

厚生労働科学研究委託費（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

難治性固形がんにも有効なPARG阻害剤の実用化研究(新規PARG阻害剤の開発)：PARG阻害剤の構造最適化による臨床開発化合物の取得（b．バックアップ化合物の探索研究）に関する研究
ならびに薬物動態評価に関する研究

担当責任者 高村 岳樹 神奈川工科大学 工学部 応用化学科 教授

要旨

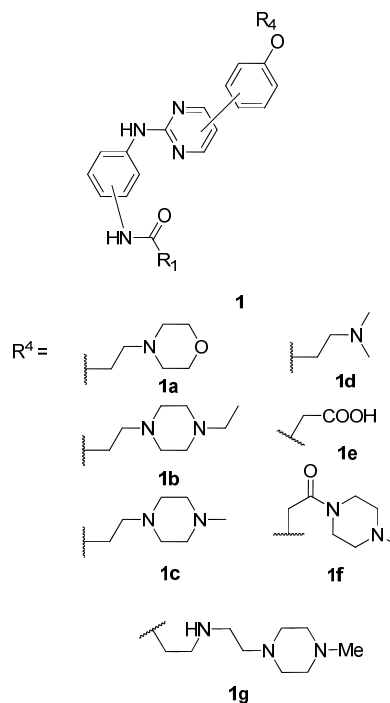
これまでのPARG阻害剤候補化合物の化学物質MO2282の類縁体としていくつかの化合物の合成を試みた。キーとなるmethoxyacetophenone誘導体の合成には光延反応および単純な求核置換反応により合成を行うことが可能であり，そこから定法により阻害剤候補化合物6種類を合成することができた。合成品に関しては，¹H-NMRおよびTOF-MSの測定により，目的の化合物であることを確認した。得られた化合物のうちカルボン酸のものはその溶媒への溶解性の低さから，単離精製を行うことが困難であった。またジメチルアミノ体においては，各合成ステップでの副生成物が多く，そのため収率の低下が問題となった。しかしながらいずれも今後の生物試験に供与できる量は確保した。得られた化合物のうち一部は小核試験を実施した。

A．研究目的

既存のPARG阻害剤MO2282はその細胞障害活性が高くがん治療薬として期待されている。しかしながら，この化合物は極めて水に溶けにくく製剤化が困難であることがこれまでの研究から明らかとなっている。そのため，MO2282との生物活性の比較を行うことを目的とし，より水溶性の高い化合物の合成を試みた。

B．研究方法

これまでに明らかにされてきたMO2282の類縁化合物であるPARG阻害剤について，いくつかの官能基を置換することで，活性の増減についての確認を行った。すなわち化合物**1**について**1a**から**1g**までの化合物について合成の検討を行った。これらの置換は従来型のPARG阻害剤であるMO2455の水溶性を向上することが目的である。

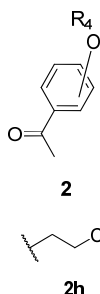


（倫理面への配慮）

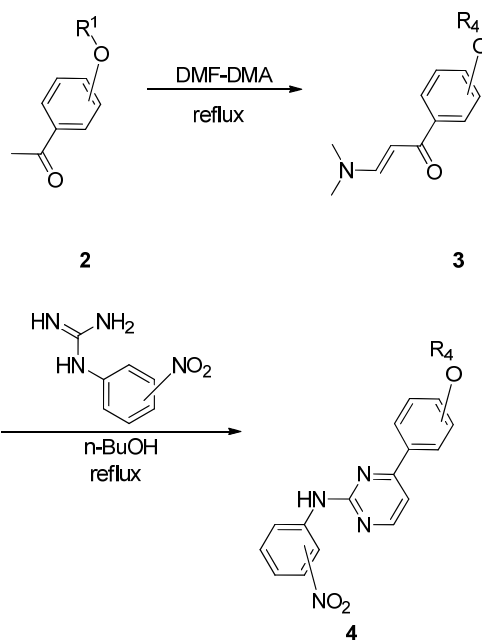
化合物の合成については，環境に負荷とならないよう，3次洗浄水までを廃液として処理した。その他，動物実験，遺伝子組み換え実験等は行っていない。

C. 研究結果

化合物 **1** の合成にあたり, アセトフェノン誘導体 **2** から合成を行った。この化合物は一般的に hydroxyacetophenone と対応するハロゲン化アルキルの求核反応から得られるが, 反応条件がきつくなることが予想されるため, 光延反応により合成することとした。化合物 **1a** の場合は, hydroxyacetophenone と **2** 等量の 2-morpholinoethanol を THF へ溶解させ, その溶液にさらに triphenylphosphine および diethyl azodicarboxylate を 2 等量ずつ加え, 反応させた。TLC で原料の消失を確認後, 目的物をカラムクロマトグラフィーにより単離した。約 60% の収率で化合物 **2a** を得ることができた。また **2b, 2c** は直接, 合成せず, クロロエタノールで光延反応後に得られるクロロエチル体 **2h** を後続反応させ, その後ピペラジン置換体を得る方法を選択した。化合物 **2d** は, 光延反応では合成は難しく, また TLC 上で複数のスポットが確認された。上述の反応条件では収率は 70% 程度であった。一方, 化合物 **2e** の場合は光延反応ではなく求核置換反応により, methyl bromoacetate を用いて炭酸カリ存在下, ニートで反応させメチルエステル体として次の反応に用いた。原料とカラムによる分離が困難なため, カラムクロマトグラフィーにより反応物を含むフラクションを集め, これを次の反応に用いることとした。化合物 **1g** は先の **2h** を経由する方法で, また **1f** は **2e** を合成する途中過程で置換基を導入した。すなわち, **2h** と 2-(4-methyl-1-piperazino)ethylamine を炭

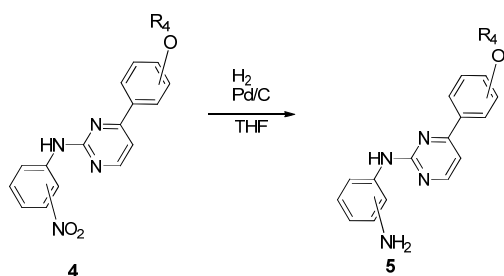


酸カリ存在下ニートで反応させ **2g** を得た。得られた化合物 **2** はさらに, DMF-DMA を用いてジメチルアミノメチレン化させ, さらにグアニジン誘導体と反応させた。化合物 **2** から **3** への反応はほぼ定量的に進行したが, 化合物 **2d** の場合は反応の進行とともに反応液が褐色化し, 目的とする化合物は 15% 程度しか得ることはできなかった。また, グアニジン誘導体 **4** への変換は置換基の種類によって収率が異なる結果となった。化合物 **3h** の場合, 収率は 20% 程度であったが, 目的化合物が反応液から固体となって単離されるため, 純度がよく, そのため, 特段の反応の最適化は行わなかった。その他の場合の目的化合物の収率は 60% 前後であった。また化合物 **3d** の場合は, アルゴン雰囲気下で反応させることにより, 液の褐色化が若干減少した。化合物 **4h** はエチルピペラジン, メチルピペラジンとそれぞれ炭酸カリ存在下, ニートで反応させ, 目的とする **4b, 4c** を得ることができた。この場合の収率はほぼ定量的であった。またこの反応で得られる化合物 **4e** のブチルエステル体は水酸化ナトリウム水溶液/MeOH で加水分解させ, 得られたカルボン酸を DMT-MM を用いてメチルピペラジンと反応させ, アミド体 **4f** を得た。



得られた化合物 **4** はPd/Cを用いて水素添加した。TLC上ではヒドロキシアミンの生成が確認され、反応時間は2日間必要であった。化合物**4e**のブチルエステル体は溶解性が悪く、溶媒としてDMFを用いたが、反応後のパラジウム触媒の除去がフィルター過だけでは困難であり、カラムにより生成を行った。また化合物**4f**の場合はイソプロパノール・水の混合溶媒で反応させ、目的物を得た。

得られた化合物**5**はさらにペプチド結合させ、目的物 **1** またはそのエステルを得ることができる。この時のカップリング剤とし



て、DMF溶媒中、DIPEA/HATU存在下、HATU、TBTU、COMU、DMT-MMと試したが、いずれも収率は30~50%であった。得られた化合物は、メタノールからの再結晶および、カラムクロマトグラフィーにより、単離を行った。ブチルエステル体は水酸化リチウムを用いて加水分解し目的とするカルボン酸**1e**を得ることができた。得られた化合物は¹H-NMRおよびTOF-MSで目的化合物であることを確認した。

得られた化合物のうち**1b**を用いて溶解度の確認を行った。この化合物の溶解度は20%DMSOに対して0.1mg/ml、リン酸塩緩衝液(20%DMSO, pH3)で0.3mg/ml程度であった。メタンスルホン酸を2等量添加すること3mg/ml(10%DMSO)の濃度まで溶解することが可能であることが分かった。

一方、シクロデキストリンに溶解させたMO2455のメシル塩の保存安定性を確認するためのLC-PDA定量分析およびMSによる定性分析を行った。各機関で調整されたMO2455のシクロデキストリン溶液について定量したところ、クロマトグラム上に若干の不純物は見られるものの、保存期間が長くなるにつれて増加するピークの存在は確認できなかった。一部のサンプルを除いて、おおむね秤量値と測定値が一致した。測定値が低くなっているものについては、沈殿の析出が多量にあり、その影響が大きいと考えられた。またMO2455のフリー体についても同様の結果であった。

さらに化合物**1a**を用い、Chinese Hamster Lung (CHL)の細胞株を用いた小核試験を実施した。Pargの活性を阻害することで、DNA切断の修復において、修復遅延または修復後の正常な細胞周期への移

行へ何等かの影響が生じることが考えられる。そのため、DNA切断から生じる小核の発生への影響を調べた。MTT試験を行った結果、この細胞に対する**1a**のIC50は約2.5 μ Mであった。また小核試験では、薬剤処理により、若干の誘発された小核の数の減少が見られた。Pargの阻害によってDNA修復処理に何等かの影響が生じている可能性がある。しかしながら、同条件では細胞の生存率が約20%と低く、また得られた結果の誤差が大きいことから、より詳細な実験の検討が必要となる。

試料	濃度 mg/ml	測定値 mg/mL
A	1.1	0.95
B	2.4	1.44
C	3.9	1.93
E	3.9	3.39
F	3.9	2.21
G	2.5	2.28

表1 MO2455 の秤量値と実測値
HPLC condition, column: cosmosil C18AR II 2.0x150 mm, Flow: 0.3 mL/min, Solvent A: 0.2 % HCOOH, Solvent B: MeCN, Linear gradient: 0 min 2% B, 20 min 100% B, 40 min 100%B, Retention time of MO2455: 13.5min, Quantification: UV340 nm (PDA2998), Injection, 5 μ L

D . 考察

MO2282の類縁体の合成について、1fまでの合成を完了した。1gについてはまだ合成の途中段階であり、2gまでの合成が終了したところである。得られた化合物は水溶性の向上を考え設定されたものであるが、いずれも、水溶性の向上は見られなかった。

ただし化合物**2f**は水溶液への分散性がよく、シクロデキストリン製剤として可溶する可能性がある。得られた化合物はすべてMO2282のベンゼン環に水酸基を導入したもので、基本骨格は同じである。仮に水酸基を保護することなく反応を完結できれば、R¹=Hの化合物をリード化合物として、ここで示したすべての化合物を得ることができる。そのために、鈴木カップリングやアリルアミネーションを利用した合成反応について現在まで検討を行ってきたが、無保護の状態では現時点では成功していない。LC-MSの分析では、シクロデキストリンの影響を排除することが重要で、カラムの選定や溶離条件がポイントとなることが分かった。今後生体試料の分析についても同様の条件が使用できると考えている。

E . 結論

MO2282の類縁体の合成に成功した。また一部は小核試験により、DNA損傷性が低下する結果を得ることができた。PARGの阻害剤の効果について、今後LC-MSを用いた

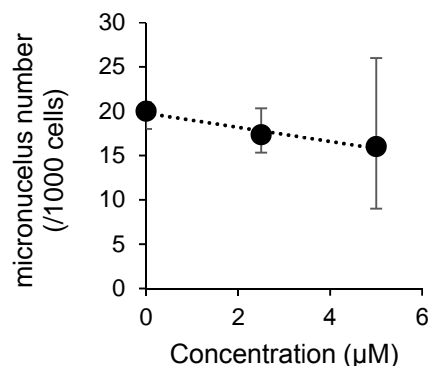


図1 小核試験の結果

PARの定量法について構築していく予定である。

G . 研究発表

1. 論文発表

本研究に関連するものとしてはなし

2. 学会発表

1)益谷美都子、藤森浩彰、原田博美、光畑元晴、高村 岳樹 Poly(ADP-ribose)代謝と ribosyladenosine 及び ribosylinosine
第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、
京都市(2014 年 10 月 16 日)。

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし