

令和元年5月9日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15483

研究課題名(和文) 高度な標的特異性を志向した新規コバレント阻害剤の創製

研究課題名(英文) Development of highly target selective covalent inhibitors

研究代表者

進藤 直哉 (Shindo, Naoya)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：20722490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、システイン残基と穏やかに反応するクロロフルオロアセタミド(CFA)基を反応基として利用し、共有結合により標的タンパク質の機能を高選択的・不可逆的に阻害するコバレント阻害剤の開発を検討した。肺癌の治療薬として上市されたEGFR阻害剤オシメルチニブの構造を鋳型に、反応基としてCFA基を有する誘導体を種々合成し、構造活性相関研究を展開した。その結果、可逆的薬剤耐性のH1975細胞に対してオシメルチニブと同等の増殖阻害活性を示し、かつ選択性が高い誘導体を創出した。また、マウスモデルを用いた試験により、創出した化合物がin vivoでも抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コバレント阻害剤は共有結合によって標的タンパク質の機能を不可逆的に阻害する薬剤で、可逆的な薬と比べ強く持続的な薬効など優れた特長を示す。一方、標的以外のタンパク質の非特異ラベル化は毒性の原因となるため、標的選択性が極めて重要である。本研究では、申請者らが見出した、システイン残基と穏やかに反応するクロロフルオロアセタミド(CFA)基を利用し、非小細胞肺癌の分子標的であるEGFRの高選択的不可逆阻害剤の開発を検討した。既承認の第三世代EGFR阻害剤であるオシメルチニブを鋳型に、反応基としてCFA基を有する誘導体を合成・評価した結果、オシメルチニブと同等の活性と、優れた選択性を示す化合物を見出した。

研究成果の概要(英文)：Irreversible inhibition of protein function by forming a covalent bond can provide therapeutic benefits compared to reversible inhibition, including enhanced and sustained pharmacological potency and protein isoform selectivity. In this research, we employed -chlorofluoroacetamide (CFA) group as a weakly reactive, cysteine-directed warhead in the design of highly target selective covalent inhibitors. Based on the molecular architecture of osimertinib, an FDA-approved irreversible EGFR inhibitor, various CFA-appended derivatives were synthesized. From SAR studies using cell antiproliferative assay, we identified a CFA-based novel covalent inhibitor which exhibits potent inhibitory activity against gefitinib-resistant H1975 cell lines. In vivo efficacy of the compound was also evaluated using a mouse xenograft model.

研究分野：創薬化学

キーワード：タンパク質 コバレントドラッグ EGFR CFA システイン 有機化学

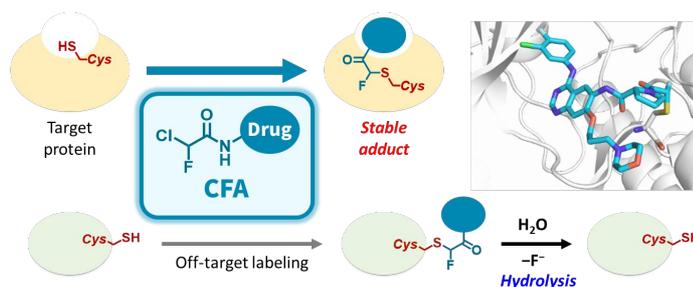
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コバレント阻害剤は求電子的反応基を持ち、標的タンパク質との共有結合により強力に持続的な薬効を示す。標的以外の生体分子との非特異反応による毒性の懸念から、従来の創薬研究では避けられる傾向にあったが、近年ではコバレント阻害剤の有用性が再認識されつつある。特に、標的タンパク質と選択的に共有結合するよう論理的にデザインされた標的コバレント阻害剤 (TCI, targeted covalent inhibitor) が盛んに開発されており、腫瘍に関連したキナーゼを標的とした TCIs が国内外でいくつか承認されている。例えばアファチニブとオシメルチニブは EGFR 阻害剤で、非小細胞肺癌治療薬として承認された。これらの化合物は EGFR の Cys797 と共有結合することでキナーゼ活性を不可逆的に阻害し、可逆的薬剤耐性の EGFR-T790M 変異体に対しても有効である。TCI は反応性の穏やかな反応基を持ち、標的の結合ポケットとの可逆的相互作用によって求核性アミノ酸残基と近接した際に反応が促進されるようデザインされている。これまでに承認された TCIs は、いずれもシステイン残基に対する反応基としてアクリルアミド型のマイケルアクセプターを持つが、比較的高い反応性のために、時間・濃度に依存して様々な非特異反応を起こすことが報告されている (Cravatt *et al. Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 760.)。こうした非特異反応は副作用により治療域を狭める可能性があるため、より安全なコバレント阻害剤開発に利用可能な新たな求電子的反応基が求められていた。

これに対し我々は、独自のアッセイ系で様々な求電子基の反応性を解析した結果、クロロフルオロアセタミド (CFA) 基がマイケルアクセプターと比べ穏やかにシステインチオールと反応することを見出した。CFA 基は分子サイズが小さく、アミノ基に容易に導入できる。また CFA 基のチオール付加体は水中で加水分解され、チオールを再生した。

すなわち、標的タンパク質との付加体が可逆的相互作用等で安定化されるのに対し、オフターゲットチオールは CFA 基と反応しても加水分解によって再生することで、より高い標的選択性の実現が期待された。実際にアファチニブの分子骨格をベースとした EGFR 阻害剤に応用し、阻害活性はアファチニブと同等で、選択性は遥かに高い化合物を見出すことに成功した。

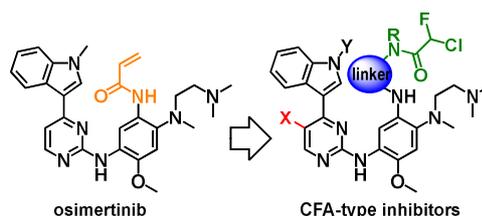


### 2. 研究の目的

本研究の目的は、反応性の穏やかな CFA 基によって標的タンパク質を極めて高い選択性で不可逆的に阻害する、安全性の高い新規コバレント阻害剤の創製である。前述のように、我々はこれまでにアファチニブと同じキナゾリン骨格を有する CFA 型の不可逆的 EGFR 阻害剤を開発した。本化合物はマウスモデルにおいてもアファチニブと同等の抗腫瘍活性を示したものの、腫瘍の成長を完全には抑制しなかった。また、キナゾリン骨格の第二世代 EGFR 阻害剤は正常細胞の野生型 EGFR も強く阻害するため、下痢等の副作用で投与量が制限され、十分な治療効果が得られない場合もある。これに対し、EGFR-T790M 変異体選択的な第三世代 EGFR 阻害剤が開発され、オシメルチニブが日本国内でも上市された。キナゾリン骨格でも反応基を CFA とすることで野生型 EGFR 阻害活性が低下したことから、第三世代の骨格に CFA 基を導入することで、さらなる T790M 変異体選択性の向上とリスクの低減が期待できる。本研究では、オシメルチニブ以上の T790M 変異体選択性を示し、T790M 変異陽性腫瘍の成長を *in vivo* で完全に阻害する、CFA 型の新規第三世代 EGFR 阻害剤の創製を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、はじめにオシメルチニブの構造を鋳型として、CFA を反応基とする新規誘導体のデザイン・合成を行った。具体的には、ピリミジン環 5 位の置換基 (X) や、骨格と CFA 基を結ぶリンカー構造が異なる様々な化合物を合成した。得られた化合物について、培養細胞を用いた増殖阻害アッセイ (MTT アッセイ) によって EGFR 阻害活性を評価した。アッセイには EGFR-T790M 変異体依存的な H1975 細胞と、野生型 EGFR 依存的な H292 細胞の二種類の細胞株を使用し、H1975 細胞の増殖のみを強力に阻害する化合物を探索した。また、MTT アッセイで優れたプロファイルを示した化合物について、マウスモデルを用いた *in vivo* 抗腫瘍活性試験を実施した。



#### 4. 研究成果

##### (1) MTT アッセイによる構造活性相関研究

オシメルチニブはピリミジン 5 位が無置換で、インドール窒素上にメチル基を有しているが、その開発過程においてピリミジン 5 位が塩素、インドール窒素が無置換の誘導体がより強力な H1975 細胞増殖阻害活性を示すことが報告されている (Finlay *et al. J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8249.). CFA 基は反応性が低いため、マイケルアクセプター型 TCI と比べ、分子デザインにおける可逆的相互作用の重要性がより大きい。ここではじめに、ピリミジン 5 位の置換基 X = Cl、インドール窒素上の置換基 Y = H に固定して、リンカー構造を検討した。その結果、L-アラニンリンカーとする NSP-011 が H1975 細胞の増殖を強く阻害することを見出した。次に、リンカーを L-アラニンに固定して、ピリミジン 5 位の置換基 X を種々検討したところ、X = Br の NSP-033 や X = CF<sub>3</sub> の NSP-037

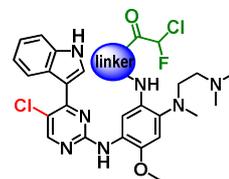
が高い H1975 細胞増殖阻害活性を示した。特に、NSP-037 は IC<sub>50</sub> = 0.015 μM で、オシメルチニブ (0.016 μM) と同等であった。さらに、強力な H1975 細胞増殖阻害活性を示した誘導体について、野生型 EGFR 依存性な H292 細胞に対する増殖阻害活性も測定し、IC<sub>50(H292)</sub>/IC<sub>50(H1975)</sub> 比を算出したところ、NSP-037 の比は 93 とオシメルチニブの 14 を大きく上回り、NSP-037 が H1975 細胞に対してより選択的であることが明らかとなった。このように、CFA 基を反応基とすることで、既承認薬よりも高い選択性で EGFR-T790M 変異体依存性な H1975 細胞を強く阻害する化合物を見出すことに成功した。

##### (2) マウスモデルを用いた抗腫瘍活性試験

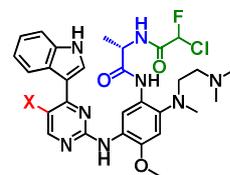
MTT アッセイにおいてオシメルチニブと同等の H1975 細胞増殖阻害活性と、より高い選択性を示した NSP-037 について、*in vivo* 抗腫瘍活性試験を実施した。H1975 細胞を異種移植した担癌モデルマウスに対し、NSP-037 を 1 日 1 回 10 または 30 mg/kg 経口投与したところ、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して腫瘍の成長が有意に抑制された。しかし、10 mg/kg で腫瘍の退縮が見られたオシメルチニブと比較すると抗腫瘍活性は低く、マウス体重の減少も観察された。このように、抗腫瘍活性試験では MTT アッセイとは異なる結果となった。

##### (3) 化合物プロファイルの改善

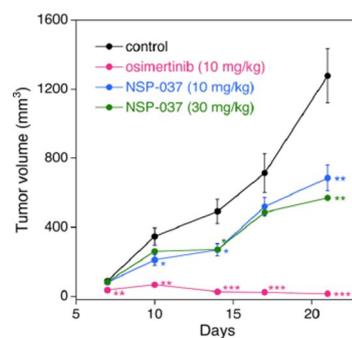
上述の *in vivo* 試験の結果を考察するため、精製キナーゼに対する各化合物の阻害活性を測定したところ、EGFR-T790M に対してオシメルチニブは 1 μM で 88.6% の阻害率を示したのに対し、NSP-037 は 52.0% と阻害活性が低いことが判明した。一方、インスリン様成長因子 1 受容体 (IGF1R) に対する阻害活性 (1 μM) はオシメルチニブが 47.7% であったのに対し、NSP-037 は 104% と完全な阻害が見られた。MTT アッセイで見られた NSP-037 の H1975 細胞に対する強力な増殖阻害活性には、EGFR-T790M 阻害だけでなく IGF1R 阻害も関与していたことが示唆された。そこで、マウスモデルで良好な結果を得るために、*in vitro* で EGFR-T790M 阻害活性の向上と IGF1R 阻害活性の抑制を目指してさらなる新規誘導体の合成・評価を行った。その結果、NSP-037 の L-アラニンリンカーをサルコシンに変更した誘導体 **1** が、1 μM での EGFR-T790M 変異体阻害率 86.5% とオシメルチニブと同等の活性を示すことを見出した。一方、リンカーの改変だけでは IGF1R 阻害活性を抑制することは困難であった。ピリミジン 5 位の CF<sub>3</sub> 基が、強力な IGF1R 阻害活性に関与することを示唆する知見が報告されたため、他の第三世代 EGFR 阻害剤の構造を参考にピリミジンおよびインドール部位の改変を検討していく。



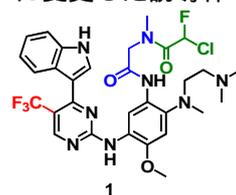
linker	IC <sub>50</sub> (μM)	linker	IC <sub>50</sub> (μM)
NSP-005	none	NSP-019	0.15
NSP-009	0.13	NSP-020	0.38
NSP-010	0.44	NSP-021	0.32
NSP-011	<b>0.031</b>	NSP-022	0.056
NSP-012	0.052		



	X	IC <sub>50</sub> (μM)	H1975	H292	ratio
osimertinib	-	0.016	0.22	14	
NSP-011	Cl	0.031	0.71	23	
NSP-027	Me	0.13	-	-	
NSP-030	OMe	0.086	-	-	
NSP-032	F	0.33	-	-	
NSP-033	Br	0.022	1.1	50	
NSP-035	H	0.46	-	-	
NSP-036	ethynyl	0.045	-	-	
NSP-037	CF <sub>3</sub>	0.015	1.4	93	
NSP-038	CN	0.15	-	-	



\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs control



## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

N. Shindo, H. Fuchida, M. Sato, K. Watari, T. Shibata, K. Kuwata, C. Miura, K. Okamoto, Y. Hatsuyama, K. Tokunaga, S. Sakamoto, S. Morimoto, Y. Abe, M. Shiroishi, J. M. M. Caaveiro, T. Ueda, T. Tamura, N. Matsunaga, T. Nakao, S. Koyanagi, S. Ohdo, Y. Yamaguchi, I. Hamachi, M. Ono, A. Ojida,

Selective and reversible modification of kinase cysteines with chlorofluoroacetamides, Nature Chemical Biology, 査読有, 15, 250-258, 2019, DOI:10.1038/s41589-018-0204-3

A. Nishimura, T. Shimauchi, T. Tanaka, K. Shimoda, T. Toyama, N. Kitajima, T. Ishikawa, N. Shindo, T. Numaga-Tomita, S. Yasuda, Y. Sato, K. Kuwahara, Y. Kumagai, T. Akaike, T. Ide, A. Ojida, Y. Mori, M. Nishida,

Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence,

Science Signaling, 査読有, 11, eaat5185, 2018, DOI:10.1126/scisignal.aat5185

N. Shindo, K. Takasu,

Synthesis of Azaheterocycles and related molecules by Tf<sub>2</sub>NH-catalyzed cycloadditions, Heterocycles, 査読有, 96, 195-218, 2018, DOI:10.3987/REV-17-875

進藤 直哉, 王子田 彰夫,

コバレント阻害剤の標的特異性向上を目指した新規反応基の探索と EGFR 阻害剤への応用,

MEDCHEM NEWS, 査読無, 27, 92-99, 2017, DOI なし,

[http://medchem.pharm.or.jp/medchem\\_news/medchem-news-vol-27-no-2/](http://medchem.pharm.or.jp/medchem_news/medchem-news-vol-27-no-2/)

### 〔学会発表〕(計25件)

進藤 直哉, コバレント阻害剤の標的選択性向上を指向した新規反応基の探索とキナーゼ阻害剤への応用, 日本薬学会第 139 年会, 2019/3/20-23, 千葉

進藤 直哉, 徳永 啓佑, 佐藤 磨美, 淵田 大和, 王子田 彰夫, 標的選択的コバレント阻害剤への応用を志向したひずみ解消型反応基の開発, 第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2018/11/5-6, 熊本

進藤 直哉, 狙ったタンパク質と選択的に共有結合を作るコバレントドラッグの有機化学, 第 6 回 BRIGHT シンポジウム, 2018/7/24, 徳島

進藤 直哉, 淵田 大和, 佐藤 磨美, 大澤 智代, 徳永 啓佑, 小野 眞弓, 渡 公佑, 王子田 彰夫, CFA 基を利用したコバレントドラッグ創薬, 日本薬学会第 138 年会, 2018/3/25-28, 金沢

Naoya Shindo, Selective and reversible covalent modification of non-catalytic cysteines with weakly reactive -chlorofluoroacetamides, KU-NTU Joint International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2018/3/5, Fukuoka

進藤 直哉, コバレント阻害剤の標的特異性向上を目指した新規反応基の開発と EGFR 阻害剤への応用, 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2017/10/25-27, 名古屋

進藤 直哉, 淵田 大和, 初山 勇次, 三浦 千鶴, 岡本 恵, 渡 公佑, 小野 眞弓, 王子田 彰夫, CFA 基の化学を利用した新規不可逆的 EGFR 阻害剤の開発, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017/9/7-9, 東京

### 〔産業財産権〕

#### 取得状況(計1件)

名称: NOVEL COMPOUND USEFUL FOR BOTH EGFR INHIBITION AND TUMOR THERAPY

発明者: 王子田 彰夫, 小野 眞弓, 渡 公佑, 進藤 直哉, 淵田 大和

権利者：国立大学法人九州大学

種類：国際出願

番号：W0 2018/084321 A1

取得年：2018

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等：<http://bunseki.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

研究代表者氏名：進藤 直哉

ローマ字氏名：SHINDO Naoya

所属研究機関名：九州大学

部局名：薬学研究院

職名：助教

研究者番号（8桁）：20722490

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。