

強力な抗腫瘍性及びHIF-1阻 害作用を有する架橋二環性オ クタデプシペプチドの開発

岐阜薬科大学 薬化学研究室

永澤 秀子

HIF-1阻害剤と想定される標的





G. Melillo, Mol Cancer Res 2006, 4, 601

キノマイシン系抗生物質は強い抗腫瘍効果とHIF-1阻害作用 を有しTME 標的創薬のシーズとして注目される



EchinomycinはHIF-1が結合する低酸素応答配列に選択的に インターカレートする



エキノマイシンの第二相臨床試験(1985~1998)

A randomized phase II trial of echinomycin, trimetrexate, and cisplatin plus etoposide in patients with metastatic nonsmall cell lung carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1587). <u>Cancer.</u> 1998 Jan 15;82(2):292-300. 転移性非小細胞肺がん

A phase II clinical trial of echinomycin in metastatic soft tissue sarcoma. An Illinois Cancer Center Study. Invest New Drugs. 1995;13(2):171-4. 転移性軟部肉腫

Phase II trial of echinomycin in patients with advanced or recurrent colorectal cancer. <u>Cancer Chemother Pharmacol.</u> 1994;34(3):266-9. 再発性大腸癌

Phase II trial of echinomycin in advanced hormone-resistant prostate cancer. An Illinois Cancer Council study. Invest New Drugs. 1994;12(1):65-6. ホルモン抵抗性前立腺癌

Phase II study of echinomycin in the treatment of renal cell carcinoma ECOG study E2885. <u>Invest</u> <u>New Drugs.</u> 1994;12(2):151-3. 腎がん

Echinomycin in recurrent and metastatic endometrial carcinoma. A phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. <u>Am J Clin Oncol.</u> 1993 Dec;16(6):492-3. 転移性子宮内膜癌

いずれも有意な治療効果は得られなかった。



HIF阻害剤エキノマイシンによる癌幹細胞の効率的除去



エキノマイシンは正常な幹細胞毒性なしに再発性急性骨髄性白血病(AML)の白血病幹細胞を選択的に殺すことができる。





Ratnayake, A. S. et. al., Bioconjugate Chem. 2019, 30, 200



Table 1. Cytotoxicity Across Multiple Tumor Cell Lines and DNA BindingAffinities of Natural Product Depsipeptide Bis-Interclators*

| compd no. | sample name | N87 (gastric) | MDA-MB-361- DYT2 (breast) | HT29 (colon) | K _D (DNA) |
|------------------|---|--------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | echinomycin A | 1.3 | 3.1 | 3.7 | 21 |
| 2 | echinomycin B | 0.19 | 0.43 | 0.44 | 8.6 |
| 3 | echinomycin C | 0.05 | 0.14 | 0.10 | 17 |
| 4 | SW-163D | 0.27 | 0.90 | ND | 6.5 |
| | | | | | |
| 5 | sandramycin | 0.55 | 0.53 | 0.11 | 0.020 |
| 5 6 | sandramycin quinaldopeptin | 0.55 5.5 | 0.53 6.7 | 0.11 4.3 | 0.020 32 |
| 5 6 7 | sandramycin quinaldopeptin luzopeptin A | 0.55 5.5 1.0 | 0.53 6.7 0.85 | 0.11 4.3 0.37 | 0.020 32 ND |
| 5 6 7 8 | sandramycin quinaldopeptin luzopeptin A luzopeptin C | 0.55 5.5 1.0 20 | 0.53 6.7 0.85 13 | 0.11 4.3 0.37 18 | 0.020 32 ND 0.61 |

* Cytotoxicity IC50 values from four cell line indications are reported as mean IC50 (nM) from 1 to 6 independent experiments. DNA binding data are mean Kd (nM). ND, not determined.



Ratnayake, A. S. et. al., Bioconjugate Chem. 2019, 30, 200

放線菌由来の抗腫瘍性ビスインターカレーター類



Ratnayake, A. S. et. al., Bioconjugate Chem. 2019, 30, 200



TA誘導体の構造展開 Ver.1



Triostin A (TA)誘導体の構造活性相関 Ver. 1

Absorbance

measurement



24 h

1 h

24 h

Luminescence

measurement

Ref) G. L. Semenza et al. J. Biol. Chem. 1996,

271, 32529-32537.

Cytotoxicity and inhibition of HIF-1 transcriptional activity



24 h

24 h

4 h

Ec 及びTA はHIF-1タンパク質発現を抑制する

Inhibition of HIF-1 protein expression Hypo (1% O₂, 16 h) Нуро Aero Aero (-)-TA [µM] (+)-TA [µM] 0 0.1 0.5 1.0 0 0 0.1 0.5 1.0 HIF-1α β-actin Нуро Нуро Aero Aero TA-SH [µM] Ac-macrolide [µM] 0.5 4.0 0.1 0 0 1.0 0 0 2.0 8.0 HIF-1α β-actin

Inhibition of angiogenesis



Control



Echinomycin 0.2 ng / CAM



Triostin A 2 ng / CAM

Inhibition of HIF-1 mRNA





MCF-7 cells was treated with TA for 16 h under aerobic or hypoxic condition.



K. Hattori, et al., Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 2090-2111

DNA結合阻害より上流にEcの標的が存在する可能性がある



架橋構造が活性の鍵を握る?

1.36

TA



a. The distances measured in the crystal structure of echinomycin-2QN were shown. *b*. Cells were treated with Ec or TA for 24 hours.

 4100 ± 300

 26.9 ± 1.3

0.40









架橋部を修飾した誘導体の生物活性-開環または環拡大-



各種癌細胞における抗腫瘍活性



非天然型架橋構造を有する強力な誘導体の生物活性②



^a half-ring of bicyclic peptide.



Synthesis of Ec-E-alkene





Synthesis of Ec-E-alkene(9) and Ec-alkane(10)





チオ/セレノエーテル架橋体の合成戦略







Synthesis of S-ether and Se-ether derivatives (31 and 32)



* R=S: a=1, 1 h 22: R=S, 97% yield 23: R=Se, 87% yield





新技術説明会

Cbz

新規二環性オクタデプシペプチド類のX線結晶構造解析







X-ray crystal structural analyses were performed by Dr. M. Ebihara (Gifu University).

Inhibition of HIF-1 α protein expression on MCF-7





ビシクロ環のコンフォメーションと活性の相関



| Dista | Distance (nm in crystal structure) | | | | IC ₅₀ [nM] | | | | | |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|---|-------------------|-----------------------|-------|-------|-----------|--|--|
| | Minor axis | Major axis (B) | _ | MTT assay | | | | HIF-1 | | |
| | (A) | | | MCF-7 | MDA-MB-231 | A549 | HT29 | Luc assay | | |
| Echinomycin (Ec |) 0.375ª | 1.01 ^a | : | 2.0 | 2.3 | 4.7 | 3.5 | 0.35 | | |
| alkene | 0.404 | 1.00 | ł | 2.9 | 3.2 | 5.3 | 6.2 | 1.0 | | |
| Se-ether | 0.400 0.387 0.385 | 0.999 1.06 | ł | 7.1 | 6.8 | 14.5 | 11.7 | 2.0 | | |
| S-ether | 0.381 0.379 | 0.983 1.05 | ł | 9.7 | 8.0 | 16.2 | 16.2 | 2.4 | | |
| Triostin A (TA) | 0.40 | 1.36 | | 211.6 | 178.0 | 367.5 | 340.2 | 26.9 | | |
| D,D-Val | 0.43 | 1.42 | ÷ | 6100 ^b | N.D. | N.D. | N.D. | 590 | | |
| S-Ac | N.D. | N.D. | • | 4300 ^b | N.D. | N.D. | N.D. | 222.4 | | |

^{*a*} Measured in Ec-2QN. ^{*b*} drug treatment: 1 day.



特願2018-222124

水中のグローバルミニマム(GM)コンフォメーションでは非天然型 架橋構造誘導体はコンパクトな球状構造をとる



高活性誘導体と低活性誘導体のコンフォメーションの比較





Global minimum structures

Week



TAの活性が低い理由はπ-πスタッキングが弱いまたは細胞内で開閉環平衡が あるため?



S-S架橋構造の生体内安定性の解析



抗腫瘍活性において拘束された架橋環状デプシペプチドのコンパクト 球状コンフォメーションが重要な構造要件である



本研究はDNAインターカレートとは異なる架橋環状部分と相互作用する新規創薬標的タンパク質の存在を示唆する



新技術の特徴

- 1. 二環性デプシペプチド類の実用的な多様性指向液相合成法を 確立した。
- 2. 架橋部の構造展開によって、環の歪みが大きくなると抗腫瘍活 性が大幅に強くなることを見出した。
- 3. エキノマイシンの10倍以上の強力な抗腫瘍効果とHIF-1阻害作 用を有する非天然型架橋誘導体を開発した。
- 中分子抗腫瘍創薬の有望なスキャフォールドとして拘束された
 架橋構造を持つ二環性デプシペプチドを見出した。

想定される用途

がん細胞の増殖、浸潤、転移の抑制、血管新生阻害、が ん幹細胞の選択的除去薬



実用化に向けた問題点とその解決法

- 1. 架橋部の拘束を強めた高活性誘導 体の合成
- 2. in vivo抗腫瘍活性の評価とADME 解析
- 3. 腫瘍細胞選択性付与のためのバイ オコンジュゲーション
- 4. <u>標的タンパク質の同定</u>



本技術に関する知的財産権

- ・発明の名称 :新規抗腫瘍性環状デプシペプチ
 ド化合物及びその製造方法
- •出願番号
- •出願日

:平成30年11月28日

:特願2018-222124

:岐阜市

• 発明者

•出願人

:永澤秀子、平山祐、小池晃太



本研究はJSPS科研費 JP16H05102の 助成によって実施された。



お問い合わせ先

岐阜薬科大学 創薬化学大講座 薬化学研究室 永澤秀子 TEL&FAX 058-230-8112

e-mail hnagasawa@gifu-pu.ac.jp

