

図5 HDACによるヒストン脱アセチル化の推定機構

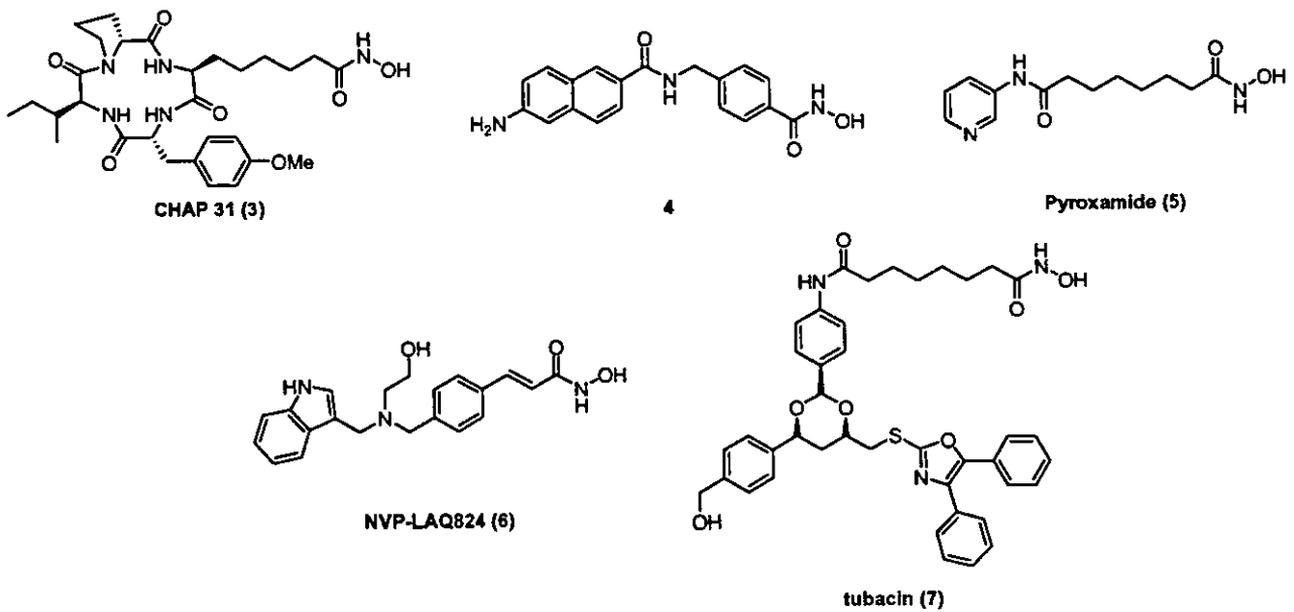


図6 ヒドロキサム酸系HDAC阻害剤

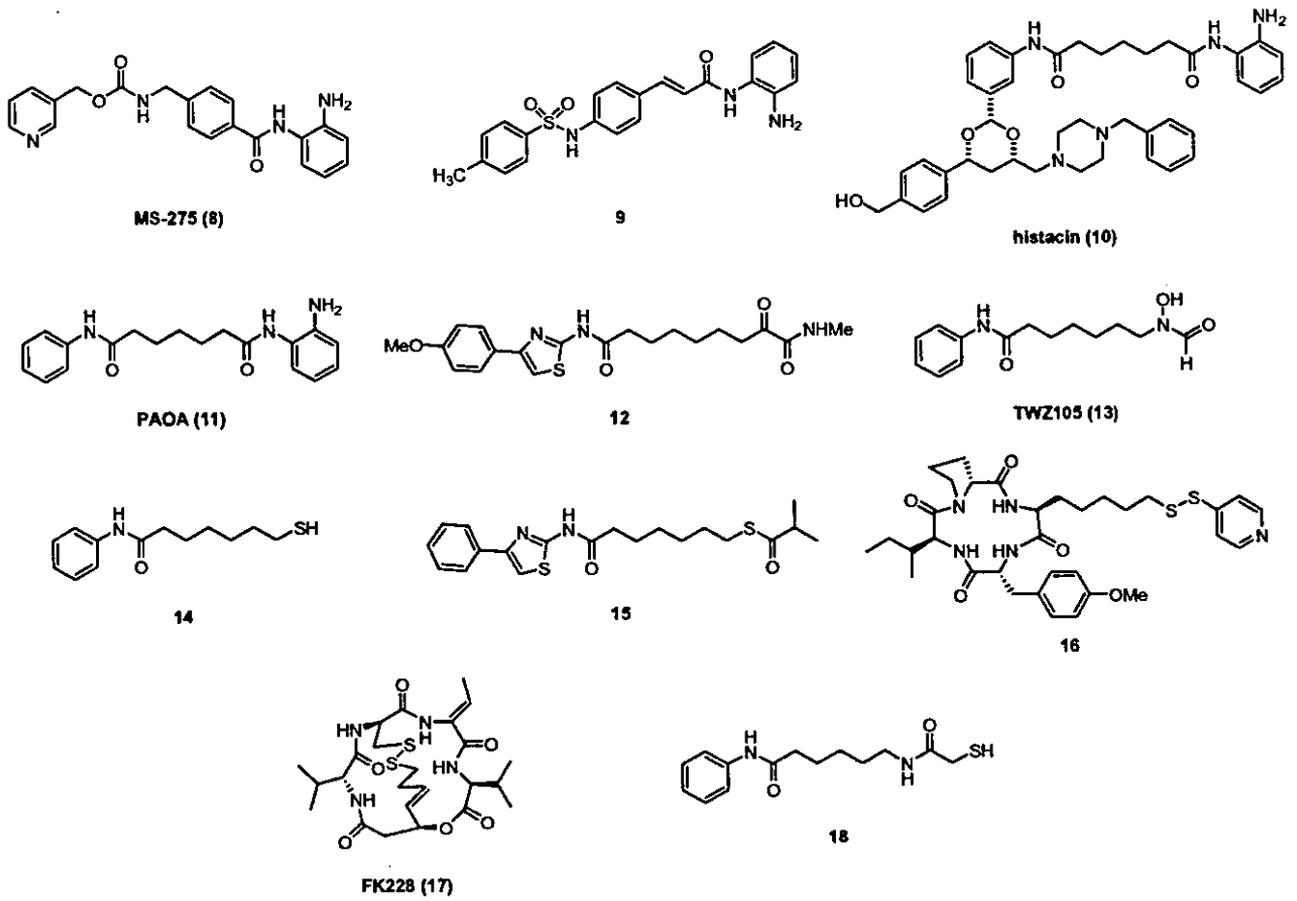


図7 非ヒドロキサム酸系HDAC阻害剤

癌の分子標的治療薬の開発

—非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の設計, 合成と生物活性評価—

Molecularly Targeted Approach to Cancer Therapy: Design, Synthesis and Biological Activity of Non-hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors

鈴木 孝禎*, 中川 秀彦, 宮田 直樹*
Takayoshi Suzuki*, Hidehiko Nakagawa and Naoki Miyata*

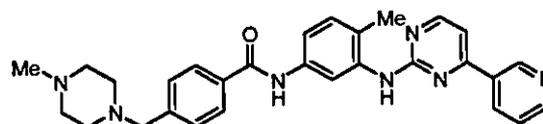
*名古屋市立大学大学院薬学研究科創薬生命科学専攻薬化学教室
(467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)
*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University
(3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8603)

As part of our studies towards molecularly targeted cancer therapy, we developed novel non-hydroxamate histone deacetylase (HDAC) inhibitors. A series of compounds modeled after suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) was designed as follows: (i) structure-based drug design; (ii) design applying the thiophilicity of zinc ion; (iii) design based on the structure of the transition state; (iv) design based on the enzyme catalysis mechanism; and (v) irreversible inhibition-oriented design. In this series, compound 7, in which the hydroxamic acid of SAHA is replaced by a thiol, was found to be as potent as SAHA, and optimization of this series led to HDAC inhibitors 43, 47, 52 and 53, which were more potent than SAHA. In cancer cell growth inhibition assay, *S*-acyl derivative 68, a prodrug of thiol 48, showed strong activity, and its potency was comparable to that of SAHA. Kinetic enzyme assay and molecular modeling study suggested that the thiol interacts with the zinc ion in the active site of HDACs.

Keywords: molecularly targeted cancer therapy, histone deacetylase, inhibitor, hydroxamic acid, non-hydroxamate, zinc protein, drug design

はじめに

世界一の長寿国となった現在の日本において、主要死因別死亡率のトップは癌である。故に今日の癌研究では、患者の quality of life (QOL) 向上のため、より副作用の少ない抗癌剤の合成や探索が行われている。このような状況の中、最近注目されているのが分子標的治療薬である。最近のヒト細胞のバイオサイエンス研究の急速な進歩により、癌細胞の増殖あるいは悪性化の分子機構が明らかにされつつある。癌細胞の増殖に関与する分子の機能を制御することにより癌治療を行うという新しいコンセプトが癌の分子標的治療である。癌の分子標的治療薬は、癌細胞の異常増殖の原因となる分子あるいはそのシグナル伝達経路など、癌の原因により近い分子を標的とするため、従来の治療薬に比べ副作用が少ないことが期待される。現在、乳癌細胞に特異的に高発現する ErbB2 を標的とした癌抗体薬剤 trastuzumab¹⁾ や BCR/ABL タンパクチロシンキナーゼ阻害剤 imatinib (図 1)²⁾ などが癌の分子標的治療薬として日本で使用されている。



Imatinib

Fig.1 Structure of imatinib.

最近、癌治療における標的分子の一つとして注目されているのがヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) である。本稿では、新たな癌の分子標的治療薬の開発を目的として、我々が見出した非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬の設計, 合成及び生物活性について述べる。

1. HDAC とは

1.1 HDAC の機能, 構造と触媒メカニズム

HDAC はヒストンのアセチル化されたリシン残基からアセチル基を除去する反応を触媒し、遺伝子発現を調節する重要な酵素である³⁾。1999年に報告されたヒト HDAC ホモログである HDLP (HDAC-like protein)

の結晶構造⁴⁾, 2004年に発表されたヒトHDACのアイソザイムの一つであるHDAC8の結晶構造⁵⁾から, HDACの構造についてはある程度の知見が得られている。基質結合部位の内壁は疎水性残基によって形成され, 酵素活性中心には亜鉛イオンが存在しており, それに水分子が配位していることが明らかになっている。また, この結晶構造からHDACによるヒストン脱アセチル化のメカニズムは次のように推定されている。まず, 亜鉛及びHis140 (HDAC1の番号)により活性化された水分子が亜鉛に配位したヒストンのアセチル化されたリシン残基のカルボニル基を求核攻撃する。カルボニルの炭素は四面体構造をとり, 最終的にC-N結合の開裂が起きて, Asp191-His141から電荷移動によりプロトンを受け取り, 脱アセチル化が完結する(図2)。

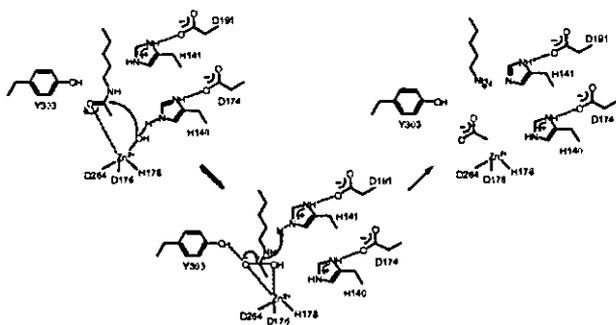


Fig.2 Proposed catalytic mechanism of acetylated lysine (H = His, D = Asp, Y = Tyr).

1.2 HDAC 阻害薬

HDACを阻害すると相対的にヒストンアセチル化酵素(HAT)の働きが強くなり, ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる(図3)。このヒストンハイパーアセチレーションにより, 多くの遺伝子の転写活性化が起こる⁶⁾。HDAC阻害により転写活性化される遺伝子の中で最も注目されているのが癌抑制に関わるp21遺伝子である。p21は, cyclin-dependent kinase-2を阻害し, 癌の細胞周期を停止する⁷⁾。このような癌抑制に関わる遺伝子の発現を制御するHDAC阻害薬は, 新たな癌の分子標的治療薬となり得る。

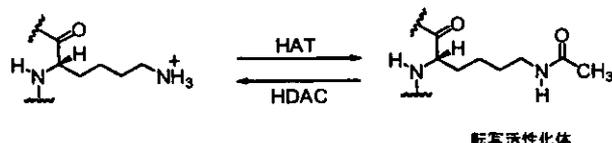


Fig.3 Mechanism of gene expression by the reversible acetylation of histone lysine residues.

これまでに報告されたHDAC阻害薬⁸⁾のほとんどはトリコスタチンA (TSA)⁹⁾やスベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA)¹⁰⁾ (図4)に代表されるようなヒ

ドロキサム酸系化合物であり, ヒドロキサム酸が酵素活性中心にある亜鉛に配位し, 基質であるアセチル化されたリシンに拮抗して阻害活性を示すと考えられている。しかしながら, 一般にヒドロキサム酸をzinc-binding group (ZBG)として持つ化合物は体内動態が悪く, 毒性の懸念も多い¹¹⁾。それ故に, より体内動態の改善した抗癌剤, より副作用の少ない抗癌剤になり得る非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の開発が望まれている。

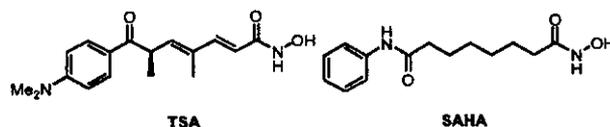


Fig.4 Structures of TSA and SAHA.

これまでに, Harvard大学のSchreiberらが報告した α -アミノアニリド¹²⁾やAbbott社で開発されたトリフルオロメチルケトン¹³⁾, Scripps研究所のSchultzらが見出したN-ホルミルヒドロキシアミン¹⁴⁾などの非ペプチド系低分子化合物がHDAC阻害活性を示すことが分かっているが(図5), それらの化合物は活性面でヒドロキサム酸系HDAC阻害薬を凌駕するものではない。このような背景を踏まえた上で, 我々は, 新たな癌の分子標的治療薬の開発を目的とし, 非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の創製を行った。

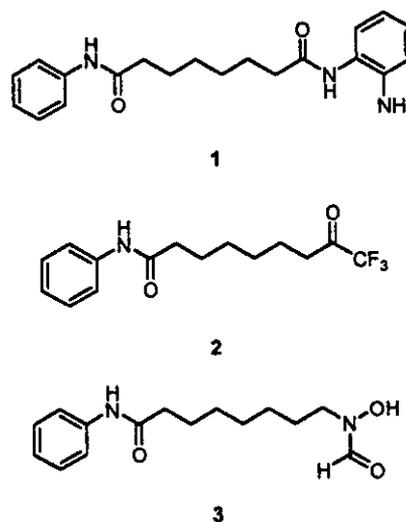


Fig.5 Previously reported non-hydroxamate HDAC inhibitors.

2. 非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の設計

我々は, 以下の5つの概念により図6に示すような非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の設計を行った。

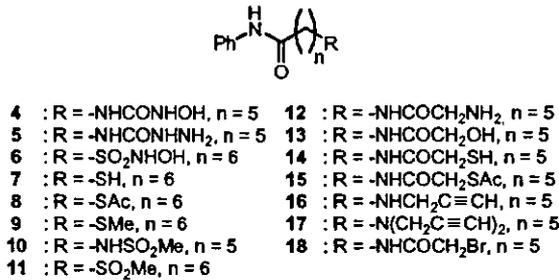


Fig. 6

2.1 酵素の三次元構造を基にした設計

HDLPあるいはHDAC8とSAHAの複合体のX線結晶構造解析の結果から、ヒドロキサム酸はHDACの活性中心にある亜鉛イオンに二座配位し、さらにチロシン及び2つのヒスチジン残基と水素結合することが分かっている(図7)^{4,5}。我々は、このデータを基に、亜鉛、チロシン、ヒスチジンと同様の相互作用をすることを考えられるヒドロキシウレア4、セミカルバジド5、ヒドロキシスルホンアミド6を設計した¹⁵。

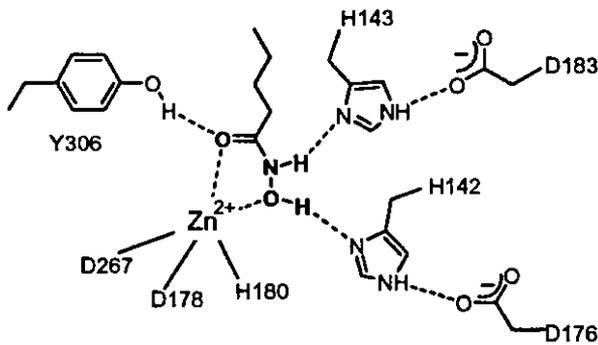


Fig. 7

2.2 亜鉛の硫黄親和性の高さを利用した設計

亜鉛イオンは硫黄親和性が高いことが知られており、特にチオールは他の亜鉛含有酵素阻害薬でZBGとしてよく用いられる官能基である¹⁷。我々は、低分子HDAC阻害薬でも同様の効果が期待できると考え、SAHAのヒドロキサム酸をチオールに変換した化合物7及びチオエステル8、メチルスルフィド9を設計した¹⁶。

2.3 遷移状態アナログの設計

HDACの基質であるアセチル化されたリシンがHDACにより脱アセチル化される際の遷移状態構造は、アミドカルボニルが亜鉛に配位した水分子から求核攻撃を受け、テトラヘドラルな炭素を含む構造になると考えられている(図2, 図8a)^{4,5}。我々は、このテトラヘドラルな炭素を硫黄に置き換えた構造、すなわちスルホン誘導体が遷移状態構造に類似していることに着目し(図8b)¹⁹、スルホンアミド10、スルホン11を遷移状態アナログとして設計した¹⁸。

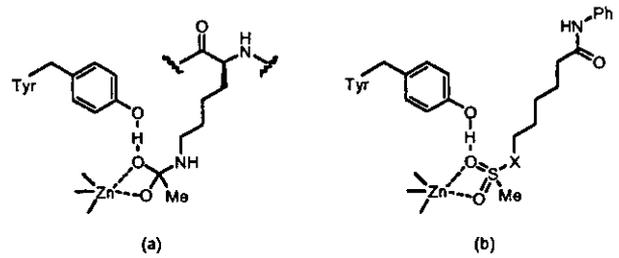


Fig. 8 The transition state proposed for HDACs (a), and models for the binding of sulfone derivatives (b).

2.4 酵素の触媒メカニズムを基にした設計

酵素反応部位に取り込まれた基質のアセチル化されたリシンは、亜鉛に配位した水分子から求核攻撃を受け、脱アセチル化されると考えられている(図2, 図9a)^{4,5}。そこで我々は、アセタミドのカルボニルのα位に不対電子をもつヘテロ原子を導入すれば、その原子が亜鉛に配位することにより、脱アセチル化に必要な水分子を加水分解の反応点から追い出してHDACを阻害することができると考え(図9b)、ヘテロ原子の置換したアセタミド12-15を基質アナログとして設計した¹⁸。

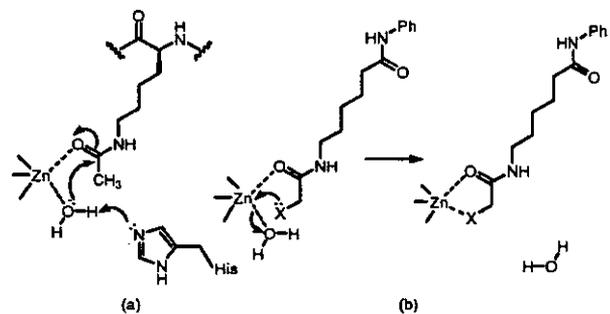


Fig. 9 The mechanism proposed for the deacetylation of acetylated lysine substrate (a), and a model for the binding of hetero atom-containing substrate analogues to zinc ion (b).

2.5 不可逆的阻害を意図した設計

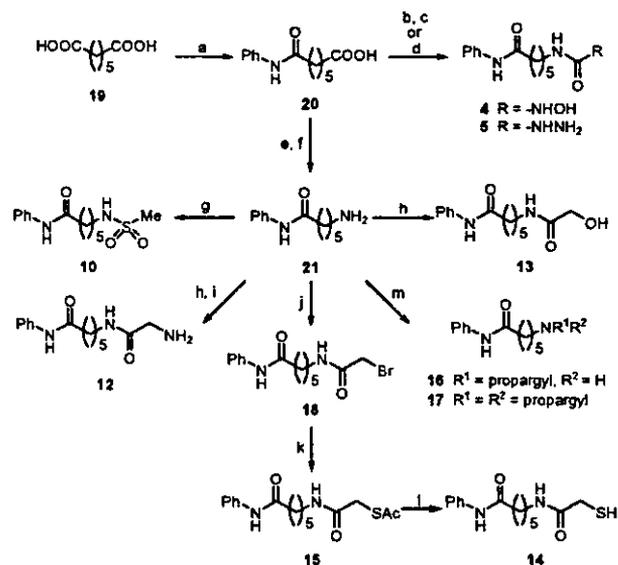
HDLP, HDAC8の3次元構造から、酵素の活性中心はヒスチジンなどの求核性の高いアミノ酸から構成されていることが分かっている^{4,5}。我々は、それらのアミノ酸残基と共有結合を形成し、不可逆的に酵素を阻害し得る化合物としてプロパルギルアミン16, 17, プロモアセタミド18を設計した¹⁵。

3. 非ヒドロキサム酸系化合物の合成

スキーム1に化合物4, 5, 10, 12-18の合成ルートを示す。化合物4, 5は、ジカルボン酸19から合成した。19をモノアミド化した後、Curtius転位により生成したイソシアネートにO-テトラヒドロピラニルヒドロキシルアミンあるいはヒドラジンを反応させ、O-テトラヒドロピラニルヒドロキシウレア及びセミカルバジド5を得た。O-テトラヒドロピラニルヒドロキシウレアを酸性条件で脱保護することによりヒドロキシ

ウレア **4** を合成した。

化合物 **10** 及び **12-18** は、共通の中間体であるアミン **21** から合成した。まず、カルボン酸 **20** を Curtius 転位を用いアミン **21** に変換し、**21** をメシル化することによりスルホンアミド **10** を得た。アミノアセタミド **12** は、アミン **21** と *N*-tert-ブトキシカルボニルグリシンをカップリングさせた後、脱保護を行うことにより、またヒドロキシアセタミド **13** は、**21** とグリコール酸をカップリングすることにより合成した。アミン **21** をプロモアセチルブロマイドと反応させ、プロモアセタミド **18** を得、つづいてポタシウムチオアセテートと反応させ、チオエステル **15** に導いた後、脱アセチル化を行い、メルカプトアセタミド **14** を得た。モノ及びジプロパルギル体 **16, 17** は、アミン **21** をプロパルギルブロマイドと反応させることにより合成した。

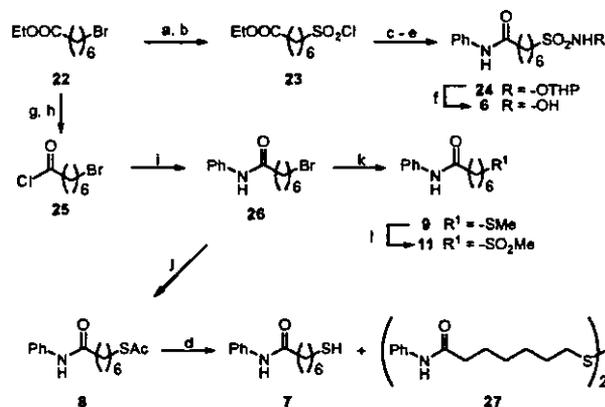


(a) aniline, 180°C, 49%; (b) diphenylphosphoryl azide (DPPA), Et₃N, toluene, reflux, and then *O*-(2-tetrahydropyranyl)hydroxylamine, reflux, 69%; (c) TsOH, MeOH, rt, 32%; (d) DPPA, Et₃N, benzene, reflux, and then hydrazine monohydrate, reflux, 52%; (e) DPPA, Et₃N, benzene, reflux, and then BrOH, reflux, 63%; (f) H₂, 5%Pd-C, MeOH, rt, 96%; (g) MsCl, pyridine, rt, 71%; (h) HOCH₂COOH or BocNHCH₂COOH, EDCl, HOBt, DMF, rt, 70% for **12**, 99% for **13**; (i) TFA, CHCl₃, rt, 84%; (j) BrCH₂COBr, Et₃N, THF, rt, 23%; (k) AcSK, EtOH, rt, 99%; (l) K₂CO₃, MeOH, rt, 62%; (m) propargyl bromide, K₂CO₃, MeOH, rt, 51% for **16**, 23% for **17**.

Scheme 1

化合物 **6-9** 及び **11** は、スキーム **2** に従い、ブロマイド **22** から合成した。**22** を亜硫酸ナトリウムでスルホン酸ナトリウムに変換後、塩化チオニルにより塩化スルホニル **23** へと導いた。**23** と *O*-テトラヒドロピラニルヒドロキシルアミンからスルホンアミドを得、エステルの加水分解、アミド化により得た **24** のテトラヒドロピラニル基を脱保護することでヒドロキシスルホンアミド **6** を合成した。チオール **7**、チオアセテート **8**、メチルスルフィド **9** 及びスルホン **11** の合成は、以下のように行った。まず、**22** を 7-プロモヘプタン

酸クロライド **25** に誘導し、アニリンと反応させることによりアミド体 **26** を得た。**26** のプロモ基をチオアセテートに置換し **8** を得た後、加水分解することにより、目的のチオール **7** を合成した。チオール **7** の合成の際、副産物としてジスルフィド **27** もわずかに (4%) 生成した。チオアセテート **8** を合成した時と同様の置換反応によりスルフィド **9** を得、*m*-クロロ過安息香酸で酸化することによりスルホン **11** に導いた。



(a) Na₂SO₃, EtOH, H₂O, reflux; (b) SOCl₂, DMF, toluene, reflux, 93% (two steps); (c) *O*-(2-tetrahydropyranyl)hydroxylamine, 4-(dimethylamino)pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 94%; (d) 2N aq NaOH, EtOH, rt, 86% for **6**, 87% for **7**; (e) aniline, EDCl, HOBt, DMF, rt, 88%; (f) TFA, CH₂Cl₂, 60°C, 61%; (g) LiOH·H₂O, EtOH, THF, H₂O, rt, 99%; (h) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂, rt; (i) aniline, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 87%; (j) AcSK, EtOH, reflux, 98%; (k) 15% aq NaSMe, EtOH, rt, 99%; (l) *m*-chloroperoxybenzoic acid, CH₂Cl₂, rt, 70%.

Scheme 2

4. HDAC 阻害活性評価

4.1 非ヒドロキサム酸系化合物の酵素阻害活性評価

設計・合成した非ヒドロキサム酸系化合物 **4-18** の HDAC 阻害活性評価は、HDAC Activity Assay/Drug discovery Kit (AK-500, BIOMOL)を用いて行った。結果を表 **1** に示す。

既知の HDAC 阻害薬である SAHA と α -アミノアニリド **1** の IC₅₀ 値は、それぞれ 0.28 μ M, 120 μ M であった。また、トリフルオロメチルケトン **2**, *N*-ホルミルヒドロキシアミン **3** は、それぞれ 6.7 μ M, 2.8 μ M の IC₅₀ 値で HDAC を阻害することが報告されている^{13,14}。

酵素の三次元構造を基に設計した化合物の中では、ヒドロキシウレア **4**, セミカルバジド **5** に HDAC 阻害活性が見られた¹⁵。しかしながら、それらの活性は、 α -アミノアニリド **1** と同等であったものの、SAHA やトリフルオロメチルケトン **2**, *N*-ホルミルヒドロキシアミン **3** には及ばなかった。

つぎに、亜鉛の硫黄親和性を利用して設計したチオール **7** の活性を調べた。チオールは一座配位で亜鉛にキレートするため、二座配位でキレートするヒドロキサム酸よりも亜鉛への配位能は小さいと考えられている。実際に、別の亜鉛含有酵素であるマトリックスポ

ロテイナーゼの阻害薬においては、チオール系阻害薬はヒドロキサム酸系阻害薬に比べ約 10 倍弱い酵素阻害活性しか示さないことが分かっている^{17b)}。しかしながら、チオール **7** は HDAC に対しては予想以上の強い阻害活性を示した¹⁶⁾。チオール **7** の HDAC 阻害活性は、 $IC_{50} = 0.21 \mu\text{M}$ と既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬である *o*-アミノアニリド **1**、トリフルオロメチルケトン **2**、*N*-ホルミルヒドロキシルアミン **3** の活性を上回り、SAHA の活性と同等以上であった。*S*-アセチル体 **8**、*S*-メチル体 **9** では活性が减弱したことから、生理条件下で生成するチオレートアニオンが亜鉛の配位に参与していることが予想された。

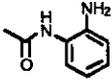
遷移状態アナログとして HDAC を阻害することを期待したスルホン誘導体 **10**, **11** では、スルホン **10** が $IC_{50} = 230 \mu\text{M}$ で HDAC を阻害したが¹⁸⁾、活性は SAHA や既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬 **1-3** には及ばなかった。

酵素の触媒メカニズムを基に設計したアセタミド **12-15** では、アミノアセタミド **12**、ヒドロキシアセタミド **13** は阻害活性を示さなかったが、メルカプトアセタミド **14** に強い活性が見られた¹⁸⁾。その活性は、*o*-アミノアニリド **1**、トリフルオロメチルケトン **2**、*N*-ホルミルヒドロキシルアミン **3** を上回り、SAHA に匹敵した。*S*-アセチル体 **15** では活性が低下したことから、チオール **7** の場合と同様にチオールのイオン化が活性発現の重要な要素であることが示唆された。

不可逆的阻害を意図して設計した化合物 **16-18** の中では、プロモアセタミド **18** が HDAC 阻害活性を示した¹⁵⁾。しかし、活性は、*o*-アミノアニリド **1** を上回ったが、SAHA には及ばなかった。

以上の結果から、低分子 HDAC 阻害薬において、チオール及びメルカプトアセタミドがヒドロキサム酸に匹敵する活性を持つ ZBG であることが分かった。これら両官能基は、低分子 HDAC 阻害薬において、ヒドロキサム酸と同等の活性を示した初めての ZBG である。

Table 1 HDAC Inhibition Data for SAHA and SAHA-based Non-hydroxamtes^a

compd	R	n	% inhbtn at 100 μM	IC_{50} (μM)
SAHA ^b	-CONHOH	6	100	0.28
1 ^c		6	48	120
2	-COCF ₃	6	ND	6.7 ^d
3		7	ND	2.8 ^e
4	-NHCONHOH	5	58	80
5	-NHCONHNH ₂	5	35	150
6	-SO ₂ NHOH	6	14	>100
7	-SH	6	100	0.21
8	-SAc	6	85	7.1
9	-SMe	6	11	>100
10	-NHSO ₂ Me	5	10	7500
11	-SO ₂ Me	6	33	230
12	-NHCOCH ₂ NH ₂	5	6	>100
13	-NHCOCH ₂ OH	5	0	>100
14	-NHCOCH ₂ SH	5	99	0.39
15	-NHCOCH ₂ Sac	5	72	22
16		6	16	>100
17		6	8	>100
18	-NHCOCH ₂ Br	6	79	14

^a Values are means of at least three experiments. ^b Prepared as described in ref 20. ^c Prepared as described in ref 12. ^d Data taken from the literature (ref 13). ^e Data taken from the literature (ref 14). ND = No Data.

4.2 酵素阻害機構の解析

今回我々が見出した低分子 HDAC 阻害薬は、酵素の活性中心にある亜鉛との相互作用を意図して設計したものである。そこで、最も高い HDAC 阻害活性が見られたチオール **7** 存在下での酵素反応速度の解析を行い、Lineweaver-Burk のプロットにより HDAC 阻害機構を調べた (図 10)²¹⁾。反応速度の逆数を縦軸に、基質濃度の逆数を横軸にとり、チオール **7** の濃度を変化させてプロットしたところ、それらの直線は縦軸上で交わり、その結果、チオール **7** の HDAC 阻害機構は可逆的競合阻害であることが明らかとなった ($K_i = 0.11 \mu\text{M}$)。システインは、HDAC の基質結合部位を構成するアミノ酸には含まれていないことから、化合物 **7** のスルフィドリル基は HDAC のシステイン残基とジスルフィド結合を形成することなく、活性中心の亜鉛と相互作用していると考えられる。

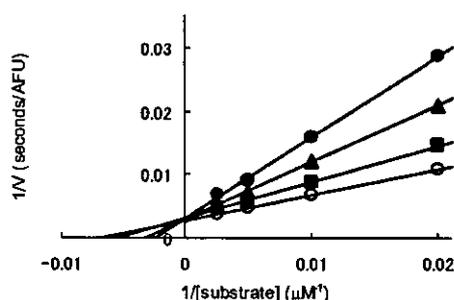


Fig.10 Reciprocal rate vs reciprocal acetylated lysine substrate concentration in the presence of 0.3 (●), 0.1 (▲), 0.03 (■), and 0 (○) μM of **7**.

つぎに, Macromodel 8.1²²⁾を用い, チオール**7**のHDAC8 活性中心における安定コンホメーションを計算した(図11)。チオール**7**の硫黄原子は, 亜鉛から2.35Å, Tyr306のヒドロキシル基から2.24Å, His142に水素結合している水分子から2.66Åの距離に位置していることから, チオール**7**は, 亜鉛および2つのアミノ酸残基(Tyr306, His142)と相互作用することによりHDACを阻害していると推定された。

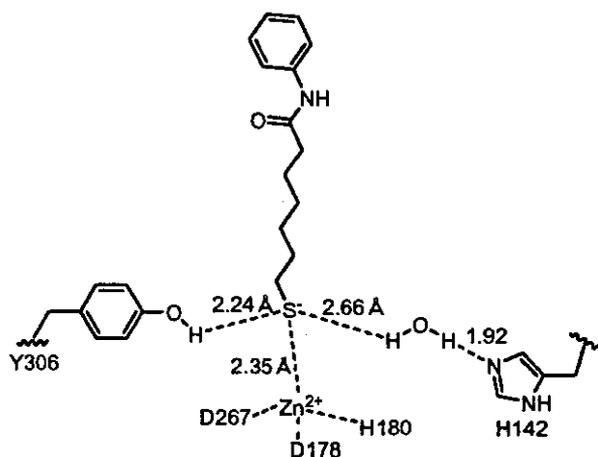


Fig.11 View of the conformation of **7** docked in the HDAC8 catalytic core.

同様に, メルカプトアセタミド**14**のHDAC 阻害機構も Lineweaver-Burk のプロットにより競合阻害であることが示された($K_i=0.78\mu\text{M}$) (図12)¹⁶⁾。メルカプトアセタミド**14**のHDAC8 活性中心における安定コンホメーションを計算したところ(図13), メルカプトアセタミドの酸素原子と硫黄原子が亜鉛に二座配位し(S-Zn, 2.44 Å; CO-Zn, 2.04 Å), 亜鉛に配位していた水分子が亜鉛から遠ざかった状態(H₂O-Zn, 4.95 Å)が安定構造となった。この結果から, 設計の際に期待した通り, 化合物**14**のメルカプトアセタミドが亜鉛に配位することにより, 脱アセチル化に必要な水分子を加水分解の反応点から引き離し, 自身が加水分解されることなく, HDACを阻害していると考えられる。

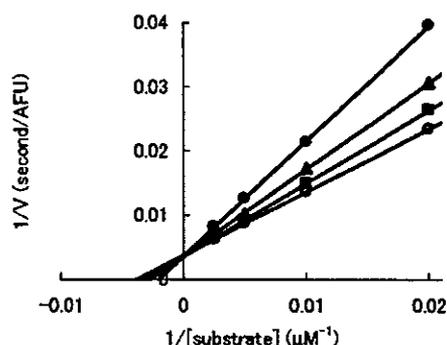


Fig.12 Reciprocal rate vs reciprocal acetyl lysine substrate concentration in the presence of 1 (●), 0.3 (▲), 0.1 (■), and 0 (○) μM of **14**.

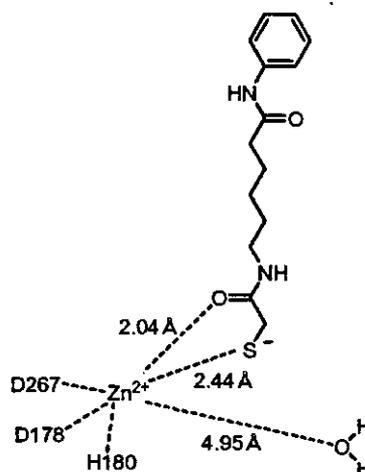
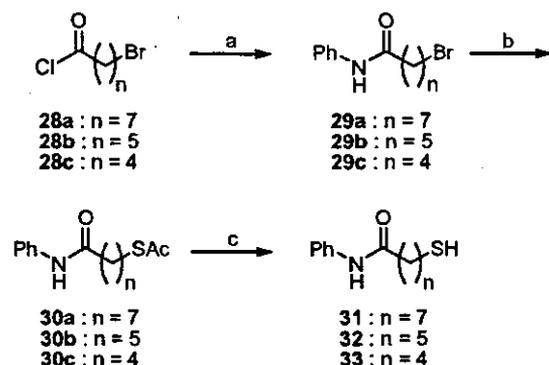


Fig.13 View of the conformation of **14** docked in the HDAC8 catalytic core.

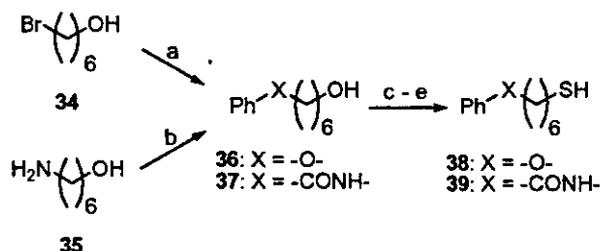
4.3 チオール系HDAC 阻害薬の構造活性相関¹⁶⁾

つぎに, 高い活性を有するチオール**7**を基本構造としてリンカー部位を変換した化合物のHDAC 阻害活性を調べた。**7**の炭素鎖の長さを変えた化合物**31-33**の合成は, スキーム3に示すようにチオール**7**の合成(スキーム2)と同じ方法で行った。**7**のアミド基をエーテルに変換した化合物**38**, 逆アミドに変換した化合物**39**はスキーム4に従って合成した。ブロマイド**34**を炭酸カリウム存在下, フェノールと反応させエーテル**36**を得, アミン**35**を安息香酸と縮合させることによりアミド**37**を得た。アルコール**36**, **37**をブロマイドに変換後, ポタシウムチオアセテートを反応させ, 引き続いて加水分解することにより目的のエーテル**38**, 逆アミド**39**を合成した。



(a) aniline, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 90–99%; (b) AcSK, EtOH, reflux, 88–96%; (c) 2N aq NaOH, EtOH, rt, 47–61%.

Scheme 3



(a) Phenol, K₂CO₃, DMF, 80°C, 96%; (b) benzoic acid, EDCI, HOBT, DMF, rt, 63%; (c) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, 0°C, 63–99%; (d) AcSK, EtOH, rt, 47–98%; (e) 2N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 46–64%.

Scheme 4

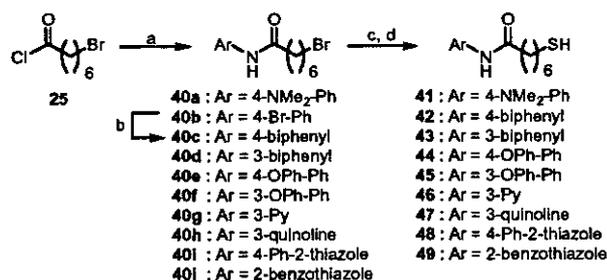
7 のリンカー部位を変換した化合物 31–33, 38, 39 の HDAC 阻害活性を評価した結果を表 2 に示した。炭素鎖の数が 6 の場合 (7) に最も強い活性を示し, 5 の場合 (32) でも活性は保持されることが分かった。炭素鎖の長さが 6 の化合物が最も強い活性を示すという結果は, ZBG がヒドロキサム酸の場合の構造活性相関²³⁾と類似しており, チオール系阻害薬は, ヒドロキサム酸系阻害薬と同様の結合様式で HDAC を阻害することを示唆している。また, フェニル基と炭素鎖をつなぐアミド基をエーテルに変換した化合物 38 では活性は減弱したが, 逆アミドに変換した化合物 39 では活性は保持されることが明らかとなった。

Table 2 Effect of Linker Variation on HDAC Inhibitory Activity of Thiols^a

Ph-X- C_nSH			
compd	X	n	IC ₅₀ (μM)
7	-NHCO-	6	0.21
31	-NHCO-	7	1.5
32	-NHCO-	5	0.37
33	-NHCO-	4	6.2
38	-O-	6	11
39	-CONH-	6	0.36

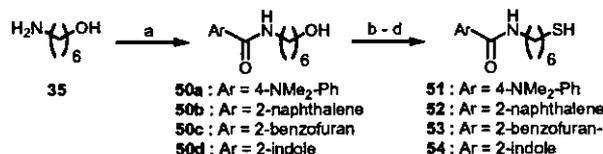
^a Values are means of at least three experiments.

つづいて, スキーム 5, 6 に従い, チオール 7, 39 のフェニル基を他の芳香環に変換した化合物 41–49, 51–54 を合成し, HDAC 阻害活性を調べた (表 3)。



(a) ArNH₂, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 25–99%; (b) PhB(OH)₂, Pd(PPh₃)₄, NaHCO₃, 1-methyl-2-pyrrolidinone, H₂O, 80°C, 18%; (c) AcSK, EtOH, 60°C, 84–96%; (d) 2N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 59–90%.

Scheme 5



(a) ArCOOH, EDCI, HOBT, DMF, rt, 61–96%; (b) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, 0°C, 25–89%; (c) AcSK, EtOH, rt, 86–99%; (d) 2N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 28–74%.

Scheme 6

アミド構造を有する化合物 (41–49) では, ベンゼン環の 4 位に置換基を導入した化合物で活性が低下する傾向にあった。具体的には, 4-ジメチルアミノフェニル 41, 4-ビフェニル 42, 4-フェノキシフェニル 44 は, フェニル体 7 に比べ 3–10 倍活性が低下した。逆に, 7 のベンゼン環の 3 位にフェニル基を導入した化合物 43 では, 約 3 倍活性が上昇し (IC₅₀ = 0.075 μM), 同じく 3 位にフェノキシ基を導入した化合物 45 でも活性は保持された。7 のベンゼン環を複素環に変換した化合物では, 3-ピリジン 46, 4-フェニル-2-チアゾール 48, 2-ベンゾチアゾール 49 で活性が保持, あるい

は、やや上昇したという結果に対し、3-キノリン **47** が $IC_{50} = 0.072 \mu\text{M}$ と、アミド化合物の中で最も強い HDAC 阻害活性を示した。逆アミド構造を有する化合物 (**51–54**) では、4-ジメチルアミノフェニル体 **51** を除いた 3 つの化合物 **52**, **53**, **54** でフェニル体 **39** よりも強い活性が見られた。特に、ナフタレン置換した化合物 **52**, ベンゾフラン置換した化合物 **53** では、フェニル体 **39** に比べ約 4 倍の活性上昇を示した (それぞれ、 $IC_{50} = 0.085 \mu\text{M}$, $0.079 \mu\text{M}$)。結果として、3-ピフェニル体 **43**, 3-キノリン体 **47**, 2-ナフタレン体 **52**, 2-ベンゾフラン体 **53** は、SAHA と比較して 3–4 倍強い HDAC 阻害活性を示した。

Table 3 Effect of Aromatic Group Variation on HDAC Inhibitory Activity of Thiols^a

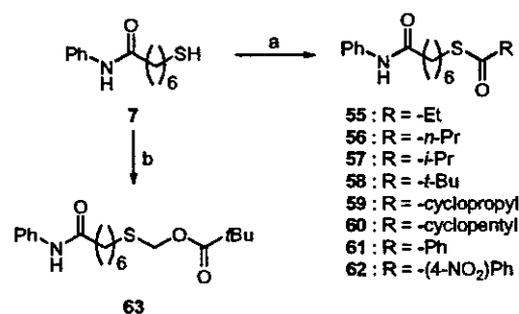
Ar-X-SH			
compd	Ar	X	IC_{50} (μM)
7	Ph-	-NHCO-	0.21
41		-NHCO-	1.2
42		-NHCO-	1.1
43		-NHCO-	0.075
44		-NHCO-	0.62
45		-NHCO-	0.21
46		-NHCO-	0.11
47		-NHCO-	0.072
48		-NHCO-	0.17
49		-NHCO-	0.34
39	Ph-	-CONH-	0.36
51		-CONH-	0.61
52		-CONH-	0.085
53		-CONH-	0.079
54		-CONH-	0.10

^a Values are means of at least three experiments.

5. チオール系 HDAC 阻害薬の癌細胞増殖抑制活性評価

5.1 チオール **7** 及びその誘導体の癌細胞増殖阻害作用

チオール系 HDAC 阻害薬の抗癌剤としての有効性を確かめるため、癌細胞増殖抑制試験を行った²¹⁾。まずチオール **7** の癌細胞増殖抑制試験を行った。癌細胞には、肺癌細胞である NCI-H460 細胞を用いた。その結果、チオール **7** は NCI-H460 細胞に対し、 $50 \mu\text{M}$ でわずか 34% の阻害作用しか示さなかった。チオール **7** は強い HDAC 阻害活性を示すにもかかわらず癌細胞増殖抑制試験で弱い増殖阻害活性しか示さなかった原因の一つとして、チオール **7** の細胞膜透過性の低さが考えられる。そこで、チオール **7** を *S*-アシル化あるいは *S*-アルキル化してプロドラッグ体を合成し (スキーム **7**)、それらの癌細胞増殖抑制効果を調べた。



(a) RCOCl, 4-(dimethylamino)pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 68–99%; (b) NaH, chloromethyl pivalate, DMF, 0°C to rt, 32%.

Scheme 7

プロドラッグ化体の癌細胞増殖抑制試験の結果を表 **4** に示す。細胞内の還元条件でチオール **7** を生成することが期待されたジスルフィド **27** は、チオール **7** に比べ活性が減弱したが、*S*-アシル化した化合物 **8**, **55–62** でチオール **7** を上回る活性が見られた。特に *S*-イソブチリル体 **57** が $EC_{50} = 20 \mu\text{M}$ と最も強い活性を示した。化合物 **57** 自身の HDAC 阻害活性は、 $IC_{50} = 56 \mu\text{M}$ とチオール **7** ($IC_{50} = 0.21 \mu\text{M}$) よりも約 270 倍小さいことから、*S*-アシル化体は、チオール体と比べ脂溶性が高いため細胞膜をより効率的に透過し、細胞内で加水分解され強い HDAC 阻害活性を持つチオール **7** に変換されたと考えられる²⁴⁾。また、*S*-ピバル酸メチル化した化合物²⁵⁾ **63** にも活性が見られたが、その活性は *S*-イソブチリル体 **57** に比べやや弱かった。

Table 4 Cell Growth Inhibition Data on NCI-H460 Cells for Compound **7** and its *S*-Modified Prodrugs^a

compd	R	EC ₅₀ (μM)
7	-H	>50 ^b
27		>50 ^c
8	-Ac	36
55	-COEt	28
56	-CO <i>n</i> -Pr	22
57	-CO <i>i</i> -Pr	20
58	-CO <i>t</i> -Bu	>50 ^d
59		27
60		21
61	-Bz	25
62		24
63	-CH ₂ COO <i>t</i> -Bu	25

^a Values are means of at least two experiments. ^b 34% inhibition at 50 μM. ^c 10% inhibition at 50 μM. ^d 42% inhibition at 50 μM.

つぎに、表 3 で示した強い HDAC 阻害活性を持つ化合物のスルフィドリル基をイソブチリル化した化合物 **64-72** を合成し (スキーム 8), それらの NCI-H460 細胞に対する増殖抑制活性を調べた (表 5)。



- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 43: Ar = 3-biphenyl, X = -NHCO- | 64: Ar = 3-biphenyl, X = -NHCO- |
| 45: Ar = 3-OPh-Ph, X = -NHCO- | 65: Ar = 3-OPh-Ph, X = -NHCO- |
| 46: Ar = 3-Py, X = -NHCO- | 66: Ar = 3-Py, X = -NHCO- |
| 47: Ar = 3-quinoline, X = -NHCO- | 67: Ar = 3-quinoline, X = -NHCO- |
| 48: Ar = 4-Ph-2-thiazole, X = -NHCO- | 68: Ar = 4-Ph-2-thiazole, X = -NHCO- |
| 49: Ar = 2-benzothiazole, X = -NHCO- | 69: Ar = 2-benzothiazole, X = -NHCO- |
| 52: Ar = 2-naphthalene, X = -CONH- | 70: Ar = 2-naphthalene, X = -CONH- |
| 53: Ar = 2-benzofuran, X = -CONH- | 71: Ar = 2-benzofuran, X = -CONH- |
| 54: Ar = 2-indole, X = -CONH- | 72: Ar = 2-indole, X = -CONH- |

(a) isobutyryl chloride, 4-(dimethylamino)pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 77-99%.

Scheme 8

その結果、化合物 **65** を除く全ての化合物でフェニル体 **57** を上回る活性が見られ、特に 3-ピフェニル **64**, 3-ピリジン **66**, 4-フェニル-2-チアゾール **68** では EC₅₀ 値が 2-3 μM と高い活性を示した。

Table 5 Cell Growth Inhibition Data on NCI-H460 Cells for Compound **57** and its derivatives^a

compd	Ar	X	EC ₅₀ (μM)
57	Ph-	-NHCO-	20
64		-NHCO-	2.8
65		-NHCO-	25
66		-NHCO-	2.9
67		-NHCO-	8.0
68		-NHCO-	2.1
69		-NHCO-	9.5
70		-CONH-	12
71		-CONH-	4.1
72		-CONH-	12

^a Values are means of at least two experiments.

NCI-H460 細胞に対し最も強い増殖抑制活性を示した化合物 **68** 及び SAHA について、さらに 9 種類の癌細胞に対する増殖抑制活性評価を行った。癌細胞には、乳癌細胞である MDA-MB-231 細胞、脳腫瘍細胞である SNB-78 細胞、大腸癌細胞である HCT116 細胞、肺癌細胞である NCI-H226 細胞、メラノーマ細胞である LOX-IMVI 細胞、卵巣癌細胞である SK-OV-3 細胞、腎癌細胞である RXF-631L 細胞、胃癌細胞である St-4 細胞、前立腺癌細胞である DU-145 細胞を用いた (表 6)。その結果、化合物 **68** は、9 種類全ての癌細胞に対し増殖阻害活性を示し、その活性は現在臨床開発が進められている SAHA に匹敵するものであった (SAHA の平均 EC₅₀ = 3.7 μM, **68** の平均 EC₅₀ = 3.8 μM)。

Table 6 Growth Inhibition of Various Cancer Cells Using SAHA and Compound **68**^a

cell	SAHA EC ₅₀ (μM)	68 EC ₅₀ (μM)
MDA-MB-231 Breast Cancer	1.5	2.3
SNB-78 Central Nervous System	16	9.1
HCT116 Colon Cancer	0.58	3.0
NCI-H226 Lung Cancer	2.6	2.6
LOX-IMVI Melanoma	1.3	1.1
SK-OV-3 Ovarian Cancer	2.5	4.5
RXF-631L Renal Cancer	2.0	2.4
St-4 Stomach Cancer	5.2	5.0
DU-145 Prostate Cancer	1.6	4.5
mean	3.7	3.8

^a Values are means of at least two experiments.

5.2 化合物 68 の癌細胞増殖阻害機構

先に述べたように、HDAC 阻害薬により HDAC の機能を停止させると相対的に HAT の働きが強くなり、ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる (図 3)。このヒストンのハイパーアセチレーションにより、癌抑制に関わる p21 遺伝子の転写活性化が起こることが知られている。そこで、化合物 68 の癌細胞増殖抑制作用が細胞内の HDAC 阻害に依るものであることを確かめるため、ウエスタンブロット解析によりヒストンの高アセチル化及び p21^{WAF1/CIP1} の誘導を調べた (図 14)。その結果、化合物 68 は、用量依存的にヒストンを高アセチル化し、p21^{WAF1/CIP1} を誘導していることが分かった。この結果から、化合物 68 の癌細胞増殖阻害作用は、細胞内の HDAC 阻害に関与していることが示唆された。

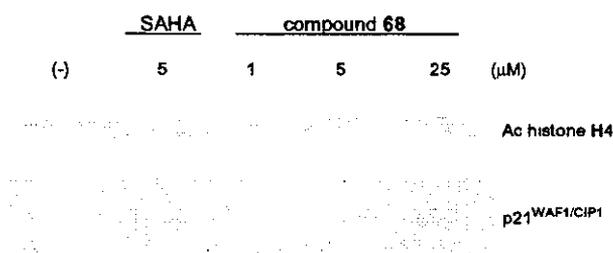


Fig.14. Western blot analysis of histone hyperacetylation and p21^{WAF1/CIP1} induction in HCT 116 cells produced by compound 68 and by reference compound SAHA.

以上の結果から、チオール系 HDAC 阻害薬のプロドラッグ化体の分子標的治療薬としての有効性が確認された。

おわりに

ヒト悪性腫瘍の発生の分子機構が明らかになるにつれ、HDAC 阻害薬の分子標的治療薬としての期待はますます高まっていくと思われる。現在までに 18 種類の HDAC が同定されているが、それぞれの HDAC のアイソザイムに特異性の高い阻害薬は生物学研究の重要なツールとしてだけでなく、副作用の少ない抗癌剤としても期待される。面白いことに、非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬は、HDAC 6 に対する感受性が低いことが最近報告され²⁶⁾、非ヒドロキサム酸系 ZBG のアイソザイム特異性における重要性が示された。本研究により見出されたチオールをはじめとする ZBG は、アイソザイム特異的 HDAC 阻害薬開発のための新規リード化合物として有用であると考えられる。我々の見出した非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬を基に、如何にしてアイソザイム選択的 HDAC 阻害薬を見出し癌治療に結び付けていくかが今後の重要課題であると認識している。

謝辞 本論文の研究成果は、参考文献中に記した共同研究者諸氏のご協力によるものであり、ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究は厚生労働科学研究費補助金、持田記念医学薬学振興財団研究助成の支援を

受けたものであり、これらの助成に厚く感謝いたします。

文献

- 1) H. J. Burstein, I. Kuter, S. M. Campos, R. S. Gelman, L. Tribou, L. M. Parke, J. Manola, J. Younge, U. Matulonis, C. A. Bunnell, A. H. Partridge, P. G. Richardson, K. Clarke, L. N. Shulman, E. P. Winer, *J. Clin. Oncol.*, **19**, 2722 (2001)
- 2) J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson, *Science*, **304**, 1497 (2004)
- 3) (a) C. M. Grozinger, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.*, **9**, 3 (2002); (b) T. Kouzarides, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 40 (1999); (c) C. A. Hassig, S. L. Schreiber, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 300 (1997)
- 4) M. S. Firmin, J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow, N. P. Pavletich, *Nature*, **401**, 188 (1999)
- 5) (a) J. R. Somoza, R. J. Skene, B. A. Katz, C. Mol, J. D. Ho, A. J. Jemings, C. Luong, A. Arvai, J. J. Buggy, E. Chi, J. Tang, B.-C. Sang, E. Verner, R. Wynands, E. M. Leahy, D. R. Dougan, G. Snell, M. Navre, M. W. Knuth, R. V. Swanson, D. E. McRee, L. W. Tari, *Structure*, **12**, 1325 (2004); (b) A. Vannini, C. Volpari, G. Filocamo, E. C. Casavola, M. Brunetti, D. Renzoni, P. Chakravarty, C. Paolini, R. D. Francesco, P. Gallinari, C. Steinkühler, S. D. Marco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 15064 (2004)
- 6) J. Taunton, C. A. Hassig, S. L. Schreiber, *Science*, **272**, 408 (1996)
- 7) L. C. Sambucetti, D. D. Fischer, S. Zabludoff, P. O. Kwon, H. Chamberlin, N. Trogani, H. Xu, D. Cohen, *J. Biol. Chem.*, **274**, 34940 (1999)
- 8) (a) T. A. Miller, D. J. Witter, S. Belvedere, *J. Med. Chem.*, **46**, 5097 (2003); (b) M. Yoshida, A. Matsuyama, Y. Komatsu, N. Nishino, *Curr. Med. Chem.*, **10**, 2351 (2003); (c) T. A. Miller, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **14**, 791 (2004)
- 9) M. Yoshida, S. Horinouchi, T. Beppu, *BioEssays*, **17**, 423 (1995)
- 10) V. M. Richon, Y. Webb, R. Merger, T. Sheppard, B. Jursic, L. Ngo, F. Civoli, R. Breslow, R. A. Rifkind, P. A. Marks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 5705 (1996)
- 11) (a) G. J. Mulder, J. H. Meerman, *Environ. Health Perspect.*, **49**, 27 (1983); (b) S. Vassiliou, A. Mucha, P. Cuniassse, D. Georgiadis, K. Lucet-Levarmier, F. Beau, R. Kannan, G. Murphy, V. Knaeuper, M. C. Rio, P. Basset, A. Yiotakis, V. Dive, *J. Med. Chem.*, **42**, 2610 (1999)
- 12) J. C. Wong, R. Hong, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 5586 (2003)

- 13) R. R. Frey, C. K. Wada, R. B. Garland, M. L. Curtin, M. R. Michaelides, J. Li, L. J. Pease, K. B. Glaser, P. A. Marcotte, J. J. Bouska, S. S. Murphy, S. K. Davidsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3443 (2002)
- 14) T. Y. H. Wu, C. Hassig, Y. Wu, S. Ding, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 449 (2004)
- 15) T. Suzuki, Y. Nagano, A. Matsuura, A. Kohara, S. Ninomiya, K. Kohda, N. Miyata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 4321 (2003)
- 16) T. Suzuki, A. Kouketsu, A. Matsuura, A. Kohara, S. Ninomiya, K. Kohda, N. Miyata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 3313 (2004)
- 17) (a) M. A. Ondetti, B. Rubin, D. W. Cushman, *Science*, **196**, 441 (1977); (b) M. Whittaker, C. D. Floyd, P. Brown, A. J. H. Gearing, *Chem. Rev.*, **99**, 2735 (1999)
- 18) T. Suzuki, A. Matsuura, A. Kouketsu, H. Nakagawa, N. Miyata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 331 (2005)
- 19) W. J. Moree, G. A. van der Marel, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 409 (1991)
- 20) A. Mai, M. Esposito, G. Sbardella, S. Massa, *Org. Prep. Proced. Int.*, **33**, 391 (2001)
- 21) T. Suzuki, Y. Nagano, A. Kouketsu, A. Matsuura, S. Maruyama, M. Kurotaki, H. Nakagawa, N. Miyata, *J. Med. Chem.*, **48**, 1019 (2005)
- 22) F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, *J. Comput. Chem.*, **11**, 440 (1990)
- 23) (a) M. Jung, G. Brosch, D. Kölle, H. Scherf, C. Gerhäuser, P. Loidl, *J. Med. Chem.*, **42**, 4669 (1999); (b) S. W. Remiszewski, L. C. Sambucetti, P. Atadja, K. W. Bair, W. D. Cornell, M. A. Green, K. L. Howell, M. Jung, P. Kwon, N. Trogani, H. Walker, *J. Med. Chem.*, **45**, 753 (2002)
- 24) V. Gagnard, A. Leydet, A. Morere, J.-L. Montero, I. Lefebvre, G. Gosselin, C. Pannecoque, E. De Clercq, *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 1393 (2004)
- 25) I. Barber, B. Rayner, J.-L. Imbach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 563 (1995)
- 26) K. B. Glaser, J. Li, L. J. Pease, M. J. Staver, P. A. Marcotte, J. Guo, R. R. Frey, R. B. Garland, H. R. Heyman, C. K. Wada, A. Vasudevan, M. R. Michaelides, S. K. Davidsen, M. L. Curtin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 683 (2004)

[所属・肩書]名古屋市立大学大学院薬学研究科・助教授 薬学博士

[経歴]1995年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了, 同年東京大学薬学部助手, 1995-2004年独立行政法人放射線医学総合研究所研究員・同主任研究員, 1999-2001年ジョーンズホプキンス大学医学部博士研究員, 2004年より現職。[専門]生物有機化学。[連絡先]e-mail:deco@phar.nagoya-cu.ac.jp

[氏名]宮田直樹

[所属・肩書]名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授 薬学博士

[経歴]1971年東京大学薬学部卒業, 1976年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了, 1976-82年東京大学薬学部助手, 1982年より厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所室長, 1991年より同所有機化学部長, 2001年より現職。[専門]有機化学。[連絡先]e-mail:miyata-n@phar.nagoya-cu.ac.jp

PROFILE

[氏名]鈴木孝禎

[所属・肩書]名古屋市立大学大学院薬学研究科・助手

[経歴]1995年東京大学薬学部薬学科卒業, 1997年東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了, 同年日本たばこ産業(株)医薬総合研究所入社, 2003年より現職。[専門]生物有機化学, 創薬化学。[連絡先]e-mail:suzuki@phar.nagoya-cu.ac.jp

[氏名]中川秀彦

Thiol-based SAHA analogues as potent histone deacetylase inhibitors

Takayoshi Suzuki,^{a,*} Akiyasu Kouketsu,^a Azusa Matsuura,^a Arihiro Kohara,^b Shin-ichi Ninomiya,^b Kohfuku Kohda^a and Naoki Miyata^{a,*}

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Aichi, Nagoya 467-8603, Japan

^bDaiichi Pure Chemicals Co., Ltd, 2117 Muramatsu, Ibaraki, Tokai 319-1182, Japan

Received 21 February 2004; revised 22 March 2004; accepted 23 March 2004

Abstract—In order to find novel nonhydroxamate histone deacetylase (HDAC) inhibitors, a series of thiol-based compounds modeled after suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) was synthesized, and their inhibitory effect on HDACs was evaluated. Compound **6**, in which the hydroxamic acid of SAHA was replaced by a thiol, was found to be as potent as SAHA, and optimization of this series led to the identification of HDAC inhibitors more potent than SAHA.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The reversible acetylation of the side chain of specific histone lysine residues by histone deacetylases (HDACs) and histone acetyl transferases (HATs) is an important regulator of gene expression.¹ Histone hyperacetylation by HDAC inhibition neutralizes the positive charge of the lysine side chain, and is thought to be associated with change of the chromatin structure and the consequential transcriptional activation of a number of genes.² One important outcome of histone hyperacetylation is induction of the cyclin-dependent kinase inhibitory protein p21^{Waf1/Cip1}, which causes cell cycle arrest.³ Indeed, HDAC inhibitors such as trichostatin A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) (Fig. 1) have been reported to inhibit cell growth,^{4–6} induce terminal differentiation in tumor cells,^{4,5} and prevent the formation of tumors in mice.⁷ Therefore, HDACs have been viewed as attractive targets for anticancer drug development. A number of structurally diverse HDAC inhibitors have been reported⁸ and most of them belong to hydroxamic acid derivatives, typified by TSA and SAHA, which chelate the zinc ion in the active site in a bidentate fashion through its CO and OH groups.⁹ Although hydroxamic acids are frequently employed as zinc-binding groups (ZBGs), they often present metabolic and pharmacokinetic problems such as glucuron-

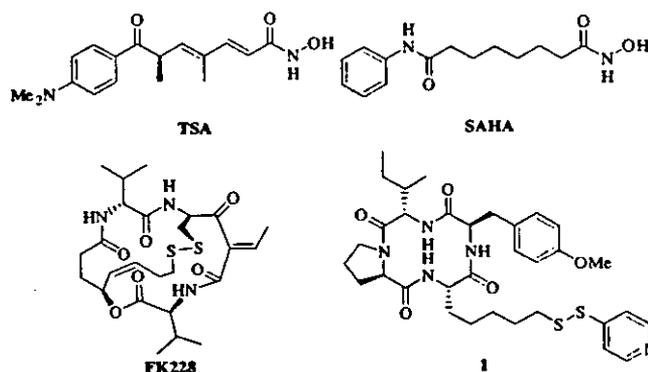


Figure 1. HDAC inhibitors.

idation, sulfation, and enzymatic hydrolysis that result in a short in vivo half-life.^{10,11} Because of such concerns with the metabolic stability associated with hydroxamic acids, it has become increasingly desirable to find replacement groups that possess strong inhibitory action against HDACs. Thus far, *o*-aminoanilides,^{12–14} electrophilic ketones,^{15–17} bromoacetamides,¹⁸ semicarbazides¹⁸ (Fig. 2), and *N*-formyl hydroxylamines¹⁹ have been reported as small molecule nonhydroxamate HDAC inhibitors. However, they have reduced potency as compared to hydroxamate inhibitors, and unfortunately, electrophilic ketones have a metabolic disadvantage in that they are readily reduced to inactive alcohols.^{15–17} We therefore initiated a search for

Keywords: HDAC; SAHA; Enzyme inhibitor; Zinc protein.

* Corresponding authors. Tel./fax: +81-52-836-3407; e-mail addresses: suzuki@phar.nagoya-cu.ac.jp; miyata-n@phar.nagoya-cu.ac.jp

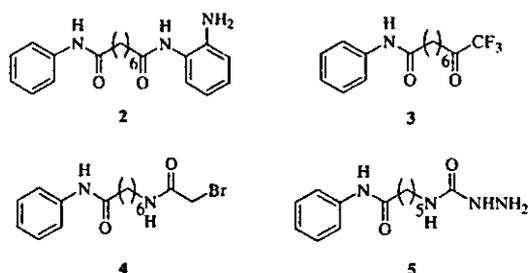


Figure 2. SAHA-based nonhydroxamate HDAC inhibitors.

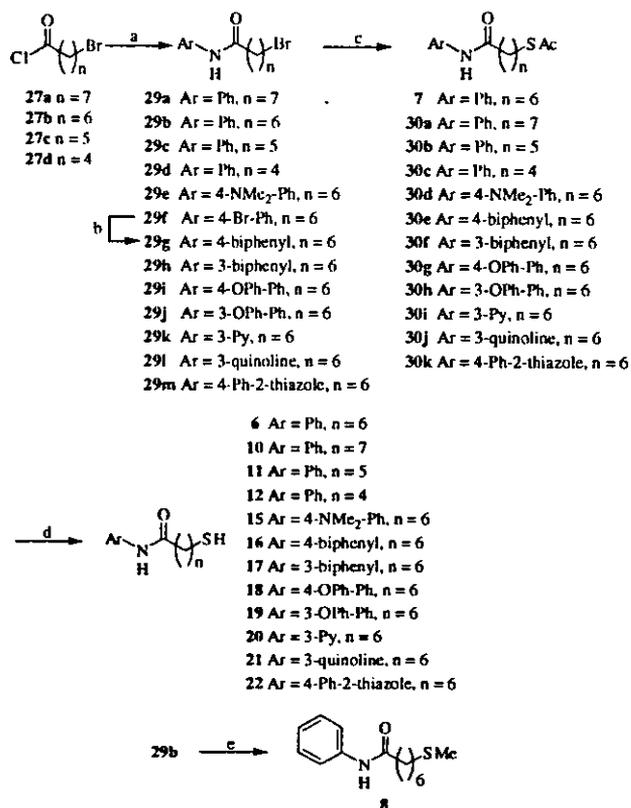
replacement groups for hydroxamic acid with the goal of drug discovery as well as finding new tools for biological research.

In the search for a suitable hydroxamic acid replacement, thiols seemed to be reasonable targets, because they have been reported to inhibit zinc-dependent enzymes such as angiotensin converting enzyme²⁰ and matrix metalloproteinase.²¹ Recently, Furumai et al. demonstrated that the disulfide bond of FK228 (Fig. 1), a cyclic peptide HDAC inhibitor, is reduced in the cellular environment, releasing the free thiol analogue as the active species,²² and Nishino et al. reported that cyclic tetrapeptides bearing disulfide group such as **1** (Fig. 1) inhibit HDACs under reductive conditions.²³ These reports prompted us to report on the synthesis and HDAC inhibition of thiol-based small molecule analogues.

The compounds prepared for this study are shown in Tables 1–3. Syntheses were accomplished as illustrated in Schemes 1–3. Compounds **6–8**, **10–12**, **15–21**, and **22** were synthesized from the corresponding acid chlorides **27a–d** by the route shown in Scheme 1. The amino group of aromatic amines **28** was acylated with an appropriate acid chloride **27** to give the amides **29a–f** and **29h–m**. Suzuki coupling²⁴ of bromobenzene **29f** with phenylboronic acid provided the biphenyl **29g**. Bromides **29** were treated with potassium thioacetate to give compounds **7** and **30a–k**, after which hydrolysis of the thioacetates under alkaline conditions gave the desired compounds **6**, **10–12**, **15–21**, and **22**. Sulfide **8** was obtained by the alkylation of sodium methanethiolate with bromide **29b**.

Synthesis of aminoethanethiol **9** was accomplished via aldehyde **34** (Scheme 2). The condensation of dicarboxylic acid **31** with an equivalent amount of aniline gave mono-anilide **32**. The carboxylic acid **32** was converted to Weinreb amide **33** in the presence of EDCI and HOBt. Compound **33** was allowed to react with lithium aluminum hydride at 0 °C to give aldehyde **34** and subsequent reductive amination afforded aminoethanethiol **9**.

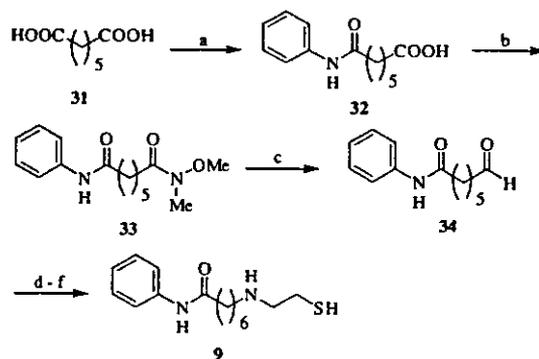
Compounds **13**, **14**, **23–25**, and **26** were prepared from alcohol **35** or **36** by the procedure outlined in Scheme 3. Treatment of bromide **35** with phenol in the presence of K_2CO_3 gave ether **38a**, and condensation of amine **36** with an appropriate aromatic carboxylic acid **37** affor-



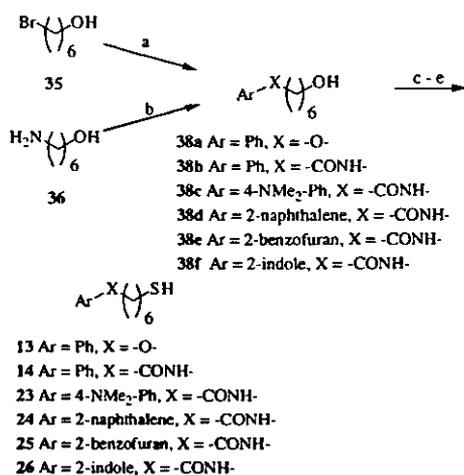
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) ArNH₂ (**28**), Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 25–99%; (b) PhB(OH)₂, Pd(PPh₃)₄, NaHCO₃, 1-methyl-2-pyrrolidinone, H₂O, 80 °C, 18%; (c) AcSK, EtOH, 60 °C, 84–99%; (d) 2 N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 47–99%; (e) 15% aq NaSMe, EtOH, rt, 99%.

ded amides **38b–f**. Alcohols **38a–f** were converted to thiols **13**, **14**, **23–25**, and **26** in a three-step sequence: conversion of the alcohols to bromides, treatment of the bromides with potassium thioacetate, and hydrolysis of the resulting thioacetates.

The compounds synthesized in this study were tested with an in vitro assay using a HeLa nuclear extract rich in HDAC activity.²⁶ The results are summarized in Tables 1–3 as IC₅₀ values.



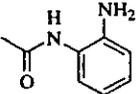
Scheme 2. Reagents and conditions: (a) Aniline, 180 °C, 43%; (b) *N*,*O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride, Et₃N, EDCI, HOBt, DMF, rt, 94%; (c) LiAlH₄, THF, 0 °C, 72%; (d) 2-aminoethanol, NaBH(OAc)₃, THF, AcOH, rt; (e) (Boc)₂O, Et₃N, rt; (f) TFA, CH₂Cl₂, rt, 44% (three steps).



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) Phenol, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 96%; (b) ArCOOH (37), EDCI, HOBT, DMF, rt, 61–96%; (c) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, 0 °C, 25–99%; (d) AcSK, EtOH, 60 °C, 47–99%; (e) 2 N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 28–74%.

As seen in Table 1, the IC₅₀ values of SAHA, *o*-aminoanilide 2, bromoacetamide 4, and semicarbazide 5 were 0.28, 120, 14, and 150 μM, respectively (entries 1, 2, 4, and 5). Trifluoromethyl ketone 3 was reported previously to inhibit HDACs with an IC₅₀ of 6.7 μM (entry 3).¹⁵ In our study, changing the hydroxamic acid of SAHA to thiol yielded fruitful results. A pronounced inhibitory effect (IC₅₀ = 0.21 μM) was observed with thiol 6, which was about 30–700-fold more active than the previously reported nonhydroxamates, and as potent as SAHA (entry 6). To confirm that the thiol group plays an important role in anti-HDAC activity, thioacetate 7, and sulfide 8 were tested. As expected, thiol transformation into thioacetate and sulfide led to an

Table 1. HDAC inhibition data for SAHA and SAHA-based non-hydroxamates^a

Entry	Compd	<i>n</i>	R	IC ₅₀ (μM)
1	SAHA ^b	6	-CONHOH	0.28
2	2 ^c	6		120
3	3	6	-COCF ₃	6.7 ^d
4	4 ^e	6	-NHCOCH ₂ Br	14
5	5 ^e	5	-NHCONHNH ₂	150
6	6	6	-SH	0.21
7	7	6	-SAc	7.1
8	8	6	-SMe	>100
9	9 ^f	6	-NHCH ₂ CH ₂ SH	>100

^a Values are means of at least three experiments.

^b Prepared as described in Ref. 31.

^c Prepared as described in Ref. 13.

^d Data taken from the literature (Ref. 15).

^e Prepared as described in Ref. 18.

^f Trifluoroacetic acid salt.

Table 2. Effect of linker variation on HDAC inhibitory activity of thiols^a

Entry	Compd	X	<i>n</i>	IC ₅₀ (μM)
1	6	-NHCO-	6	0.21
2	10	-NHCO-	7	1.5
3	11	-NHCO-	5	0.37
4	12	-NHCO-	4	6.2
5	13	-O-	6	11
6	14	-CONH-	6	0.36

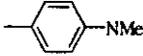
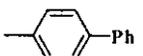
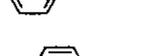
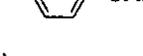
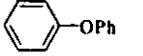
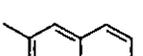
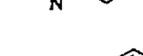
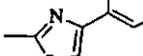
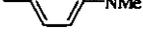
^a Values are means of at least three experiments.

inhibitor that was about 30-fold less potent and a compound devoid of anti-HDAC activity, respectively (entries 7 and 8). These results suggest that although the inherent affinity of a monodentate thiol ZBG is less than that of bidentate ZBGs such as hydroxamate and hydrated electrophilic ketone, its ease of ionization makes thiol 6 as powerful as SAHA.²⁷ In order to find more potent ZBGs, we examined the activity of aminoethanethiol 9, which was expected to coordinate zinc ion in a bidentate fashion. Although aminoethanethiols have been reported to inhibit zinc proteins,²⁸ this functional group led to a loss of HDAC inhibitory activity (entry 9).

We next examined the effect of linker parts of thiol 6. The results are shown in Table 2. HDAC inhibition was distinctly dependent on chain length, with *n* = 7 (10) and *n* = 4 (12) resulting in less potent inhibitors. However, compound 11, in which *n* = 5, proved to be equally effective to 6, in which *n* = 6 (entries 1–4). The similar structure–activity relationship (SAR) between thiols and hydroxamates, with *n* = 6 optimal,^{29,30} indicates that thiols inhibit HDACs in a binding mode similar to that of hydroxamates. As for the group attaching the phenyl moiety, ether 13 displayed a moderate activity, whereas the activity of the reversed amide 14 was maintained (entries 5 and 6).

Having investigated the requirements for the ZBGs and linker parts, we next turned our attention to aromatic groups (Table 3). In the amide-linked series (entries 1–9), 4-substituted phenyl compounds tended to reduce the potency. Specifically, compounds 15 (Ar = 4-NMe₂-Ph), 16 (Ar = 4-biphenyl), and 18 (Ar = 4-PhO-Ph) showed about a 3–10-fold decrease in potency when compared to the parent thiol 6 (entries 2, 3, and 5). In contrast, when a phenyl group was introduced at the 3-position of the phenyl group of 6, the IC₅₀ of compound 17 was improved and reached 0.075 μM (entry 4). In addition, 3-phenoxy compound 19 was equipotent with compound 6 (entry 6). Next, we investigated the effect of the replacement of the phenyl group of compound 6 with heteroaryl rings (entries 7–9). While pyridine 20 and phenylthiazole 22 retained the potency of compound 6, quinoline 21 was about 3-fold more active than compound 6 (IC₅₀ = 0.072 μM). The reversed amide-linked series (entries 11–14) exhibited potencies similar to or

Table 3. Effect of aromatic group variation on HDAC inhibitory activity of thiols^a

Entry	Compd	Ar	X	IC ₅₀ (μM)
1	6	-Ph	-NHCO-	0.21
2	15		-NHCO-	1.2
3	16		-NHCO-	1.1
4	17		-NHCO-	0.075
5	18		-NHCO-	0.62
6	19		-NHCO-	0.21
7	20		-NHCO-	0.11
8	21		-NHCO-	0.072
9	22		-NHCO-	0.17
10	14	-Ph	-CONH-	0.36
11	23		-CONH-	0.61
12	24		-CONH-	0.085
13	25		-CONH-	0.079
14	26		-CONH-	0.1

^a Values are means of at least three experiments.

greater than the parent thiol 14, except for 23 (Ar = 4-NMe₂-Ph), which resulted in a slightly less potent inhibitor. In particular, the reversed amides 24 with a naphthalene substituent and 25 with a benzofuran substituent showed stronger inhibition of HDACs with IC₅₀s of 0.085 and 0.079 μM, respectively. As a result, IC₅₀s in the double-digit nanomolar range were observed with 3-biphenyl 17, quinoline 21, naphthalene 24, and benzofuran 25, which were approximately 3–4-fold more potent than SAHA.

In summary, in order to find novel nonhydroxamate HDAC inhibitors, we designed and prepared a series of thiol-based SAHA analogues, and evaluated their inhibitory effect on HDACs. Compound 6, in which the hydroxamic acid of SAHA was replaced by a thiol, was found to be as potent as SAHA. We have shown that the potency is related to chain length, with *n* = 6 optimal, and the amide and reversed amide were preferred as the group attaching the phenyl moiety. The conversion of the phenyl group of compound 6 to other aromatic groups led to the identification of inhibitors more potent than SAHA. The SAR results within the thiol series indicate that thiols inhibit HDACs in a manner similar to that of hydroxamates. As far as we could determine, this is the first report of nonmacrocyclic thiol inhibitors of HDACs. These small molecule thiols may be useful as tools for biological research and as orally bioavailable anticancer drugs. Currently, further detailed SAR studies and the next stage of evaluations are under way.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Health Sciences Foundation from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, and the Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research.

References and notes

- Hassig, C. A.; Schreiber, S. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 300.
- Taunton, J.; Hassig, C. A.; Schreiber, S. L. *Science* **1996**, *272*, 408.
- Sambucetti, L. C.; Fischer, D. D.; Zabudoff, S.; Kwon, P. O.; Chamberlin, H.; Trogani, N.; Xu, H.; Cohen, D. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 34940.
- Yoshida, M.; Horinouchi, S.; Beppu, T. *Bioessays* **1995**, *17*, 423.
- Richon, V. M.; Webb, Y.; Merger, R.; Sheppard, T.; Jursic, B.; Ngo, L.; Civoli, F.; Breslow, R.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 5705.
- Richon, V. M.; Emiliani, S.; Verdin, E.; Webb, Y.; Breslow, R.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 3003.
- Cohen, L. A.; Amin, S.; Marks, P. A.; Rifkind, R. A.; Desai, D.; Richon, V. M. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4999.
- Miller, T. A.; Witter, D. J.; Belvedere, S. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5097.
- Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P. *Nature* **1999**, *401*, 188.
- Mulder, G. J.; Meerman, J. H. *Environ. Health Perspect* **1983**, *49*, 27.
- Vassiliou, S.; Mucha, A.; Cuniase, P.; Georgiadis, D.; Lucet-Levannier, K.; Beau, F.; Kannan, R.; Murphy, G.; Knaeuper, V.; Rio, M. C.; Basset, P.; Yirotakis, A.; Dive, V. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2610.
- Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Fukazawa, N.; Saito, A.; Mariko, Y.; Yamashita, T.; Nakanishi, O. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3001.

13. Wong, J. C.; Hong, R.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5586.
14. Haggarty, S. J.; Koeller, K. M.; Wong, J. C.; Butcher, R. A.; Schreiber, S. L. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 383.
15. Frey, R. R.; Wada, C. K.; Garland, R. B.; Curtin, M. L.; Michaelides, M. R.; Li, J.; Pease, L. J.; Glaser, K. B.; Marcotte, P. A.; Bouska, J. J.; Murphy, S. S.; Davidsen, S. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3443.
16. Wada, C. K.; Frey, R. R.; Ji, Z.; Curtin, M. L.; Garland, R. B.; Holms, J. H.; Li, J.; Pease, L. J.; Guo, J.; Glaser, K. B.; Marcotte, P. A.; Richardson, P. L.; Murphy, S. S.; Bouska, J. J.; Tapang, P.; Magoc, T. J.; Albert, D. H.; Davidsen, S. K.; Michaelides, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3331.
17. Vasudevan, A.; Ji, Z.; Frey, R. R.; Wada, C. K.; Steinman, D.; Heyman, H. R.; Guo, Y.; Curtin, M. L.; Guo, J.; Li, J.; Pease, L.; Glaser, K. B.; Marcotte, P. A.; Bouska, J. J.; Davidsen, S. K.; Michaelides, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3909.
18. Suzuki, T.; Nagano, Y.; Matsuura, A.; Kohara, A.; Ninomiya, S.; Kohda, K.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4321.
19. Wu, T. Y. H.; Hassig, C.; Wu, Y.; Ding, S.; Schultz, P. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 449.
20. Ondetti, M. A.; Rubin, B.; Cushman, D. W. *Science* **1977**, *196*, 441.
21. Whittaker, M.; Floyd, C. D.; Brown, P.; Gearing, A. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2735.
22. Furumai, R.; Matsuyama, A.; Kobashi, N.; Lee, K.-H.; Nishiyama, M.; Nakajima, H.; Tanaka, A.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4916.
23. Nishino, N.; Jose, B.; Okamura, S.; Ebisusaki, S.; Kato, T.; Sumida, Y.; Yoshida, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 5079.
24. Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457.
25. Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815.
26. The HDAC activity assay was performed using an HDAC fluorescent activity assay/drug discovery kit (AK-500 BIOMOL Research Laboratories): HeLa Nuclear Extracts (0.5 μ L/well) were incubated (37 °C) with 25 μ M of Fluor de LysTM substrate and various concentrations of samples. Reactions were stopped after 30 min with Fluor de LysTM developer and fluorescence was measured on a fluorometric reader with excitation set at 360 nm and emission detection set at 460 nm.
27. Babine, R. E.; Bender, S. L. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1359.
28. Hamasaki, A.; Naka, H.; Tamanoi, F.; Umezawa, K.; Otsuka, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1523.
29. Jung, M.; Brosch, G.; Kölle, D.; Scherf, H.; Gerhäuser, C.; Loidl, P. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4669.
30. Remiszewski, S. W.; Sambucetti, L. C.; Atadja, P.; Bair, K. W.; Cornell, W. D.; Green, M. A.; Howell, K. L.; Jung, M.; Kwon, P.; Trogani, N.; Walker, H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 753.
31. Mai, A.; Esposito, M.; Sbardella, G.; Massa, S. *Org. Prep. Proc. Int.* **2001**, *33*, 391.

Design and synthesis of cyclic urea compounds: a pharmacological study for retinoidal activity

Masaaki Kurihara,^{a,*} Abu Shara Shamsur Rouf,^a Hisao Kansui,^a Hiroyuki Kagechika,^b Haruhiro Okuda^a and Naoki Miyata^c

^aDivision of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

^cFaculty of Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Tanabedori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

Received 23 March 2004; revised 11 June 2004; accepted 11 June 2004

Abstract—Retinoids are natural and synthetic analogues of all-*trans* retinoic acid (ATRA). Cancer and other serious hyperproliferative diseases are attractive therapeutic targets for retinoids. We report here the design and synthesis of novel cyclic urea compounds with retinoidal activity. YR105 exhibited potent differentiation-inducing ability toward human promyelocytic leukemia HL-60 cells at the concentration of 10^{-9} M: its potency was almost equal to that of the native ligand, all-*trans* retinoic acid.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Retinoids, natural and synthetic analogues of all-*trans* retinoic acid (ATRA), have a variety of potent biological activities, such as induction of cell differentiation, proliferation, and apoptosis, as well as developmental changes.¹

Retinoids also have potential chemotherapeutic and chemopreventive applications in the fields of dermatology and oncology.² Retinoic acid has a remarkable remedial effect on acute promyelocytic leukemia (APL).³ Further, the inhibitory effect of retinoids on IL-6 production suggests their possible usefulness in various IL-6 associated diseases, including psoriasis and rheumatoid arthritis.⁴

It has been shown that the biological effects of retinoids are mediated by the activation of retinoic acid receptors (RARs), which are ligand-dependent gene transcription factors. There are three distinct receptor subtypes (RAR α , β , γ), which possess considerable homology in their ligand binding domains.⁵

We report here the design and synthesis of novel cyclic urea compounds, which have retinoidal activity.

In earlier studies, a number of synthetic retinoid analogues were prepared, and a few of them showed potential biological effects several times higher than all natural retinoids (Fig. 1).⁶ Some were selected as promising lead compounds for retinoidal activity. All the compounds consisted of two parts: a lipophilic portion fused with a hydrophilic benzoic acid moiety via amide or alkene or keto linkage. The biological activity depended on the linker type as well as the presence or absence of lipophilic moieties. Considering these aspects we selected the lipophilic moieties and the amido or alkene was changed to a urea linker, which may act as a suitable ligand for retinoid receptors. However Ur80,⁷

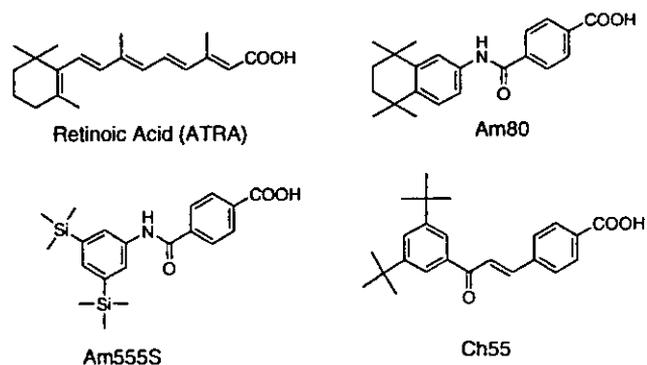


Figure 1. Structures of typical retinoid agonists.

Keywords: Cyclic urea; Retinoid; Cell differentiation; Drug design.

* Corresponding author. Tel.: +81-3-3700-1141; fax: +81-3-3707-6950; e-mail: masaaki@nihs.go.jp

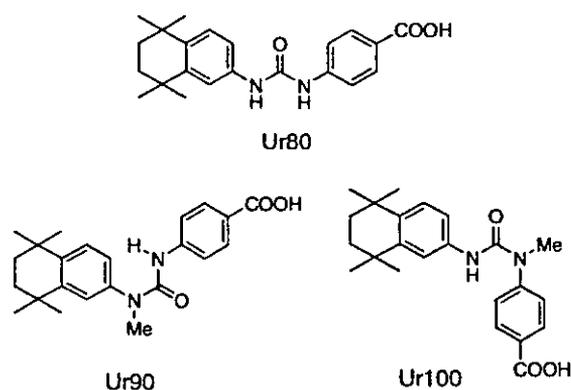


Figure 2. Conformations of methylated Ur80.

which has a urea linker, exhibited low bioactivity. Introduction of substitutes to urea nitrogen would cause flipping of stereochemistry to form Ur90 and Ur100 like Am80⁸ (Fig. 2). Because of fix of conformation and lipophilicity, we chose a cyclic urea structure as the linker (Fig. 3).

A very simple method was developed to synthesize all desired cyclic urea derivatives. The synthesis of urea derivatives (5a–h) was accomplished via the following reaction sequences (Scheme 1). A number of different aromatic amines (1a–d) were utilized as the starting materials for the preparation of the desired cyclic urea compounds.

Various primary aromatic amines (1a–d) alkylated with 1,2-dibromoethane or 1,3-dibromopropane in acetonitrile resulted in formation of the respective secondary amines (2a–h). The synthesized secondary aromatic

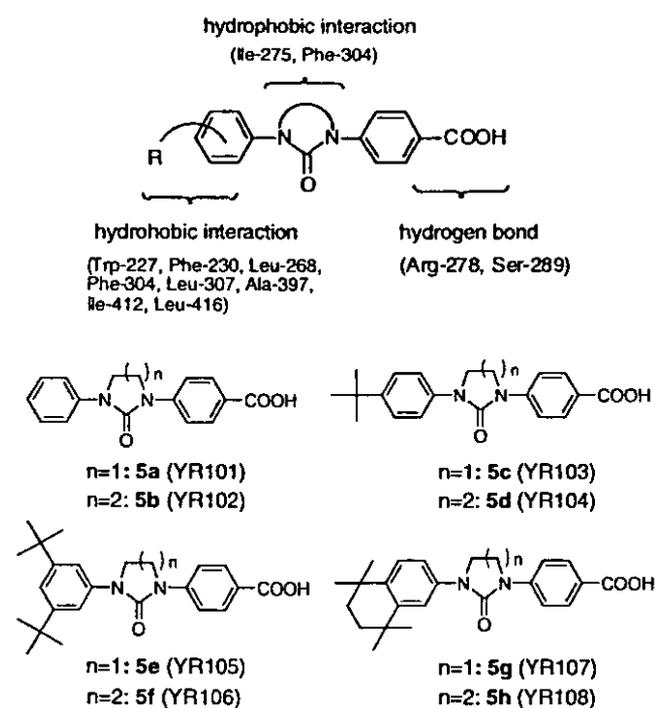
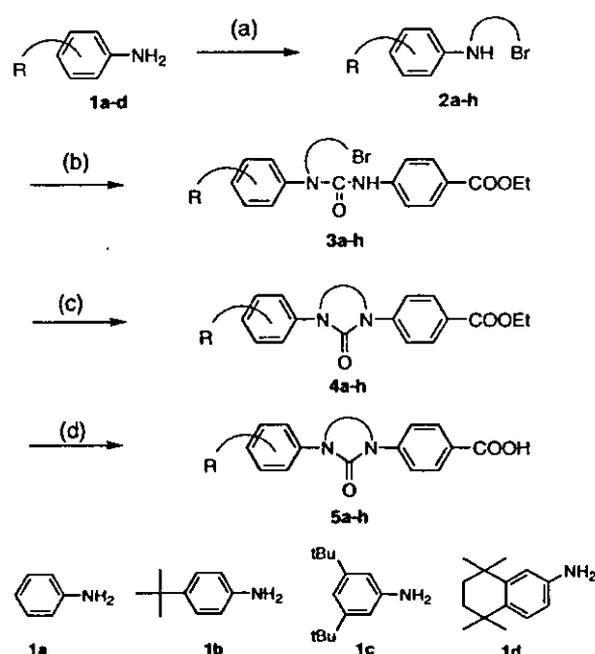


Figure 3. Design of cyclic urea compounds.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) 1,2-dibromoethane or 1,3-dibromopropane, CH₃CN, 50–70 °C, 72 h, 25–60%; (b) ethyl 4-isocyanobenzoate, benzene, 60–70 °C, 48 h, 60–80%; (c) NaH, THF, rt, 3 h, 75–97%; (d) 5% NaOH, MeOH–H₂O (7:3), 60 °C, 1 h, 90–96%.

amines were allowed to react with ethyl 4-isocyanobenzoate in anhydrous benzene to form urea derivatives (3a–h). The intramolecular cyclization of the urea derivatives was performed utilizing sodium hydride as the base to obtain cyclic urea derivatives (4a–h). Finally, the ethyl ester of cyclic urea derivatives was converted to free acid form (5a–h) under basic conditions.

The biological activities of compounds 5a–h were evaluated in terms of induction of differentiation of HL-60 cells into mature granulocytes. The results are summarized in Table 1. YR105 (5e) exhibited potent differentiation-inducing activity toward HL-60 cells, with an EC₅₀ value of 8.3 × 10⁻⁹ M. The activity of YR105 was one order weaker than that of retinobenzoic acid Am80, and comparable to that of all-*trans* retinoic acid. YR106

Table 1. HL-60 differentiation-inducing activity of cyclic urea compounds (5a–h)

Compound	Activity (ED ₅₀) (M)
5a (YR101)	Inactive
5b (YR102)	Inactive
5c (YR103)	Inactive
5d (YR104)	Inactive
5e (YR105)	8.3 × 10 ⁻⁹
5f (YR106)	4.9 × 10 ⁻⁷
5g (YR107)	1.2 × 10 ⁻⁷
5h (YR108)	Inactive
Retinoic acid	2.4 × 10 ⁻⁹
Am80	7.9 × 10 ⁻¹⁰
Ur80	>10 ⁻⁶

Inactive means there was no activity at 10⁻⁶ M, and >10⁻⁶ M means there was slight activity at 10⁻⁶ M.