

## ベンズアミド・ベンズアミジン誘導体の合成と構造活性相関

(学習院大学理学部、国立感染症研究所)

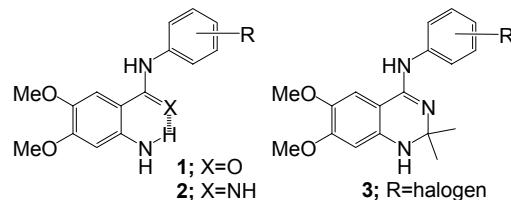
○中村 浩之、浅野 亨、吉川 智裕、山本 浩嗣、上原 至雅

## はじめに

近年、様々な細胞増殖因子受容体が発見され、その増殖シグナル伝達系が明らかとなってきた。その中でも、多くのガン細胞に共通に見られるチロシンキナーゼはガン細胞では常に活性化されており自律性の増殖が起こっているため、このシグナル伝達を阻害することでガン細胞の増殖を抑制できると考えられる。1994年、Fry らは<sup>1)</sup>、4-アニリノキナゾリン(PD 153035)が増殖因子受容体の一つである上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼに特異的に阻害活性を示すことを初めて明らかにし、2002年7月にはその誘導体であるイレッサが認可された<sup>2)</sup>。さらに4-アニリノキナゾリン誘導体(ZD 6474, KN 1022)が血管内皮細胞増殖因子受容体(VEGFR)や他のキナーゼに阻害活性を示すことが明らかにされてきた。

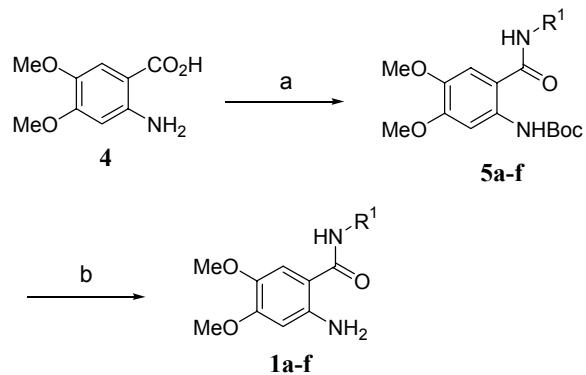
我々は、これらのチロシンキナーゼ阻害剤に共通しているキナゾリン骨格に着目した。Eigenbrot らの最近の報告によると<sup>3)</sup>、erlotinib と EGFR キナーゼのX線結晶構造解析からキナゾリンとアニリンの分子内二次角は42° であり、キナゾリン環のN1窒素原子が酵素領域のメチオニン-769 アミドの窒素原子と、キナゾリン環のN3窒素原子はスレオニン-766 側鎖と水分子を介してそれぞれ水素結合していることがわかった。そこで、キナゾリン骨格に柔軟性を持たせることによって酵素領域と阻害剤の相互作用に効果が期待できると考えた。今回の講演では、分子内水

素結合を利用した化合物 **1**~**3** を設計・合成、およびその生理活性評価について報告すると共に、ドッキングシミュレーションを用いた構造活性相関について議論する。



## 合成

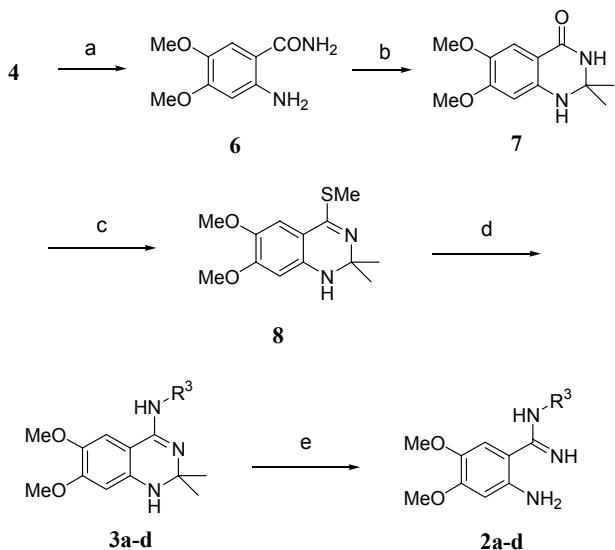
アントラニル酸 **4** を Boc で保護した後、様々なアニリン化合物とカップリングさせ、Scheme 1 に示すように、ベンズアミド誘導体 **1a-f** を合成した。



**Scheme 1.** (a) i. (Boc)<sub>2</sub>O, NaOH, H<sub>2</sub>O; ii. R<sub>1</sub>NH<sub>2</sub>, EDCI, HOBt, DMF. (b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

また、ベンズアミジン誘導体 **2** および **3** を Scheme 2 に示す方法により合成した。アントラニル酸 **4** をアンモニアと処理しアミド体 **6** とした後、酸触媒下アセトンと反応させ環状化合物 **7** とした。Lawesson 試薬により **8** とした後、様々なアニリン

と反応させ化合物 **3a-d** とし、脱保護を行い、アミジン誘導体 **2a-d** を合成した。



**Scheme 2.** (a)  $\text{NH}_3$ , DCC, HOBT, THF. (b) acetone, p-TsOH, reflux. (c) i. Lawesson's reagent,  $80^\circ\text{C}$ ; ii. MeI. (d) amine, neat,  $110^\circ\text{C}$ . (e) HCl, reflux.

#### 細胞成長阻害活性評価および様々なチロシンキナーゼに対する特異的阻害活性評価

EGFR 発現の高い細胞である A431 細胞を用いて 50% 細胞成長阻害濃度を求めた。結果を Table 1 に示した。アミド誘導体 **1** およびアミジン誘導体 **2** と比較して環状化合物 **3** は高い細胞成長阻害活性を示した。最も高い細胞成長阻害活性が見られたのは化合物 **3d** でその  $\text{IC}_{50}$  値は  $90 \mu\text{M}$  であった。

さらに様々なチロシンキナーゼ (PKC, v-Src, eEF2K, EGFR, Flt-1) に対する特異的阻害活性を調べた。結果を Table 2 に示した。++ は 80% 以上、+ は 50~80%、- は 50% 以下のキナーゼ阻害活性をそれぞれ示している。アミド誘導体 **1a** は EGFR および Flt-1 に選択的阻害活性を示した。EGFR に特異的阻害活性を示したのは、アミド誘導体 **1b**、アミジン誘導体 **2a**、**3a** であり、特に化合物 **3a** は  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度でも非常に高い阻害活性を示した。興味深いことに、アミジン誘導体 **2d** は、v-Src に対し特異的な阻害活性を示した。

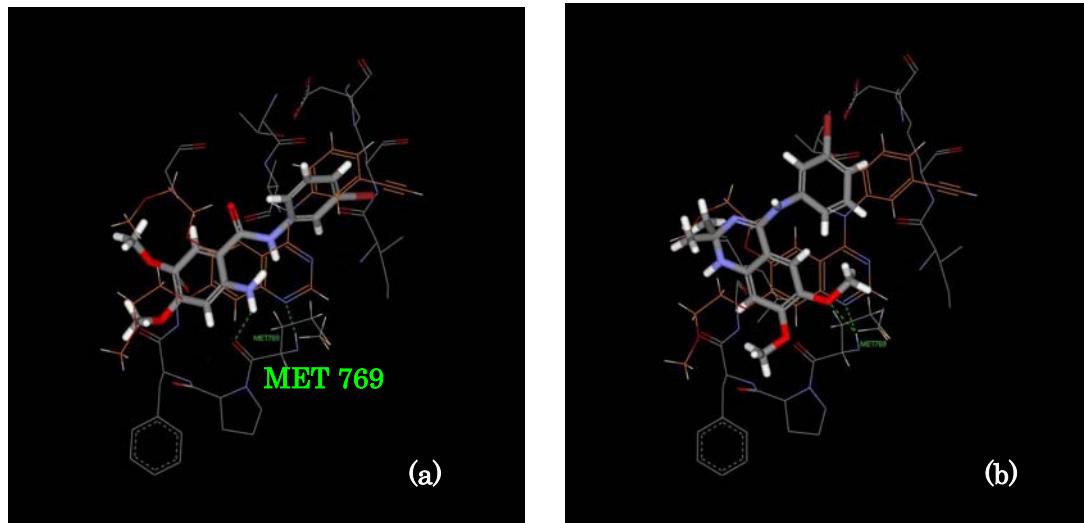
**Table 1.** Cytotoxicity of **1**, **2** and **3** toward A431 cells.

Compound	$\text{IC}_{50}$ (mM)
<b>1a:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{Br}$	0.34
<b>1b:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CF}_3$	0.47
<b>1c:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{OMe}$	0.20
<b>1d:</b> $\text{R}_1 = \text{F}, \text{R}_2 = \text{Cl}$	>1
<b>2a:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{Br}$	0.30
<b>2b:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CF}_3$	0.46
<b>2c:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{OMe}$	0.34
<b>2d:</b> $\text{R}_1 = \text{F}, \text{R}_2 = \text{Cl}$	0.20
<b>3a:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{Br}$	0.13
<b>3b:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CF}_3$	0.20
<b>3c:</b> $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{OMe}$	0.32
<b>3d:</b> $\text{R}_1 = \text{F}, \text{R}_2 = \text{Cl}$	0.09

**Table 2.** Inhibition Specificity

	conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	PKC	v-Src	eEF2K	EGFR	Flt-1
<b>1a</b>	10	-	-	-	+	+
	1	-	-	-	-	-
<b>1b</b>	10	-	-	-	+	-
	1	-	-	-	-	-
<b>2a</b>	10	-	-	-	+	-
	1	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-
<b>2d</b>	10	-	+	-	-	-
	1	-	-	-	-	-
<b>3a</b>	10	-	-	-	++	-
	1	-	-	-	+	-
	0.1	-	-	-	-	-

++: inhibition more than 80 %, +: inhibition of 50~80%, -: inhibition under 50%

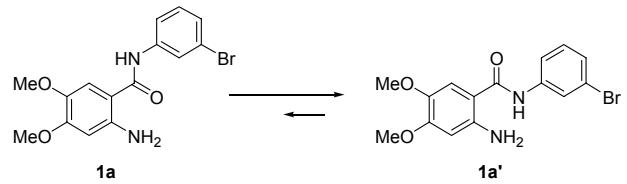


**Figure 1.** Docking modes of the benzamide **1a** (a) and the cyclic benzamidine **3a** (b) overlaid with the binding conformation of erlotinib into the active site of EGFR kinase domain.

### 分子モデリングと構造活性相関

チロシンキナーゼ阻害活性試験において EGFR への特異的な阻害活性を示したベンズアミド **1a** と環状ベンズアミジン **3a** の構造活性相関について分子モデリングを用いて検討した。EGFR タンパク構造には、erlotinib と EGFR キナーゼの X 線結晶構造解析 (PDB code: 1M17) を元にドッキングシミュレーションを行った (DS モデリング Ver. 1.2, Accelrys 社製)。その結果を Figure 1 に示した。ベンズアミド **1a** と EGFR チロシンキナーゼ部位とのドッキングシミュレーションでは、期待していた分子内でのアミン基とアミドカルボニル基間での水素結合による偽環状形成は見られず、Scheme 3 に示すように、**1a'** のような立体構造を形成し作用していることから、従来のキナゾリン化合物より阻害活性が低い原因であることが分かった。一方、環状ベンズアミジン **3a** と EGFR チロシンキナーゼ部位とのドッキングシミュレーションでは、2 つのメチル基の立体的影響により、キナゾリン化合物とは異なった結合を形成することが分かった。Scoring 関数を用いて結合親和力を求めたところ、erlotinib の EGFR チロシンキナーゼに対する LigScore2 は 5.61 であるのに対し、ベンズアミド **1a** および環状ベンズアミジン **3a** は、それぞれ 5.05, 5.10 と erlotinib の LigScore2

値に比べ小さく、これらの計算結果は、実際のチロシンキナーゼ阻害活性の低下を支持するものであった<sup>4)</sup>。



**Scheme 3**

### まとめ

分子内水素結合を利用した偽キナゾリン環状化合物 **1~3** を分子設計し合成した。チロシンキナーゼに対する特異的阻害活性評価および分子モデリングによるドッキングシミュレーションの結果、EGFR チロシンキナーゼに対し期待した結合様式により相互作用していないことから、高い阻害活性は得られなかつたが、今回の結果はキナゾリンに代わる新たな骨格の開発に重要な情報を提供するものであると考えている。

### References

- [1] D. W. Fry, *et al.*, *Science* **265**, 1093-1095 (1994).
- [2] A. J. Barker, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 1911-1914 (2001).
- [3] J. Stamos, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **277**, 46265 (2002).
- [4] T. Asano, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 3529 (2004); *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 2299 (2004).

