

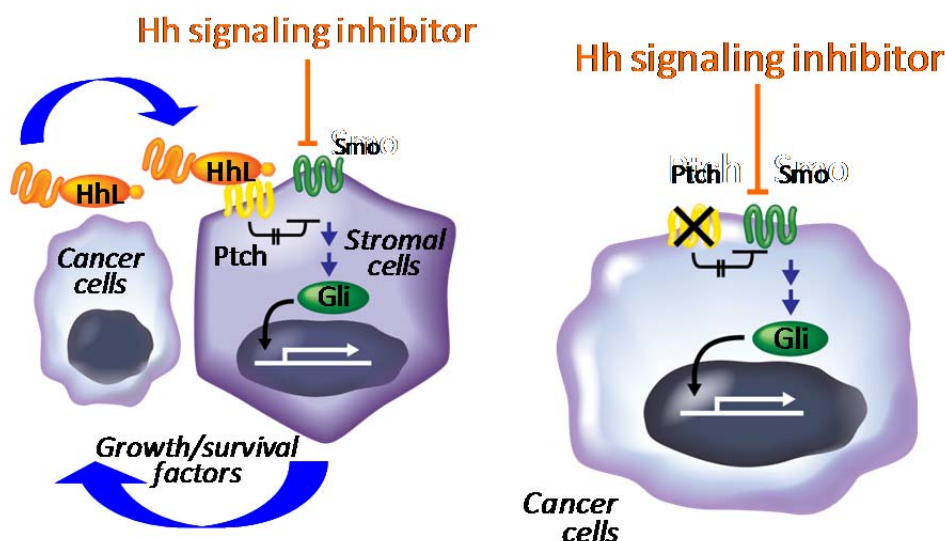
新規ヘッジホッグシグナル阻害薬の合成研究

武田薬品工業株式会社

医薬研究本部 主任研究員 大橋 知洋

【序論】

ヘッジホッグシグナルは胎生期における臓器形成、細胞増殖および細胞分化に重要な因子として知られている。哺乳動物では、ソニックヘッジホッグ(Shh)、デザートヘッジホッグ(Dhh)およびインディアンヘッジホッグ(Ihh)の3種がシグナル伝達を引き起こすリガンドタンパクとして知られており、その中でも全身に発現が認められる Shh の研究が盛んに行われている。正常な成体組織では、パッチド(Ptch)と呼ばれる12回膜貫通型タンパクが7回膜貫通型タンパクであるスミーズンド(Smo)の機能を制御し、本シグナル伝達は不活性化されている。近年多くのがんにおいて、ヘッジホッグリガンド(HhL)の過剰発現や Ptch への変異によるヘッジホッグシグナル伝達の活性化が引き起こされることが報告されている。一般的にがん5年生存率が低いとされているすい臓がんにおいても、このような現象が確認されていることは非常に興味深い。



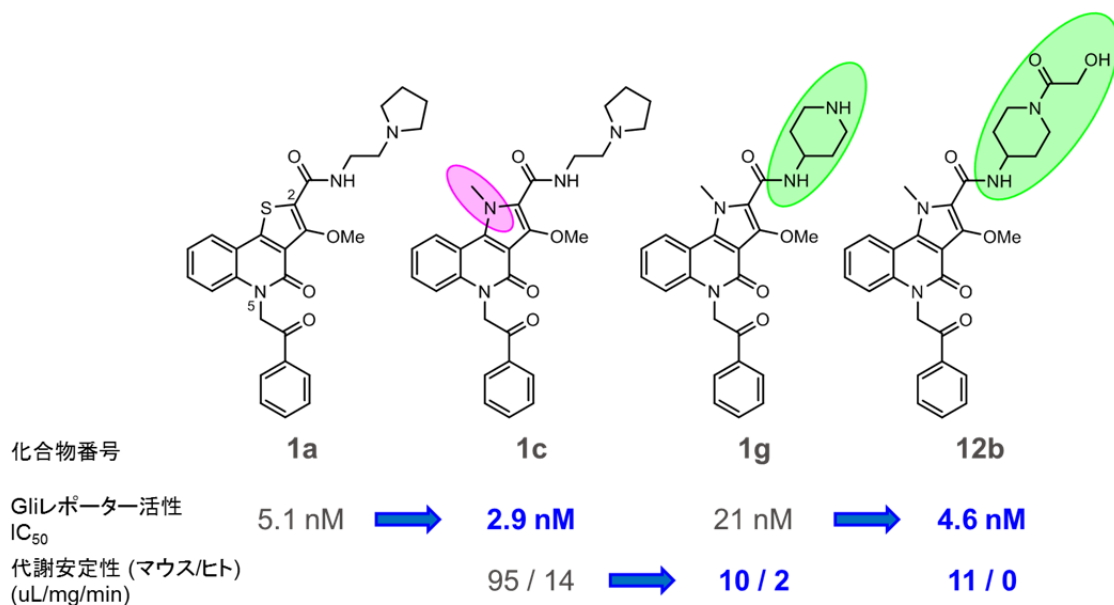
HhL が過剰発現すると、リガンドが Ptch に結合し Ptch の持つ機能を不活性化させる。従って Smo への機能制御が無くなることで Smo が活性化し、下流に存在する転写因子 Gli にシグナルが流れ、Gli が活性化する。これによりがん細胞に増殖シグナルおよび生存シグナルが伝達され、がん細胞が増殖する。このメカニズムは大腸がん、前立腺がん、すい臓がんなど多くのがん種で観測される。一方 Ptch に変異が加わるとその機能が失われるため、HhL が存在しなくても Smo が常時活性化する。この状態は先ほどと同様に、下流に存在する転写因子 Gli の活性化に伴う、がん細胞増殖シグナルの活性化を引き起こす。このメカニズムは髄芽腫や基底細胞がんなどで観測される。

以上の背景に基づき、ヘッジホッグシグナル伝達経路を阻害する分子標的薬は、多くの種類のがんに適応できる新たな抗がん薬として期待できると考え、新規ヘッジホッグシグ

ナル阻害薬の研究に着手した。

【第一章】

武田薬品工業株式会社所有の化合物ライブラリを用いたハイスループットスクリーニングにより、チエノ[3,2-*c*]キノリン-4-オン骨格を有するヒット化合物 **1** を見出した。本化合物は非常に強い Gli レポーター阻害活性を示したが、マウスおよびヒトの肝ミクロソームにおける代謝安定性が問題であった。そこで本代謝安定性の改善を指向し、推定代謝部位と考えられる、中央チオフェン環、2 位アミド側鎖、5 位フェナシル基の変換に着手した。中央環に関しては、チオフェン環 **1a** よりも脂溶性が低く、強い Gli レポーター阻害活性を示すメチルピロール環 **1c** を見出した。アミド側鎖では、直接ピペリジン環が結合した **1g** で 10 倍程度の活性減弱が認められたが、代謝安定性が大きく改善することが判明した。そこで本化合物の更なる活性向上を指向し、化合物 **1c** との安定コンホメーション計算の比較を用いてアミド側鎖部分のデザインを行った。さらに心毒性や不整脈の原因となる hERG 阻害回避の観点から、ピペリジン部の塩基性を軽減した側鎖デザインを行った。その結果、*N*-[1-(ヒドロキシアセチル)ピペリジニル]アミドを有する化合物 **12b** を見出した。また、5 位フェナシル基の変換では、末端ベンゼン環およびカルボニル基の除去で大きく活性が減弱したことから、フェナシル基が最適であると結論した。以上より、化合物 **12b** を用いた更なる評価を行った。

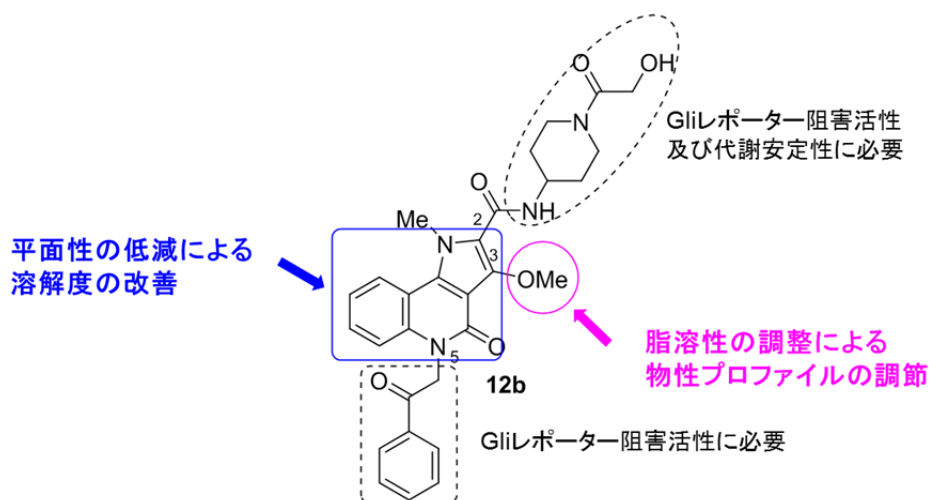


化合物 **12b** は Smo に対する強い結合活性を示し、Smo の下流に存在する転写因子 Gli の mRNA 発現量を強く抑制した。従って、本化合物は Smo タンパクへの結合を介してヘッジホッグシグナルを阻害する薬剤であることを確認した。また、マウス髄芽腫同種移植系モデルを用いた *in vivo* 抗腫瘍試験において、6.25 mg/kg、1 日 2 回投与の条件で 2 週間連投した結果、大きな体重減少を伴うことなく腫瘍の増殖を大きく抑制することが分かった。以

上の結果より、化合物 **12b** はヘッジホッグシグナルの阻害により抗がん作用を示すことが確認できた。

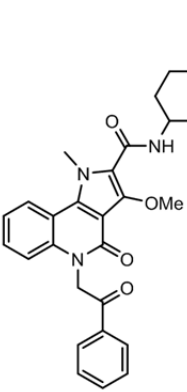
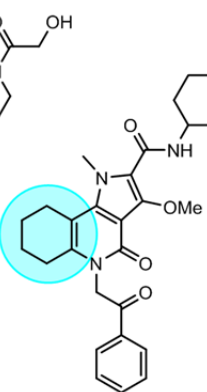
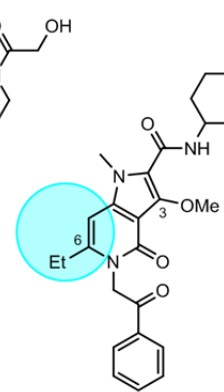
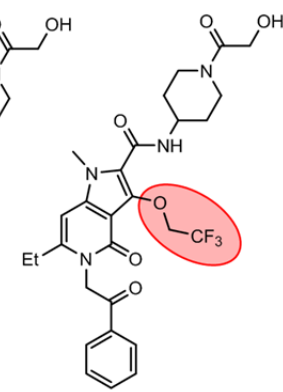
【第二章】

次に、化合物 **12b** の更なるプロファイリングを行ったところ、マウスにおける高用量投与(100mg/kg)での血中動態が悪いことが判明した。また、低用量投与(10mg/kg)との血中動態の比較により、動態の線形性を示さないことが明らかとなった。こういった現象は、毒性試験のような更に高用量での投与を行う試験において、化合物が正しく評価出来なくなる可能性がある。また臨床段階において、げっ歯類や大動物における血中動態からヒトの血中動態予測をする際に問題となるため、回避すべき課題である。化合物 **12b** は日局 2 液に対する溶解度が低いことから、溶解度の改善を行うことで動態プロファイル向上が期待できると考え、溶解度改善を指向した化合物デザインを行った。前章での結果より、2 位アミド側鎖および 5 位フェナシル基は強い Gli レポーター活性と代謝安定性に必要であるため、これら置換基は固定化した。一般的に化合物の平面性が向上すると溶解度は低下することから、ピロロ[2,3-*c*]キノリン-4-オン骨格に起因する平面性を低減することで、溶解度改善が期待できると考えた。さらに平面性低減に伴う物性プロファイルの調節を 3 位メトキシ基の変換により調整することとした。

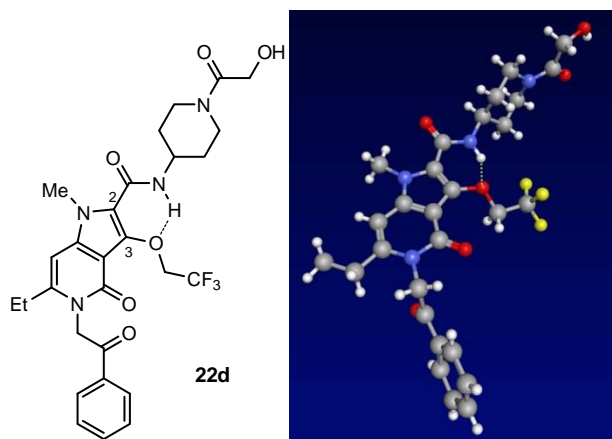


ピロロ[2,3-*c*]キノリン-4-オン骨格のベンゼン環をシクロヘキサン環へと変換した化合物 **22i** では 20 倍程度の活性減弱が認められたが、予想通り大幅に溶解度が改善した。更に置換基の小さい 6 位エチル体 **22e** は、リード化合物 **12b** に匹敵する強力な Gli レポーター阻害活性を示した。このことから活性発現には分子の平面性は関係なく、キノリンのベンゼン環周辺に適切な大きさの置換基を有し、ベンゼン環周辺の空間を占拠することが必要であることが考えられた。次にピロール環 3 位アルコキシ基の変換により、ベンゼン環除去に伴う脂溶性の調整を行うことで、活性及び物性プロファイルの両立できる化合物が見出せると考えた。この際、適度な分子サイズを有し、かつ静電的な効果が期待できるフッ素原

子の導入を実施し、トリフルオロエチル体 **22d** が強い Gli レポーター阻害活性および良好な溶解度を示すことを見出した。以上の結果より、化合物 **22d** を用いた更なる評価を行った。

				
化合物番号	12b	22i	22e	22d
Gliレポーター活性 IC ₅₀	4.6 nM	96 nM	5.7 nM	4.4 nM
溶解度 (日局2液, pH6.8) (ug/mL)	8.7	80	63	81

まず化合物 **22d** の X 線単結晶構造を取得したところ、3 位アルコキシ基の酸素原子と 2 位アミド窒素原子との間で分子内水素結合の形成が確認された。この相互作用は分子全体の安定性を向上させることに加え、2 位アミド側鎖の方向を規定することで活性発現に重要な役割を果たしていることが考えられた。

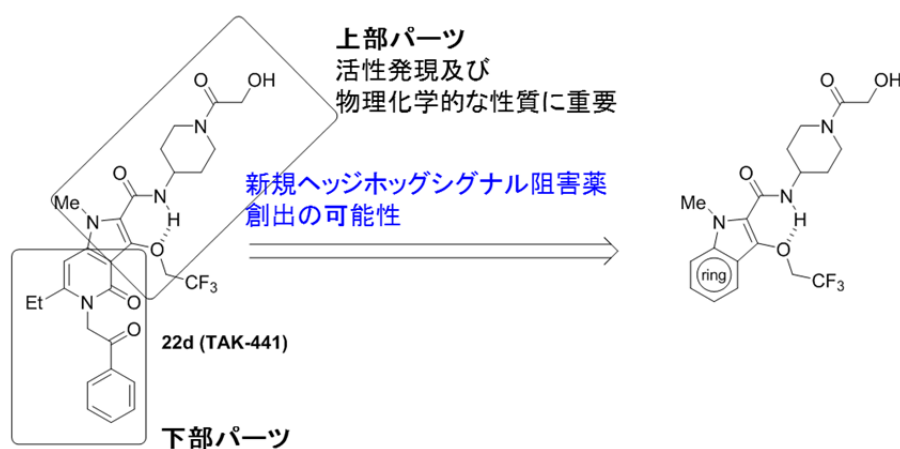


化合物 **22d** の動態は、同用量の比較で **12b** よりも血中濃度が高く、用量依存的に血中濃度が向上することが判明した。マウス髄芽腫同種移植系モデルを用いた *in vivo* 抗腫瘍試験を実施したところ、化合物 **22d** は 1mg/kg および 25mg/kg の 2 用量における抗腫瘍作用に用量依存性を示し、25mg/kg では腫瘍の増殖をほぼ完全に抑制した。また抗腫瘍試験中に大きな体重減少を伴わなかったことから、化合物の高い安全性も確認できた。さらにラット及びイヌにおける血中動態も良好であることから、大動物における薬効も同様に期待できると考えられた。以上の結果より、化合物 **22d** は経口投与可能なヘッジホッグシグナル阻害

薬として開発が可能な薬剤であることを確認した。

【第三章】

化合物 **22d** の構造活性相関情報としては、これまでに上部パーツの変換を中心的に行っており、活性、物性および動態プロファイルの向上に大きく関与することが分かっている。しかしながら、中央ピリドン環を含む下部パーツに関してはほとんど情報がなく、本構造がどのような役割を持つか不明であった。このような考えの下、**22d** のピリドン環を含む下部パーツの変換から、新規骨格を有するヘッジホッグシグナル阻害薬の創出可能性について検討した。



化合物 **22d** の 7 位に窒素原子を導入したピロロ[2,3-*d*]ピリミジン誘導体 **25g** で強い Gli レポーター阻害活性が維持したことから、この位置に対する窒素原子許容性を確認した。この窒素原子を固定しカルボニル基を除去したピロロ[2,3-*b*]ピリジン誘導体 **25b** では、**22d** と比較し活性が約 10 倍減弱した。本結果は母核カルボニル基が活性に必要であることを示唆したが、数十 nM 程度の活性が残っていることを考慮すると、本骨格の更なる最適化により有望なヘッジホッグシグナル阻害薬が見出せる可能性があると考えた。そこで次に **25b** の活性向上を指向した化合物デザインを検討した。

化合物デザインの手掛かりとして前章で取得した X 線単結晶構造を利用した。それぞれの X 線単結晶構造の比較から、そのコンホメーションの差が *in vitro* 活性に影響していると仮定し、各々の単結晶構造がどのような周辺環境に基づいたものであるかを考察した。その結果、分子内水素結合による構造安定化や、隣接置換基の立体障害によるコンホメーションの固定化が考えられた。化合物 **25b** は 5 位フェナシル基周辺の自由度が高いため活性発現に必要なコンホメーションを取りづらい。そのため、自由度を制限する新たな置換基の導入が必要であると考え、フェナシル基の代替としてベンズアミド基が適当であると考えた。

ピロロ[2,3-*b*]ピリジン骨格にベンズアミド基を導入した化合物 **25c** は期待通り強い Gli レポーター阻害活性を示した。本知見は同様の周辺環境を有する他のヘテロ環にも適応可能

Chemical structures of Gli receptor activators 22d, 25g, 25b, and 25f are shown. The structures are derivatives of a Gli receptor activator, featuring a central pyridine ring substituted with an ethyl group, a benzoyl group, and a piperidine ring. The structures are labeled 22d, 25g, 25b, and 25f. The structures are shown with their corresponding Gli receptor activator activity (IC₅₀) values.

化合物番号

22d

25g

25b

25f

Gliレポーター活性
IC₅₀

4.6 nM

6.2 nM

46 nM

3.6 nM (25c)
2.6 nM (25d)
3.9 nM (25e)
3.1 nM (25f)