

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390036

研究課題名（和文）微小管を標的とした抗がん剤の創薬・ケミカルバイオロジー・化学薬剤学展開

研究課題名（英文）Study on Medicinal Chemistry, Chemical Biology and Chemical Pharmaceutics of Anticancer Drug Based on the Microtubule Targeting Agents

研究代表者

林 良雄（HAYASHI YOSHIO）

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10322562

研究成果の概要（和文）：天然環状ジペプチドを基盤とする抗がん剤創製研究で、新生血管内皮細胞の微小管に作用し、新生血管を障害する Vascular Disrupting Agent (VDA) の開発に成功。以前の研究で開発したプリナブリン（第II相臨床試験）に続き、更に30倍強力な誘導體 KPU-133 を創製した。一方、プリナブリンの難水溶性改善として、6 mg/mL の高水溶性と生体酵素での親化合物再生を実現するプロドラッグの創製にも成功した。化学プローブを用いた分子機構解析では、プリナブリンはチューブリンの両サブユニットの境界面でコルヒチン結合部位の近傍を認識していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Our efforts to develop novel microtubule depolymerization agents, which was focused on a natural diketopiperazine, phenylalhistin, have succeeded in creating a highly potent anticancer drug candidate “Plinabulin” in Phase II clinical trials as a “vascular disrupting agent”, which induces tumor-selective vascular collapse. SAR study from plinabulin has been conducted to develop more potent derivatives. A benzophenone derivative KPU-133 exhibited a 30-times higher cytotoxicity than plinabulin and would be promising candidates for further drug development. Moreover, to improve the low water-solubility of plinabulin (< 0.1 mg/mL), a highly water-soluble prodrug (6 mg/mL in water) was developed to regenerate the parent drug by a unique skeletal transformation from monolactim to DKP. On the other hand, investigation of the tubulin-binding site using chemical probes indicated that plinabulin derivatives could interact in the interfacial region of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, which partially overlaps with the colchicine-binding site.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	11,800,000	3,540,000	15,340,000

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：医薬品開発, 抗がん剤, 有機合成化学, チューブリン作用薬, プロドラッグ, ケミカルバイオロジー, 化学薬剤学, 化学プローブ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がんの罹患率と死亡率の激減を目指した第3次対がん総合戦略において、その最終目標は、

最先端の科学に基づいた有効ながんの予防法確立と優れた抗がん剤の開発である。腫瘍部位選択的な血管内皮細胞障害作用を有する天然

化合物フェニラヒスチンを戦略的分子とする新規抗がん剤の開発はこの最終目標を達成できる有望な医薬品候補化合物の創出に繋がると思われた。そこで本研究では、独自の創薬研究から治験にまで至っている医薬品候補化合物プリナブリンの次世代創薬化合物の創製、および科学基盤確立研究として、本分子が腫瘍部位選択的な血管内皮細胞障害作用を示すメカニズムの解明を進めることを目的とした。

(2)がん組織周辺に誘導される血管新生は、がん組織への酸素および栄養供給に重要な役割を果たすことから、新生血管を選択的に障害できる阻害剤は、原発腫瘍のみならず、特に転移部での固形がんの増殖抑制に有効である。癌転移の抑圧はいまや癌治療における最大の課題であることから、腫瘍部位選択的な新生血管内皮細胞障害作用を有するフェニラヒスチン誘導体は、がん治療薬の有望な候補と位置づけられた。がんで活性化した受容体等を標的とする分子標的療法剤では、一般に、腫瘍細胞への選択性は高いが、アポトーシスへ導く力が比較的弱い場合もあり。強力な抗がん作用を発揮する細胞障害物質との併用が必要となる。しかし、殺細胞活性を基とする既存抗がん剤との併用では、これらの薬剤に対する耐性がんの発現や低選択性による副作用の発現など、既存抗がん剤の欠点が現れ、分子標的療法の利点を十分に発揮できない。一方、フェニラヒスチンは微小管に作用する天然物として、本申請者のグループにより見いだされた環状ジペプチド化合物であるが、パクリタキセル等の既存薬剤に耐性を示すがん細胞にも効果があり、且つがん組織選択的な血管内皮細胞障害作用を有する血管内皮細胞障害物質(Vascular Disrupting Agent)であることが見いだされ、これより我々は大学発の創薬として現在米国において第II相臨床試験に入っているプリナブリンを開発した。

(3)プリナブリンは難水溶性で、改善すべき点もあることから、その欠点を補い、更に有効な第二世代の化合物の創製が本研究の主目的であり、将来のがん化学療法において大きく貢献できると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1)本研究は、微小管作用に基づく腫瘍選択的な新生血管内皮細胞障害剤の創薬研究を中核とし、分子機能を探るケミカルバイオロジー研究、さらに微小管作用薬の薬剤学的高度機能化研究を統合的に実施するもので、抗がん剤として重要な微小管作用薬の新しい潮流を総合的に開拓するものである。特に微小管脱重合作用を

基盤に、新生血管内皮細胞障害剤 (Vascular Disrupting Agent, VDA) の創薬研究である。

(2)本申請者は天然物微小管脱重合物質フェニラヒスチン (PLH) を戦略分子とする創薬研究から強力な VDA (プリナブリン) の創製に既に成功している (図1)。当該物質は前臨床試験を経て、現在世界4カ国で第II相臨床試験が実施中であるが、本研究ではプリナブリンを基に第二世代の VDA 型抗がん剤開発、水溶性プロドラッグ、腫瘍高選択性光応答型プロドラッグの創製研究、更にケミカルバイオロジーに応用可能な光標識プローブの開発を通じ、血管内皮細胞障害作用のメカニズム解明をめざす研究である。

(3)また、薬剤耐性発現など複数の薬剤学的課題を解決可能な化学薬剤学の展開を図るものである。高活性誘導体創製、水溶性プロドラッグへの変換や耐性を克服し経口投与を可能にする薬剤への分子進化は、有機合成化学を先導的に利用して展開する。すなわち、本申請の研究課題では、これらを統合的に研究・融合させることで、がん化学療法で重要な微小管作用薬の新しい潮流を構築する。

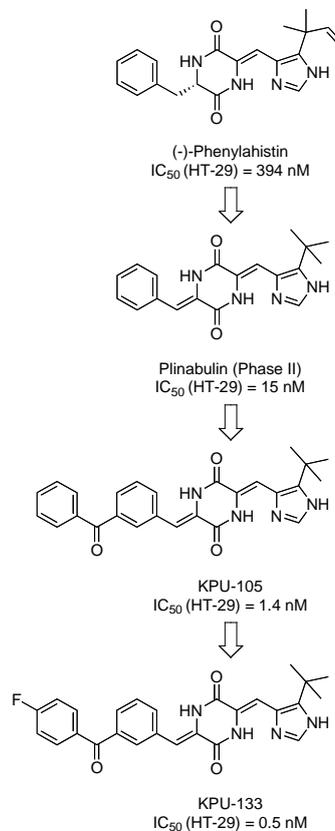
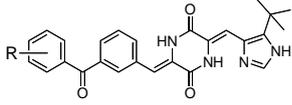


図 1. ジケトピペラジン構造を有する天然物と創製された新しい腫瘍新生血管障害剤 ( $IC_{50}$  値: ヒト大腸由来 HT-29 細胞に対する殺細胞活性を示す)

表 1. プリナブリン誘導体の生物活性



comd	structure (R-)	Kd ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup>
Plinabulin	NA <sup>c</sup>	1.06	15 ± 3.8
KPU-105	H-	0.62	1.4 ± 0.2
KPU-133	<i>p</i> -F-	0.65	0.5 ± 0.1
KPU-146	<i>m</i> -F-	0.58	0.6 ± 0.1
KPU-147	<i>o</i> -F-	0.81	3.0 ± 2.0
KPU-135	<i>p</i> -Cl-	0.84	1.1 ± 0.1
KPU-152	<i>m</i> -Cl-	ND <sup>d</sup>	2.0 ± 0.8
KPU-134	<i>p</i> -Br-	0.21	4.0 ± 0.1
KPU-153	<i>p</i> -I-	ND <sup>d</sup>	41 ± 12
KPU-136	<i>p</i> -OMe-	0.70	3.8 ± 0.4
KPU-137	<i>m</i> -OMe-	0.73	39 ± 12
KPU-138	<i>o</i> -OMe-	11.2	360 ± 66
KPU-151	<i>p</i> -isoPr-	8.96	1520 ± 600

<sup>a</sup>Dissociation constant against porcine tubulin, <sup>b</sup>Cytotoxicity against H-29 cells, <sup>c</sup>Not applicable, <sup>d</sup>Not determined.

### 3. 研究の方法

プライナブリン新規誘導体あるいは化学プローブ開発のためプリナブリンを基盤に合成研究を実施した。

### 4. 研究成果

(1) 第二世代の VDA 型抗がん剤開発  
フェニル基をベンゾフェノン構造に変換した誘導体 (KPU-224, 図1) が高活性であることを見だし, 更に同環上への置換導入による誘導を実施したところ, ベンゾフェノン4'位にブロモ原子を有する新規誘導体 KPU-134 (表1) がプリナブリンを凌ぐ強力なチューブリン結合能および殺細胞活性を有することを見いだした。更に F 原子を 4'位または 3'位に導入した新規誘導体 KPU-133, -146 がプリナブリンより 30 倍強力な活性 (IC<sub>50</sub> = 0.5 nM) を有することを見いだした。これらの超高活性誘導体は, 第二世代プリナブリンとしての開発が期待される。

#### (2) 水溶性プロドラッグの開発

プリナブリンは注射剤にもかかわらず高度に難水溶性である。そこで, 水溶性プロドラッグの検討を行なった。非常にコンパクトな分子のため, 水溶性官能基の導入に難儀したが, 合成研究の結果, カルボニル酸素上にリンカー構造の導入が可能なことを発見し, 9 mg/mL の高い水溶性を有するプロドラッグ創製に成功 (図2)。この化合物は, *in vitro* でエステラーゼ存在下にプリナブリンを再生することを確認。ジケトピペラジ

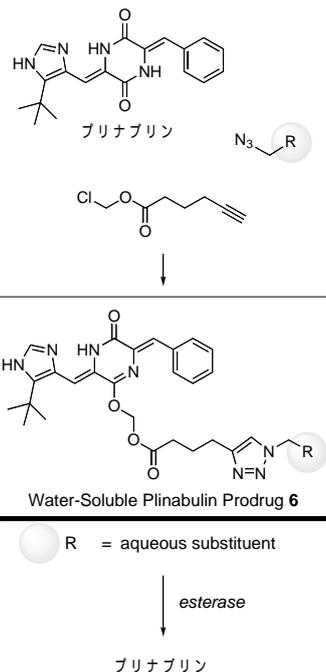


図 2. 骨格変換を利用したプリナブリン水溶性プロドラッグの創製

ンモノラクチム変換とクリックケミストリーによる水溶性プロドラッグのデザイン・合成を達成。今後, 高次評価に付す創薬分子の創製に至った。

(3) プリナブリンのケミカルバイオロジー  
プリナブリンの分子機構解析のため, ケミカルバイオロジーによる解析を実施。蛋白質を光親和性標識するベンゾフェノン構造を持つ高活性誘導体を基に, ビオチンタグ含有プローブとして, ベンゾフェノン部にタグを付加した複数の化学プローブ, およびクリック反応でイミダゾール環を標識した化学プローブを設計・化学合成し, 生物活性を確認後, 標識研究を実施した (図3)。その結果, プローブはチューブリンのサブユニット  $\alpha\beta$  を相互に標識することが解った。これを基にモデリングによる検討を行い, プリナブリン認識部位は, チューブリン両サブユニットの境界面とコレヒチン結合部位近傍と考察した。質量分析による詳細な解析は実施中である。

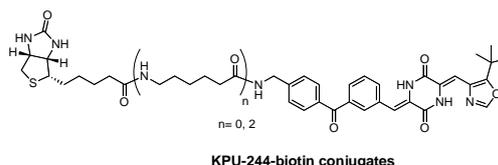


図 3. 光反応性化学プローブ

本研究課題は 23 年度までの申請であったが、上記の如く研究の進捗を鑑み、最終年度前年度応募課題として、基盤研究(B)に採択された。新規基盤研究において現課題を発展的に展開する。第二世代 VDA では、薬理高次評価を予定。候補の有用性を検討しつつ、強力な誘導体創製をめざした構造活性相関研究を進める。一方、Plinabulin 水溶性プロドラッグは実用性評価と共に、体内酸化酵素によるチオール-スルフォキシド変換に基づくプロドラッグも検討する。類似プロドラッグ戦略を用いたがん組織選択的 DDS の創製もめざす。また我々の創製した VDA は、放射線療法との相乗効果が期待されており、放射線治療後の転移・再発を抑制する新規薬剤として、医学部との共同研究に挑戦する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Yamazaki, Y., Kido, Y., Hidaka, K., Yasui, H., Kiso, Y., Yakushiji, F., Hayashi, Y. Tubulin photoaffinity labeling study with a plinabulin chemical probe possessing a bitin tag at the oxazole. *Bioorg. Med. Chem.*, (査読有) 19, 595-602 (2011).
- ② Yamazaki, Y., Sumikura, M., Hidaka, K., Yasui, H., Kiso, Y., Yakushiji, F., Hayashi, Y. Anti-microtubule “plinabulin” chemical probe KPU-244-B3 labeled both a- and b-tubulin. *Bioorg. Med. Chem.*, (査読有) 18, 3169-3174 (2010).
- ③ Yamazaki, Y., Mori, Y., Oda, A., Okuno, Y., Kiso, Y., Hayashi, Y. Acid catalyzed mono-dehydro-2,5-diketopiperazine formation from N- $\alpha$ -ketoacyl amino acid amides. *Tetrahedron*, (査読有) 65, 3688 -3694 (2009).
- ④ Takayama, K., Suehisa, Y., Fujita, T., Nguyen, J-T., Futaki, S., Yamamoto, A., Kiso, Y., Hayashi, Y. Oligoarginine-based prodrugs with self-cleavable spacers for Caco-2 cell permeation. *Chem. Pharm. Bull.*, (査読有) 56, 1515-1520 (2008).
- ⑤ Yamazaki, Y., Kohno, K., Yasui, H., Kiso, Y., Akamatsu, M., Nicholson, B., Deyanat- Yazdi, G., Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G. K., Hayashi, Y. Tubulin Photoaffinity Labeling by Biotin-Tagged Derivatives of Potent Diketopiperazine Anti-Microtubule Agents. *ChemBioChem*, (査読有) 9, 3074 -3081 (2008).

[学会発表] (計 38 件)

- ① Yuri Yamazaki, Development of chemical probes towards the elucidation of binding mechanism of plinabulin, a cyclic dipeptide based anti-microtubule agent, 5th International Peptide Symposium in conjunction with 47th Japanese Peptide Symposium, 2010 年 12 月 4

日, Kyoto (口頭発表).

- ② Yoshio Hayashi, Plinabulin a diketopiperazine-type vascular targeting anti-cancer agent based on microtubule depolymerization activity, ACS Spring 2010 National Meeting & Exposition, 2010 年 3 月 22 日, San Francisco, USA (招待講演).
- ③ Yoshio Hayashi, Plinabulin a cyclic dipeptide-based vascular targeting anti-cancer agent based on microtubule depolymerization activity, 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium / 13th Korean Peptide and Protein Symposium: “Peptides at Cutting Edge”, 2009 年 11 月 9 日, Jeju Island, Korea (口頭発表).
- ④ Y. Hayashi, Cyclic dipeptide-based microtubule depolymerization agents as vascular targeting anti-cancer drugs, 7th AFMC International Medicinal Chemistry Congress, 2009 年 8 月 27 日, Cairns, Australia (口頭発表).
- ⑤ Yoshio Hayashi, A new microtubule targeting agent as a vascular targeting anti-cancer drug, 12th Akabori Conference: German-Japanese Symposium on Peptide Science, 2008 年 5 月 16 日, Kyoto (口頭発表).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Analogs of dehydrophenylahistins and their therapeutic use and preparation.

発明者: Michael A. Palladino, G. Kenneth Lloyd, Yoshio Hayashi

権利者: Nereus Pharmaceuticals

種類: 特許権

番号: US20080221122

出願年月日: 20080911

国内外の別: 米国

○取得状況 (計 2 件)

名称: Synthesis Of Diketopiperazines

発明者: Yoshio Hayashi,

権利者: Nereus Pharmaceuticals

種類: 特許権

番号: US7732605

取得年月日: 2010 年 6 月 8 日

国内外の別: 国外

名称: Dehydrophenylahistins And Analogs Thereof And The Synthesis Of Dehydrophenylahistins And Analogs Thereof

発明者: Yoshio Hayashi, Michael A Palladino Jr, Jennifer Grodberg

権利者: Nereus Pharmaceuticals

種類: 特許権

番号: US7674903

取得年月日: 2010 年 3 月 9 日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/yakuhinkagaku/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 良雄 (HAYASHI YOSHIO)

研究者番号: 1 0 3 2 2 5 6 2

(2)研究分担者

山崎 有理 (YAMAZAKI YURI)

研究者番号：70459725