

—総説—

## 5-FU との併用療法を目指す ヒトデオキシウリジントリホスファターゼ阻害剤の開発

宮腰均<sup>a), b)</sup>

**要約：**ヒトデオキシウリジントリホスファターゼ (dUTPase) 阻害剤は 5-フルオロウラシルをベースとした化学療法との併用剤として現在の化学療法の治療効果を改善できる可能性がある。著者は dUTPase 阻害剤の開発を目的にウラシル誘導体の SAR 研究を行った。dUTPase を強く阻害できる骨格として N-カルボニルピロリジンまたは N-スルホニルピロリジン構造を有するウラシル誘導体及び 1,2,3-トリアゾール構造を有するウラシル誘導体を見出した。その中で、化合物 **14c** は非常に強いヒト dUTPase 阻害活性 ( $IC_{50} = 0.067 \mu M$ ) 且つ良好な薬物動態プロファイルを有しており、*in vitro* においては HeLa S3 細胞に対し、5-フルオロ-2'-デオキシウリジンの細胞増殖抑制効果 ( $EC_{50} = 0.07 \mu M$ ) を、また *in vivo* においては MX-1 細胞に対し、5-フルオロウラシルの抗腫瘍効果を劇的に増強した。また著者は化合物 **8a** とヒト dUTPase との共結晶構造解析を行い、新規 dUTPase 阻害剤のウラシル環と末端ベンゼンがそれぞれウラシルポケットと疎水性ポケットと相互作用し、且つスタッキングし安定化することで dUTPase を阻害していることを明らかにした。これらのデータから、見出した化合物 **14c** は臨床においても 5-フルオロウラシルのようなチミジレートシンターゼ阻害剤の治療効果を劇的に改善することが期待される。

**索引用語：**デオキシウリジントリホスファターゼ、5-フルオロウラシル、チミジレートシンターゼ阻害剤

## Development of Human Deoxyuridine Triphosphatase Inhibitors for Combination Cancer Therapies with 5-FU

Hitoshi MIYAKOSHI<sup>a), b)</sup>

**Abstract:** Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) has emerged as a potential target for drug development as part of a new strategy of 5-fluorouracil-based combination chemotherapy. We have initiated a project to develop potent drug-like dUTPase inhibitors based on structure-activity relationship (SAR) studies of uracil derivatives. N-carbonylpyrrolidine- or N-sulfonylpyrrolidine-containing uracils and 1,2,3-triazole-containing uracils were found to be promising scaffolds that led us to human dUTPase inhibitors (**14c**) having excellent potencies ( $IC_{50} = 0.067 \mu M$ ) and an improved pharmacokinetic profile. The X-ray structure of a complex of **8a** and human dUTPase revealed a unique binding mode wherein its uracil ring and phenyl ring occupy a uracil recognition region and a hydrophobic region, respectively, and are stacked on each other. Compound **14c** dramatically enhanced the growth inhibition activity of 5-fluoro-2'-deoxyuridine against HeLa S3 cells *in vitro* ( $EC_{50} = 0.07 \mu M$ ) and the antitumor activity of 5-fluorouracil against human breast cancer MX-1 xenograft model in mice significantly. These data indicate that **14c** is a promising candidate for combination cancer chemotherapies with TS inhibitors.

**Key phrases:** dUTPase, 5-fluorouracil, TS inhibitor

a) 岐阜薬科大学薬化学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西 1 丁目 25-4)

Laboratory of Medicinal & Pharmaceutical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University (1-25-4 Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, JAPAN)

b) 現所属：大鵬薬品工業株式会社つくば研究センター化学研究所創薬化学研究室 (〒300-2611 茨城県つくば市大久保 3 番地)

Medicinal Chemistry, Chemistry Research Laboratory, Tsukuba Research Center, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd. (3 Okubo, Tsukuba, Ibaraki 300-2611, JAPAN)

1. 緒言

Thymidylate synthase (TS) 阻害剤である 5-fluorouracil (5-FU) やその誘導体は現在もなお、がん治療の一翼を担う化学療法の大きな柱の一つとして、消化器癌や乳癌を中心に広く使用されている。しかしながら TS 阻害剤は臨床において抗腫瘍効果を発揮する一方で、それに対する耐性を獲得する癌細胞が出現するためその有用性が限定的な場合がある。この問題に対し、TS 阻害剤の治療効果を最大化するために、耐性化メカニズムの研究が数多く行われている。この一連の研究の中で Ladner らは TS 阻害剤の重要な効果規定因子として deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) を見出した<sup>1)</sup>。

TS 阻害剤は癌細胞に取り込まれ、標的酵素を阻害することで細胞内の thymidine triphosphate (dTTP) プールを減少させると同時に細胞内の deoxyuridine monophosphate (dUMP) プールを上昇させる。その結果、細胞内では dUMP が更にリン酸化された deoxyuridine triphosphate (dUTP) プールの上昇が起こる。DNA を合成する DNA ポリメラーゼは本来の基質である dTTP と dUTP を区別できないため<sup>2)</sup>、dUTP プールの上昇は必然的に dUTP の DNA への取り込みを促し、その結果強い DNA ダメージを引き起こす (Fig. 1)。このメカニズムは TS 阻害剤が癌細胞を増殖抑制及び細胞死へ誘導するために重要である<sup>3-5)</sup>。dUTPase は特異的に dUTP や 5-FU を TS 阻害剤として用いた場合に生じる 5-fluoro-2'-deoxyuridine triphosphate (FdUTP) のみを認識し加水分解することで (F) dUMP へ変換する酵素であり<sup>6-7)</sup>、癌細胞においてこの酵素の発現が高まれば、5-FU に対して耐性を示すようになる<sup>8-10)</sup>。このことを裏付ける報告がいくつか存在し<sup>1)</sup>、<sup>11-13)</sup>、dUTPase をターゲットとした薬剤によって、TS 阻害剤を用いた化学療法の効果を劇的に改善できる可能性があると考えられる。本総説では著者が行ったヒト dUTPase 阻害剤の開発研究について詳述する。なお本総説に記載されている化合物の合成法に関しては引用文献<sup>14-15)</sup>を参考にしたい。

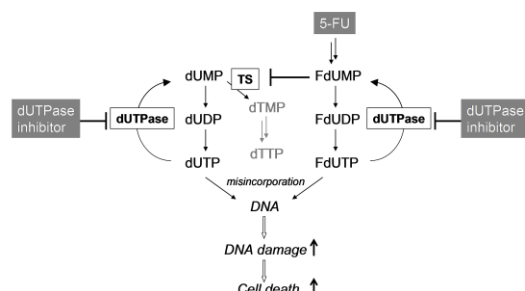


Fig. 1. 5-FU の癌細胞に対する作用と dUTPase.

2. ヒト dUTPase 阻害活性を有する *N*-カルボニルピロリジンまたは *N*-スルホニルピロリジン骨格を持つウラシル化合物の開発

dUTPase 阻害剤探索の研究は幾つかのグループから報告されている (Fig. 2)<sup>16-25)</sup>。しかし強い酵素阻害活性と同時に、臨床応用に耐えうる細胞膜透過性や生体における代謝安定性を併せ持つ阻害剤は存在しない。

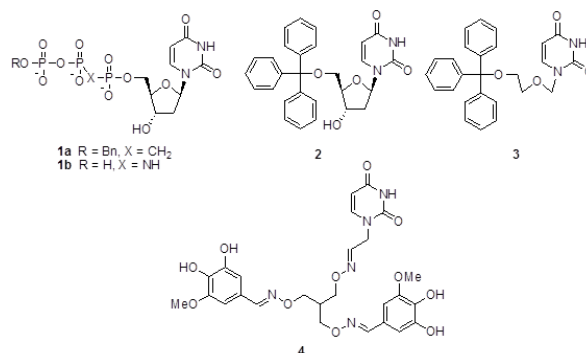
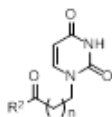


Fig. 2. Structural formula of dUTPase inhibitors.

著者は dUTPase 阻害剤を創製するにあたり dUTPase のウラシル環構造に対する高い基質特異性に注目した。そこでウラシル環を有する誘導体ライブラリーを用意し、そのヒト dUTPase 阻害活性を測定した。その結果、阻害活性は弱いものの、hit 化合物として化合物 5 を見出した (Table 3)。化合物 5 (IC<sub>50</sub> = 97 μM) のアミン部位とウラシル環からアミド基までのリンカー部位の更なる structure-activity relationship (SAR) 研究を行うべく 6a-w を合成し、そのヒト dUTPase 阻害活性を評価した (Table 3)。Table 1 に示すアミド基を有するウラシル化合物の SAR 研究の結果、(1) ウラシル環からアミド基へのリンカーはトリメチレンリンカーが最適であること、(2) アミン部位に関しては *N*-2,2-ジフェニルエチル基と 3 級アミド基を併せ持つことが強い阻害活性に必要であることが明らかになった。この 2 点の性質を併せ持つ 6s (IC<sub>50</sub> = 1.3 μM) や 6w (IC<sub>50</sub> = 1.1 μM) はヒト dUTPase に対して既知阻害剤よりも明らかに強い阻害活性を示し且つ lipophilicity (clogP:1.83-2.17) も良好であった。

次に著者は 6s が有する嵩高いアルキルアミノ側鎖において dUTPase の活性部位と相互作用する際のエン트로ピーロスを低減することができれば更なる阻害活性の向上が期待できると考え、*N*-カルボニルピロリジン骨格を有するウラシル化合物を設計・合成し、そのヒト dUTPase 阻害活性を評価した (Table 2)。

予想通りピロリジン環の導入によって、分子の rigidity が高められた *N*-カルボニルピロリジン骨格を有するウラシル化合物のヒト dUTPase 阻害活性は更に増強された。

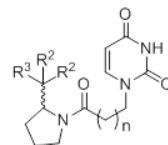
**Table 1.** Human dUTPase inhibitory activity of amide-containing uracil derivative **5**, **6a-w** and reference compounds **1-4**.

	n	R <sup>2</sup>	clogP <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
<b>1a</b>			-4.23	N.T. (K <sub>i</sub> = 0.3 μM) <sup>c</sup>
<b>1b</b>			-6.52	15±1.4 (K <sub>i</sub> = 5 μM) <sup>c</sup>
<b>2</b>			4.46	N.T. (K <sub>i</sub> = 18 μM) <sup>c</sup>
<b>3</b>			4.96	>300 (K <sub>i</sub> = 17 μM) <sup>c</sup>
<b>4</b>			3.16	N.T. (IC <sub>50</sub> = 3.3 μM) <sup>c</sup>
<b>5</b>	2	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-0.71	97±2.0
<b>6a</b>	1	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.83	>30
<b>6b</b>	1	-NHC(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.67	22±0.59
<b>6c</b>	1	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-0.93	>30
<b>6d</b>	1	-N(CH <sub>2</sub> Ph) <sub>2</sub>	1.65	>30
<b>6e</b>	1	-NHCHPh <sub>2</sub>	1.38	>30
<b>6f</b>	1	-NHCH <sub>2</sub> CHPh <sub>2</sub>	1.61	>30
<b>6g</b>	1	-NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CHPh <sub>2</sub>	1.98	>30
<b>6h</b>	1	-N(CH <sub>2</sub> Ph) <sub>2</sub>	1.62	>30
<b>6i</b>	1	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C(OH)Ph <sub>2</sub>	1.75	7.3±0.32
<b>6j</b>	2	-NHPh	0.19	>30
<b>6k</b>	2	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	1.05	30±0.60
<b>6l</b>	2	-NHCH <sub>2</sub> Ph	-0.15	>30
<b>6m</b>	2	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph	0.93	>30
<b>6n</b>	2	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ph	0.55	>30
<b>6o</b>	2	-NHC(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.88	>30
<b>6p</b>	2	-NHCHPh <sub>2</sub>	1.60	>30
<b>6q</b>	2	-NHCH <sub>2</sub> CHPh <sub>2</sub>	1.83	16±0.39
<b>6r</b>	2	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C(OH)Ph <sub>2</sub>	1.96	2.5±0.071
<b>6s</b>	2	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CHPh <sub>2</sub>	2.17	1.3±0.068
<b>6t</b>	2	-N(CH <sub>2</sub> Ph) <sub>2</sub>	2.16	>30
<b>6u</b>	2	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Ph	1.38	21±0.72
<b>6v</b>	2	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	-1.82	>30
<b>6w</b>	2	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(OH)Ph <sub>2</sub>	1.87	1.1±0.038

<sup>a</sup>Calculated by ACD/LogP algorithm. <sup>b</sup>Except compounds **1a-b**, **2-3** and **5**, enzyme inhibition assay are tested at 30 μM or below. IC<sub>50</sub> values are shown as the mean ±SE (n = 3). <sup>c</sup>Reference data. N.T. = not tested

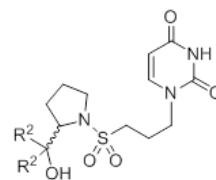
また、これらの誘導体は良好な lipophilicity を有していた (Table 2)。Table 2 に示す SAR 研究では **7a** (IC<sub>50</sub> = 0.29 μM) に代表される *S* 体が eutomer (eudismic ratio = 34) であり、非常に強い阻害活性を有していること、Thienyl 基を有する化合物 **7j** (IC<sub>50</sub> = 0.23 μM) においても非常に強い阻害活性を有することが明らかになった。

次に *N*-カルボニルピロリジン骨格の bioisostere である *N*-スルホニルピロリジン骨格についても検討した (Table 3)。興味深いことに *N*-カルボニルピロリジン誘導体とは異なり、**8a** (IC<sub>50</sub> = 0.32 μM) に代表される *R* 体が eutomer であり、*N*-カルボニルピロリジン骨格を持つ化合物同様に非常に強いヒト dUTPase 阻害活性を有していることが明らかになった。

**Table 2.** Human dUTPase inhibitory activity of *N*-carbonylpyrrolidine-containing uracil derivatives **7a-l** and **6s**

	n	S or R	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	clogP <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
<b>6s</b>					2.17	1.3±0.068
<b>7a</b>	2	<i>S</i>	Ph	OH	1.82	0.29±0.015
<b>7b</b>	2	<i>R</i>	Ph	OH	1.82	10±0.30
<b>7c</b>	2	<i>S</i>	3-F-Ph	OH	1.92	0.35±0.017
<b>7d</b>	2	<i>S</i>	4-F-Ph	OH	1.92	0.60±0.014
<b>7e</b>	2	<i>S</i>	3-Cl-Ph	OH	3.01	0.58±0.027
<b>7f</b>	2	<i>S</i>	4-Cl-Ph	OH	3.01	>1.0 <sup>c</sup>
<b>7g</b>	2	<i>S</i>	2-MeO-Ph	OH	1.65	>1.0 <sup>c</sup>
<b>7h</b>	2	<i>S</i>	3-MeO-Ph	OH	1.65	>1.0 <sup>c</sup>
<b>7i</b>	2	<i>S</i>	4-MeO-Ph	OH	1.65	>1.0 <sup>c</sup>
<b>7j</b>	2	<i>S</i>	3-Thienyl	OH	1.17	0.23±0.0033
<b>7k</b>	2	<i>S</i>	Ph	H	2.81	0.15±0.0094
<b>7l</b>	1	<i>S</i>	Ph	OH	1.60	>1.0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Calculated by ACD/LogP algorithm. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> values are shown as the mean ±SE (n = 3) <sup>c</sup>Except **7b**, enzyme inhibition assay are tested at 1.0 μM or below.

**Table 3.** Human dUTPase inhibitory activity of *N*-sulfonylpyrrolidine-containing uracil derivatives **8a-f** and **6s**

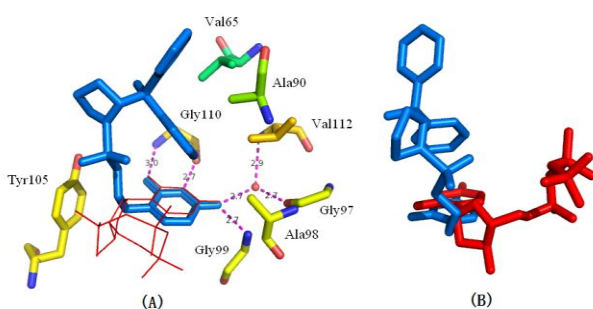
	S or R	R <sup>2</sup>	clogP <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
<b>6s</b>			2.17	1.3±0.068
<b>8a</b>	<i>R</i>	Ph	1.92	0.32±0.018
<b>8b</b>	<i>S</i>	Ph	1.92	9.4±0.085
<b>8c</b>	<i>R</i>	3-F-Ph	2.02	0.28±0.0026
<b>8d</b>	<i>R</i>	4-F-Ph	2.02	0.31±0.0071
<b>8e</b>	<i>R</i>	2-MeO-Ph	1.75	>1.0 <sup>c</sup>
<b>8f</b>	<i>R</i>	3-MeO-Ph	1.75	>1.0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Calculated by ACD/LogP algorithm. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> values are shown as the mean ±SE (n = 3) <sup>c</sup>Except **8b**, enzyme inhibition assay are tested at 1.0 μM or below.

### 3. ヒト dUTPase 阻害剤とヒト dUTPase の共結晶の X 線構造解析と考察

著者が見出した新規阻害剤はウラシル環を有しているものの、キラルなジフェニルメチルピロリジリアミドまたはスルホニルアミド構造を有している点で天然基質であ

る dUTP とは全く異なる構造を有している。しかしながらこれらの化合物は非常に強いヒト dUTPase 阻害活性を有し、その IC<sub>50</sub> 値から考察すると dUTPase によって天然基質 dUTP とほぼ同等に認識されると考えられる (酵素阻害アッセイにおいて dUTP の濃度は 0.1 μM)。よって新規阻害剤の dUTPase に対する作用メカニズムは非常に興味深い。著者は阻害作用メカニズムを明らかにするため、新規阻害剤とヒト dUTPase との共結晶の X 線構造解析を試みた。幾つかの化合物について検討した結果、著者は強い阻害活性を有する **8a** とヒト dUTPase の共結晶取得とその X 線構造解析に成功し、高分解能 (1.7 Å) の共結晶構造を得ることができた (Fig. 3)。

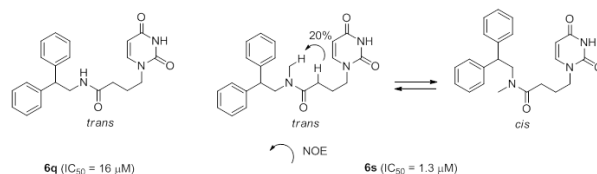


**Fig. 3.** Binding of **8a** (blue stick) in the catalytic site of human dUTPase. (A) Polar interactions. Distances [Å] are indicated. Waters are shown as small spheres. Red line depicted  $\alpha,\beta$ -imino dUTP **1b** in the human dUTPase:  $\alpha,\beta$ -imino dUTP **1b** structure (PDB code: 2HQU) superimposed on the **8a**: human dUTPase (PDB code: 3ARA). (B) Comparison of **8a** (blue stick) with  $\alpha,\beta$ -imino dUTP **1b** (red stick)

Fig. 3 (A) にヒト dUTPase と **8a** の共結晶構造を示す。また Fig. 3 (B) にはヒト dUTPase と  $\alpha,\beta$ -imino dUTP (**1b**) の共結晶構造 (PDB code: 2HQU)<sup>26)</sup>中の  $\alpha,\beta$ -imino dUTP (**1b**) の構造を重ね合わせ、比較した。興味深いことに基質である dUTP を模倣した dUTP mimic **1b** と **8a** はそれぞれのウラシル環が dUTPase の同じウラシルポケットに認識されるのみで、両化合物の dUTPase 活性部位内での側鎖の結合位置は大きく異なっていた。つまり、**8a** のスルホンアミド部位やジフェニルメタノール部位は dUTPase のトリリン酸または糖部認識部位に位置しておらず、**8a** の末端フェニル基の一つが Val65, Ala90, Ala98 及び Val112 が形成する疎水ポケットに位置し、且つ自身のウラシル環とスタッキングすることで安定化し、dUTPase を阻害していることが明らかになった。Val65, Ala90, Ala98 及び Val112 が形成する疎水ポケットは dUTPase が酵素機能を発揮する際に C 末端ループに存在する Phe158 のフェニル基が相互作用する空間であり、**8a** はこの空間とうまく相互作用することで強い阻害能を発揮していると言える。

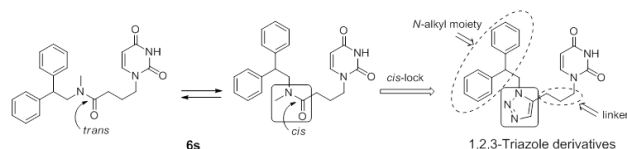
#### 4. ヒト dUTPase 阻害活性を有する 1,2,3-トリアゾール骨格を持つウラシル化合物の開発

アミド基を有するウラシル化合物の SAR 研究において 3 級アミド基を持つ **6s** (IC<sub>50</sub> = 1.3 μM) が 2 級アミド基を持つ **6q** (IC<sub>50</sub> = 16 μM) に比べ約 12 倍もの強いヒト dUTPase 阻害活性を持つことが明らかになった (Table 1)。また **6s** の NMR 実験から、d<sub>6</sub>-DMSO 中 25 °C においては二つの異性体の混合物であることが判明し (Fig. 4, cis :trans = 2:3)、80°C においては平衡状態に達し、一つのピークに収束した。



**Fig. 4.** Conformational preference of amide compounds **6q** (trans) and **6s** (trans and cis)

著者は **6s** の強いヒト dUTPase 阻害活性はその cis 異性体の寄与に起因していると予測し、**6s** のアミド基を cis 配座に固定することで更なるヒト dUTPase 阻害活性が見込める可能性があると考えた。そこでエチニル基を有する中間体とアジド基を有する中間体から容易に合成できる 1,2,3-トリアゾール誘導体を設計した (Fig. 5)。



**Fig. 5.** Triazole-replacement strategy of compound **6s** and molecular modification for the SAR study

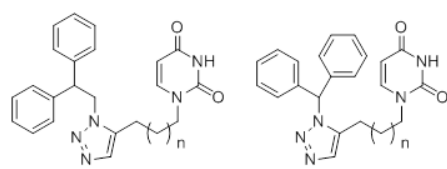
まず著者はアミド化合物である化合物 **6s** の 3 級アミド基を 1,2,3-トリアゾール基へ変換し cis 配座に固定した化合物 **9a** 及びその誘導体を合成し、その dUTPase 阻害活性を評価した (Fig. 5, Table 4)。

予測通り 1,2,3-トリアゾール誘導体である化合物 **9a** (IC<sub>50</sub> = 1.3 μM) は 3 級アミド化合物である **6s** (IC<sub>50</sub> = 1.3 μM) と同等の強いヒト dUTPase 阻害活性を有していた。またテトラメチレンリンカーを有する **9b** (IC<sub>50</sub> = 0.74 μM) も強い酵素阻害活性を有していることが明らかになった。

見出した 1,2,3-トリアゾール基を有する **9a-b** は (1) 比較的分子量が大きいことと (2) 効率良い誘導体合成が困難であることからリード化合物としてはあまりふさわしくない。更に、前述の **8a** と dUTPase の共結晶構造から考察するとジフェニル骨格が必ずしも阻害活性に必須ではないと考えられた。筆者は **9a-b** の構造を基に、その末端ベンゼン環の一つを除いたモノフェニルエチル基を有する誘導体を設計し、そのヒト dUTPase 阻害活性を評価した (Table 5)。化合物 **9a** の末端ベンゼン環の一つを除いた

化合物 **11a** のヒト dUTPase 阻害活性は大きく減弱した ( $IC_{50} = >10 \mu\text{M}$ )。しかしながらウラシル環とトリアゾール基をテトラメチレンリンカーで連結した化合物である **11b** は、活性は減弱したもののその阻害活性はある程度維持された ( $IC_{50} = 3.5 \mu\text{M}$ )。更に **11b** の末端ベンゼン環での置換基効果を探るべく **11c-g** を合成・評価したところ、嵩高いシクロプロピルメトキシ基を末端ベンゼン環の 2 位及び 3 位に導入した誘導体 (**11f-g**) は強いヒト dUTPase 阻害活性を有することが明らかになった (**11f**:  $IC_{50} = 0.39 \mu\text{M}$ , **11g**:  $IC_{50} = 0.21 \mu\text{M}$ )。

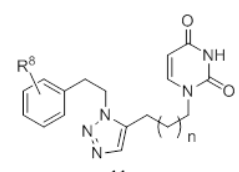
**Table 4.** Human dUTPase inhibitory activity of triazole-containing uracil derivative **9a-b**, **10a-b** and tert-amide containing uracil compound **6s**.



	$IC_{50} (\mu\text{M})^a$
<b>6s</b>	$1.3 \pm 0.068$
<b>9a</b>	$1.3 \pm 0.052$
<b>9b</b>	$0.74 \pm 0.011$
<b>10a</b>	$>10$
<b>10b</b>	$1.6 \pm 0.019$

<sup>a</sup>Enzyme inhibition assay are tested at  $10 \mu\text{M}$  or below.  $IC_{50}$  values are shown as the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ )

**Table 5.** Human dUTPase inhibitory activity of triazole-containing uracil derivatives **11a-g** and **9a-b**.

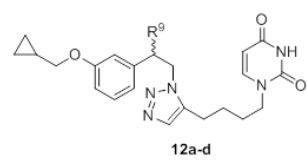


	n	R <sup>6</sup>	$IC_{50} (\mu\text{M})^a$
<b>9a</b>			$1.3 \pm 0.052$
<b>9b</b>			$0.74 \pm 0.011$
<b>11a</b>	1	H	$>10$
<b>11b</b>	2	H	$3.5 \pm 0.023$
<b>11c</b>	2	2-MeO	$5.7 \pm 0.030$
<b>11d</b>	2	3-MeO	$4.1 \pm 0.065$
<b>11e</b>	2	4-MeO	$>10$
<b>11f</b>	2	2-(Cyclopropyl)MeO	$0.39 \pm 0.0044$
<b>11g</b>	2	3-(Cyclopropyl)MeO	$0.21 \pm 0.0026$

<sup>a</sup>Enzyme inhibition assay are tested at  $10 \mu\text{M}$  or below.  $IC_{50}$  values are shown as the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ )

次に著者は化合物 **11g** のヒト dUTPase に対する阻害活性を更に増強するため、**11g** のベンジル位にアルキル基を導入した際の置換基効果について検討した (Table 6)。具体的には **11g** のベンジル位にメチル基またはエチル基を導入したキラル化合物 (**12a-d**) を合成し、その評価を行った。その結果 R 体である **12a** ( $IC_{50} = 0.058 \mu\text{M}$ ) 及び **12c** ( $IC_{50} = 0.029 \mu\text{M}$ ) は非常に強いヒト dUTPase 阻害活性を示した。一方 S 体である **12b** ( $IC_{50} = 0.87 \mu\text{M}$ ) 及び **12d** ( $IC_{50} = 0.72 \mu\text{M}$ ) は **11g** に比べその阻害活性は減弱した (eudismic ratio = 15 ~ 25)。R 体が eutomer である理由は明らかではないが、S 体と比較して dUTPase と効率的な疎水性相互作用をすることができるためと考えられる。

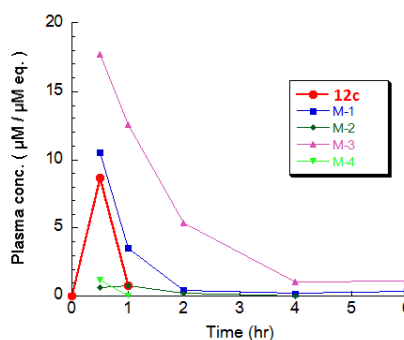
**Table 6.** Human dUTPase inhibitory activity of triazole-containing uracil derivatives **12a-d** and **11g**.



	R <sup>9</sup>	$IC_{50} (\mu\text{M})^a$
<b>11g</b>		$0.21 \pm 0.0026$
<b>12a</b>	Me (R)	$0.058 \pm 0.0019$
<b>12b</b>	Me (S)	$0.87 \pm 0.015$
<b>12c</b>	Et (R)	$0.029 \pm 0.00047$
<b>12d</b>	Et (S)	$0.72 \pm 0.022$

<sup>a</sup> $IC_{50}$  values are shown as the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ )

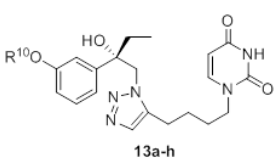
医薬品創製の過程では、標的に対する効果の増強のみが重要ではなく、薬物動態プロファイルの最適化も重要なステップの一つである。非常に強いヒト dUTPase 阻害活性を有することが明らかになった **12c** ( $IC_{50} = 0.029 \mu\text{M}$ ) について、マウスでの薬物動態試験を行った (Fig.6)。その結果化合物 **12c** の血中への吸収は良好であったものの、著しく代謝されていることが明らかになった。



**Fig. 6.** The pharmacokinetic profile of **12c** after oral administration dose at  $50 \text{ mg/kg}$  in Balb/cA mice ( $n=2$ , ♂). Compound **12c** was administered as a solution (2.5% DMA, 2.5% Tween80, 10% Cremophor EL). Pharmacokinetic parameters of **12c** are shown in Table 5. M-1~4 represent metabolites of **12c**.

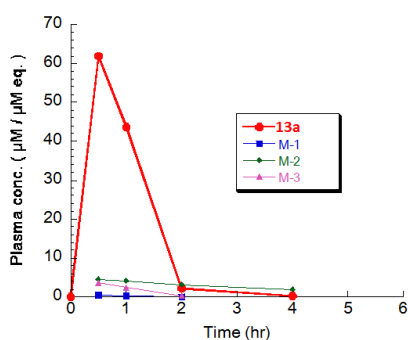
**12c** の代謝物の同定には至らなかったが、著者は **12c** の代謝不安定性はそのベンジル位の代謝に起因していると推測した。そこで **12c** のベンジル位に立体選択的に水酸基を導入した誘導体 **13a** (Table 7) を合成した。化合物 **12c** 同様、化合物 **13a** についてもマウスでの薬物動態試験を行ったところ、著しく吸収性及び代謝安定性が向上していることが判明し、その AUC は化合物 **12c** の AUC に比べ 15 倍程度向上することが明らかになった (Fig. 7, Table 8)。また、幸いにも化合物 **13a** のヒト dUTPase に対する強い阻害活性は維持された ( $IC_{50} = 0.15 \mu\text{M}$ , Table 8)。

**Table 7.** Human dUTPase inhibitory activity of triazole-containing uracil derivatives **13a-h**.



	R <sup>10</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
<b>13a</b>		0.15±0.0030
<b>13b</b>		0.21±0.0019
<b>13c</b>	Et	>1.0
<b>13d</b>		0.63±0.023
<b>13e</b>		0.55±0.026
<b>13f</b>		0.36±0.0083
<b>13g</b>		>1.0
<b>13h</b>		0.15±0.0027

<sup>a</sup>Enzyme inhibition assay are tested at 1.0 μM or below. IC<sub>50</sub> values are shown as the mean ± SE (n = 3).



**Fig. 7.** The pharmacokinetic profile of **13a** after oral administration dose at 50mg/kg in Balb/cA mice (n=2, ♂). **13a** was administered as a solution (2.5% DMA, 2.5% Tween80, 10% Cremophor EL). Pharmacokinetic parameters of **13a** are shown in Table 5. M-1~3 represent metabolites of **13a**.

**Table 8.** Pharmacokinetics parameters of **12c** and **13a** after oral administration dose at 50mg/kg in Balb/cA mice (n=2, ♂).

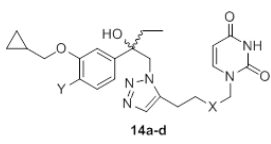
	AUC <sub>0-4</sub> (μM·hr)	T <sub>1/2</sub> (hr)	T <sub>max</sub> (hr)	C <sub>max</sub> (μM)
<b>12c</b>	4.56	0.5~1	0.5	8.69
<b>13a</b>	67.37	1~2	0.5	62.06

Each compounds was administered as a solution (2.5% DMA, 2.5% Tween80, 10% Cremophor EL).

更に著者は化合物 **13a** の末端ベンゼン環3位のアルコキシ基を最適化する目的で、化合物 **13b-h** を設計及び合成し、そのヒト dUTPase 阻害活性を評価した (Table 7)。評価した化合物の内、シクロペンチロキシ基を有する **13b** ( $IC_{50} = 0.21 \mu\text{M}$ ) 及びシクロブチルメトキシ基を有する **13h** ( $IC_{50} = 0.15 \mu\text{M}$ ) は強い阻害活性を維持していたが、化合物 **13a** より明らかに良好な化合物は見出されなかった。

次に著者は化合物 **13a** のヒト dUTPase 阻害活性と薬物動態プロファイルを最適化するために、そのリンカー部位、ベンジル位の立体化学及び末端ベンゼン環の置換基を変換した誘導体 (**14a-d**) を設計・合成し、その阻害活性を評価した (Table 9)。この中で末端ベンゼン環4位にフッ素原子を導入した化合物 **14c** ( $IC_{50} = 0.067 \mu\text{M}$ ) は非常に強いヒト dUTPase 阻害活性を示した。また、**14c** は **13a** 同様マウスにおいて良好な薬物動態プロファイルを示した (Table 10)。一方、化合物 **14c** (eutomer) のエナンチオマーである **14d** (distomer) は化合物 **14c** よりも阻害活性が減弱した ( $IC_{50} = 0.35 \mu\text{M}$ , eudismic ratio = 5.2)。

**Table 9.** Human dUTPase inhibition activity of triazole-containing uracil derivatives **14a-d** and **13a**.



	R or S	X	Y	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
<b>13a</b>	S	CH <sub>2</sub>	H	0.15±0.0030
<b>14a</b>	R	CH <sub>2</sub>	H	>1.0
<b>14b</b>	S	O	H	0.17±0.0074
<b>14c</b>	S	CH <sub>2</sub>	F	0.067±0.0017
<b>14d</b>	R	CH <sub>2</sub>	F	0.35±0.0049

<sup>a</sup>Enzyme inhibition assay are tested at 1.0 μM or below. IC<sub>50</sub> values are shown as the mean ± SE (n = 3).

**Table 10.** Pharmacokinetics parameters of **14c** after oral administration dose at 50mg/kg in Balb/cA mice (n=2, ♂).

	AUC <sub>0-4</sub> (μM·hr)	T <sub>1/2</sub> (hr)	T <sub>max</sub> (hr)	C <sub>max</sub> (μM)
<b>14c</b>	57.28	1~2	1	49.80

**14c** was administered as a solution (2.5% DMA, 2.5% Tween80, 10% Cremophor EL).

### 5. 新規 dUTPase 阻害剤による FdUrd の *in vitro* 細胞増殖抑制効果の増強作用

著者はヒト子宮癌細胞 HeLa S3 を用い、見出した新規ヒト dUTPase 阻害剤を 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) と併用させることでその細胞増殖抑制増強効果の評価を検討した。HeLa S3 (24 hr) に対する 1  $\mu$ M FdUrd の細胞増殖抑制効果を 2 倍にするのに必要な新規 dUTPase 阻害剤の濃度を EC<sub>50</sub> として表し、細胞増殖抑制増強作用の指標として用いた (Table 11)。

抽出した 8 つの化合物の内いくつかは HeLa S3 に対して単独では弱い細胞増殖抑制効果を示した (EC<sub>50</sub> =>22  $\mu$ M)。しかしながら 8 化合物はそれよりも極めて低濃度域で HeLa S3 に対する FdUrd の細胞増殖抑制効果を劇的に増強した (EC<sub>50</sub> = 0.05-3.0  $\mu$ M)。また、この増強効果は化合物のヒト dUTPase 阻害活性と非常に良く相関した。このことから 8 化合物はそれぞれ HeLa S3 内の dUTPase を阻害することで FdUrd の細胞増殖抑制効果を増強していることが強く示唆される。

**Table 11.** The enhancing effect of dUTPase inhibitors for growth inhibition activity of FdUrd against HeLa S3 cells *in vitro*.

	Cytotoxicity EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) with 1 $\mu$ M FdUrd <sup>b</sup>	dUTPase IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>c</sup>
6r	>100	3.0±0.10	2.5±0.071
6s	>100	1.2±0.037	1.3±0.068
7a	>100	0.27±0.0041	0.29±0.015
8a	>100	0.30±0.0050	0.32±0.018
9a	>100	1.1±0.022	1.3±0.052
11g	84±2.1	0.26±0.0046	0.21±0.0026
12c	22±0.13	0.05±0.00049	0.029±0.00047
14c	41±0.25	0.07±0.0013	0.067±0.0017

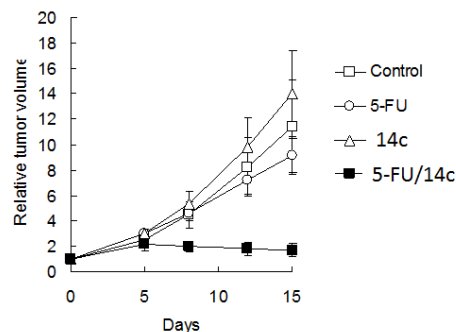
<sup>a</sup>Cytotoxicity of dUTPase inhibitors against HeLa S3 cells (72 hr)

<sup>b</sup>EC<sub>50</sub> value shows the concentration of each dUTPase inhibitor that is essential to reduce T/C% (70-80%) value of FdUrd (1  $\mu$ M) against HeLa S3 cells (24 hr) to the half *in vitro*. EC<sub>50</sub> values are shown as the mean  $\pm$  SE (n = 3). <sup>c</sup>IC<sub>50</sub> value shows dUTPase inhibitory activity as the mean  $\pm$  SE (n = 3).

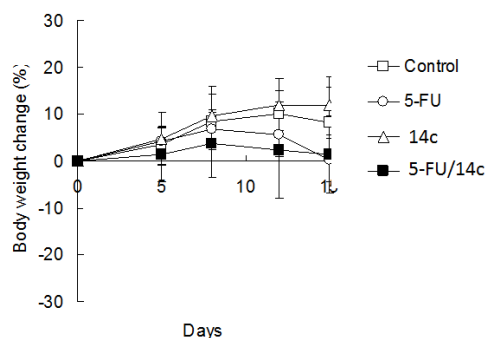
### 6. 新規ヒト dUTPase 阻害剤である化合物 14c による 5-FU の *in vivo* 抗腫瘍効果の増強作用

著者は非常に強いヒト dUTPase 阻害活性と良好な薬物動態プロファイルを有する化合物 14c について *in vivo* における乳癌細胞株 MX-1 xenograft マウス皮下移植モデルでの、5-FU の抗腫瘍効果増強作用を検討した。その結果を Fig. 8 及び Table 12 に示す。

(A)



(B)



**Fig. 8.** (A) Efficacy of 14c for antitumor activity of 5-FU against breast cancer xenograft MX-1 in mice. Relative tumor volume (RTV) is expressed as mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. (B) Body weight change (%) is expressed as mean $\pm$ SD.

*in vivo* において化合物 14c は体重減少の上乗せなしに 5-FU の抗腫瘍効果を劇的に増強することが明らかになった。一方、*in vitro* において化合物 14c は弱いながらも細胞増殖抑制効果を示したが (Table 11, EC<sub>50</sub> = 22  $\mu$ M)、この *in vivo* 試験においては単独で抗腫瘍効果を示さなかった。

**Table 12.** *in vivo* enhancing efficacy of 14c for antitumor activity of 5-FU against breast cancer xenograft MX-1 in mice.

	dose (mg/kg/day)	treatment	TV <sup>a</sup> (mm <sup>3</sup> , mean $\pm$ SD)	RTV <sup>b</sup> (mean $\pm$ SD)	IR <sup>c</sup> (%)
control	-	-	2047.62 $\pm$ 693.70	11.41 $\pm$ 3.74	-
5-FU	15	c.i.	1644.48 $\pm$ 322.60	9.13 $\pm$ 1.35	20.0
14c	300	p.o.	2474.95 $\pm$ 534.68	14.06 $\pm$ 3.35	-23.2
5-FU/14c	15/300	c.i./p.o.	300.68 $\pm$ 103.20	1.72 $\pm$ 0.55**##	84.9

<sup>a</sup>Tumor volume (TV) on Day 15 was calculated according to the following formula: TV (mm<sup>3</sup>) = (width)<sup>2</sup> × (length) / 2

<sup>b</sup>Relative tumor volume (RTV) on Day 15 was calculated as the ratio of TV on Day 15 to that on Day 0 according to the following formula: RTV = (TV on Day 15) / (TV on Day 0)

<sup>c</sup>Inhibition rate (IR) of tumor growth on Day 15 on the basis of RTV was calculated according to the following formula: IR (%) = [1 - (mean RTV of the treated group) / (mean RTV of the control group)] × 100

\*\* : p < 0.01 Dunnet test as compared with the control group.

## : p < 0.01 Student's t-test as compared with the 5-FU group.

## 7. 結論

TS 阻害剤である 5-FU やその誘導体は、がん治療の一翼を担う化学療法の大きな柱の一つとして、消化器癌や乳癌を中心に現在もお広く使用されている。ヒト dUTPase 阻害剤は臨床における TS 阻害剤の効力を劇的に改善できる可能性があるため、著者はその開発研究を行った。

ヒット化合物であるウラシル化合物誘導体 **5** ( $IC_{50} = 97 \mu M$ ) をきっかけに、本研究ではアミド構造または 1,2,3-トリアゾール構造を有するウラシル化合物の SAR 研究により、ヒト dUTPase 阻害活性が約 1500 倍増強され且つマウスにおける薬物動態プロファイルが良好な化合物 **14c** を見出すことに成功した。見出された新規ヒト dUTPase 阻害剤は *in vitro* において TS 阻害剤である FdUrd の細胞増殖抑制効果を、また *in vivo* において 5-FU の抗腫瘍効果を劇的に増強することが明らかになった。

更に著者は化合物 **8a** とヒト dUTPase との共結晶の獲得とその解析に成功し、ヒト dUTPase の阻害様式を明らかにした。

本研究で見出した化合物 **14c** は臨床においても TS 阻害剤の効果を劇的に改善するポテンシャルを十分に有していると考えられ、本剤と TS 阻害剤との併用により新たな化学療法の治療体系を構築できる可能性があると思われている。

## 1 1. 謝辞

本研究に関して種々の貴重な御助言を賜りました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・永澤孝子教授並びに大鵬薬品工業株式会社・福岡正哲博士に深甚なる謝意を表します。また、本研究全般にわたり多大なる御協力頂きました大鵬薬品工業株式会社つくば研究センター各位に厚く御礼申し上げます。

## 1 2. 引用文献

- Ladner R. D., Lynch F. J., Groshen S., Xiong Y. P., Sherrod A., Caradonna S. J., Stoehlmacher J., Lenz H. J., *Cancer Res.*, **60**, 3493-3503 (2000).
- Richardson C. C., Schildkraut C. L., Kornberg A., *Cold Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 9-19, (1963).
- Longley D. B., Harkin D. P., Johnston P. G., *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 330-338 (2003).
- Curtin N. J., Harris A. L., Aherne G. W., *Cancer Res.*, **51**, 2346-2352 (1991).
- Webley S. D., Hardcastle A., Ladner R. D., Jackman, A. L., Aherne G. W., *Br. J. Cancer*, **83**, 792-799 (2000).
- Mol C. D., Harris J. M., McIntosh E. M., Tainer J. A., *Structure*, **4**, 1077-1092 (1996).
- Caradonna S. J., Cheng Y. C., *Mol. Pharmacol.*, **18**, 513-520 (1980).
- An Q., Robins P., Lindahl T., Barnes D. E., *Cancer Res.*, **67**, 940-945 (2007).
- Wilson P. M., Fazzone W., LaBonte M. J., Deng J., Neamati N., Ladner R. D., *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 3029-3037 (2008).
- Ingraham H. A., Tseng B. Y., Goulian M., *Mol. Pharmacol.*, **21**, 211-216 (1982).
- Koehler S. E., Ladner R. D., *Mol. Pharmacol.*, **66**, 620-626 (2004).
- Takatori H., Yamashita T., Honda M., Nishino R., Arai K., Takamura H., Ohta T., Zen Y., Kaneko S., *Liver Int.*, **30**, 438-446 (2009).
- Kawahara A., Akagi Y., Hattori S., Mizobe T., Shirouzu K., Ono M., Yanagawa T., Kuwano M., Kage M., *J. Clin. Pathol.*, **62**, 364-369 (2009).
- Miyakoshi H., Miyahara S., Yokogawa T., Chong K. T., Taguchi J., Endoh K., Yano W., Wakasa T., Ueno H., Takao Y., Nomura M., Shuto S., Nagasawa H., Fukuoka M., *J. Med. Chem.*, **55**, 2960-2969 (2012).
- Miyakoshi H., Miyahara S., Yokogawa T., Endoh K., Muto T., Yano W., Wakasa T., Ueno H., Chong K. T., Taguchi J., Nomura M., Takao Y., Fujioka A., Hashimoto A., Itou K., Yamamura K., Shuto S., Nagasawa H., Fukuoka M., *J. Med. Chem.*, **55**, 6427-6437 (2012).
- Zalud P., Wachs W. O., Nyman P. O., Zeppezauer M. M., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **370**, 135-138 (1994).
- Persson T., Larsson G., Nyman P. O., *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 553-556 (1996).
- Nguyen C., Kasinathan G., Leal-Cortijo I., Musso-Buendia A., Kaiser M., Brun R., Ruiz-Perez L. M., Johansson N. G., Gonzalez-Pacanowska D., Gilbert I. H., *J. Med. Chem.*, **48**, 5942-5954 (2005).
- Whittingham J. L., Leal I., Nguyen C., Kasinathan G., Bell E., Jones A. F., Berry C., Benito A., Turkenburg J. P., Dodson E. J., Ruiz Perez L. M., Wilkinson A. J., Johansson N. G., Brun R., Gilbert I. H., Gonzalez Pacanowska D., Wilson K. S., *Structure*, **13**, 329-338 (2005).
- Nguyen C., Ruda G. F., Schipani A., Kasinathan G., Leal I., Musso-Buendia A., Kaiser M., Brun R., Ruiz-Perez L. M., Sahlberg B. L., Johansson N. G., Gonzalez-Pacanowska D., Gilbert I. H., *J. Med. Chem.*, **49**, 4183-4195 (2006).
- Jiang Y. L., Chung S., Krosky D. J., Stivers J. T., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 5666-5672 (2006).
- McCarthy O. K., Schipani A., Buendia A. M., Ruiz-Perez L. M., Kaiser M., Brun R., Pacanowska D. G., Gilbert I. H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 3809-3812 (2006).
- Beck W. R., Wright G. E., Nusbaum N. J., Chang J. D., Isselbacher E. M., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **195 Pt B**, 97-104 (1986).



- 
- 24) Marriott J. H., Aherne G. W., Hardcastle A., Jarman M., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **20**, 1691-704 (2001).
- 25) Hampton S. E., Baragana B., Schipani A., Bosch-Navarrete C., Musso-Buendia J. A., Recio E., Kaiser M., Whittingham J. L., Roberts S. M., Shevtsov M., Brannigan J. A., Kahnberg P., Brun R., Wilson K. S., Gonzalez-Pacanowska D., Johansson N. G., Gilbert, I. H., *ChemMedChem*, **6**, 1816-1831 (2011).
- 26) Varga B., Barabas O., Kovari J., Toth J., Hunyadi-Gulyas E., Klement E., Medzihradzky K. F., Tolgyesi F., Fidy J., Vertessy B. G., *FEBS Lett.*, **581**, 4783-4788 (2007).

### 13. 特記事項

本総説は、岐阜薬科大学博士論文（甲 138 号）の内容を中心にまとめたものである。