと容易に導くことができた。これはラクタム環を含む

Scheme 7 Syntheses of tetrahydrobenzindolones.

共役系がカチオンの安定化に寄与しているため、求核剤と4 α ,5位メチル基との立体障害から7 α 置換体が優先するものと推定した。

一方で、7 β -ヒドロキシ体43は次のように合成した。化合物42をアルカリ処理して6,7-エポキシ中間体へと導き、次いで塩酸を反応させて、生成した7 α -と7 β -ヒドロキシ体の混合物から7 β -ヒドロキシ体43を単離した。なお、7 β 体は先の理由により7 α 体より低収率であった。

またテトラヒドロナフトフラノン誘導体と同様に、化合物42とトシル酸を反応させることにより、反応性の高い7 α 位アセトキシ基が脱離した6-エノール体を経て、さらに異性化した6-オキソ体44、続く NaBH_4 還元により6 β -ヒドロキシ体45への誘導も可能であった。

以上の検討から、種々の7位置換基を有するテトラヒドロベンズインドロン骨格の効率的な合成法を確立することに成功した。

次に我々は、テトラヒドロベンズインドロン誘導体のPRリガンドとしての有用性を判断するために、7 α -メトキシ体40aから6-エステル体41a-eを合成し(スキーム8)、対応するテトラヒドロナフトフラノン誘導体とヒトPR親和性を比較した。ここでは、プロゲステロンのPR親和性($\text{IC}_{50}=32\text{ nM}$)に対する相対値(RBA)として、その結果を示した(表6)。

テトラヒドロベンズインドロン誘導体41a-eの親和性は、対応するテトラヒドロナフトフラノン誘導体35a-eと比較して、2–21倍の高い親和性を示した。中

Table 6 Human PR binding affinities of tetrahydrobenzindolone and tetrahydronaphthofuranone 6-ester derivatives.

Compound	R ¹	RBA*	Compound	R ²	RBA*
41a	Me	16	35a	Me	5
41b	Et	34	35b	Et	4
41c		230	35c		11
41d		57	35d		10
41e		94	35e		40
progesterone		100			

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
 $\text{RBA} = (\text{IC}_{50} \text{ of progesterone} / \text{IC}_{50} \text{ of test compound})$.

でもシクロプロピルエステル体41cは、プロゲステロンをはるかに上回る親和性を示し、非ステロイド性PRリガンドとして非常に有用であることがわかった。

こうして我々は化学的安定性が優れている上に、高い親和性を示す新規な非ステロイド性PRリガンド、テトラヒドロベンズインドロン骨格を見出すことができた。

3.2 リード化合物の探索—1位および7位の修飾—

我々はさらに優れたファーマコフォアを探索すべく、まずテトラヒドロベンズインドロン骨格の1位置換基の最適化を行った(スキーム8)。前項3.1に示した方法を用いて、PF1092Cをメシル化してアンモニア、エチルアミン、ベンジルアミンを作用させた後、酢酸により環化し、次いでメタノールと反応させて対応する7 α -メト

a) (i) MsCl (1.2 eq), *i*-Pr₂NEt (1.5 eq), CH₂Cl₂, (ii) R¹NH₂ (excess), THF, (iii) AcOH (3.3 eq), CH₃CN, (iv) MeOH;
b) R²COCl (3.0 eq), pyridine; c) RCOCl (3.0 eq), pyridine; d) R³COCl (3.0 eq), pyridine.

Scheme 8 Syntheses of tetrahydrobenzindolone 6-ester derivatives.

キシ体 46a-c へと変換した。続いて、それぞれの 6 位水酸基をアシル化することにより、目的とする 6-エステル体 47a-d へと導いた。

ヒト PR 親和性を評価したところ、1 位の修飾においては無置換体 47a の親和性は著しく低下したが、1-メチル体 41b, 41e は高い親和性を示したことから、1 位置換基の必要性を確認することができた(表 7)。また、置換基のかさ高さに伴い親和性が低下したことから(47b-d), 1 位置換基はメチル基が最適であることがわかった。

さらに、リード化合物になり得るテトラヒドロベンズインドロン誘導体の詳細な構造活性相関を調べるため、

その 7 位についても展開を図った。まずスキーム 7 に示した方法を用いて、7 α -アセトキシ体 42 からトシル酸との反応により 7-デオキシ体 45 を、種々のアルコールとの置換反応によって 7 α -アルコキシ体 40c-f を合成した。次いで、7-ヒドロキシ体 40b, 43 については 7 位水酸基の保護・脱保護工程を経て、それぞれの 6 位水酸基をアシル化することにより、目的とする 6-エステル体 48a-h へと導いた(スキーム 8)。

評価の結果、7-デオキシ体 48a および 7 α -アセトキシ体 48d のヒト PR 親和性が低いのに対し、7 β -ヒドロキシ体 48c の親和性は比較的高く、さらに 7 α -ヒドロキシ体 48b はプロゲステロンの約 2 倍の最も高い親和性を示すことを確認した(表 8)。また、7 α -アルコキシ体 41b, 48e-h については、置換基のかさ高さに伴い親和性が低下したことから、7 α 位はメトキシ基が最適であることを明らかにした。また、前項 2.3 と同様にこれらの転写活性を調べたところ、6-エステル体は 7 位置換基の変換に関わらず、アゴニスト作用(タイプ c)を示すことがわかった。

以上の構造活性相関から、我々は水酸基の保護・脱保護工程が不要である 1-メチル-7 α -メトキシ体を基本構造として選択し、非ステロイド性 PR リガンドの創出に向けてさらなる最適化を行うこととした。

3.3 新規骨格を有する非ステロイド性 PR アンタゴニストの創出

まず我々は、先のテトラヒドロナフトフラノン誘導体研究と同様に、新規骨格であるテトラヒドロベンズイン

Table 7 Human PR binding affinities of 1-substituted derivatives.

Compound	R ¹	R ²	RBA*
47a	H	Et	4
41b	Me	Et	34
47b	Et	Et	2
41e	Me		91
41c	Et		8
41d	PhCH ₂		<5
progesterone			100

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
RBA = (IC₅₀ of progesterone / IC₅₀ of test compound).

Table 8 Human PR binding affinities and activities of 7-substituted derivatives.

Compound	R ¹	R ²	R ³	RBA*	LUC assay
48a	H	H	Et	17	c
48b	HO	H	Et	178	c
48d	AcO	H	Et	12	c
41b	MeO	H	Et	34	c
48e	EtO	H	Et	20	c
48f	<i>n</i> -PrO	H	Et	13	c
48g	<i>n</i> -BuO	H	Et	8	c
48h	<i>i</i> -PrO	H	Et	6	b
48c	H	HO	Me	59	-**
progesterone				100	d

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
 $RBA = (IC_{50} \text{ of progesterone} / IC_{50} \text{ of test compound}) \times 100$.
 **not tested.

ドロンを用いた PR アンタゴニストの探索を行った。

これまでの研究から, PR 親和性の発現には 6 位置換基の結合に含まれるカルボニル基が重要であると考察していたため, 始めに 7 α -メトキシ体 40a の 6 位水酸基をアシル化した 6-エステル体 41a-h を合成した(スキーム 8)。その結果, 6 位エステル側鎖の変換によりヒト PR 親和性は変化するものの, いずれもアゴニスト作用(タイプ c)を示し, 目的とするアンタゴニストは得られなかった(表 9)。

Table 9 Human PR binding affinities and activities of 6-ester derivatives.

Compound	R	RBA*	LUC assay
41a	Me	15	c
41b	Et	33	c
41c		230	c
41d		56	c
41e		91	c
41f		17	c
41g		47	c
41h		86	c
progesterone		100	d

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
 $RBA = (IC_{50} \text{ of progesterone} / IC_{50} \text{ of test compound}) \times 100$.

しかし, 我々はテトラヒドロナフトフラノン誘導体研究において, 6 位水酸基の結合様式を変換することにより転写活性が変化する知見を得ていたため, 次に 7 α -メ

トキシ体 40a の 6 位置換基の結合様式を検討した。テトラヒドロベンズインドロン骨格では塩基性条件下での化学的安定性が向上していることから, テトラヒドロナフトフラノン骨格では合成が困難であった 6 位水酸基のアルキル化が可能であった。そこで我々は 6 位のエーテル体に興味を持ち, 49a-h を合成した(スキーム 9)。

Scheme 9 Syntheses of tetrahydrobenzindolone 6-ether derivatives.

ヒト PR 親和性と転写活性を測定したところ, エーテル体が目的とするアンタゴニスト作用(タイプ a-b)を示しており, 中でも 49f が最も強いアンタゴニスト作用(タイプ a)を有していた(表 10)。6 位のエーテル体から見出された化合物 49f は, ウサギを用いた *in vivo* 有効性評価において, 10 mg/kg の皮下投与により子宮腺の発達を抑制し, PR アンタゴニストとして有効性を示すことを確認した。

先の研究で見出したテトラヒドロナフトフラノン誘導体 37d と比較して, エーテル体 49f は PR 親和性が低いにも関わらず, 生体内における安定性が向上していることから, 同等の *in vivo* PR アンタゴニスト作用を示したものと推測している。

Table 10 Human PR binding affinities and activities of 6-ether derivatives.

Compound	R	RBA*	LUC assay
49a	Me	3	b
49b	Et	8	b
49c	<i>n</i> -Pr	14	b
49d	allyl	10	b
49e	<i>n</i> -Bu	20	b
49f	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂	8	a
49g		46	b
49h		6	b
progesterone		100	d

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
 $RBA = (IC_{50} \text{ of progesterone} / IC_{50} \text{ of test compound}) \times 100$.

以上のように、新規なテトラヒドロベンズインドロン誘導体においても、*in vivo* 有効性を示す非ステロイド性 PR アンタゴニスト 49f を見出すことができた。

3.4 非ステロイド性 PR アゴニストの創出

臨床において子宮内膜症に対する有用性を示した PR アゴニストは、いずれもステロイド骨格を有しており、その構造に由来すると思われる副作用の報告例も多い。一方、先のテトラヒドロベンズインドロン誘導体における PR アンタゴニスト探索研究の過程で、我々はプロゲステロンより高い親和性を有する PR アゴニストとして、6-シクロプロピルエステル体 41c を見出していた(表 9)。そこで我々はこれまでの研究結果をふまえ、非ステロイド性 PR アゴニストによる子宮内膜症治療薬の創出を目指し、テトラヒドロベンズインドロン誘導体の探索研究を開始した。

これまでの結果から、テトラヒドロベンズインドロン誘導体では、6 位置換基の結合に含まれるカルボニル基が PR 親和性よりも PR アゴニスト作用の発現に重要であると考察し、先のエステル誘導体に加えてカルバメート誘導体を合成した。テトラヒドロナフトフランオン誘導体と同様に、まず 7 α -メトキシ体 40a の 6 位水酸基に 1, 1'-カルボニルジイミダゾール (CDI) を作用させて、イミダゾリル中間体とした後、各種アミンと反応させ、目的とするカルバメート体 51a-f へと変換した(スキーム 10)。さらに、6 位の置換基をプロピルカルバモイル基として、7 位を変換した誘導体の合成には、7-デオキシ体 45, 7 α -ヒドロキシ体 40b および 7 α -アルコキシ体 40c, f, g を用い、同様にイミダゾリル中間体を経て目的とする 6-カルバメート体 52a-e へと導いた(スキーム 10)。

これらの誘導体は PR 親和性を保持した上でアゴニスト作用(タイプ c)を示しており、中でも直鎖アルキル側

鎖を有するカルバメート体 51a-c は、プロゲステロンを上回る親和性を有することを見出した(表 11)。また、6 位にプロピルカルバモイル基を有する 7 位変換体では、置換基のかさ高さに伴い親和性が低下したことから(52c-d), 7 α 位はメトキシ基が最適であることを明らかにした。

Table 11 Human PR binding affinities and activities of 6-carbamate derivatives (1).

Compound	R ¹	R ²	RBA*	LUC assay
51a	Me	MeO	139	c
51b	Et	MeO	145	c
51c	<i>n</i> -Pr	MeO	119	c
51d		MeO	38	c
51e		MeO	14	c
51f		MeO	21	c
52a	<i>n</i> -Pr	H	107	c
52b	<i>n</i> -Pr	HO	48	c
52c	<i>n</i> -Pr	EtO	78	c
52d	<i>n</i> -Pr	<i>i</i> -PrO	11	b
52e	<i>n</i> -Pr	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ O	7	c
progesterone			100	d

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
RBA = (IC₅₀ of progesterone / IC₅₀ of test compound) x 100.

目的とする PR アゴニストとして見出されたこれらの 6-カルバメート体について、さらなる最適化を図った。スキーム 10 に示した方法を用いて、イミダゾリル中間体にジアルキルアミンあるいは環状アミンを反応させ、ジアルキルカルバメート体 53a-f へと導いた。その結果、6-カルバメート体はジアルキルタイプでもアゴニス

Scheme 10 Syntheses of tetrahydrobenzindolone 6-carbamate derivatives.

Table 12 Human PR binding affinities and activities of 6-carbamate derivatives (2).

Compound	R ¹	R ²	RBA*	LUC assay
53a	Me	Me	188	c
53b	Me	Et	80	c
53c	Me	<i>n</i> -Pr	89	c
53d	Et	Et	43	c
53e			59	c
53f			107	c
progesterone			100	d

*Relative binding affinity (RBA) was calculated as follows:
RBA = (IC₅₀ of progesterone / IC₅₀ of test compound) x 100.

ト作用(タイプc)を示すことがわかり、これらの誘導体の中からプロゲステロンの約2倍と、最も高い親和性を示す6-ジメチルカルバメート体53aを見出した(表12)。

以上のように、カルボニル基を有する6位置換基の最適化を行うことにより、テトラヒドロベンズインドロロン誘導体の中から、数多くの非ステロイド性PRアゴニストを見出すことができた。これらの誘導体についてウサギを用いた*in vivo*有効性評価を行ったところ、6-プロピルカルバメート体51cと6-ジメチルカルバメート体53aは10 mg/kgの経口投与により、その子宮腺の発達を促進した。すなわち、*in vivo*においても経口投与でPRアゴニスト作用を示すことを確認できたのである^{25,26)}。

さらに、6-ジメチルカルバメート体53aについては、マウスの内性子宮内膜症(子宮腺筋症)モデルにおいて、1 mg/mouseの皮下連続投与により発症を抑制し、その有効性を明らかにすることができた²⁷⁾。このモデルは臨床で子宮内膜症に有効な薬剤の効果が確認されている*in vivo*評価系であり、臨床応用の可能性を示している結果と考えられることから、化合物53aの子宮内膜症に対する治療効果が期待される。

おわりに

臨床において子宮内膜症・乳がんなどの婦人科疾患治療薬として使用されている既存のステロイド系薬剤が有する副作用を持たない、全く新しい治療薬としての非ステロイド性PRリガンドの創出を目的として、本研究を開始した。

我々は微生物代謝産物PF1092物質を発見し、まず*in vivo*有効性を示すPRアンタゴニストであるテトラ

ヒドロナフトフラノン誘導体37dを見出した。続いてテトラヒドロベンズインドロロン骨格をとらえ、*in vivo*有効性を示すPRアンタゴニスト49fに導いた。さらに、テトラヒドロベンズインドロロン骨格が有する強いPRアゴニスト作用を活かして、経口投与で*in vivo*有効性を示す51cを見出した。さらに、マウス内性子宮内膜症モデルにおいて経口投与で有効性を示したPRアゴニスト53aの創製に成功した。

いずれの誘導体も、ステロイドホルモンレセプターの中で、最も問題とされる副腎皮質ホルモン(グルココルチコイド)レセプターに対して親和性を示さず、高いPR選択性を有していたことから^{23,25,26,28)}、これらの化合物は既存のステロイド系薬剤が有する副作用を持たない、全く新しい治療薬として大いに期待される。また、これらの非ステロイド性PRリガンドが生体内におけるPRの機能・役割の解明、あるいはPRが関与する婦人科疾患に対する新しい治療に貢献できることを願ってやまない。

本研究は、微生物代謝産物のスクリーニングによるPF1092物質の発見に始まり、当社コア技術の1つである発酵技術を生かし、大量生産したPF1092Cを用いて展開してきた半合成創薬である。近年、天然物を用いる創薬はその生産性等の観点から縮小傾向にあるが、本研究は天然物を活用して当社保有の技術を生かしたものと考えている。

最後に、田邊潔氏、田端祐二博士、倉田靖博士、飯塚由美子氏をはじめとする文献記載の各分野における協同研究者の方々と、微生物培養・精製部門の方々に深く感謝いたします。(2006年1月31日受理)

文 献

- 1) J. R. Pasqualini, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **59**, 357 (1996)
- 2) I. M. Spitz, C. W. Bardin, *Contraception*, **48**, 403 (1993)
- 3) K. Chwalisz, K. Stockemann, K.-H. Fritzemeier, U. Fuhrmann, *Hum. Reprod.*, **4**, 570 (1998)
- 4) C. Pathirana, R. B. Stein, T. S. Berger, W. Fenical, T. Ianiro, D. E. Mais, A. Torres, M. E. Goldman, *Mol. Pharmacol.*, **47**, 630 (1995)
- 5) J. P. Edwards, L. Zhi, C. L. F. Pooley, C. M. Tegley, S. J. West, M.-W. Wang, M. M. Gottardis, C. Pathirana, W. T. Schrader, T. K. Jones, *J. Med. Chem.*, **41**, 2779 (1998)
- 6) S. Palmer, C. A. Campen, G. F. Allan, P. Rybczynski, D. Haynes-Johnson, A. Hutchins, P. Kraft, M. Kiddoe, M. T. Lai, E. Lombardi, P. Pedersen, G. Hodgen, D. W. Combs, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **75**, 33 (2000)
- 7) Z. Zang, A. M. Olland, Y. Zhu, J. Cohen, T. Berroddin, S. Chippari, C. Appavu, S. Li, J. Wilhem, R. Chopra, A. Fensome, P. Zhang, J. Wrobel, R. J. Unwalla, C. R. Lyttle, R. C. Winneker, *J. Biol. Chem.*, **280** 28468 (2005)
- 8) Y. Tabata, N. Miike, M. Hatsu, Y. Kurata, T. Yaguchi, A. Someya, S. Miyadoh, S. Hoshiko, T. Tsuruoka, S. Omoto, *J. Antibiot.*, **50**, 304 (1997)
- 9) Y. Tabata, M. Hatsu, Y. Kurata, K. Miyajima, M. Tani, T.

- Sasaki, Y. Kodama, T. Tsuruoka, S. Omoto, *J. Antibiot.*, **50**, 309 (1997)
- 10) K. Kurihara, K. Tanabe, R. Shinei, T. Okonogi, Y. Ohtsuka, S. Omoto, S. Yasuda, K. Tatsuta, *J. Antibiot.*, **50**, 360 (1997)
- 11) K. Kurihara, K. Tanabe, Y. Yamamoto, R. Shinei, K. Ajito, T. Okonogi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1837 (1999)
- 12) K. Yamakawa, I. Izuta, H. Oka, R. Sakaguchi, M. Kobayashi, T. Satoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 331 (1979)
- 13) K. Yamakawa, M. Kobayashi, S. Hinata, T. Satoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3265 (1980)
- 14) F. Bohlmann, W. Otto, *Liebigs Ann. Chem.*, **1982**, 186
- 15) O. Rosenheim, W. W. Starling, *J. Chem. Soc.*, **1937**, 377
- 16) W. D. Woggon, F. Ruthner, H. Egli, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1980**, 706
- 17) J. R. Hwu, J. M. Wetzel, *J. Org. Chem.*, **50**, 3946 (1985)
- 18) G. M. Rubottom, M. A. Vazeques, D. R. Pelegrina, *Tetrahedron Lett.*, **15**, 4319 (1974)
- 19) D. H. R. Barton, S. W. McCombie, *J. Chem. Soc., Perkin I.*, **1975**, 1574
- 20) 栗原健一, 菊地伸江, 秋山佳央, 臼井孝之, 特願平 7-112181
- 21) J. Ellis, J. Dutchher, C. Heathcock, *Synth. Commun.*, **4**, 71 (1974)
- 22) 投稿中(新榮麗英, 栗原健一, 田邊潔, 田端祐二, 倉田靖, 星子繁, 小此木恒夫 Nonsteroidal Progesterone Receptor Ligands (I); Synthesis and SAR of New Tetrahydronaphthofuranone Derivatives)
- 23) Y. Tabata, Y. Iizuka, N. Takei Masuda, R. Shinei, K. Kurihara, T. Okonogi, S. Hoshiko, Y. Kurata, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **82**, 217 (2002)
- 24) 投稿中(栗原健一, 新榮麗英, 田邊潔, 田端祐二, 倉田靖, 星子繁, 小此木恒夫 Nonsteroidal Progesterone Receptor Ligand (II); Synthesis and SAR of New Tetrahydrobenzindolone Derivatives)
- 25) Y. Tabata, Y. Iizuka, R. Shinei, K. Kurihara, T. Okonogi, S. Hoshiko, Y. Kurata, *Eur. J. Pharmacol.*, **461**, 73 (2003)
- 26) Y. Kurata, Y. Tabata, R. Shinei, Y. Iizuka, N. Takei Masuda, K. Kurihara, T. Okonogi, S. Hoshiko, *J. Pharmacol. Exper. Therapeutics.*, **313**, 916 (2005)

- 27) T. Mori, Y. Kurata, Y. Tabata, N. Niho, M. Masuda, Y-F. Zhou, *Life Sci.*, **71**, 527 (2002)
- 28) Y. Tabata, Y. Iizuka, J. Kashiwa, N. Takei Masuda, R. Shinei, K. Kurihara, T. Okonogi, S. Hoshiko, Y. Kurata, *Eur. J. Pharmacol.*, **430**, 159 (2001)

PROFILE

栗原健一 明治製菓株式会社 創業研究部門
化学研究所・主任研究員

〔経歴〕1989年東京理科大学薬学部卒業,
1991年同大学院薬学研究科修士課程修了,
同年明治製菓株式会社入社。1997年薬学博
士。〔専門〕有機化学。〔連絡先〕Tel.: [REDACTED]
e-mail: [REDACTED]

新榮麗英 明治製菓株式会社 創業研究部門
化学研究所・研究員

〔経歴〕1993年東京理科大学薬学部卒業, 同
年明治製菓株式会社入社。〔専門〕創薬化学。
〔連絡先〕e-mail: [REDACTED]

小此木恒夫 明治製菓株式会社 知的財産
部・部長

〔経歴〕1974年群馬大学工学研究科修士課程
修了, 明治製菓入社。1990年薬学博士。〔専
門〕有機化学。〔連絡先〕Tel.: [REDACTED]
e-mail: [REDACTED]