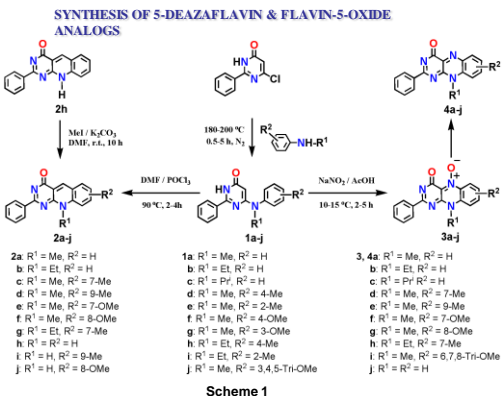


本研究は、細胞増殖機能調節に関わっている酵素のプロテインキナーゼ-C(PKC)やチロシンキナーゼ(PTK)を阻害して腫瘍細胞の増殖を阻害する新規抗腫瘍薬の開発に関する研究である。

特に、デアザフラビン類をシースとする類縁化合物に関して、コンピューターを駆使したバーチャルスクリーニング系の構築を行い、この系より得られた活性情報を基にデザインした新たな活性有効化合物のみを合成し、その合成化合物の*in vitro*での癌細胞への阻害活性試験および*in vivo*での抗腫瘍活性動物試験を行う。本研究は、バーチャルスクリーニング系を抗腫瘍薬開発に取り入れた新規高効率抗腫瘍薬開発研究である。

本研究に於いて、デアザフラビン類をシース(リガンド)とする類縁化合物にPKCやPTK酵素を阻害する多くの新化合物を見出した(Scheme 1)。更に、各種酵素へのDocking研究より、各種キナーゼの活性部位に対するデアザフラビン類の結合自由エネルギー(ΔG_b)を求め、それと各種腫瘍細胞への*in vitro*活性試験結果(IC₅₀)との相関関係よりバーチャルスクリーニング系を構築した(Figures 5 & 6 参照)。

酵素のチロシンキナーゼの活性部位へ強く結合(ΔG_b が小さい値)する化合物が、腫瘍細胞へ強い阻害作用を示すことを見出した。そこで、本研究はコンピューターでデザインした化合物に対し、上述のバーチャルスクリーニング系より求めた情報より活性部位へ強く結合(強い酵素阻害)した化合物のみを合成し、*in vitro* & *in vivo*試験で活性評価する優れた高効率抗腫瘍薬開発研究である。本研究は、このスクリーニング系で得られた情報より毒性の少ない最適な抗腫瘍薬を見出すのが目的で、創薬の新規な試みである。



Tab.1. Antiproliferative activities of 2-deoxy-2-phenyl-5-deazaflavins (2a-j) and 2-deoxy-2-phenylflavin-5-oxides (3a-i) against various tumor cell lines.

Compound	Inhibitory activity against tumor cell lines [IC ₅₀ (μM)]				
	NCL-H460	HCT116	A431	CCRF-HSB-2	KB
2a	2.23	2.11	1.44	11.83	2.33
2b	ND	ND	0.76	1.79	2.62
2c	2.08	1.68	2.45	1.49	1.86
2d	ND	ND	ND	0.70	3.98
2e	3.10	2.91	ND	1.23	0.50
2f	ND	ND	ND	2.14	5.04
2g	ND	ND	ND	0.73	0.51
2h	ND	ND	3.88	3.83	5.12
2i	ND	ND	ND	299.3	>350.0
2j	ND	ND	ND	24.4	62.7
3a	2.72	1.80	1.31	0.97	1.08
3b	ND	ND	ND	0.96	2.38
3c	6.05	6.85	ND	0.98	2.18
3d	4.39	3.28	ND	0.50	1.75
3e	ND	ND	ND	1.29	3.28
3f	1.33	0.72	ND	ND	ND
3g	ND	ND	ND	ND	ND
3h	ND	ND	ND	1.71	2.97
3i	3.72	3.76	ND	ND	ND
Cisplatin	0.82	2.33	ND	ND	ND
Ara-C	ND	ND	ND	0.15	0.70
Adriamycin	ND	ND	ND	0.05	ND

ND, not done.

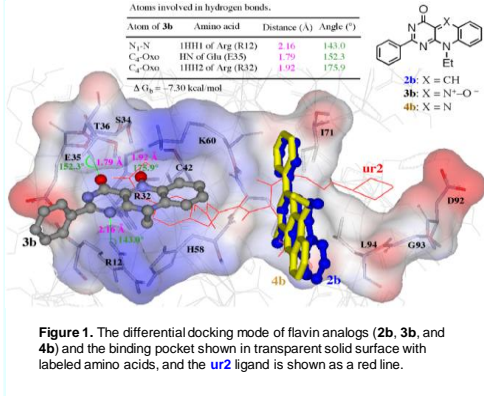
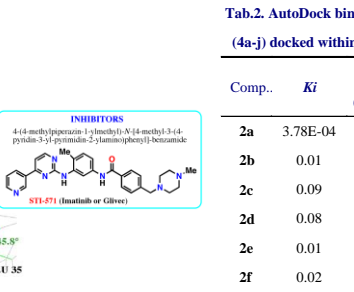
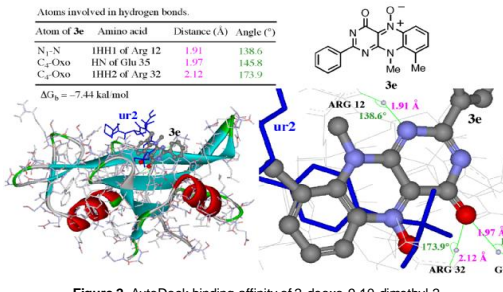


Figure 1. The differential docking mode of flavin analogs (2b, 3b, and 4b) and the binding pocket shown in transparent solid surface with labeled amino acids, and the ur2 ligand is shown as a red line.



Tab.2. AutoDock binding free energies (ΔG_b) and inhibition constants (*K_i*) for (2a-i) and (4a-j) docked within PTK.

Comp.	<i>K_i</i>	ΔG_b (kcal/mol)	Comp.	<i>K_i</i>	ΔG_b (kcal/mol)	Comp.	<i>K_i</i>	ΔG_b (kcal/mol)
2a	3.78E-04	-4.67	3a	4.99E-06	-7.23	4a	2.20E-04	-4.99
2b	0.01	-2.50	3b	4.45E-06	-7.30	4b	0.02	-2.27
2c	0.09	-1.44	3c	2.70E-05	-6.23	4c	...	0.22
2d	0.08	-1.53	3d	8.45E-06	-6.92	4d	0.01	-2.61
2e	0.01	-2.68	3e	3.55E-06	-7.44	4e	0.04	-1.89
2f	0.02	-2.45	3f	2.19E-05	-6.36	4f	0.02	-2.41
2g	0.09	-1.42	3g	5.21E-06	-7.21	4g	0.03	-2.05
2h	1.29E-06	-8.03	3h	4.68E-06	-7.27	4h	0.03	-2.02
2i	00	-4.18	3i	4.35E-05	-5.95	4i	0.01	-1.38
2j	3.97E-04	-4.93	3j ^d	1.71E-06	-7.84	4j	1.95E-06	-7.79

^a Can not be calculated as ΔG_b is a positive value.

Figure 2. AutoDock binding affinity of 2-deoxy-9,10-dimethyl-2-phenylflavin-5-oxide (3e) shown as ball and stick colored by element. The binding pocket of the pp60c-src shown as solid backbone ribbon with the ur2 ligand (blue stick).

Antitumor Potency against:
HCT 116: 2a, 2c, 3a, and 3f of higher activity > cisplatin, e.g. 3f (IC₅₀: 0.72 μM) of 3-fold more potent activity > cisplatin (IC₅₀: 2.23 μM).
A431: potencies are less than adriamycin (less toxic).
CCRF-HSB-2: many compounds showed (IC₅₀: 0.5 - 2.0 μM).
KB: 2e and 2g (IC₅₀: 0.5 μM) > Ara-C (IC₅₀: 0.70 μM).

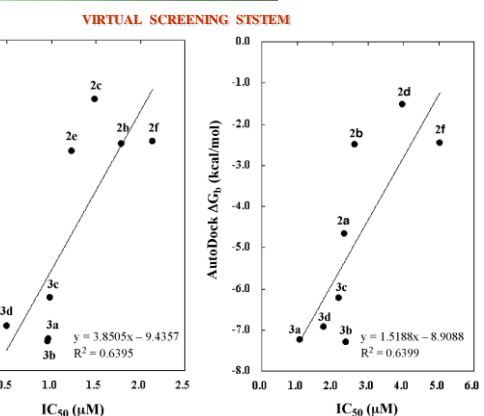
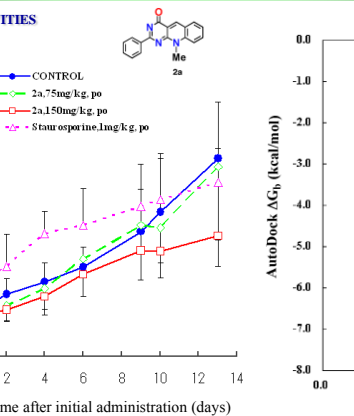
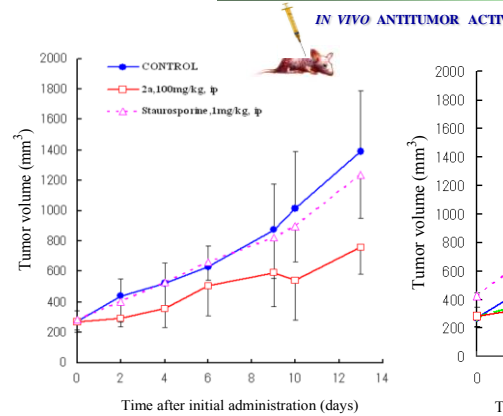


Figure 3. A 431 tumor volume implanted into nude mouse treated with chemicals (ip) after several days. A 431 cells were implanted subcutaneously into nude mice and the administration was started on the day when the mice show tumor growth in the 100-300 mm³ range.

Figure 4. A 431 tumor volume implanted into nude mouse treated with chemicals (po) after several days. A 431 cells were implanted subcutaneously into nude mice and the administration was started on the day when the mice show tumor growth in the 100-300 mm³ range.

Figure 5. Correlation between the binding free energy (ΔG_b) and IC₅₀ (μM) of 2-deoxy-2-phenyl-5-deazaflavins (2b, c, e, f) and 2-deoxy-2-phenylflavin-5-oxides (3a-d) against human T-cell acute lymphoblastic leukemia (CCRF-HSB-2).

Figure 6. Correlation between the binding free energy (ΔG_b) and IC₅₀ (μM) of 2-deoxy-2-phenyl-5-deazaflavins (2a, b, d, f) and 2-deoxy-2-phenylflavin-5-oxides (3a-d) against human oral epithelial carcinoma (KB).

本研究は、コンピューター計算化学を利用した新しい手法を用いて、特定の疾患に良く効く医薬薬を効率的に探し出す手法の開発に関する研究である。

すなわち、酵素タンパクのチロシンキナーゼの活性部位に対するデアザフラビン化合物類の結合自由エネルギーを計算し、これと各種腫瘍細胞への*in vitro*活性試験結果との「構造活性相関」を利用して「新規バーチャルスクリーニング系 (V S 系)」を構築するものであり、キナーゼ酵素阻害薬を標的化合物とした各種酵素阻害化合物のV S 系として広く応用可能な系である。本V S 系で見出したキナーゼ阻害化合物について*in vitro*試験で活性評価を行い、最も抗腫瘍活性の強い化合物について小動物での*in vivo*試験候補化合物を見出すことを試みている。これまでに、デアザフラビン類をシースとする類縁化合物に細胞増殖機能調節に関わる酵素のプロテインキナーゼ-Cやチロシンキナーゼを阻害する新化合物を見出した。本研究は、V S 系の構築を行い、このV S 系より得られた活性情報を基にデザインした新たな活性有効化合物候補のみを合成し、その合成化合物の*in vitro*での癌細胞への阻害活性試験を行うという「高効率の活性有効化合物探索」を行うことである。このコンピューターによる計算化学を駆使したバーチャルスクリーニングを取り入れた高効率の阻害化合物探索方法は当研究グループで開発を進めており、内外の製薬企業からも注目されており、次のステップの動物体内動態(吸収、分布、代謝、排泄)試験へ進むための開発候補化合物の選別である。今後、製薬企業への技術移転もしくは新抗腫瘍薬探索方法および当研究で見出された新抗腫瘍薬開発について事業化のための検討を始める予定である。