

5. 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.
6. 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.
7. Cohen, L. A.; Amin, S.; Marks, P. A.; Rifkind, R. A.; Desai, D.; Richon, V. M. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4999.
8. For a review, see: Miller, T. A.; Witter, D. J.; Belvedere, S. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5097.
9. 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.
10. Somoza, J. R.; Skene, R. J.; Katz, B. A.; Mol, C.; Ho, J. D.; Jennings, A. J.; Luong, C.; Arvai, A.; Buggy, J. J.; Chi, E.; Tang, J.; Sang, B.-C.; Verner, E.; Wynands, R.; Leahy, E. M.; Dougan, D. R.; Snell, G.; Navre, M.; Knuth, M. W.; Swanson, R. V.; McRee, D. E.; Tari, L. W. *Structure* **2004**, *12*, 1325.
11. Mulder, G. J.; Meerman, J. H. *Environ. Health Perspect.* **1983**, *49*, 27.
12. Vassiliou, S.; Mucha, A.; Cuniassse, P.; Georgiadis, D.; Lucet-Levannier, K.; Beau, F.; Kannan, R.; Murphy, G.; Knaeuper, V.; Rio, M. C.; Basset, P.; Yiotakis, A.; Dive, V. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2610.
13. Mai, A.; Massa, S.; Rango, R.; Cerbara, I.; Jesacher, F.; Loidl, P.; Brosch, G. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 512.
14. Suzuki, T.; Nagano, Y.; Matsuura, A.; Kohara, A.; Ninomiya, S.; Kohda, K.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4321.
15. Wu, T. Y. H.; Hassig, C.; Wu, Y.; Ding, S.; Schultz, P. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 449.
16. Christianson, D. W.; Lipscomb, W. N. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 62.
17. Kapstin, G. V.; Fejer, G.; Gronlund, J. L.; McCafferty, D. G.; Seto, E.; Etzkorn, F. A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3053.
18. Moree, W. J.; van der Marel, G. A.; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 409.
19. 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 Lys™ substrate and various concentrations of samples. Reactions were stopped after 30 min. with Fluor de Lys™ Developer and fluorescence was measured on a fluorometric reader with excitation set at 360 nm and emission detection set at 460 nm.
20. The reason that compounds **3** and **4** were inactive is unclear, but it is probably because the amino group of **3** is not able to chelate zinc ion due to the protonation under the assay conditions, and because the zinc-chelating ability of hydroxyl group (**4**) is less than that of sulfhydryl group (**5b**).
21. 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.
22. Suzuki, T.; Kouketsu, A.; Matsuura, A.; Kohara, A.; Ninomiya, S.; Kohda, K.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3313.
23. Rizvi, N. A.; Humphrey, J. S.; Ness, E. A.; Johnson, M. D.; Gupta, E.; Williams, K.; Daly, D. J.; Sonnichsen, D.; Conway, D.; Marshall, J.; Hurwitz, H. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 1963.
24. Baxter, A. D.; Bird, J.; Bhogal, R.; Massil, T.; Minton, K. J.; Montana, J.; Owen, D. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 897.
25. Mai, A.; Esposito, M.; Sbardella, G.; Massa, S. *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, *33*, 391.

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

鈴木 孝禎*
中川 秀彦
宮田 直樹*

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

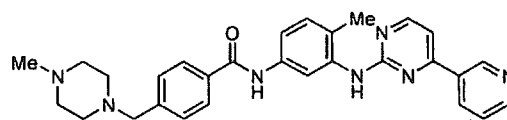
Takayoshi Suzuki*, Hidehiko Nakagawa, and Naoki Miyata*

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.

Key words: 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。癌細胞の増殖に与関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1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，合成およ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1つである HDAC 8 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

* 名古屋市立大学大学院薬学研究所創薬生命科学専攻薬化学教室 (467-8603 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 467-8603, Japan)

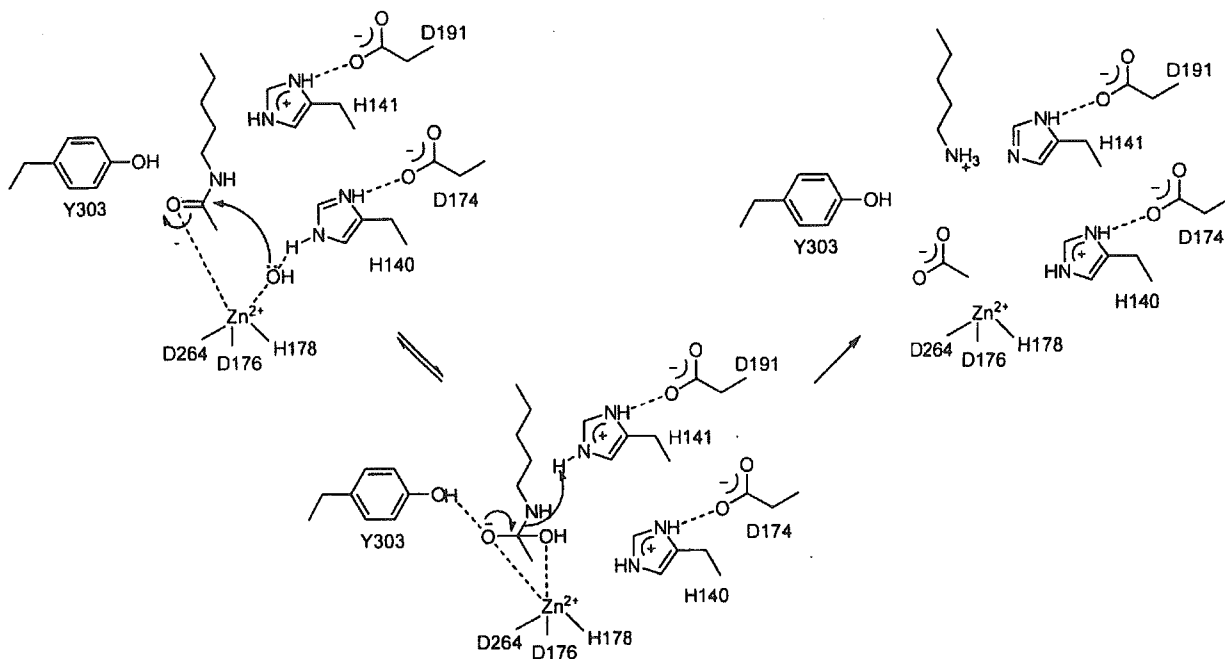


Fig. 2 Proposed catalytic mechanism of acetylated lysine (H = His, D = Asp, Y = Tyr).

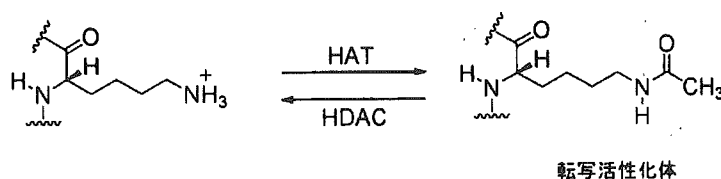


Fig. 3 Mechanism of gene expression by the reversible acetylation of histone lysine residues.

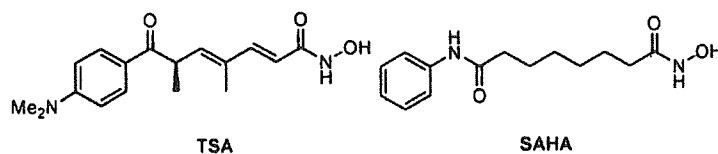


Fig. 4 Structures of TSA and SAHA.

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、亜鉛および His 140 (HDAC 1 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、Asp 191-His 141 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)。

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。

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。

これまでに、Harvard 大学の Schreiber らが報告した *o*-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²¹³⁾、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³¹⁴⁾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わかっているが(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。

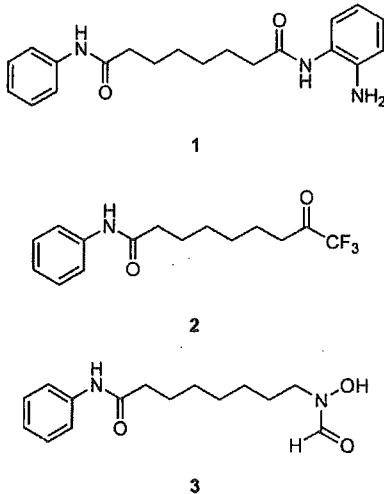
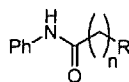


Fig. 5 Previously reported non-hydroxamate HDAC inhibitors.

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。



- | | |
|--|--|
| 4 : R = -NHCONHOH, n = 5 | 12 : R = -NHCOCH ₂ NH ₂ , n = 5 |
| 5 : R = -NHCONHNH ₂ , n = 5 | 13 : R = -NHCOCH ₂ OH, n = 5 |
| 6 : R = -SO ₂ NHOH, n = 6 | 14 : R = -NHCOCH ₂ SH, n = 5 |
| 7 : R = -SH, n = 6 | 15 : R = -NHCOCH ₂ Sac, n = 5 |
| 8 : R = -SAc, n = 6 | 16 : R = -NHCH ₂ C≡CH, n = 5 |
| 9 : R = -SMe, n = 6 | 17 : R = -N(CH ₂ C≡CH) ₂ , n = 5 |
| 10 : R = -NHSO ₂ Me, n = 5 | 18 : R = -NHCOCH ₂ Br, n = 5 |
| 11 : R = -SO ₂ Me, n = 6 | |

Fig. 6

2.1 酵素の三次元構造を基にした設計

HDLP あるいは HDAC 8 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、さらにチロシンおよび2つのヒスチジン残基と水素結合することがわかっている(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と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⁾。

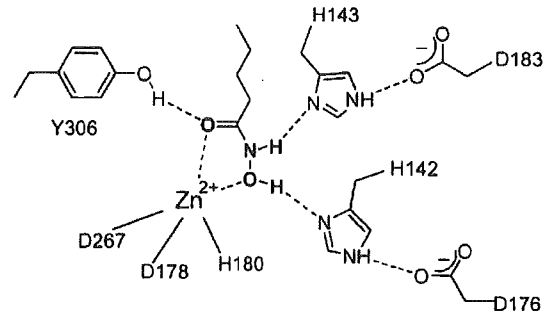


Fig. 7

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 およびチオエステル 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⁾。

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、アセトア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トアミド 12-15 を基質アナログとして設計した¹⁸⁾。

2.5 不可逆的阻害を意図した設計

HDLP, HDAC 8 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

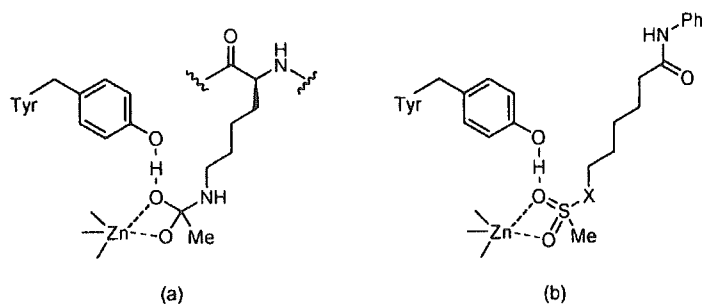


Fig. 8 The transition state proposed for HDACs (a), and models for the binding of sulfone derivatives (b).

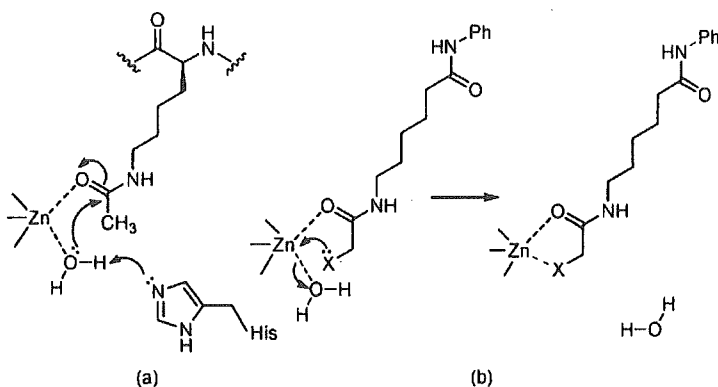


Fig. 9 The mechanism proposed for the deacetylation of acetylated lysine substrate (a), and a model for the binding of hetero atom-containing substrate analogues to zinc ion (b).

ていることがわかっている^{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, プロモアセトアミド 18 を設計した¹⁵⁾。

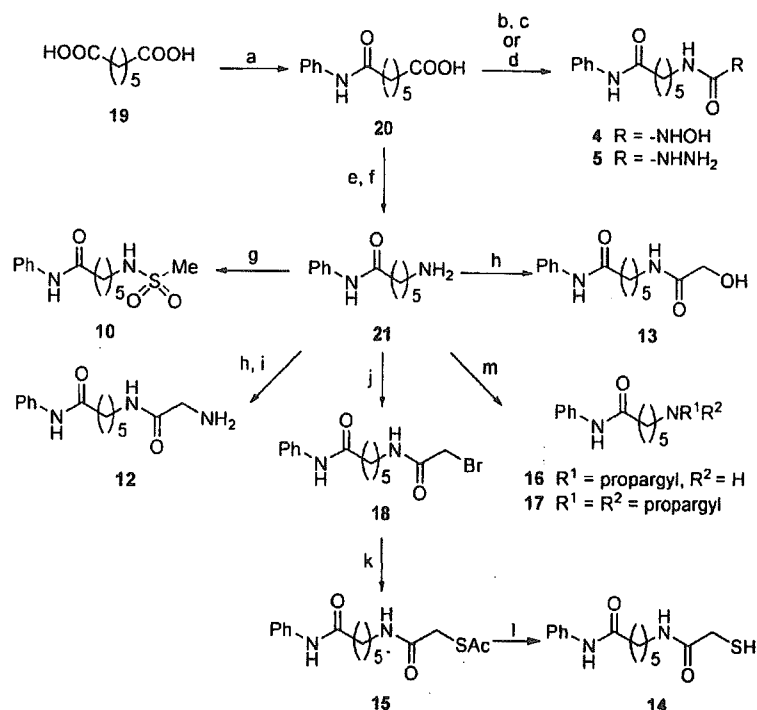
3. 非ヒドロキサム酸系化合物の合成

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およびセミカルバジド 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。

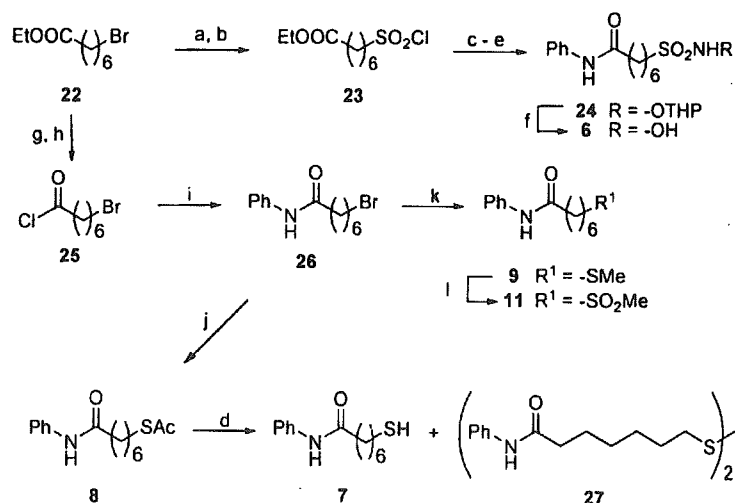
化合物 10 および 12-18 は、共通の中間体であるアミン 21 から合成した。まず、カルボン酸 20 を Curtius 転位を用いアミン 21 に変換し、21 をメシル化することによりスルホンアミド 10 を得た。アミノアセトアミド 12 は、アミン 21 と *N*-*tert*-ブトキシカルボニルグリシンをカップリングさせた後、脱保護を行うことにより、またヒドロキシアセトアミド 13 は、21 とグリコール酸を

カップリングすることにより合成した。アミン 21 をプロモアセチルプロマイドと反応させ、プロモアセトアミド 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、メルカプトアセトアミド 14 を得た。モノおよびジプロパルギル体 16, 17 は、アミン 21 をプロパルギルプロマイドと反応させることにより合成した。

化合物 6-9 および 11 は、スキーム 2 に従い、プロマイド 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ン 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 およびスルホン 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-



Scheme 1 (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 BnOH, 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 2 (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) 2 N 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 NaSMc, EtOH, rt, 99%; (l) *m*-chloroperoxybenzoic acid, CH₂Cl₂, rt, 70%.

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。

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*o*-アミノアニリド1のIC₅₀値は、それぞれ0.28 μM, 120 μM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 μM, 2.8 μM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、*o*-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メタロプロテ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わかっている^{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、IC₅₀=0.21 μM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では活性が減弱したことから、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関与していることが予想された。

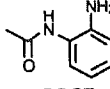
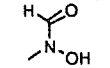
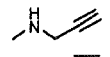
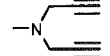
遷移状態アナログとしてHDACを阻害することを期待したスルホン誘導体10, 11では、スルホン10がIC₅₀=230 μMでHDACを阻害したが¹⁸⁾、活性はSAHAや既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬1-3には及ばなかった。

酵素の触媒メカニズムを基に設計したアセトアミド12-15では、アミノアセトアミド12、ヒドロキシアセトアミド13は阻害活性を示さなかったが、メルカプトアセトアミド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、プロモアセトアミド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。

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

以上の結果から、低分子HDAC阻害薬において、チオールおよびメルカプトアセトアミドがヒドロキサム酸に匹敵する活性を持つZBGであることがわかった。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。

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。

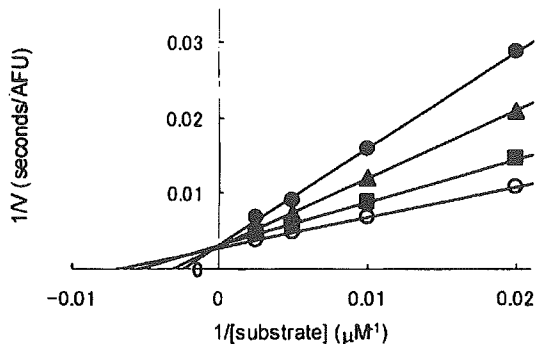


Fig. 10 Reciprocal rate vs reciprocal acetylated lysine substrate concentration in the presence of 0.3 (●), 0.1 (▲), 0.03 (■), and 0 (○) μM of 7.

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2.35 Å, Tyr 306のヒドロキシル基から2.24 Å, His 142に水素結合している水分子から2.66 Å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(Tyr 306, His 142)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。

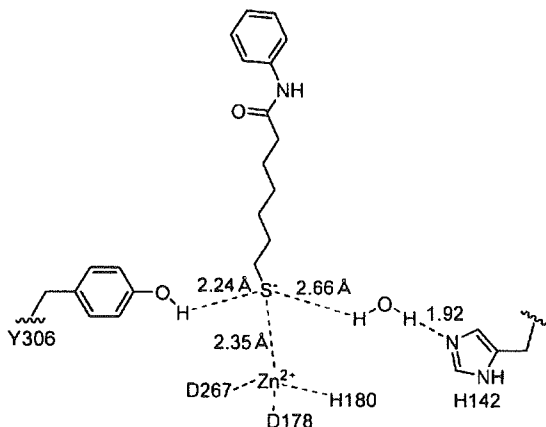


Fig. 11 View of the conformation of 7 docked in the HDAC 8 catalytic core.

同様に、メルカプトアセトアミド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)¹⁸⁾。メルカプトアセトアミド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)、メルカプトアセトア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($\text{H}_2\text{O-Zn}$, 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とおり、化合物14のメルカプトアセトア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。

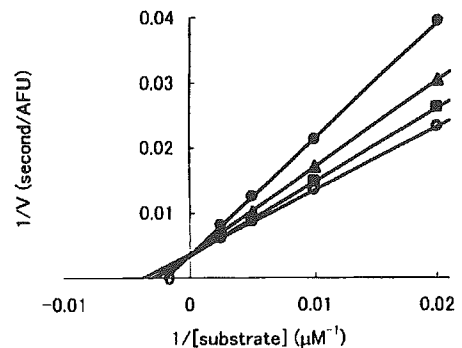


Fig. 12 Reciprocal rate vs reciprocal acetyl lysine substrate concentration in the presence of 1 (●), 0.3 (▲), 0.1 (■), and 0 (○) mM of 14.

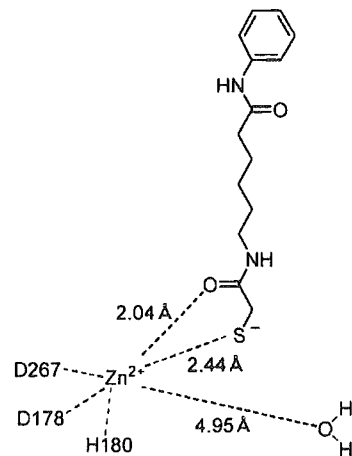
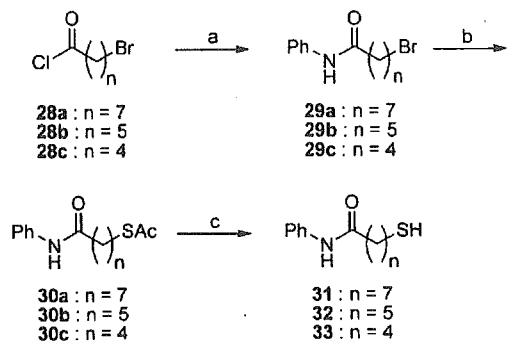


Fig. 13 View of the conformation of 14 docked in the HDAC 8 catalytic core.

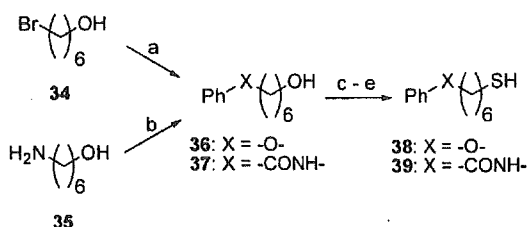
4.3 チオール系HDAC阻害薬の構造活性相関¹⁶⁾

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。プロマイド 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をプロマイドに変換後, 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。



Scheme 3 (a) Aniline, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 90–99%; (b) AcSK, EtOH, reflux, 88–96%; (c) 2 N aq NaOH, EtOH, rt, 47–61%.



Scheme 4 (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) 2 N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 46–64%.

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わかった。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。

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–

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

Ph-X-(CH ₂) _n -SH			
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.

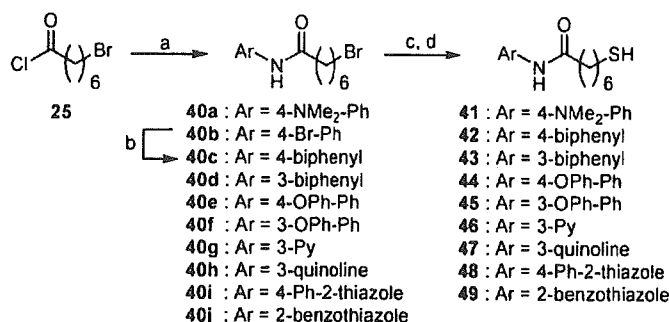
Table 3 Effect of aromatic group variation on HDAC inhibitory activity of thiols^a.

Ar-X-(CH ₂) ₆ -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

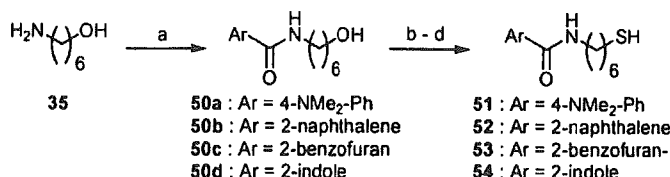
^a Values are means of at least three experiments.

54 を合成し, HDAC 阻害活性を調べた (表 3)。

アミド構造を有する化合物 41–49 では, ベンゼン環



Scheme 5 (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) 2 N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 59–90%.



Scheme 6 (a) ArCOOH, EDCI, HOBT, DMF, rt, 61–96%; (b) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, 0 °C, 25–89%; (c) AcSK, EtOH, rt, 86–99%; (d) 2 N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 28–74%.

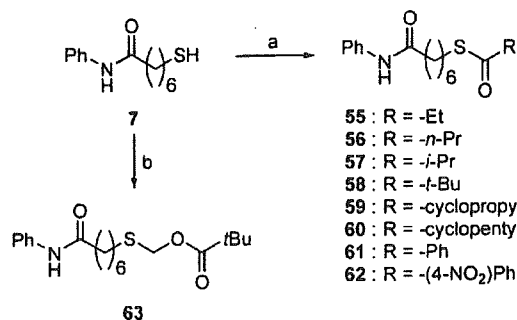
の4位に置換基を導入した化合物で活性が低下する傾向にあった。具体的には、4-ジメチルアミノフェニル 41、4-ビフェニル 42、4-フェノキシフェニル 44 は、フェニル体 7 に比べ 3–10 倍活性が低下した。逆に、7 のベンゼン環の3位にフェニル基を導入した化合物 43 では、約 3 倍活性が上昇し (IC₅₀=0.075 μM)、同じく 3 位にフェノキシ基を導入した化合物 45 でも活性は保持された。7 のベンゼン環を複素環に変換した化合物では、3-ピリジン 46、4-フェニル-2-チアゾール 48、2-ベンゾチアゾール 49 で活性が保持、あるいは、やや上昇したという結果に対し、3-キノリン 47 が IC₅₀=0.072 μM 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、IC₅₀=0.085 μM, 0.079 μM)。結果として、3-ビフェニル体 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。

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 およ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-H 460 細胞を用いた。その結果、チオール 7 は NCI-H 460 細胞に対し、50 μM でわずかに 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 1 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。

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 EC₅₀=20 μM と最も強い活性を示した。化合物 57 自身の HDAC 阻害活性は、IC₅₀=56 μM とチオール 7 (IC₅₀=0.21 μM) よりも約 270 倍小さいことか



Scheme 7 (a) RCOCl, 4-(dimethylamino)pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 68–99%; (b) NaH, chloromethyl pivalate, DMF, 0 °C to rt, 32%.

ら、S-アシル化体は、チオール体に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。

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)。

その結果、化合物65を除くすべ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。

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および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種類すべ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

Table 4 Cell growth inhibition data on NCI-H460 cells for compound 7 and its S-modified prodrugs^a.

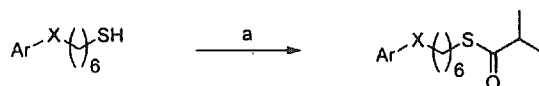
compd	R	EC ₅₀ (μM)
7	-H	>50 ^b
27		>50 ^c
8	-Ac	36
55	-COEt	28
56	-CO <i>n</i> -Pr	22
57	-CO <i>i</i> -Pr	20
58	-CO <i>t</i> -Bu	>50 ^d
59		27
60		21
61	-Bz	25
62		24
63	-CH ₂ OCO <i>t</i> -Bu	25

^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.

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)。

5.2 化合物68の癌細胞増殖阻害機構

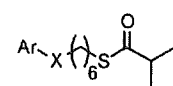
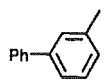
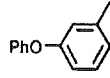

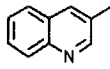
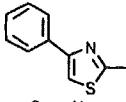
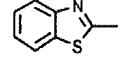
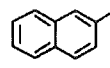
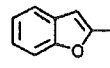
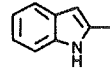
先に述べたように、HDAC阻害薬によりHDACの機能を停止させると相対的にHATの働きが強くなり、ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる(図3)。このヒストンのハイパーアセチレーションにより、癌抑制に関わるp21遺伝子の転写活性化が起こることが知られている。そこで、化合物68の癌細胞増殖抑制作用が細胞内のHDAC阻害によるものであることを確かめるため、ウエスタンブロット解析によりヒストンの高アセチル化およびp21^{WAF1/CIP1}の誘導を調べた(図14)。その結果、化合物68は、用量依存的にヒストンを高アセチル化し、p21^{WAF1/CIP1}を誘導していることがわかっ



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

Scheme 8 (a) Isobutyryl chloride, 4-(dimethylamino)pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 77–99%.

Table 5 Cell growth inhibition data on NCI-H 460 cells for compound 57 and its derivatives^a.

compd			EC ₅₀ (μM)
	Ar	X	
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.

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。

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

Table 6 Growth inhibition of various cancer cells using SAHA and compound 68^a.

cell	SAHA		68	
		EC ₅₀ (μM)		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.

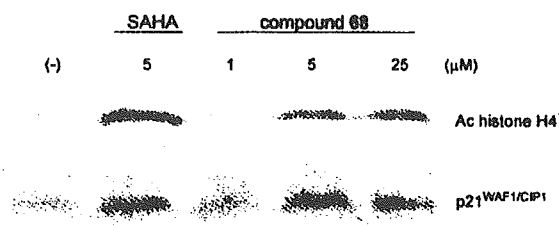


Fig. 14 Western blot analysis of histone hyperacetylation and p21^{WAF1/CIP1} induction in HCT 116 cells produced by compound 68 and by reference compound SAHA.

ドロキサム酸系 HDAC 阻害薬を基に、いか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、ここに厚くお礼申し上げます。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。

(2005年3月1日受理)

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, 1997, 300
- 4) M. S. Finnin, 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. Jennings, 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. Cuniassé, D. Georgiadis, K. Lucet-Levannier, 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. Gearring, *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, *ibid.*, 45, 753 (2002)
- 24) V. Gagnard, A. Leydet, A. Morere, J.-L. Montero, I. Lefebvre, G. Gosselin, C. Pannecouque, 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)

PROFILE



鈴木孝禎 名古屋市立大学大学院薬学研究科・助手 薬学博士
 (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



中川秀彦 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修士課程修了, 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年ジョンス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



宮田直樹 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修士課程修了, 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

Non-hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors

Takayoshi Suzuki* and Naoki Miyata*

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

Abstract: A number of histone deacetylase (HDAC) inhibitors have been developed as anticancer agents and most of them are hydroxamic acid derivatives, typified by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), Trichostatin A (TSA) and NVP-LAQ824. However, hydroxamic acids have been associated with poor pharmacokinetics and severe toxicity. In addition, although isozyme-selective HDAC inhibitors are considered useful not only as tools for probing the biology of an enzyme but as drugs with low toxicity, many of the hydroxamate HDAC inhibitors do not distinguish well among the HDAC isozymes. Thus, there has been considerable interest in developing non-hydroxamate HDAC inhibitors. To date, small fatty acids, *o*-aminoanilides, electrophilic ketones, *N*-formyl hydroxylamines, thiols and mercaptoamides have been reported as non-hydroxamate HDAC inhibitors, and some of them show antiproliferative activity comparable to hydroxamates. Interestingly, hydroxamate HDAC inhibitors such as SAHA and TSA do not discriminate well among the HDAC isozymes whereas many non-hydroxamate HDAC inhibitors have shown selectivity. These non-hydroxamate HDAC inhibitors should pave the way for the development of tools for biological research and new medicines with few side effects. In this review, we introduce non-hydroxamate HDAC inhibitors describing their design, enzyme inhibition, cancer cell growth inhibition and isozyme selectivity.

Keywords: Histone deacetylase, inhibitor, hydroxamic acid, non-hydroxamate, zinc protein, drug design, anticancer agent, isozyme selectivity.

INTRODUCTION

The steady state of nucleosomal histone acetylation is established by the dynamic equilibrium between competing histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). The reversible acetylation of histone lysine residues by HATs and HDACs results in chromatin remodeling and acts as a control mechanism for gene expression [1-3] (Fig. (1)). In general, histone deacetylation

is correlated with transcriptional repression, whereas histone hyperacetylation facilitates gene expression [4]. The inhibition of HDACs causes histone hyperacetylation and leads to the transcriptional activation of genes such as *p21^{WAF1/CIP1}* [5], *Gadd 45* [6], *FAS* and *caspase-3* [7] which are associated with growth arrest, differentiation or apoptosis in tumor cells. In addition, there is also evidence that HDAC inhibitors are drug candidates for other diseases such as inflammation [8] and globin disorders [9]. Therefore, HDACs have emerged as attractive targets in drug

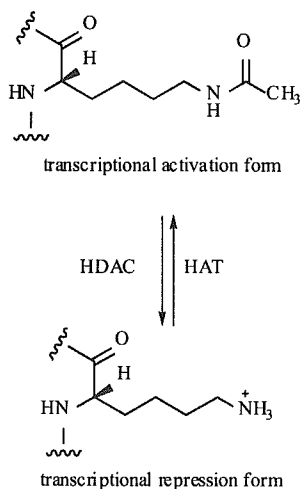


Fig. (1). Reversible acetylation of histone lysine residues.

*Address correspondence to these authors at the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8603, Japan; Tel and fax: +81-52-836-3407; E-mail: suzuki@phar.nagoya-cu.ac.jp; miyata-n@phar.nagoya-cu.ac.jp

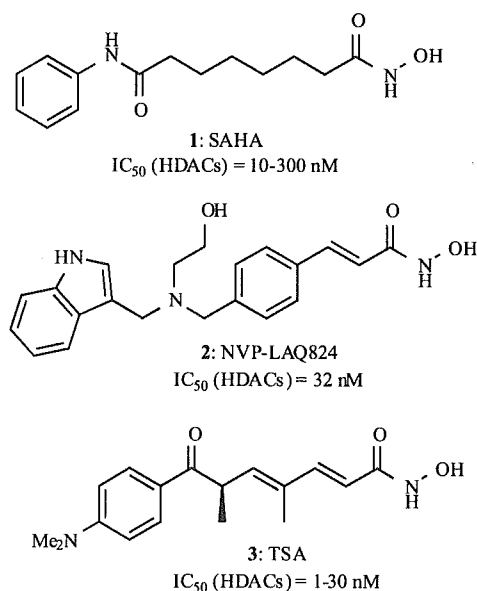


Fig. (2). Hydroxamate HDAC inhibitors.

development [10-15]. Indeed, HDAC inhibitors such as suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) **1** [16] and NVP-LAQ824 **2** [17] (Fig. (2)) are currently in clinical trials for the treatment of cancer.

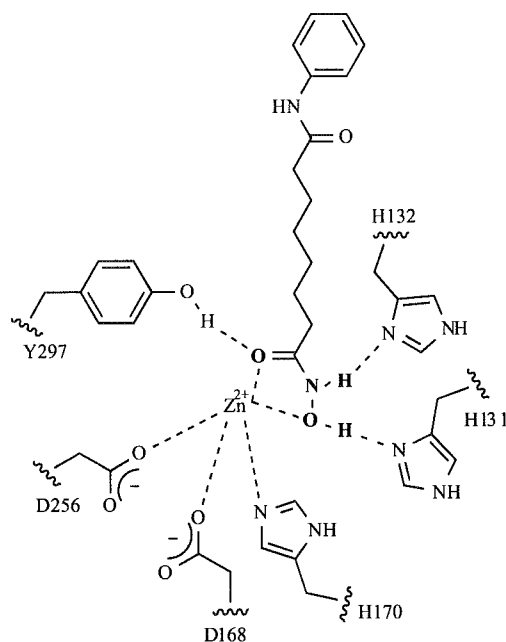


Fig. (3). SAHA in the catalytic core of HDLP.

Research potential in the development of HDAC inhibitors accelerated when the X-ray crystal structures of an archaeobacterial HDAC homologue (HDAC-like protein, HDLP)/hydroxamic acid inhibitors were disclosed [18]. The structures made it clear that the enzyme contains a zinc ion at the bottom of the active site and that the hydroxamic acid

group coordinates the zinc ion through its CO and OH groups and also forms three hydrogen bonds between its CO, NH and OH groups and Tyr 297, His 132 and His 131, respectively (Fig. (3)). The crystal structures have led to a solid understanding of not only the three-dimensional structure of the active site of HDACs but also the catalytic mechanism for the deacetylation of acetylated lysine substrate. It has been proposed that the carbonyl oxygen of the substrate could bind the zinc ion, and the carbonyl could be attacked by a zinc-chelating water molecule, which would result in the production of deacetylated lysine via a tetrahedral carbon-containing transition state (Fig. (4)). The crystal structures of human HDAC8 complexed with hydroxamates, reported recently [19, 20], also supported such a catalytic mechanism of HDACs.

To date, a number of HDAC inhibitors have been developed. As depicted in Fig. (5), HDAC inhibitors typically possess a zinc-binding group (ZBG), which coordinates the zinc ion in the active site, a cap substructure, which interacts with amino acids at the entrance of the *N*-acetylated lysine binding channel, and a linker connecting the cap and the ZBG at a proper distance. Most of the previously reported HDAC inhibitors are hydroxamic acid derivatives, typified by SAHA **1**, NVP-LAQ824 **2** and Trichostatin A (TSA) **3** [21, 22] (Fig. (2)), which are thought to chelate the zinc ion in the active site in a bidentate fashion through its CO and OH groups [18-20]. Although hydroxamic acids are frequently employed as ZBGs, they often present metabolic and pharmacokinetic problems such as glucuronidation and sulfation that result in a short *in vivo* half-life [23, 24]. Indeed, it has been reported that intravenous administration of SAHA **1** has a half-life ranging from 21 to 58 min in patients [25]. TSA **3** has been reported to have no antitumor activity in nude mice bearing xenografts of human melanoma cells [26], which is probably

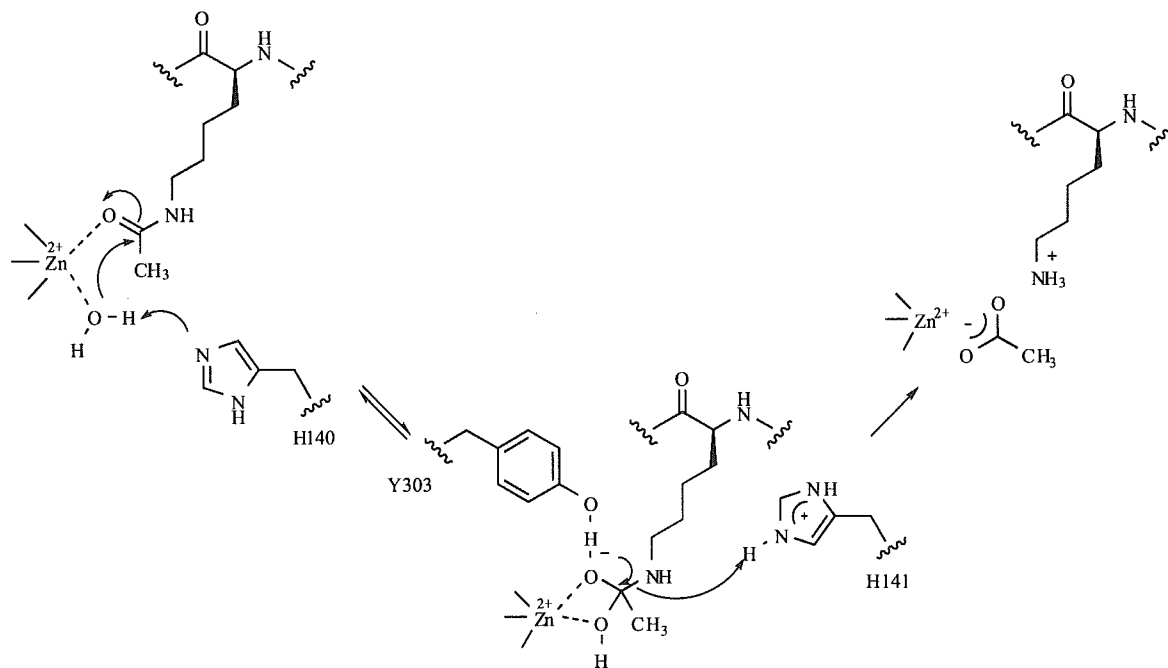


Fig. (4). Proposed catalytic mechanism for the deacetylation of acetylated lysine.

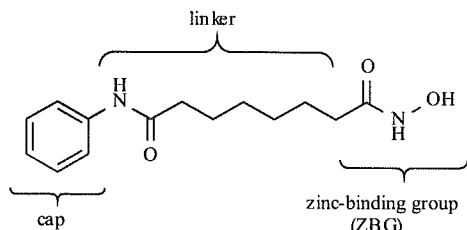


Fig. (5). Pharmacophoric summary of the structural characteristics of HDAC inhibitors.

a consequence of metabolic inactivation of TSA 3. Furthermore, many hydroxamates are unstable in vivo, and are prone to hydrolysis giving hydroxylamine which has potential mutagenic properties [27]. In addition, although isozyme-selective HDAC inhibitors are considered useful not only as tools for probing the biology of an enzyme but as drugs with low toxicity, hydroxamate HDAC inhibitors, with the exception of a few compounds such as tubacin [28] and (3-fluorophenylpropyl)pyrrolyl hydroxamate [29], do not distinguish well among the HDAC isozymes. Thus, there has been considerable interest in developing non-hydroxamate HDAC inhibitors. Many groups have ongoing research programs to find non-hydroxamate inhibitors of HDACs, and these efforts have led to the identification of several classes of inhibitors. In this review, we introduce non-hydroxamate HDAC inhibitors describing their design, enzyme inhibition, cancer cell growth inhibition and isozyme selectivity.

NON-HYDROXAMATE INHIBITORS OF HISTONE DEACETYLASES

Small Fatty Acids

Sodium butyrate **4** (Fig. (6)) has long been known to have antiproliferative and differentiating activity against several types of cancer cells [30]. It was later revealed that **4**

inhibits HDACs at high micromolar concentrations, which explains the anticancer mechanism of **4** [31]. Most probably, **4** inhibits HDACs by binding to their catalytic center.

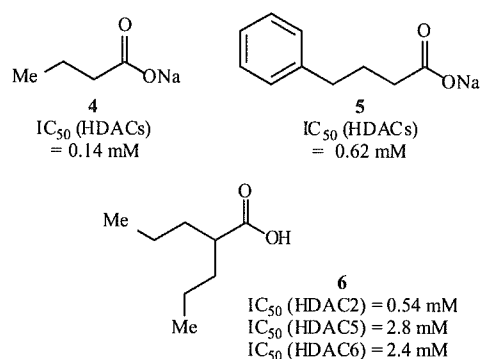


Fig. (6). Small fatty acid HDAC inhibitors.

To date, several short-chain fatty acid analogues of **4**, such as sodium phenylbutyrate **5** and valproic acid **6**, have also been reported to show inhibition of HDACs and antiproliferative activity, although their inhibitory activity is weak ($IC_{50} > 0.1$ mM) [32-34]. Nevertheless, it is noteworthy that a combination of **5** and all-trans retinoic acid induced histone hyperacetylation and complete remission of a highly resistant promyelocytic leukemia without severe side effects in a patient [35]. In addition, it has also been reported that tumor metastasis was significantly reduced by valproic acid **6** in animal experiments [32]. Some of the small fatty acid analogues such as **4** and **6** are currently in Phase I or Phase I/II trials for the treatment of cancer [36].

Epoxyketones

Cyclic tetrapeptides bearing epoxyketone such as HC-toxin I **7** and trapoxin B **8** (Fig. (7)) were originally discovered by screening natural products for antiparasitic or

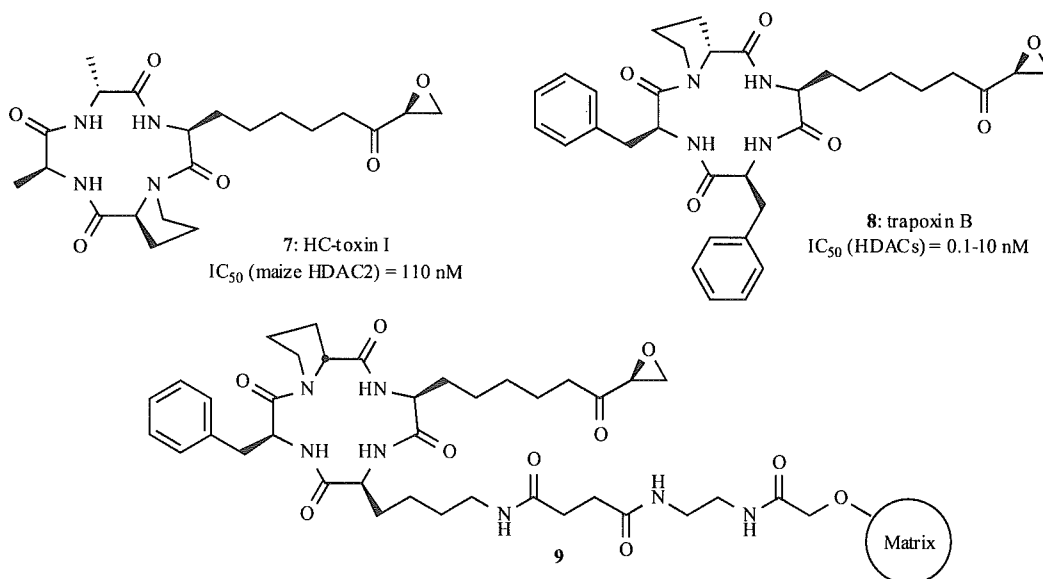


Fig. (7). HDAC inhibitors with epoxyketone.

antiproliferative activity [37-41]. These compounds were also identified as HDAC inhibitors [42-44]. Experiments *in vitro* using mouse histone deacetylase revealed that a low concentration of **8** irreversibly inhibits the deacetylation of acetylated histones [42]. It is easily speculated that the epoxide of **8** is attacked by an active site nucleophile such as histidine. Applying trapoxin B's characteristic irreversible inhibition of HDAC activity, the isolation and cloning of a human HDAC were achieved. Trapoxin B affinity matrix **9** was used to isolate a novel nuclear protein HD1 (HDAC1) using affinity chromatography [4].

Although the epoxyketone moiety seems essential for inhibitory activity, several cyclic tetrapeptides without the epoxyketone structure inhibited HDACs as well [45-47]. Furthermore, HC-toxin I **7** was found to inhibit maize HDAC reversibly and non-competitively with acetylated lysine substrate [43]. It remains unclear whether the covalent bond formed *via* the reaction of the epoxyketone with a nucleophile at the active site is responsible for the inhibitory activity.

o-Aminoanilides

Suzuki and co-workers identified MS-275 **10** (Fig. (8)) from a set of synthetic benzamide derivatives [48]. MS-275 **10** inhibited HDACs with an IC_{50} of 4.8 μ M and showed significant oral anticancer activity without severe side effects in animal models [49]. MS-275 **10** is currently in phase II

clinical trials for the treatment of cancer. CI-994 **11**, another *o*-aminoanilide compound from Pfizer which is in phase II clinical trials, was recently found to inhibit HDAC1 and HDAC2 without affecting the activity of the prototypical histone acetyltransferase GCN5 [50]. Sulfonamide anilides such as MGCD0103 **12** were identified as inhibitors of HDACs [51, 52]. Compound **12** exhibited antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. The antitumor activity of **12** correlated well with its ability to arrest the cell cycle and to alter the expression of cell cycle regulators such as p21^{WAF1/CIP1} and cyclin A. MGCD0103 **12** is presently entered into phase I clinical trials for the treatment of cancer. A series of ω -substituted alkanolic acid (2-aminophenyl)amides such as **13** have been reported recently [53, 54]. These compounds inhibited recombinant human HDAC1 with IC_{50} values ranging from 0.5 to 12 μ M. Compound **13** showed efficacy in human tumor xenograft models. However, the activity was lower than that of MS-275 **10**. Schreiber and co-workers synthesized about 2,400 *o*-aminoanilides using the combinatorial approach to find isozyme-selective HDAC inhibitors [55]. This approach led to the identification of histacin **14** and the related compound PAOA **15**, inhibitors inactive toward HDAC6 in cells [28, 56] (see the section Isozyme Selectivity).

As mentioned above, it has been clearly demonstrated that several *o*-aminoanilides possess antitumor activity that is associated with HDAC inhibitory activity. At present, it is yet unclear whether *o*-aminoanilide derivatives interact

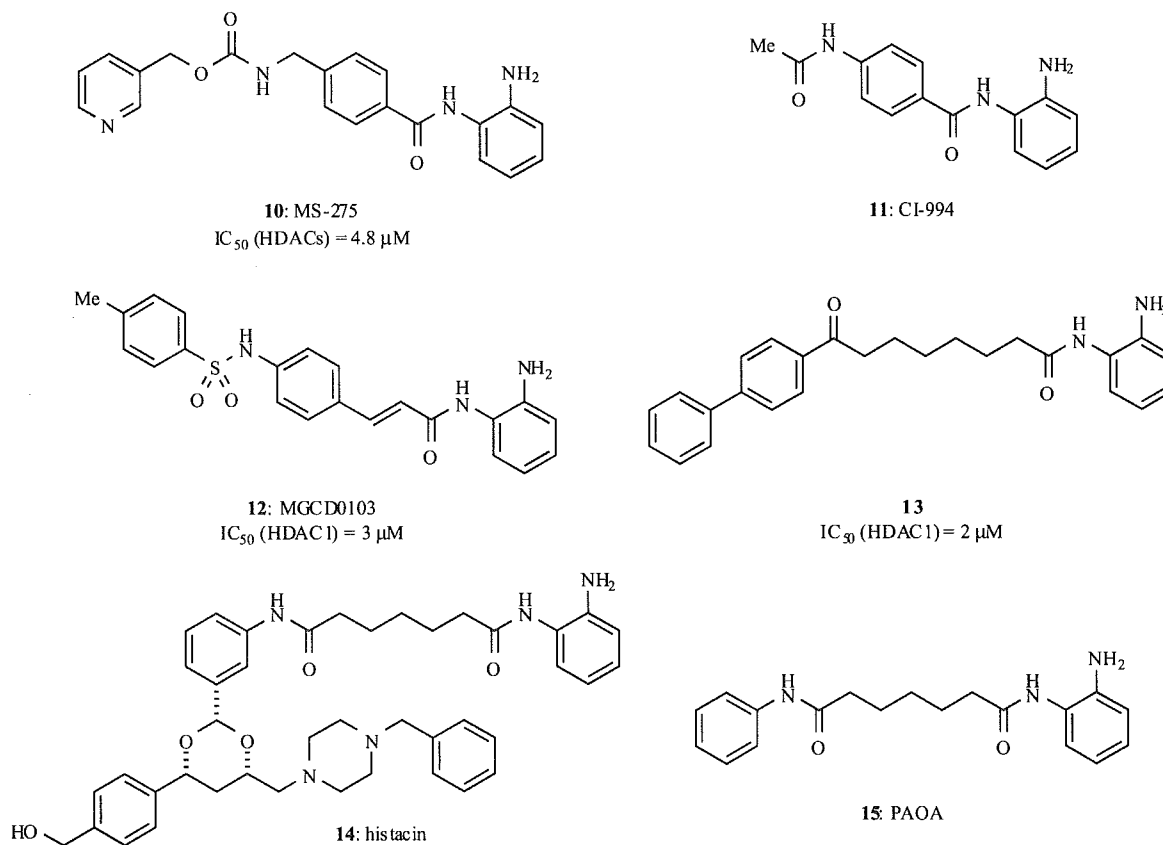


Fig. (8). HDAC inhibitors with *o*-aminoanilide.

with the zinc ion and amino acid residues in the active site or bind at an allosteric site. However, the similar structure-activity relationship between *o*-aminoanilides and hydroxamates indicates that *o*-aminoanilides inhibit HDACs in a binding mode similar to hydroxamates [51, 53, 54, 57].

Electrophilic Ketones

Electrophilic ketones have been a fruitful area of investigation in the search for novel HDAC inhibitors [58]. As shown in Fig. (9), electrophilic ketones are readily hydrated to form 1,1-diols which could coordinate zinc ion

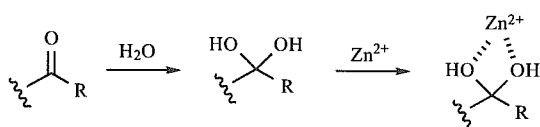


Fig. (9). Inhibition of HDACs by electrophilic ketones.

in the active site of HDACs. Frey and co-workers at Abbott reported trifluoromethyl ketones as HDAC inhibitors [59]. Trifluoromethyl ketones such as **16** (Fig. (10)) showed inhibitory activity against a mixture of HDAC1 and HDAC2

(IC₅₀ of **16** = 0.38 μM). Compound **16** demonstrated antiproliferative effects against HT1080 and MDA435 cell lines and induced histone H4 hyperacetylation and p21^{WAF1/CIP1} expression in MDA435 cells. Nishino and co-workers prepared cyclic tetrapeptide with trifluoromethyl and pentafluoroethyl ketones [60]. Compound **17** showed potent activity in a human HDAC inhibition assay and p21 promoter assay. Other reported structures of electrophilic ketone inhibitors include α-ketoamides and heterocyclic ketones such as **18**, **19** and **20** [61-63]. Notably, α-ketoamides showed potent inhibition of HDAC (IC₅₀ < 10 nM) and excellent antiproliferative activity against HT1080 and MDA435 cell lines (IC₅₀ < 1 μM). This class of inhibitors have a metabolic problem in that they are readily reduced to the corresponding alcohols in vivo, even within cells. Nevertheless, compound **18** exhibited significant antitumor effects in an in vivo tumor model. These results suggest that a brief exposure to HDAC inhibitors can produce in vivo biological activity.

N-Formyl Hydroxylamines

The crystal structures of HDLP/hydroxamate and HDAC8/hydroxamate complexes made it clear that the

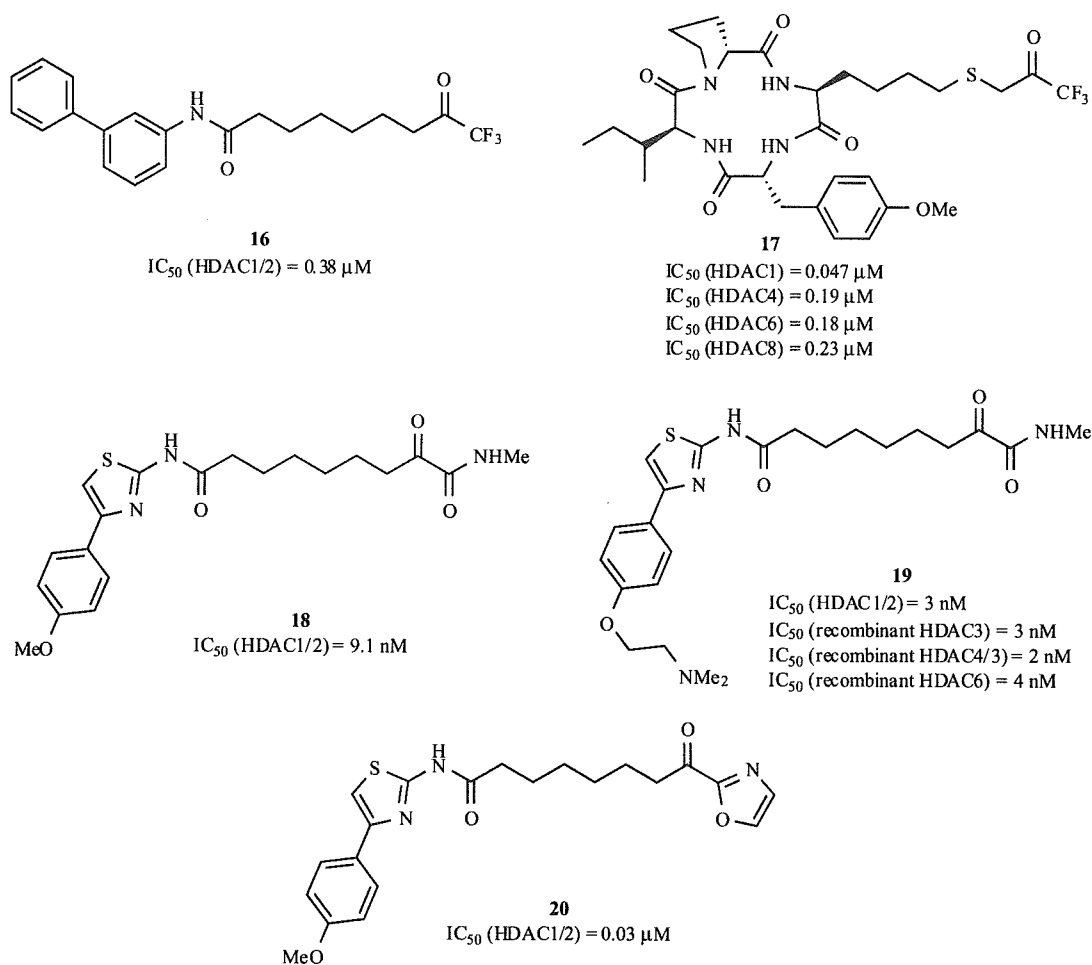


Fig. (10). HDAC inhibitors with electrophilic ketones.

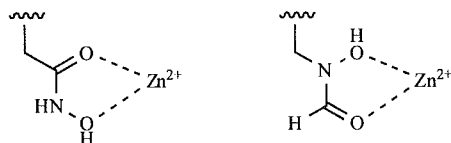


Fig. (11). Model for the binding of hydroxamic acid (left) and *N*-formylhydroxylamine (right) to zinc ion.

hydroxamic acid group coordinates the zinc ion in the active site through its CO and OH groups (Fig. (3); Fig. (11), left) [18-20]. Compounds bearing *N*-formyl hydroxylamine could inhibit HDACs by forming a bidentate chelate with zinc ion (Fig. (11), right). Schultz and co-workers synthesized a series of *N*-formyl hydroxylamines and evaluated their biological activity [64]. Among these compounds, compound **21** (Fig. (12)) displayed HDAC inhibitory

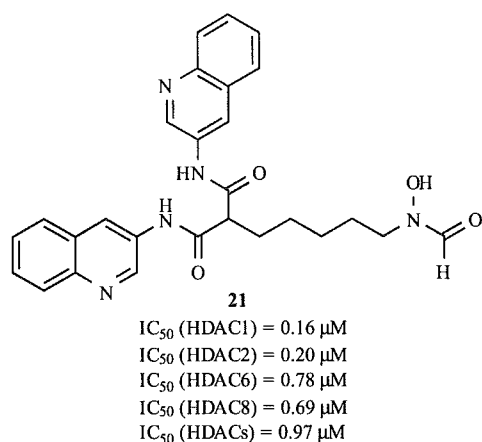
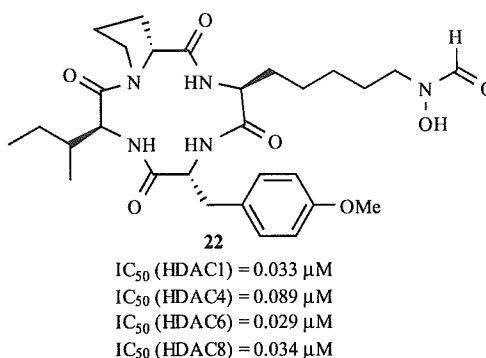


Fig. (12). HDAC inhibitors with *N*-formylhydroxylamine.

activity in the submicromolar range. The antiproliferative activity of compound **21** was comparable to that of SAHA **1**. Nishino and co-workers presented cyclic tetrapeptides having *N*-formyl hydroxylamine as HDAC inhibitors [65]. Cyclic tetrapeptides such as **22** were 10 times more potent than straight chain *N*-formyl hydroxylamines such as **21**.

Thiols

Thiols are an attractive ZBG for incorporation in HDAC inhibitors, because zinc ion is highly thiophilic and thiol derivatives have been reported to inhibit zinc-dependent enzymes such as angiotensin converting enzyme [66] and matrix metalloproteinases [27]. We found that compound **23** (Fig. (13)), in which the hydroxamic acid of SAHA **1** is replaced by a thiol, was as potent as SAHA **1** in an enzyme assay using HeLa nuclear extracts (IC₅₀ of SAHA **1** = 0.28 μM, IC₅₀ of **23** = 0.21 μM) [67]. The results of an enzyme kinetic assay (Lineweaver-Burk plot) established that thiol **23** engages in competitive inhibition versus acetylated lysine substrate, with an inhibition constant (*K_i*) of 0.11 μM [68]. Optimization of the linker part and aromatic cap part of **23** led to the identification of HDAC inhibitors such as **24** and **25**, which are more potent than SAHA **1** in enzyme assays.



Although compound **23** was weakly active in a cell growth inhibition assay with NCI-H460 cells (34% inhibition at 50 μM), the prodrug approach improved the antiproliferative activity [68]. *S*-Isobutyryl compound **26**, a prodrug of **23**, inhibited the growth of NCI-H460 cells with an EC₅₀ of 20 μM. Furthermore, optimization of the cap part of **26** to

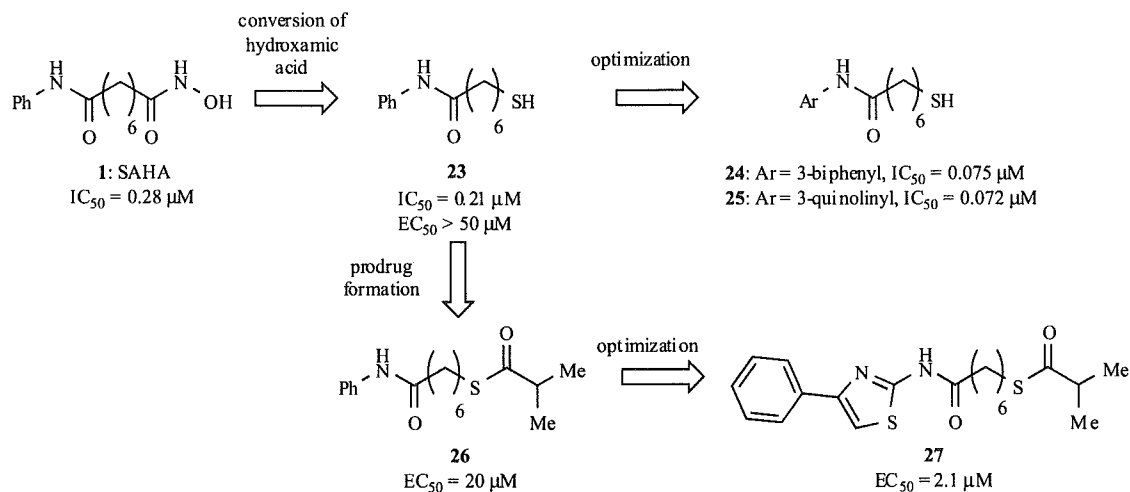


Fig. (13). Thiol-based HDAC inhibitors. IC₅₀: Inhibitory activity against human HDACs; EC₅₀: antiproliferative activity.

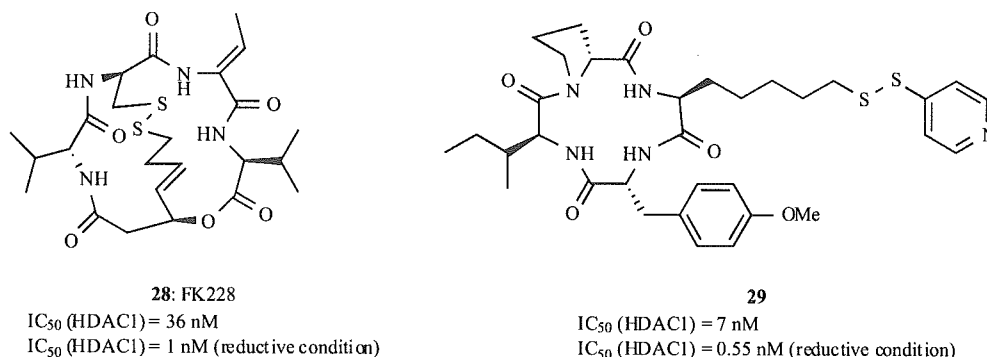


Fig. (14). HDAC inhibitors with disulfide.

various aromatic rings led to a highly potent cancer cell growth inhibitor **27**. Compound **27** exerted potent antiproliferative activity against various human cancer cells, with EC_{50} values ranging from 1 to 10 μ M, and these activities were comparable to those of SAHA **1** (average EC_{50} of **27** 3.8 μ M, SAHA **1** 3.7 μ M) which is currently being evaluated in clinical trials for use in the treatment of cancer. In addition, treatment of HCT 116 cells with compound **27** gave rise to elevated and dose-dependent levels of acetylated histone H4 and p21^{WAF1/CIP1}. These results suggested that the antiproliferative activity of compound **27** significantly correlates with the inhibition of intracellular HDACs.

Furumai and co-workers demonstrated that the disulfide bond of FK228 **28** (Fig. (14)), a depsipeptide HDAC inhibitor, is reduced in the cellular environment, releasing the free thiol analogue as the active species [69], and Nishino and co-workers reported that cyclic tetrapeptides bearing a disulfide group such as **29** inhibit HDACs potently under reductive conditions [70].

Modeling of compound **23** docked with HDAC8 suggested that the thiol of compound **23** interacts directly with the zinc ion in the active site of HDACs [68] (Fig. (15), left), whereas computer modeling of reduced FK228 suggests that the thiol of the reduced FK228 interacts with the zinc ion via a water molecule [69] (Fig. (15), right).

Mercaptoamides

We identified a mercaptoacetamide-based inhibitor **30** (Fig. (16)) by mechanism-based drug design [71]. On the basis of the proposed catalytic mechanism (Fig. (17)a), the HDACs would supposedly be inhibited if the water molecule is forcibly removed from the zinc ion, and then heteroatom-containing substrate analogues **30**, **31** and **32** were designed and synthesized (Fig. (16)). These analogues would be recognized as substrates by HDACs and be easily taken into the active site where they force the water molecule off the zinc ion and the reactive site for the deacetylation by chelation of the heteroatom to the zinc ion, and behave as

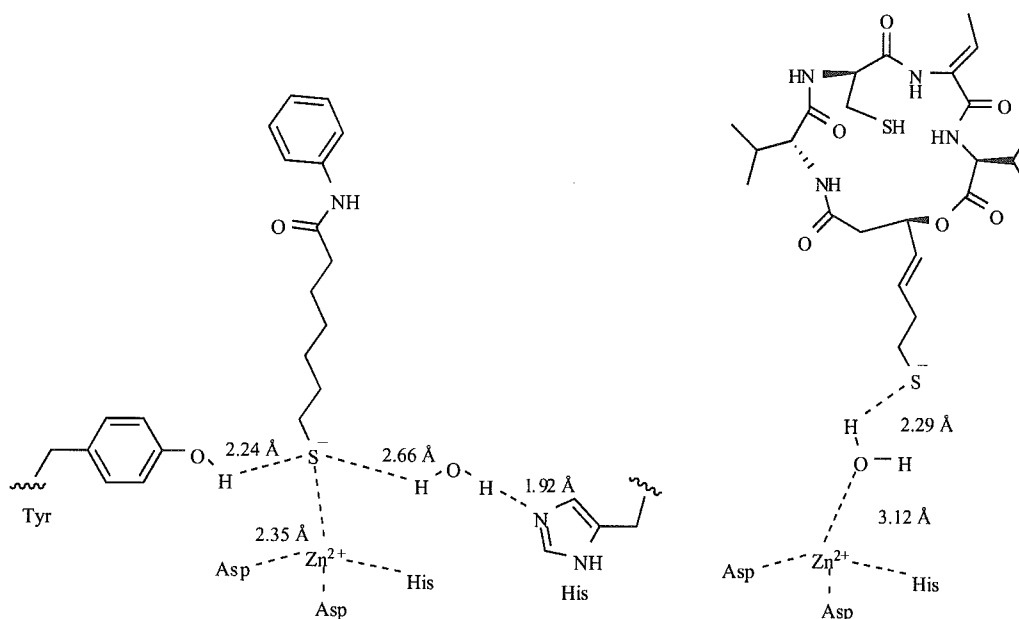


Fig. (15). Low energy conformation of **23** docked in the HDAC8 catalytic core (left) and of reduced FK228 in the HDLP catalytic core (right).