

論文題目 ATP 濃度依存性低減を指向した分子設計に基づく新規経口 Cdc7 阻害薬の合成研究
氏名 倉澤 修

【緒言】

抗悪性腫瘍薬の研究開発は、20 世紀半ばの細胞障害性抗がん剤に始まり、ゲノム解析の進展に伴い腫瘍の分子を標的とした分子標的薬へと進展した。近年では免疫関連分子を標的とした薬剤へ開発対象が広がっている。種々のがんにおいて高発現している Cdc7 は、DNA 複製期(S 期)において、MCM2 をリン酸化し DNA 複製を制御する Ser/Thr キナーゼである。siRNA を用いた Cdc7 の発現阻害により p53 正常細胞においては G1 期停止、p53 変異がん細胞においては S 期におけるアポトーシスを誘導することが示されていることから、Cdc7 阻害薬には従来の細胞障害性抗がん剤と比較して副作用の軽減、また幅広い固形がんへの適用が期待される。研究開始時点において、HTS では良好なヒット化合物は得られなかったが、Nerviano 化合物(1)の報告例が存在した

(図 1)。Nerviano 化合物(1)は、酵素阻害評価系で nM オーダーの活性(Cdc7 酵素阻害活性 $IC_{50} = 2 \text{ nM}$)を有し、担癌マウスモデルにおいて経口投与で薬効を示す。しかしながら複数のキナーゼ活性を阻害すること、また比較的細胞系活性が低く、高い薬剤暴露量を必要とすることから潜在的にオフターゲット効果を惹起する懸念点が危惧され、後に臨床試験まで進むも、Proof Of Concept (POC)や薬効の報告はなされていない。そこで、筆者は Cdc7 阻害薬のリード創出と臨床応用に適用可能な薬剤の創出を指向し、研究を開始した。

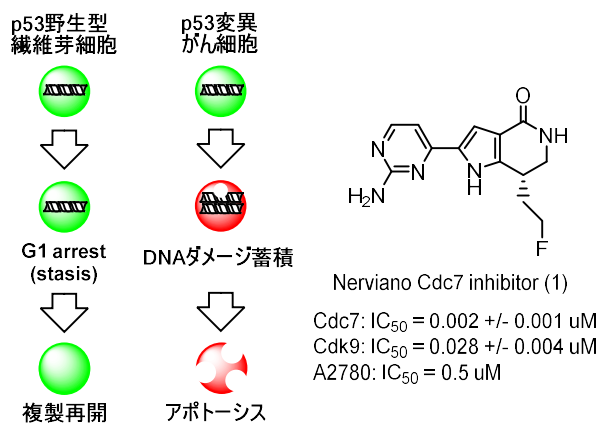


図1. Cdc7阻害薬の作用様式とNerviano社Cdc7阻害薬(1)

【本論】

(1) 新規縮合チオフェン系 Cdc7 阻害薬のデザイン

Cdc7 とアミノ酸相同性が高い CK2 タンパク質結晶を利用して、Cdc7 ホモロジーモデルを作成し、Nerviano inhibitor (I) の ATP ポケットへの結合様式を推定し、ファーマコフォアモデルを構築した(図2)。筆者は、privileged structure としての有用性を期待して、過去の GPCR 拮抗薬研究で用いられていた縮合チオフェン骨格を Cdc7 阻害薬に適用することとし、特徴的な水素結合形成に加え、ゲートキーパーアミノ酸の Met134 との S-S 相互作用の付与を期待し、かつ溶媒側方向へさまざまな置換基導入が可能な、硫黄原子の位置の異なる縮合チオフェン

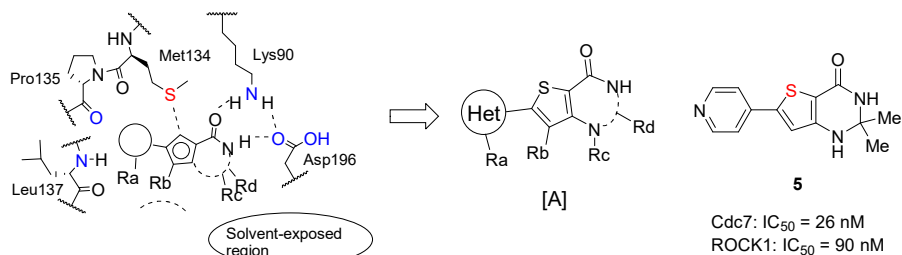


図2. ファーマコフォアモデルの作成と縮合チオフェン系Cdc7阻害薬のデザイン

骨格[A]をデザインした。予備検討の結果、**5**に 10^{-8}M オーダーの Cdc7 酵素阻害活性を確認した。一方でキナーゼパネル（46 キナーゼ）試験の結果、**5**は ROCK1 に対しても同等の阻害活性を示した。また硫黄原子が Met134 側を向く配置が活性および選択性の面で比較的好ましいという構造活性相関情報を明らかにした。

（２）ATP 濃度依存性低減を指向したリード化合物の探索

細胞内高濃度 ATP に打ち勝つ強固な水素結合能の形成と Cdc7 に対する適切な空間充填を指向して、1)ピラゾール環をヒンジ結合部位に用いることで二本の水素結合を形成、2)水素結合の保護効果を期待し、ピラゾール環へ水分子の影響を低減しうる置換基の導入。3)Lys90-Asp196 塩橋部位へ水素結合を追加するための塩基性部位の導入、4)Cdc7 の ATP ポケットに最適な空間充填、また塩橋部位との水素結合保護効果を期待したかさ高い構造の導入、という最適化戦略を立案した（図 3）。チエノピリミジン誘導体の合成を実施し、生物活性評価を進めたところ、ヒンジ部位にメチルピラゾール基、また塩基性部位としてピロリジノメチル基を有する **16c** に、 10^{-10}M オーダーの Cdc7 酵素阻害活性と、Cdk2/cycE および ROCK1 に対して、それぞれ 14000 倍、200 倍の選択性を確認した。colo205 ヒト結腸癌細胞株を用いて細胞系活性を評価したところ、酵素阻害活性値と比較して減弱してはいるものの、MCM2 リン酸化阻害活性($\text{IC}_{50} = 250 \text{ nM}$)および細胞増殖阻害活性($\text{EC}_{50} = 1100 \text{ nM}$)が認められた。**16c** の酵素阻害活性における ATP 濃度の影響を評価したところ、ATP 濃度の影響を受けにくい性質(ATP 濃度依存性の低減)が認められ、さらにヒンジ結合部位の構造活性相関情報を明らかにすることにより、本戦略の有効性を確認した。

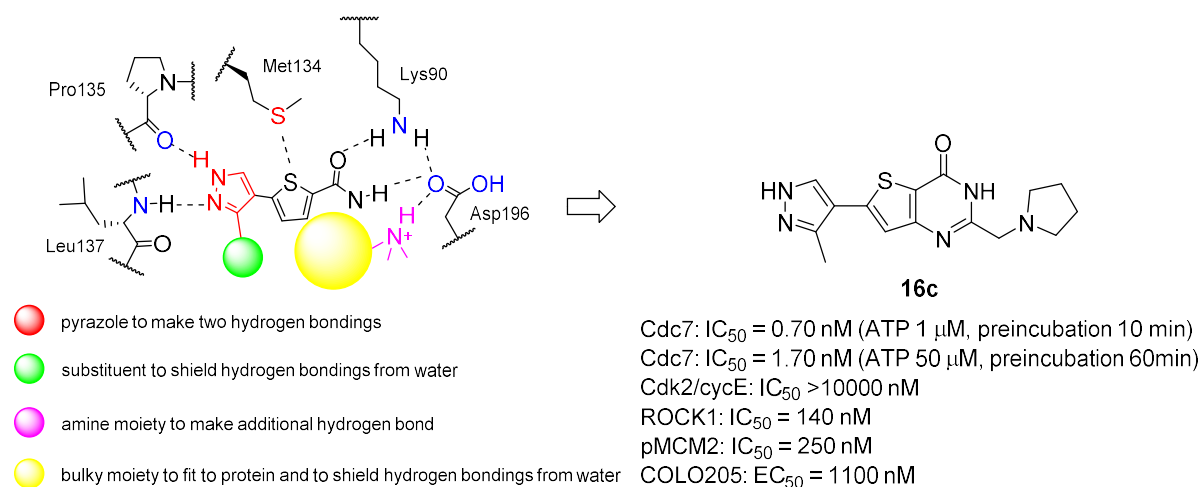


図3. 推定結合様式に基づく分子設計とATP濃度依存性が低減されたリード化合物創出

（３）細胞系活性と選択性の向上を指向した構造最適化

さらに細胞系活性の向上を図るため、塩橋との水素結合をより強固にするべく、環状アミン直結構造として、塩基性部位のコンホメーションを固定化する戦略を立案した（図 4）。検討を進めたところ、(2*S*)-ピペリジニル構造を有する **18d** に、大幅に向上した細胞系活性を確認した (pMCM2: $\text{IC}_{50} = 36 \text{ nM}$, $\text{EC}_{50} = 130 \text{ nM}$)。 **18d** は高濃度 ATP($50 \mu\text{M}$)存在下においても低濃度 ATP($1 \mu\text{M}$, Km)存在下と同等の Cdc7 阻害活性を示し、本最適化戦略の有効性が裏付けられた。また **18d** はキナーゼパネル (>300 キナーゼ) 試験で他のキナーゼ全般に高い選択性を示した。さらに経口投与における担がんマウスモデルにおいて、PD および抗腫瘍活性を確認し、**18d** を精査候補化合物として選定した。

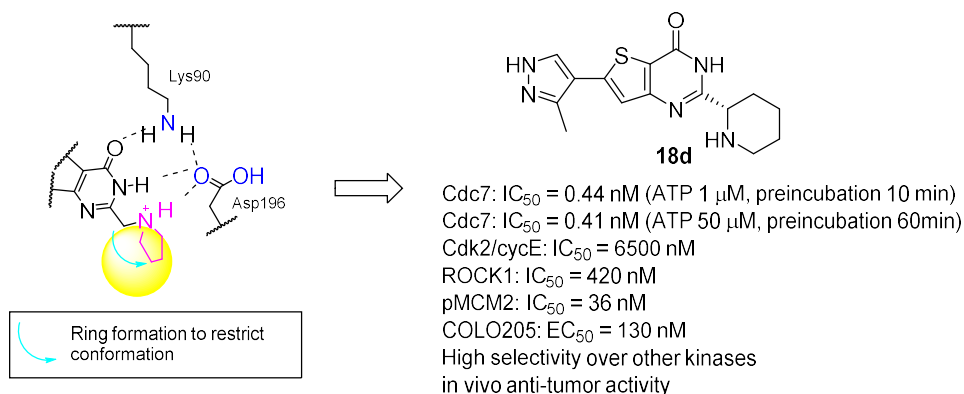


図4. 推定結合様式に基づく最適化戦略および細胞系活性と選択性の向上

(4) 新規経口 Cdc7 阻害薬 TAK-931 の創製

精査試験を進めるにつれ、**18d** のホルムアルデヒドアダクト体 **27** が各種生物試験下や製剤化検討中に検出され、開発へ支障があることが判明した (図5)。

アダクト形成を回避する方策として、塩基性部位のビスクロ化戦略を立案した (図6)。ビスクロ化は、よりコンホメーションを固定化する方法でもあることから、活性および選択性の向上の可能性も期待し、検討を進めた。その結果、いずれのビスクロ化合物も **18d** より優れた Cdc7 酵素阻害活性を示し、コンホメーションを固定化した **18i** や窒素原子上の水素を有さない **26b** において、ホルムアルデヒドアダクトが検出されないことを確認した。高濃度 ATP 下での Cdc7 酵素阻害活性および細胞系活性を評価し、最良のプロファイルを示した **26b (TAK-931)** を精査候補化合物として選定するに至った。

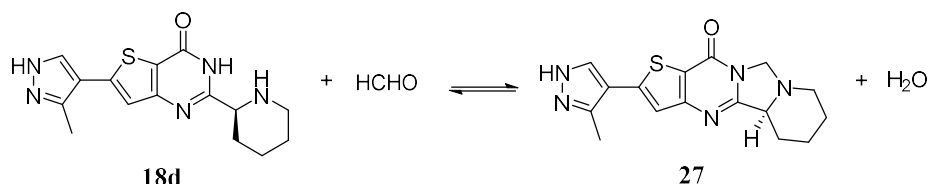


図5. 水溶液中でのホルムアルデヒドアダクトの形成

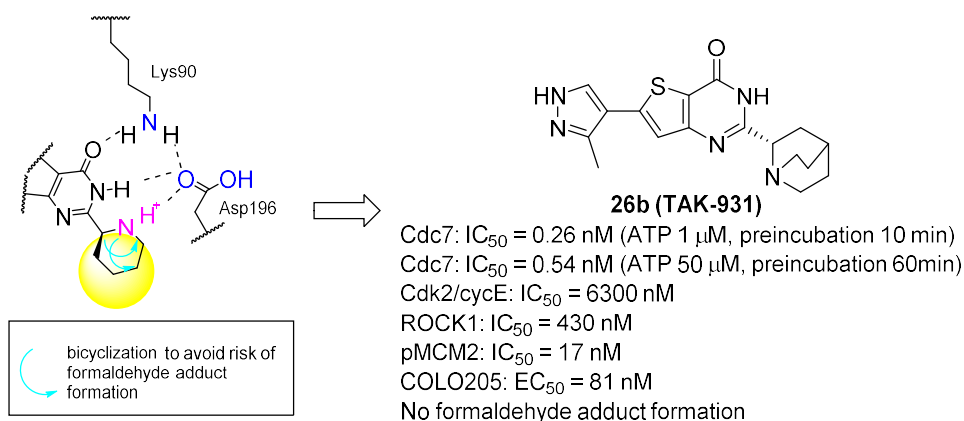
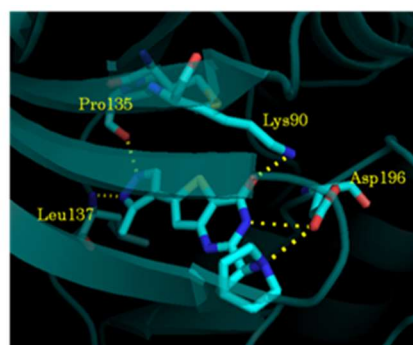


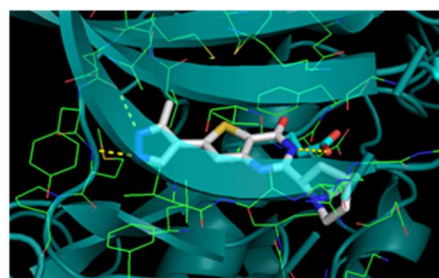
図6. 推定結合様式に基づく回避戦略とTAK-931の創製

既知の Cdc7 結晶構造(4F9C)と化合物 **26b** のドッキングモデルを作成し、結合様式を解析した (図7)。その結果、化合物 **26b** は Cdc7 に対して、合理的に複数の水素結合を形成している様子が観測され、ヒンジ結合部位のメチル基およびキヌクリジン環の炭素鎖は溶媒側に位置し、重要な水素結合の保護に寄与していると推定された。選択性に関する考察を行うべく、ROCK1 とアミノ酸配列相同性が高い ROCK2 と化合物 **26b** の共結晶を取得し、構造解析した。その結果、キヌクリジン部位の電子密度は不明確であり、すなわちキヌクリジン窒素原子は水素結合を未形成であった。また、ヒンジ結合部位のメチル基は蛋白奥側に位置し、水素結合の保護に寄与しない結合様式であった。以上の三次元構造情報は、化合物 **26b** の強力な Cdc7 酵素阻害活性および

び高濃度 ATP 条件における活性低減効果の構造的な要因、また ROCK1 を含めた他のキナーゼに対する高い選択性を説明するものである。



Cdc7結晶構造へのドッキングモデル



ROCK2共結晶構造

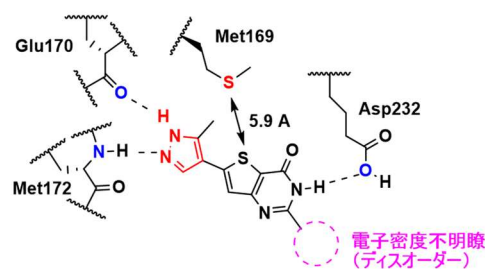
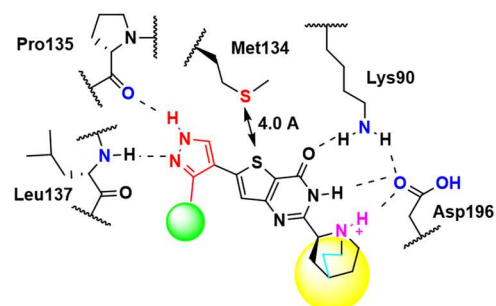


図7. 化合物26bの結合様式

結語

筆者は、新規経口 Cdc7 阻害薬の創出を指向した戦略を立案した。Cdc7 ホモロジーモデルに対する Nerviano 化合物(1)の結合様式を推定し、privileged structure としての有用性を期待し、縮合チオフェン誘導体を着想した。さらに細胞内高濃度 ATP に打ち勝つ強固な水素結合能と Cdc7 に対する高選択性の獲得を指向した最適化戦略を立案した。検討を進め、ヒンジ部位の構造と、高濃度 ATP による活性低下の低減という ATP 拮抗型阻害剤として希少な性質についての構造活性相関情報を明らかにした。さらに、塩基性部位のコンホメーションを固定化する戦略を進め、大幅に向上した細胞系活性を示す(2*S*)-ピペリジン誘導体 **18d** を見出した。**18d** の高いキナーゼ選択性と、経口投与における担がんマウスモデル抗腫瘍性活性の確認に成功した。しかしながら、新たにホルムアルデヒドアダクト形成の課題を有することが判明し、アダクト形成を回避する方策として、塩基性部位のビシクロ化戦略を立案し、検討を進めた。その結果、さらに細胞系活性が向上し、ホルムアルデヒドアダクト形成を回避した **26b** を見出すことに成功した。**26b** は後の精査試験を経て、開発化合物 TAK-931 として臨床試験で評価中である。フェーズ 1 試験での用量依存的な薬剤暴露と良好な PK/PD 相関を伴う PD 抑制効果、また忍容性と初期の臨床徴候についての速報が ASCO national meeting 2018 (*J. Clin. Oncol.* **36**, no. 15_suppl (May 20, 2018) 2506-2506)で報告されている。

以上の結果から、本研究は、privileged structure とファーマコフォアモデルからデザインした骨格を基に、細胞内高濃度 ATP に打ち勝つ強固な水素結合能の形成と Cdc7 に対する適切な空間充填を指向して立案した最適化戦略が、臨床応用に適用可能な新規経口 Cdc7 阻害薬の創出に有用な方法論であることを示した。本戦略は他の ATP 拮抗型キナーゼ阻害薬にも応用可能と考えられる。