

# 論文の内容の要旨

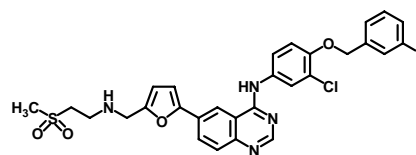
論文題目 新規 EGFR・Her-2 デュアル阻害剤の創薬研究

氏名 鈴木尚之

受容体型チロシンキナーゼである、上皮成長因子受容体 EGFR (ErbB1) および Her-2 (ErbB2) は、幅広い種類の癌細胞の増殖、浸潤、転移に重要な役割を担っていることから、これら受容体を阻害する化合物は有望な抗癌剤として注目されている。私は、EGFR と Her-2 を同時に阻害するデュアル阻害剤に着目し、既に臨床で用いられている Lapatinib (図 1) を

起点とした構造活性相関研究により、有効性の高い新たな EGFR・Her-2 デュアル阻害剤の創製を行った。特に、

- 1) Lapatinib より *in vitro* 活性が向上した化合物の創出
- 2) 低水溶性や CYP 阻害作用などの Lapatinib の欠点の改善により、薬物動態や安全性の向上した抗癌剤の創製を本研究の目的とした。



Lapatinib  
(GSK)  
EGFR・Her-2阻害剤  
乳癌  
図1

## 1. EGFR・Her-2 デュアル阻害剤としての ピリミジン骨格の発見と置換基位置の最適化

既に承認されている 3 つの低分子 EGFR 阻害剤(Lapatinib, Erlotinib, Gefitinib)の構造から、EGFR・Her-2 デュアル阻害剤には、①4-アニリノキノズリン骨格、②キノズリン 6 位置換基、③アニリンパラ位の脂溶性置換基という 3 つのファーマコフォアが必要であると考えた(図 2)。しかし、EGFR あるいは Her-2 阻害作用を有するキノズリン誘導体に関する

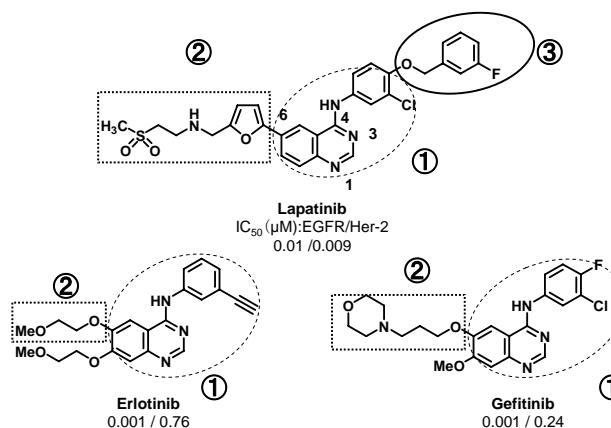
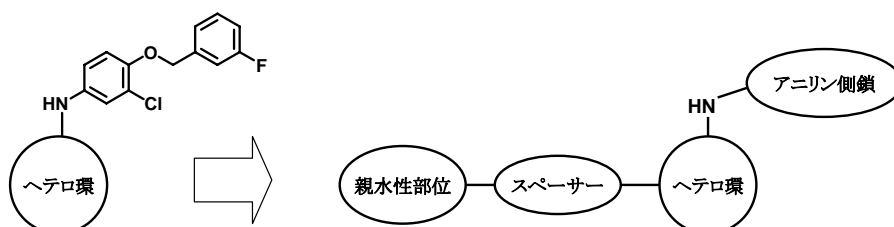


図 2

特許が、既に 100 件以上出願されていたことから、キノズリン構造を保持しながら新たな阻害剤を創出することは困難が予想された。そこで私は、新規な物質創製をめざして、キノズリン以外のヘテロ環骨

格を探索し、デュアル阻害作用の有効性を検証するとともに、Lapatinib より高い抗癌作用を示す阻害剤の創製を目指すことにした。ヘテロ環骨格の探索は、アニリン側鎖を Her-2 阻害活性に有利な Lapatinib 側鎖に固定して行い、そこで見出された骨格において、アニリン側鎖やスペーサー、親水性官能の検討する方針を定めた(図 3)。

図 3 ①ヘテロ環母核の探索 ②新規母核を基軸とした各ファーマコファアの探索



ヘテロ環骨格を幅広く探索するため、市販で入手容易なヘテロ環ハライドと、Lapatinib アニリン側鎖とのカップリング反応によって生成した誘導体について、EGFR 阻害活性を評価した。

表 1 ヘテロ環の探索とスペーサー位置の最適化

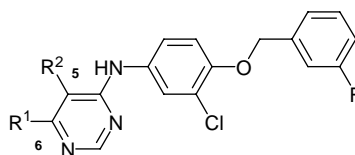
compound	Het	EGFR IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	compound	Het	EGFR IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
4		132	8		122
5		127	9		25
6		121	10		113
7		132	11		5.1

その結果、ピリミジン誘導体(11)が、比較的良好な阻害活性を示すことを明らかにした(表 1)。ピリミジン誘導体はキナゾリン誘導体と構造が類似しているが、当時は EGFR・Her-2 デュアル阻害剤としての報告がなく、新規なスキヤホールド構造であった。そこで私は、新規阻害剤のヘテロ環としてピリミジン環を採用することに決め、活性の向上を目指した探索を進めた。

次に、ピリミジン環 6 位の探索を行った。その結果、6-メチル体 22 および 24 が高い EGFR・Her-2 デュアル阻害活性を示すことを見出した(表 2)。6 位については、メチル基より立体的に大きい置換基を導入し

た場合に(例えば 6 位エチル体 23)、阻害活性が低下することから、周辺の空間的余裕は小さいことが示唆された。また、5 位へメチルやエチル基を導入することで活性が向上したことから、ファーマコファの一つであるスペーサーについては、5 位に導入することが適切であると考えた。

表 2 ピリミジン誘導体のスペーサー置換位置の最適化



compound	R <sup>1</sup> (6位)	R <sup>2</sup> (5位)	EGFR IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Her-2 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	compound	R <sup>1</sup> (6位)	R <sup>2</sup> (5位)	EGFR IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Her-2 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>
11		H	5.1	N.T.	15	H	H	0.83	18
14		H	39	>100	21	CH <sub>3</sub>	H	1.1	5.5
16		H	>100	>100	22	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	0.01	0.13
17		H	13	>100	23	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	45	>100
19		H	9.5	>100	24	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.03	0.12

2. ピリミジン環の置換基(親水性部位とスペーサー)の最適化:アルケン, アルキン構造の発見

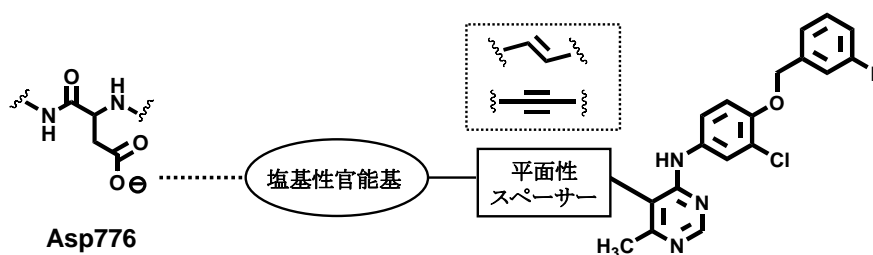


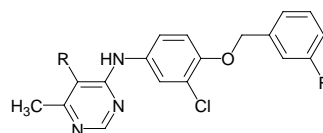
図 4

Lapatinib/EGFR の共結晶構造が新たに報告されたことから、私はピリミジン 5 位置換基の探索に、Lapatinib の結合コンホメーションの情報を利用することを考えた。Lapatinib のフラン環はキナゾリン環と同一平面に位置しており、やや幅の狭い結合部位に適合している。そのため、ピリミジン体のスペーサー部位については、母核と同一平面に位置できる、平面的なアルケンやアルキン構造を検討することを考えた。また、Lapatinib 末端アミン官能基は EGFR の Asp776 の近傍に位置し、相互作用の可能性が示唆される。そのため、ピリミジン誘導体においても、末端にアミン官能基を導入し、Asp776 との相互作用を想定した(図 4)。

平面性の親水性部位も含めたスペーサー構造として、アルケン, アルキン誘導体を検討した結果、脂肪族アルキン体 46 およびアクリルアミド体 50 は、良好な EGFR・Her-2 デュアル阻害活性を示すが、乳癌細胞の 1 種である BT474 細胞に対する *in vitro* 抗腫瘍活性は、IC<sub>50</sub> 値が約 1 $\mu$ M と乖離が大きいことが判明した。一方、フェニルアルキン体 31 およびスチレン体 39 は、活性が中程度でありながら、酵素阻害活性と BT474 阻害活性の乖離が小さかった(表 3)。

そこで私は、酵素系と細胞系の乖離が最も小さいフェニルアセチレン誘導体が、有効な *in vivo* 抗癌作用を示す可能性が高いと考え、フェニルアセチレン誘導体の末端部分(親水性部位)について探索を行った。その結果、ピロリジン体 **55** および **57** が、Lapatinib と同等以上の BT474 および N87 阻害活性を示すことを見出した。アミン官能基については、メタ置換よりもパラ置換の方が

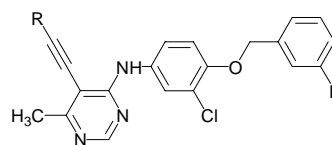
表 3 ピリミジン 5 位のスパーサーと親水性構造の最適化



compound	R	EGFR IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	Her-2 IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	BT474 IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	Ratio BT474/Her-2
<b>46</b>		0.003	0.019	1.13	59.4
<b>50</b>		0.009	0.036	1.44	40.0
<b>31</b>		0.24	0.44	0.394	0.90
<b>39</b>		0.12	0.19	0.644	3.39
<b>Lapatinib</b>		0.010	0.009	0.10	11.1

適しており、また脂肪族体と同様に、モルホリンからピロリジンへの変換によって活性が向上した。更に、ベンゼン環上にフッ素基を導入することで、酵素阻害活性が低下するものの抗腫瘍活性が向上し、これまでで最も活性の強い化合物 **57** を見出すことに成功した。一方、フラン体 **58** やチアゾール体 **59** では、酵素系と細胞系の乖離が大きくなる現象が見られた(表 4)。

表 4 5 位アルケン上置換基の最適化



compound	R	EGFR IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	Her-2 IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	BT474 IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
<b>31</b>		0.39	0.43	0.39
<b>53</b>		0.57	0.61	0.96
<b>54</b>		0.003	0.017	0.16
<b>55</b>		0.009	0.041	0.08
<b>56</b>		0.054	0.056	0.14
<b>57</b>		0.19	0.11	0.05
<b>58</b>		0.075	0.13	0.81
<b>59</b>		0.079	0.10	0.44
<b>Lapatinib</b>		0.01	0.009	0.10

最も抗腫瘍作用が強かった化合物 **57** について、薬物動態特性および *in vivo* 抗癌作用を評価した。その結果、化合物 **57** は全体的に許容可能な特性を示し、特に溶解度、代謝安定性および CYP 阻害については、Lapatinib に比べ改善した(図 5)。一方、癌細胞(N87)移植マウスを用いた *in vivo* 抗癌作用評価モデルにおいては、20mg/kg の経口投与で Lapatinib とほぼ同等の抗癌作用を示すことが明らかとなった(図 6)。

この結果から、EGFR・Her-2 デュアル阻害剤の *in vivo* における有効性が改めて確認されたと共に、化合物 **57** が既に承認されている薬剤と比較可能な高い創薬ポテンシャルを有することが明らかとなった。

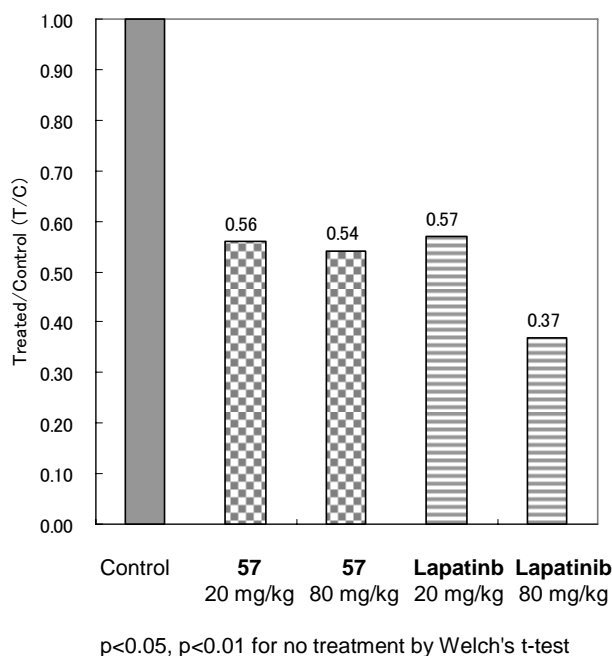
図 5 化合物 57 の ADME 特性

in vitro ADME		Rat PK (1mg/kg, po)	
水溶性 (JP2 + TCA) <sup>a</sup>	>50 $\mu$ M (24 $\mu$ M) <sup>a</sup>	AUC	361 ng/mL.h
代謝安定性 hMS, rMS	63%, 24% (37%, 7%) <sup>a</sup>	CL <sub>tot</sub>	18 mL/min/kg
CYP 阻害 (IC <sub>50</sub> ) 2C9, 3A4	>20 $\mu$ M, 15 $\mu$ M (8 $\mu$ M, 3 $\mu$ M) <sup>a</sup>	BA	35 %

<sup>a</sup>Lapatinib

図 6 in vivo 活性評価

(T/C: 薬剤投与群の腫瘍体積/非投与群の腫瘍体積)



以上私は、抗癌薬を指向した新規 EGFR・Her-2 デュアル阻害剤の創薬研究を行い、Lapatinib より *in vitro* 抗腫瘍活性と薬物動態特性が改善し、良好な *in vivo* 抗癌作用を有する新規ピリミジン誘導体 **57** を見出した。本化合物は、既に多数報告されているキナズリン誘導体ではなく、本研究における SAR によって見出した 6-メチルピリミジン骨格を用い、Lapatinib の活性コンホメーションからデザインした 5 位アルケン・アルキン構造の検討、および酵素阻害活性と抗腫瘍活性の乖離に着目したフェニルアセチレン誘導体の最適化によって創出された。今回の研究結果から、EGFR・Her-2 デュアル阻害剤の有効性が改めて検証されたと共に、デュアル阻害剤のテ

ンプレートとして、キナズリン環に代わる新たなピリミジン-フェニルアセチレン構造を見出すことに成功した。本研究成果は、有効な抗癌作用を示す新規デュアル阻害剤の創薬研究における化学的基礎基盤を提供するものと考えている。