

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム
基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする低分子薬剤の前臨床開発試験
(英 語) Preclinical Development of small molecule drug candidate which mimics
the function of tumor suppressor 4E-BP1

研究開発実施期間：2015 年 11 月 2 日～2018 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 小路 弘行 > 竹原 大
(英 語) Hiroyuki Kouji > Dai Takehara

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 株式会社 PRISM BioLab 代表取締役
(英 語) PRISM BioLab Co., Ltd, President & CEO

分担研究 1 (日本語) 癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする低分子化合物のデザイン・合成
開発課題名 (英 語) Design and synthesis of small molecules which mimics the function of
tumor suppressor 4E-BP1

研究開発分担者 (日本語) 株式会社 PRISM BioLab 研究開発部 主幹研究員 今村 佳正
所属 役職 氏名：(英 語) Research and development department, PRISM BioLab Co., Ltd,
Senior Scientist, Yoshimasa Imamura

分担研究 2 (日本語) MO 化合物の細胞評価：作用機構の解析
開発課題名：(英 語) Evaluation of the effect of MO compounds in cells; and mechanism
underlying suppression of tumor growth.

研究開発分担者 (日本語) 愛知県がんセンター 研究所 感染腫瘍学部 部長 小根山 千歳
所属 役職 氏名：(英 語) Division of Microbiology and Oncology, Aichi Cancer Center Research
Institute, Chief, Chitose Oneyama

分担研究 3 (日本語) MO 化合物の標的蛋白との結合解析・作用機構解析
開発課題名：(英 語) Analysis of the interaction of MO compounds with their target protein
研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院薬学研究科 准教授 吉田 卓也
所属 役職 氏名：(英 語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka university, Associate
Professor, Takuya Yoshida

分担研究 4 (日本語) MO 化合物の抗癌活性評価

開発課題名 (英 語) Anti-tumor activity evaluation of M0 compounds

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 特別研究員 中野 洋文

所属 役職 氏名 : (英 語) Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Staff Scientist, Hirofumi Nakano

分担研究 (日本語) M0 化合物の X 線結晶構造解析と標的蛋白への結合解析

開発課題名 (英 語) X-ray crystal analysis of M0 compounds and its binding site in eIF4E

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 教授 中村 浩之

所属 役職 氏名 : (英 語) Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Professor, Hiroyuki Nakamura

分担研究 5 (日本語) M0 化合物の in vivo 抗がん活性のマウスを用いた評価

開発課題名 : (英 語) Evaluation of anti-oncogenic activities of M0 components for in vivo tumorigenesis in mouse

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人滋賀医科大学 微生物感染症学部門 准教授 井上寛一

所属 役職 氏名 : (英 語) Division of Microbiology and Infectious Diseases, Shiga University of Medical Science, Associate Professor, Hirokazu Inoue

II 研究開発の概要

【研究開発の目的】

膵臓癌等の難治性癌や再発癌に対する新たな分子標的治療薬が望まれている。研究開発者らは mTOR 経路の活性化に伴う 4E-BP1 の機能阻害が癌細胞の増殖に重要であることを明らかにした。4E-BP1 の癌抑制機能を模倣する低分子化合物の創出に挑戦し、4E-BP1 の機能に重要なアミノ酸配列をミミックする M0 化合物に膵臓癌等の癌細胞に増殖抑制活性を示すことを見出した。そこで、以下を目標に前臨床開発試験等を実施した。

1. M030003 を非 GLP で大量合成し、抗癌活性・至適投与法・安全性・ADME を調べる。
2. M030003 の標的蛋白質 eIF4E との結合・作用機構解析を基に新規 M0 関連化合物を合成する。そのデータを用いて特許を強化する。
3. 癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする抗癌剤の臨床効果を期待できる POC を動物モデルで取得する。
4. 癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする抗癌剤の臨床開発を行うため、製薬企業と提携する。

癌抑制因子4E-BP1の機能をミミックする低分子薬剤の前臨床開発試験



■期待される成果

癌抑制因子4E-BP1の機能をミミックする新規低分子抗癌剤の開発

■想定される実用化の時期

2018年頃、製薬企業と連携して臨床開発試験に向けた計画を策定する。

- ・癌細胞では癌抑制因子4E-BP1の欠損やリン酸化による不活化でeIF4Eが活性化し、蛋白合成が異常に亢進する
- ・4E-BP1は癌増殖シグナルが合流する"Funnel Factor"

■代表機関・課題リーダー

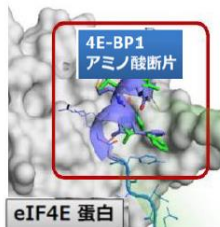
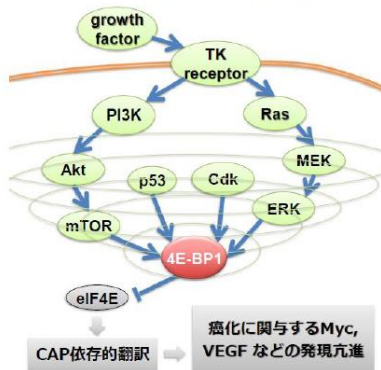
株式会社PRISM BioLab 小路弘行
→竹原大

■実施機関

株式会社PRISM BioLab、愛知県がんセンター、大阪大学、東京工業大学、滋賀医科大学

■実施期間

平成27年11月～平成30年3月



青：4E-BP1ヘリックス構造
緑：4E-BP1模倣化合物

■シーズの内容

- ・4E-BP1の構造をミミックする低分子リード化合物MO3721は"癌抑制因子の低分子ミミック薬"のPOCを4E-BP1の欠損した膵臓癌のマウスモデルで示した
- ・MO化合物はeIF4Eの4E-BP1結合部位に認識される(NMR解析)

■研究開発のポイント

- ① リード化合物MO30003などを非GLPで大量合成し、抗癌活性・至適投与法・安全性・ADMEを調べる。
- ② リード化合物と標的蛋白eIF4Eとの結合・作用機構解析を基に新規MO関連化合物を合成し、特許を強化する。
- ③ 癌抑制因子4E-BP1の機能をミミックする抗癌剤の臨床効果が期待できるPOCを動物モデルで取得する。
- ④ 癌抑制因子4E-BP1の機能をミミックする抗癌剤の臨床開発を行うため、製薬企業と提携する。

【成果の概要】

癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする低分子化合物のデザイン・合成【(株) PRISM BioLab】

標的蛋白質 eIF4E と 4E-BP1 複合体立体構造から eIF4E 結合部位をミミックする MO 化合物のデザインと合成を進めた。これらの実現に効率的な誘導体合成法も確立した。構造・物性等を考慮し、MO30003 および周辺化合物の代謝安定性試験・PK 等を評価した。これまでに得られた MO 化合物の評価結果を基に SAR 解析を行い、MO30003 の課題である in vivo における高投与量・代謝安定性の低さ等を回避しつつ、活性の維持・向上した化合物をデザインし、合成を行った。その結果、代謝安定性の要因となっている脂溶性を低減した化合物で MO30003 と同程度の活性を有し、ヒト正常上皮細胞株における細胞毒性が認められない MO16165 等を見出した。また、高活性化合物群 (MO30003 のおよそ 3 倍の抑制活性を示す) の MO16130 および MO16131 のマウス・ヒト肝ミクロソーム代謝安定性・CYP5 分子種の阻害作用および CYP3A4 時間依存的阻害作用ならびに hERG 阻害作用について評価したところ、顕著な hERG 阻害活性は認められず、これらは MO30003 に比べ代謝安定性が改善していることが明らかとなった。In vivo 評価を実施する化合物として MO30006, MO30018, MO16130, MO16131 等の 6 化合物を選定して合成した。総合的に抗腫瘍活性、代謝安定性や化合物の物性等を考慮して、MO16130 等を in vivo 動物モデル評価に進める化合物に選定し、大量合成を実施し、滋賀医科大学へサンプルを供与した。MO16130 は低投与量で明確な腫瘍抑制効果が認められた。

癌抑制因子4E-BP1の機能をミミックする抗癌剤の臨床開発を行うため、製薬企業と提携する【(株) PRISM BioLab】

これまでに得られた成果について製薬企業との提携交渉を開始した。数社については引き続き検討を進めているところである。他の研究機関からも製薬企業へアプローチを実施した。

MO 化合物の細胞評価：作用機構の解析【愛知県がんセンター 研究所】

まず、MO 化合物の細胞および動物レベルでの評価を 3 機関 (愛知県がんセンター、東京工業大学、滋賀医科大学) にて行うにあたり、化合物評価系の標準化と至適化を行った。具体的には細胞株の培養に用いる血清 (FCS) の標準化および化合物の評価に用いる膵臓癌細胞株の共通化と共に、化合物評価のためのコントロー

ルとして合成された M03721 標準品を共用することにより、化合物評価のための実験系の標準化を行った。そこで、M03721 や M030003 よりも癌細胞の足場非依存性増殖に対して阻害活性が高い化合物を選択し、マウスへの至適投与量を見積もるため、癌細胞における癌化抑制能を癌化の指標である足場非依存的増殖能によって評価した。結果として、M0 新規化合物中、M030003 より 3 倍程度活性の高い 4 種の化合物を見出した。さらに M030003 と新規 M0 化合物は、4E-BP1 null の膀胱癌細胞だけでなく、Kras や EGFR 変異を有する別の難治癌細胞においても癌抑制活性を有することが明らかとなった。一方、M030003 と新規 M0 化合物について細胞毒性を正常細胞の足場依存的増殖能によって評価したところ、M030003 と新規 M0 化合物について癌抑制活性の見られる濃度 ($1\ \mu\text{M}$) の 50 倍に相当する $50\ \mu\text{M}$ でも正常細胞に対する細胞毒性がほとんど見られず、これらの作用が癌細胞選択的なものであることが示唆された。

さらに M0 化合物の作用機構解析のため、我々が開発したプロテアーゼ感受性の変化を利用して化合物の標的分子を同定する新しい方法 (W0200302096 薬物の標的同定法; Anal Biochem 2009; 385:314-20. Drug-target identification from total cellular lysate by drug-induced conformational change) を用い、M0 化合物による eIF4E のプロテアーゼ感受性の変化について評価し、M0 化合物による癌抑制因子の機能ミミックを生化学的に検証することとした。その結果、高活性の M030003 や上記化合物により、標的蛋白質 eIF4E のプロテアーゼ感受性が濃度依存的に亢進し、化合物の活性と相関が見られることを明らかとした。これらの結果から、M0 化合物の癌抑制作用が癌抑制因子 4E-BP1 の機能ミミックによることを生化学的に検証した。

M0 化合物の標的蛋白との結合解析・作用機構解析【大阪大学 大学院薬学研究科】

M0 化合物とその標的蛋白質 eIF4E との結合を解析し、作用機構を検証することを目的として研究を実施した。eIF4E の大腸菌大量発現精製系を作成して、安定同位体標識した eIF4E を調製し、溶液中での NMR による相互作用解析を実施した。まず前臨床試験に向けた候補化合物である M030000 系列を中心に検討した結果、高溶解性で塩基性部分を有する化合物である M030005 について、Trp73 および Glu70 由来シグナルの化学シフト摂動を認めた。また芳香環を有さない化合物である M030006 については、化学シフト変化は認められなかったが、シグナルの強度低下が観測された。これらの結果より、M030000 系列の化合物は、eIF4E の 4E-BP1 結合部位近傍と相互作用していることが示唆された。

各種 M0 化合物の細胞アッセイから、新たに M016130 系列の化合物も、比較的良好な活性を示すことが分かった。そこで、それらについても同様の相互作用解析を実施した結果、M016131、M016165 および 16166 については、M030005 などと同様に 4E-BP1 結合部位における相互作用を示し、さらに Trp166、Thr168 など CAP 結合部位を含む領域においても化学シフト摂動が観測された。この結果より、M016130 系列の化合物は、標的である eIF4E 蛋白質と 4E-BP1 結合部位近傍において相互作用するだけでなく、CAP 結合部位に対しても、直接的な相互作用かアロステリック作用かは不明であるが、何らかの影響を及ぼしている可能性が示された。さらに、M0 化合物の 4E-BP1 ミミックとしての機能を検討するため、4E-BP1 の eIF4E 結合部位に相当するペプチドと M030005 を共存させた際の NMR スペクトルを解析した。その結果、M0 化合物は 4E-BP1 との結合を安定化する作用をもつ可能性が示唆された。

M0 化合物と標的蛋白質 eIF4E との複合体結晶構造解析を目指して、eIF4E と M0 化合物との結晶化条件のスクリーニングを実施した。NMR による検討で相互作用が示唆された上記 M0 化合物を用いた結果、M030005 共存下で微結晶が得られた。

M0 化合物の抗癌活性評価、M0 化合物の X 線結晶構造解析と標的蛋白への結合解析【東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所】

癌抑制因子 4E-BP1 の機能をミミックする M0 化合物の標的蛋白質 eIF4E への結合解析、結晶化した化合物の X 線結晶構造解析を行い、新規化合物のデザインと合成に提供した。: M03721 の立体異性体全 4 化合物

(M03721, M04221, M016099=*ent*-M04221, M016100=*ent*-M03721) について単結晶を取得することに成功し、得られた化合物の X 線結晶構造解析により絶対配置を決定することができた。Benzophenone 側鎖を導入した M0 化合物を結合させた eIF4E 蛋白質のフラグメントを追加予算で購入した分取 HPLC 装置を用いて精製し、Orbitrap 質量分析計で結合アミノ酸残基を同定できた。M016131 は eIF4E の部分ペプチド(Q26-V217) の N 末に結合した。

ヒト癌細胞株のスフェロイドの増殖と形態を染色することなく迅速評価する方法を用いて、M0 化合物と標的蛋白質 eIF4E との結合解析を基に合成された新規 M0 化合物の抗癌活性を評価した。新規化合物のなかに M030003 より活性の高い (約 3 倍) 高活性の M0 化合物として M016130, M016131, M016133 および平成 29 年度に合成された M016173 を見出し、高次評価に進めた。

KRAS 活性化変異を持つ膵臓癌細胞 PANC-1, MIA PaCa-2、大腸癌 HCT116 などが M0 化合物に高い感受性を示した。一方、KRAS が正常な癌細胞株は M016130, 16131, 16133 および 16173 などの高次評価に選ばれた化合物にも感受性が低いことが明らかになった。これまでの評価で最も高い感受性を示したのは膵臓癌 MIA PaCa-2 である。

線虫を用いた M0 化合物の安全性評価 : M016130, M016131 などは生後 16 日の老年期まで DMSO コントロールより高い運動量を示し、また異常な動きも見られない。これまで高活性 M0 化合物は正常細胞、線虫などで毒性は見出されていない。

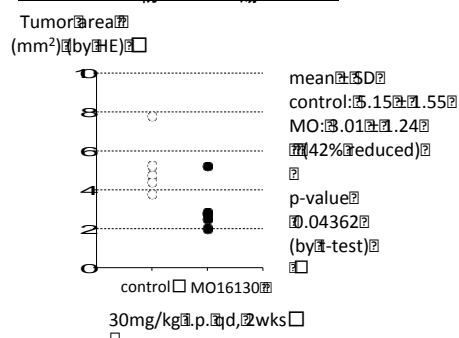
製薬企業とのアライアンス : Non-Confidential 資料を作成し、4 社に紹介した。D 社から、“M030003 より細胞での活性が高い後続化合物が低い投与量で膵臓癌同所移植モデルでの癌の増殖を抑制したら知らせて欲しい” との連絡をいただいた。

M0 化合物の in vivo 抗がん活性のマウスを用いた評価【滋賀医科大学 微生物感染症学部門】

In vitro スクリーニングで選択された複数の M0 化合物について、ヒト膵臓癌細胞株 MIA PaCa-2 を用いてヌードマウスへの膵臓接種 (同所性) による腫瘍形成の実験系を確立し、腫瘍抑制活性および副作用の有無等の評価を行った (下左図)。MIA PaCa-2 細胞を 5 週齢の雌性ヌードマウスの膵臓に移植し、1 週間後 M0 化合物を腹腔内に 1 日 1 回 2 週間にわたって投与した。2 週間後、マウスを解剖し膵臓腫瘍形成について病理解析を行った。また、腸、肝臓、腎臓、肺、心臓、血清等についても病理解析を行った。膵臓腫瘍形成に対して M030003 化合物は 75mg/kg の濃度で強い腫瘍形成抑制効果を示した。肝臓、腎臓、肺、心臓等の主要臓器については薬剤投与による異常は認められなかったが、この投与量では腸の肥大、下痢傾向等が認められた。M030003 の 60mg/kg の投与量では 75mg/kg より弱い抑制効果は認められ副作用は示さなかった。



M016130化合物の膵臓腫瘍抑制効果



次に細胞レベルでのスクリーニングで M030003 の約 3 倍の抑制効果を示した M016130 化合物についても同じマウス膵臓腫瘍実験系を用いて腫瘍抑制効果を検討した。この実験ではより腫瘍の生着率の高い NOD-scid マウスを用い投与量は 30mg/kg で実験を行った。上右図に示すように、M016130 は明確な (t 検定で有意の

差あり)の抑制効果を示した。薬剤投与マウスでは腸、肝臓、腎臓、肺、膵臓等の臓器に特に異常は認められなかった。また、下痢傾向も認められなかった。これらの結果から MO 化合物が膵臓腫瘍の抑制に有効であることが示された。

【英文研究概要】

New molecular targeted therapeutic agents for intractable cancer such as pancreatic cancer and recurrent cancer are desired. We have revealed that inhibition of 4E-BP1 function associated with activation of mTOR pathway is important for cancer cell proliferation. We challenged the creation of small molecules which mimic the function of tumor suppressor 4E-BP1 and found that MO compounds which mimic the amino acid sequence important for the function of 4E-BP1 show growth inhibitory activity in cancer cells such as pancreatic cancer.

<PRISM BioLab Co., Ltd>

We proceeded design and syntheses of MO compound which mimics eIF4E binding site from the target protein and 4E-BP1 tertiary structure. Considering the structure, physical properties, metabolic stability and PK, MO30003 and many compounds were evaluated. We synthesized the compound maintained or improved in activity while avoiding metabolic stability in vivo and found MO16165, etc., which have the same degree of activity as MO 30003 and do not show cytotoxicity in human normal epithelial cell line and reduced lipophilicity. In addition, MO16130 and MO16131 in the group of highly active compounds (showing approximately 3 times inhibitory activity of MO 30003) showed improved metabolic stability compared with MO30003. As a result, six compounds such as MO30006, MO30018, MO16130, MO16131, etc. were selected and synthesized as compounds for in vivo evaluation. MO 16130 showed clear tumor suppressing effect at low dosage.

We have negotiated partnerships with pharmaceutical companies on results obtained so far. We are continuing to consider about several companies. Other research groups also approached pharmaceutical companies.

<Aichi Cancer Center Research Institute>

To develop the more effective compounds related to MO30003, we evaluated the effects of MO30003-related compounds in pancreatic cancer cells (PANC-1) and normal cells (MEFs and HaCaT).

Under the conditions previously optimized, we assayed MO compounds and found that several compounds suppressed growth of PANC-1 cells as well or better than MO30003. These MO compounds also suppressed growth of colon and lung cancer cells harboring Kras or EGFR mutation. In contrast, these MO compounds had no cytotoxic effects in normal cells. Furthermore, to confirm the mechanism of action of MO compounds as a 4E-BP1 mimic in cells, we used the method “Drug-target identification from total cellular lysate by drug-induced conformational change” previously we developed. Using the method, we demonstrated that MO compounds suppressed growth of cancer cells by mimicking the function of tumor suppressor 4E-BP1.

<Osaka University>

We performed NMR chemical shift perturbation experiments on eIF4E protein to obtain the structural implications of the binding of MO30000 series compounds. Analysis of ¹⁵N-HSQC spectra showed a specific pattern of chemical shift perturbations upon addition of MO30005 and MO30006 at Glu70 and Trp73. These results suggest that MO30000 series compounds interact to eIF4E around the 4E-BP1 binding region. We further evaluated binding of newly synthesized MO16130-series compounds by using NMR.

Among them, M016131, 16165, and 16166 showed chemical shift perturbations at the 4E-BP1 binding region and CAP binding site also. This can be interpreted either as a consequence of direct ligand interactions or of compound-induced conformational changes of eIF4E. We also found that the binding of M030005 and eIF4E is not exclusive and M030005 stabilizes the eIF4E/4E-BP1 interaction. Based on these results, we tried to crystallize the complex of eIF4E with M0 compounds for structural analysis and have obtained small crystals of eIF4E in presence of M030005.

<Tokyo Institute of Technology>

Anti-tumor activity of M0 compounds with 3D sphere culture method:

- M030003 inhibited proliferation with 3D sphere culture method of human cancer cells with KRAS activated mutation; pancreatic cancer cell PANC-1 which is 4E-BP1 deficient and also pancreatic cancer cell MIAPaCa-2 and cancer cell colon cancer cell HCT116 in which 4E-BP1 is inactive by phosphorylation.
- New M0 compounds were evaluated their anti-tumor activity as above. Several compounds (M016130, M016131, M016133, M016173, etc.) have shown superior activity than M030003 and were selected for further evaluation. These M0 compounds did not cause any toxicity on *C. elegans* during their whole life stage.

Analysis of 3D structure of M0 compounds and its binding site in eIF4E

- Structure of M0 compounds, including four stereo-isomeric compounds of M03721 (M03721, M04221, M016099 = *ent*-M04221, M016100 = *ent*-M03721), were revealed by X-ray crystal analysis and has been applied to design new M0 compounds.
- Identification of amino acids in the eIF4E fragment that bind to M0 compounds: A fragment of eIF4E protein to which the M0 compound with benzophenone side chain was photo-crosslinked were purified using a preparative HPLC apparatus purchased on an additional budget. Using Orbitrap mass spectrometer, the binding site of M016131 was identified at the peptide (Q26-V217) in N-terminus region of eIF4E.

<Shiga University of Medical Science>

To evaluate the anti-oncogenic activity of M0 compounds which mimic the function of tumor suppressor 4E-BP1 by in vivo mouse model, we established the murine orthotopic model of pancreatic cancer which closely mimics the pancreatic tumor formation. MIAPaCa-2 pancreatic cancer cells were injected into the tail of the pancreas of ten 5 weeks-old nude mouse (or NOD-scid mouse). After 7 days of the injection, mice were intraperitoneally administered 75mg/kg of M030003 compound once daily for 2 weeks. Control mice were daily administered a vehicle. Finally, mice were sacrificed a day after the last administration. After 3 weeks of injection, the injected MIAPaCa-2 cells formed a pancreatic cancer-like tumor. The tumors derived from injected MIAPaCa-2 cells could be distinguished from normal pancreas. After 2 weeks of the intraperitoneal administration of 75 mg/kg M030003, the tumor formation was significantly suppressed. We observed no abnormal behavior, difference in the body weight or detected any histopathological change in the liver, heart, lung and kidney between the control and M030003-treated groups. However, the swelling of gut and diarrheas were observed in M030003-treated mice. Administration of 60mg/kg M030003 showed weaker anti-tumor effect but did not show any side effect. We also used the M016130 compound which showed more potent in vitro anti-cancer activity for MIAPaCa-2 cells. Administration of 30mg/kg M016130 showed significant anti-tumor effect but did not show any side effect. These results confirmed the ability of M0 compounds to suppress in vivo

pancreatic tumor formation.