95 年度研究計畫補助案成果報告

計畫名稱：血管新生抑制劑對癌細胞轉移之活性評估

計畫編號：CNPH9510

主持人：呂玉玲

執行期限：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

中文摘要: 爲阻止惡性腫瘤細胞藉由新生血管增生作用，突破原來的生長區域、擴張生長，而使癌症一直擴展而蔓延到其他部位。近年來，抑制新血管增生成爲治療癌症的新策略。研究惡性腫瘤時發現了各種不同的血管新生因子，其中以 VEGF (vascular endothelial growth factor) 可由腫瘤細胞或巨噬細胞分泌，是促進內皮細胞增生；移動及存活的誘導因子，在腫瘤新血管生成過程中扮演最重要的角色。藉由抑制 VEGF 調控訊息的抗新血管增生之治療模式，對癌症病人而言，應是安全且副作用少的治療方式。爲此抑制腫瘤細胞的新血管生成，VEGF 接受器成爲藥物設計的新標的。最近，應用小分子(anilinoquinazoline 類衍生物) 來抑制 KDR 之 tyrosine kinase 的活性，它們能干擾 VEGF 接受器之 RTK 的活性，結果顯示，此小分子可有效抑制血管新生作用。本計劃以 anilinoquinazoline 類衍生物當模型，將 quinazoline 與 aniline 之連接方式以 sulfonylamide (-SO_2NH-)取代-NH-，以人類 VEGFR2 (KDR)的 X 光結晶構形 ATP 結合中心當作 docking region，以 ZD6474 及 sulfonylamide analog **5,** 利用 Autodock 的過程作研究，發現 sulfonylamide analog 之 sulfonyl 基團可與 ATP 結合中心之胺基酸有額外的氫鍵結合機會。

Abstract: Pathological angiogenesis has been associated with a variety of disease states including diabetic retinopathy, psoriasis, cancer, rheumatoid arthritis, atheroma, Kaposi’s sarcoma, and haemangioma. Recently evidence indicates that VEGF (vascular endothelial growth factor) is an important stimulator of both normal and pathological angiogenesis. VEGF has been shown to be secreted by human tumor cell lines in culture. Moreover, VEGF protein has been identified for VEGF receptor FlK-1/KDR in primary tumors of breast, colon, and renal origin. Blockade of VEGF signal transduction by sequestration of VEGF with antibody has been shown to prevent tumor growth. VEGF RTKs must, therefore, be viewed as attractive therapeutic targets for the development of novel agents to treat angioproliferative diseases such as cancer. Recently, a series of substituted 4-anilinoquinazolines have potential inhibitors of VEGF receptor (Flt and KDR) tyrosine kinase activity. In this report, we replaced linkage of 4-anilinoquinazolines by sulfonamide link. To evaluated quinazoline phenyl sulfonamide derivatives for KDR by Autodock program. The results showed hydrogen binding between sulfonylamide analog **5** and ATP binding site of KDR.

緒論：

今年六月，衛生署再度証實癌症是危害人體健康的重要疾患。自從民國七十一年以來，連續二十二年癌症蟬聯台灣十大死因之榜首，平均每十四分鐘就有一人因癌症離開人世。醫藥科技的進步，解救了許多寶貴的生命，但對於癌症的治療幫助卻非常有限。人人談癌色變，癌症的可怕在哪裡呢？癌症的可怕即在癌細胞會不斷的分裂、加倍增生。目前治療癌症的方法有三種：一、化學治療；二、放射治療；三、外科手術治療。但是這三種治療方式其副作用很大，相對地對骨髓、淋巴腺等健康細胞造成破壞，且造成本身免疫系統抗癌能力喪失，體能也過度消耗，導致治療失敗。

因此、研究人員企圖尋找新穎的抗癌策略。最新的研究報告指出，惡性腫瘤細胞在缺乏養分、充滿毒素且缺乏氧氣的環境下仍然能夠持續成長、發育、茁壯，主要是因爲惡性腫瘤細胞能藉由新生血管增生作用，突破原來的生長區域、擴張生長，則可使癌症一直擴展而蔓延到其他部位。(ref1)近年來，抑制新血管增生成爲治療癌症的新策略。

新血管增生在一般正常情況下，僅發生在胚胎發育期；子宮內膜再生期及傷口癒合期，然而，在惡性腫瘤細胞生長的部位，也可觀察到新血管增生的現象。(ref2)因爲癌細胞快速生長的同時，需要週邊的血管網路提供足夠的養分作爲癌細胞生長的能源。此作用也促使腫瘤細胞有機會轉移至其他位置。(ref3)應用藥物抑制癌細胞之新血管增生作用，即可阻斷新血管的形成，切斷營養與氧氣的供應，讓癌細胞在缺乏營養與氧氣的情況下，癌細胞便會餓死，即不會繼續分裂增生，而達到治癌的目標。(ref4)

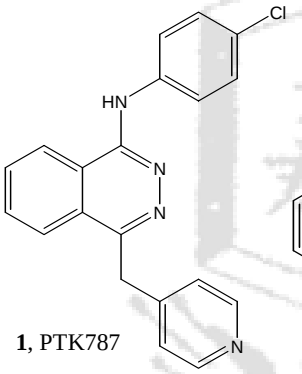
研究惡性腫瘤時發現了各種不同的血管新生因子，這些因子在新血管的形成中扮演的角色被詳細的評估。其中以 VEGF (vascular endothelial growth factor) 可由腫瘤細胞或巨噬細胞分泌，(ref5)是促進內皮細胞增生；移動及存活的誘導因子，在腫瘤新血管生成過程中扮演最重要的角色，它是最強且專一性的內皮細胞新血管生成因子。(ref4a 當腫瘤細胞缺乏營養與氧氣；喪失腫瘤抑制因子或致癌基因活化的情況下，VEGF 接受器即會過度表現。VEGF 接受器是一種穿透細胞膜的接受器，目前已知有三種形式：Flt-1(VEGFR1)，KDR (VEGFR2)，Flt-4 (VEGFR3)。當 VEGF 與血管內皮細胞之 VEGF 接受器結合，可誘導血管內皮細胞大量表現新血管生成因子的接受器 KDR (kinase domain-containing receptor ;VEGFR2) 及 Flt-1 (fms-like tyrosine kinase; VEGFR1)，這些接受的細胞內側具有 tyrosine kinase，當 VEGF 結合至接受器，將造成接受器形成二元體，即可活化接受器進行自身磷酸化反應(autophosphylation)，起動新血管增生訊息傳遞至細胞核，結果即誘導血管內皮細胞增生，促使 protease 表現，引發新生血管朝向腫瘤處突出生長。(ref6)

腫瘤細胞可以調控隣近血管的內皮細胞 VEGF 與 VEGF 接受器表現，實驗証實抑制 VEGF 誘導的新血管增生之訊息，將選擇性抑制腫瘤有關的血管增生，對正常血管之內皮細胞之增生則少有影響。因此，藉由抑制 VEGF 調控訊息的抗新血管增生之治療模式，對癌症病人而言，應是安全且副作用少的治療方式。(ref7)爲此抑制腫瘤細胞的新血管生成，VEGF 接受器成爲藥物設計的新標的。除了抗腫瘤外，抑制新血管增生的藥物，應該也可成爲與血管化病變有關之疾病的新治療藥物，例如糖尿病性視網

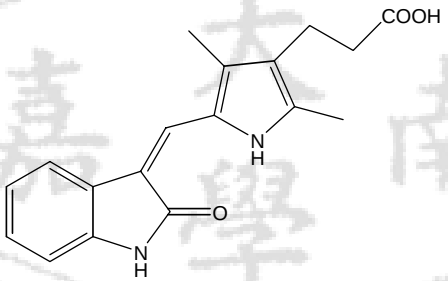
膜病變(diabetic retinopathy)；老化有關的斑點病變(age-related maculopathy)和類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)等。(ref8)另外，VEGF 是一個增加血管通透性的強力誘導因子。所以，在惡性腫瘤的腹水及水腫的形成也扮演重要的角色。由此可以推測，藉由抑制 VEGF 調控訊息的抗新血管增生的治療，對癌症病人的腹水及水腫，應有相當程度的幫助(ref5)。

應用各種不同的方法抑制新血管增生之訊息傳導的技術正在研究中，例如使用一個專一抗體來清除 VEGF 或 VEGF 接受器。最近，也有應用小分子(RTK 抑制劑) 來抑制 KDR 之 tyrosine kinase 的活性，正在臨床試驗中。結果顯示，此小分子可有效抑制血管新生作用。

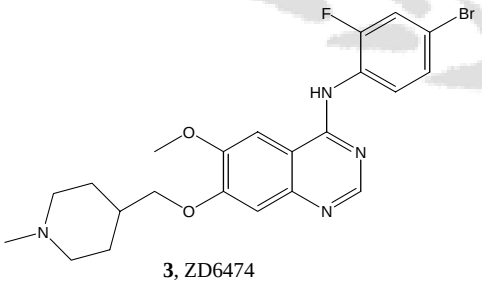
目前在研究中有三類可口服有生體可用率的小分子，它們能干擾 VEGF 接受器之 RTK 的活性：第一類爲 phthalazine **1** (PTK 787)它可同時抑制 Flt-1 與 KDR(ref9)。第二類爲 indolinone **2** (Su 6668) 它具有抑制 PDGFR 的活性，但對 KDR 的抑制活性較弱(ref10)。第三類爲 anilinoquinazoline **3** (ZD6474) 可同時抑制 Flt-1 與 KDR 且抑制的強度在 nanomole 的範圍(ref11)。



1, PTK787



2, SU6668



3, ZD6474

在研究 anilinoquinazoline 類衍生物對 VEGF 接受器之 tyrosine phosphorylation 的活性評估顯示(ref12)：

1、 anilinoquinazoline 的 aniline 環上的取代基:

aniline 環 2 位以親脂性較小；缺電子基取代，合併 4 位以親脂性較大；拉電子基取代 (如 Br; Cl)時，抑制活性最佳。在 aniline 的 meta 位以羥基(-OH) 取代，則抑制 Flt-1 的活性明顯增加 ，而對 KDR 的抑制則只增加了 2-4 倍。

2、 anilinoquinazoline 的 quinazoline:

quinazoline 的 6 位以分子小；供電子基(如-OCH_3) 的抑制作用最佳；若以 H 或 bulkyl 取代，則對 KDR 的抑制活性下降了二十倍。

quinazoline 的 7 位可以耐受親脂性；鹼性；電子性或立體性等各種變化，也不致影響抑制活性。quinazoline 的 7 位的側鏈的性質可以改善藥物的藥效動力學

(pharmacokinetic properties)的性質，並不影響它對 KDR 之良好的抑制作用。當 quinazoline 的 7 位以中性的取代基 1,2,3-triazole-ethoxy 取代，因此、使 ZD4190 在血清中的濃度較高，於血清中維持的時間較長；若將 quinazoline 的 7 位改以鹼性含氮的側鏈取代，如 morpholines; pyrrolidine 或 piperidine，可使其化合物的 pKa 值維持在 7 至 9 之間，有利於藥物的藥效動力學的性質。

3、anilinoquinazoline 的 quinazoline 以不同的雜環取代:

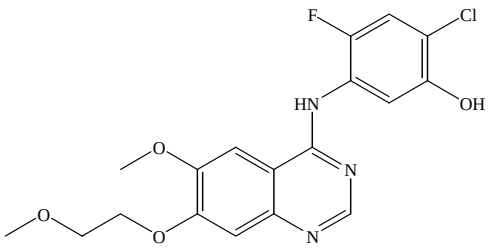
如以 quinoline 與 cinnoline 取代 quinazoline。當取代基爲 2-fluoro-4-chloroaniline 時，quinoline 類與 quinazoline 類之抑制性幾乎相當。若以 cinnoline 取代 quinazoline 則抑制活性明顯下降 160 倍。當取代基爲 3-hydroxyaniline 時，無論是 quinazoline 類或 quinoline 類 或 cinnoline 類 其抑制作用都有提昇的作用。

研究方法:：

以電腦模擬比對來解釋 anilinoquinazoline 類衍生物對 VEGF 接受器之 tyrosine phosphorylation 的活性評估(ref12):

研究 ATP 與 PKA (protein kinase A)之結合活性中心顯示，ATP 之 adenine 與 PKA 間形成二個氫链，一個是 adenine 6 位之 amine 與 PKA 之活性中心之胺基酸骨架的 Glu-121 carbonyl 形成氫鍵的提供者；另一個是 adenine N1 與 PKA 之活性中心之胺基酸骨架的 amide N-H 形成氫鍵的接受者。在此活性中心有一個厭水性的凹槽。

以電腦模擬比對 Flt-1 與抑制劑的氫鍵結合顯示，結果與 ATP 和 PKA 之活性中心相似。一般 adenine N1 以接受氫鍵的形式與酵素結合，針對大部分的抑制劑所比對的結果也都相同，在很多的例子中，証實當抑制劑嵌入 adenine 的位置時，僅有接受型氫鍵是固定存在；反之提供型氫鍵在抑制劑與酵素的交互作用常是不存在的，在鄰近 adenine 結合區有一個深且大小中等的凹槽。雖然氫鍵的鍵結是抑制劑與酵素結合所必須的，但它與抑制劑的強度大小並無相關性，目前的研究顯示此厭水性的凹槽才是決定了抑制劑的強度及選擇性的關鍵。



Compound **4**

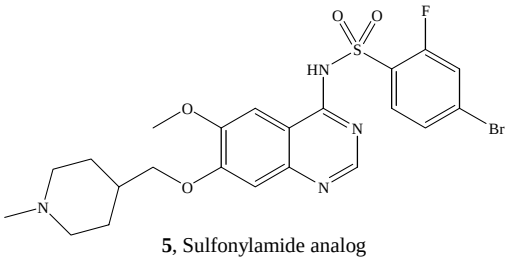
研究化合物 **4** 與 Flt-1 電腦模擬結果，其中 Quinazoline 環是以平面形式佔據 adenine 位置，Quinazoline 環上 N-1 同樣以接受型氫鍵與 Flt-1 結合，而 Quinazoline 環上 N-3 並不會與 Flt-1 有任何鍵結關係。其中 Quinazoline 環 C-2 緊鄰 Flt-1 活性中心之胺基酸骨架的 Glu-910 之 carbonyl 的氧原子。因此，當 Cinnoline 取代 Quinazoline 時，Cinnoline 的 2 位爲氮原子，因而會與 Glu-910 之 carbonyl 的氧原子形成排斥作用，所以抑制作用明顯下降。反觀，Quinoline 取代 Quinazoline 時，Quinoline 的 2 位爲碳原子即不會與 Glu-910 之 carbonyl 的氧原子形成排斥作用。另外，Quinoline 的 3 位也是碳原子，它可與 Flt-1 活性中心之胺基酸骨架的 Val-909 形成 van der Waal 作用，相似於 Quinazoline 的 3 位也是氮原子的作用，所以酵素抑制作用也相當。

Quinazoline 的 4 位取代 2-fluoro-4-chloroaniline 時，此時 2-fluoro-4-chloroaniline 會陷入緊鄰 ATP 結合中心之厭水性的凹槽處，此凹槽處的大小固定，所以，取代基團的大小比取代基的性質更重要。Quinazoline 環的 C-6；C-7 位於 ATP 結合中心之厭水性的凹槽的外面，所以，C-7 位置的取代可以較廣泛；而 C-6 則較受限制。

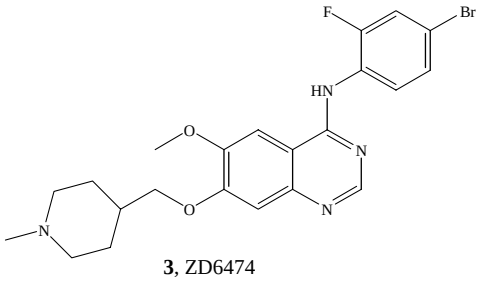
但當 meta-hydroxy-aniline 取代 Quinazolin；Quinoline 或 Cinnoline 的 4 位時，都有比較強的酵素抑制作用，推測 meta-hydroxy 與 Mg-ATP 結合的固定基團 Asp-Phe-Gly 上之 Asp-1040 形成氫鍵有關，此 phenolic-oxy 也會與 Asp-1040 骨架上 NH 形成氫鍵。

結果與討論：

本計劃以 anilinoquinazoline 類衍生物當模型，將 Quinazoline 與 aniline 之連接方式以 Sulfonylamide (-SO_2NH-)取代-NH-。以人類 VEGFR2 (KDR)的 X 光結晶構形 ATP 結合中心當作 docking region，以 ZD6474 及 sulfonylamide analog **5** 利用 Autodock 的過程作研究，發現 sulfonylamide analog 之 sulfonyl 基團可與 ATP 結合中心之胺基酸有額外的氫鍵結合機會。所以，比對 ZD6474 及 sulfonylamide analog 5 之 docking energy (-9.24 和-10.36)，証明 sulfonylamide analog 與 ATP 結合中心有更好的結合力。

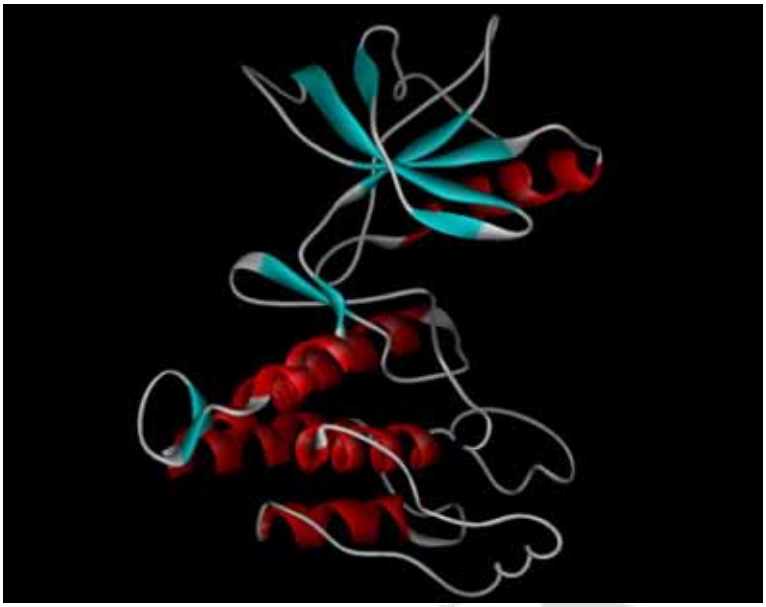


5, Sulfonylamide analog

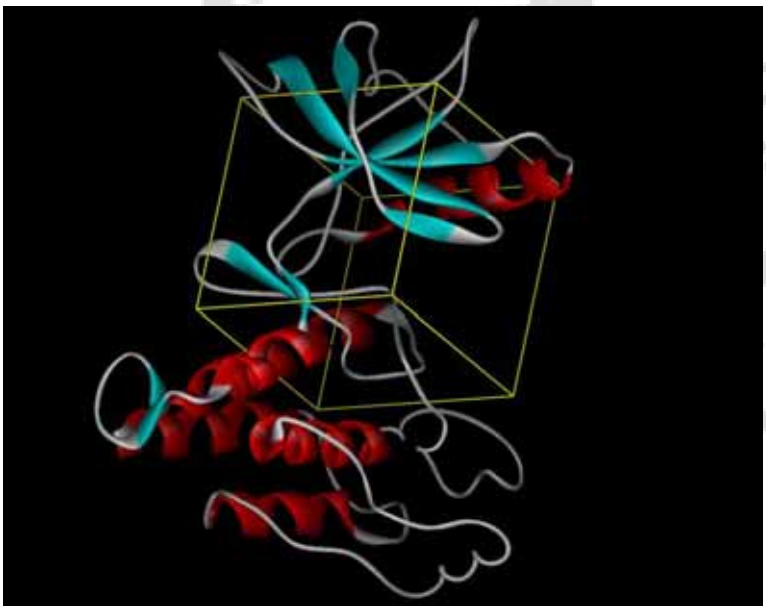


3, ZD6474

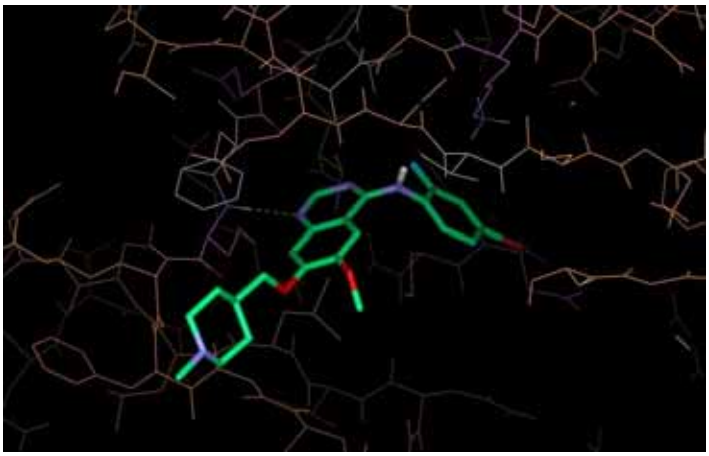
Crystal Structure of Human VEGFR2 (KDR)



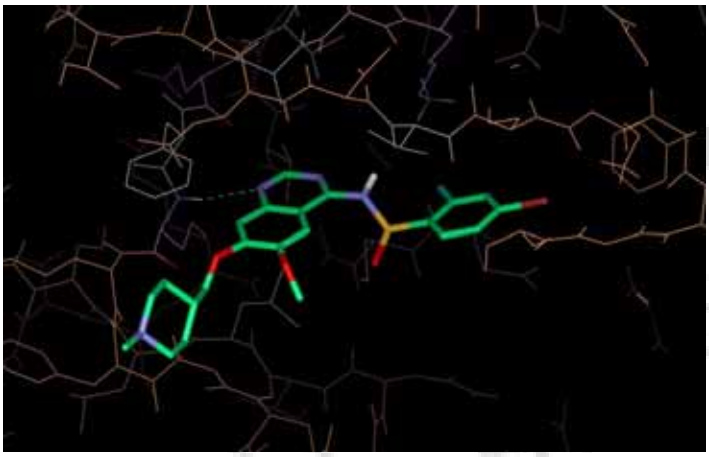
Docking Studies on KDR Using the Program AutoDock



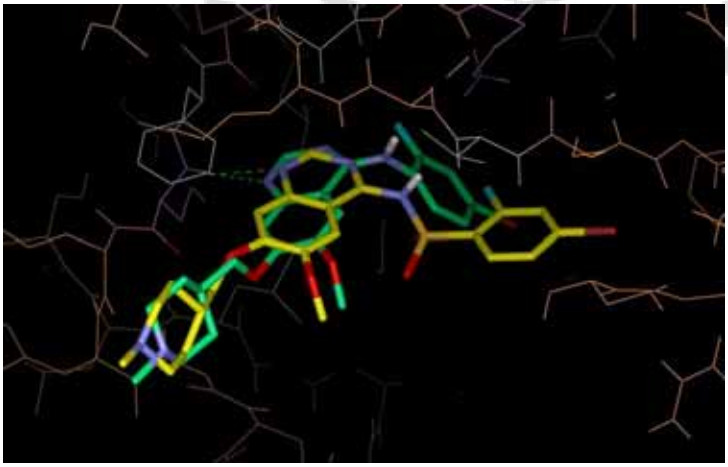
Docking Model of ZD6474



Docking Model of Sulfonamide_analog5



Superimposition of ZD6474 (green) and Sulfonamide_analog5 (yellow)



因此，未來可以合成 Quinazoline phenyl sulfonamide 類衍生物，對抗新血管增生的作用，用於發展新一類的抗腫瘤藥物。

Reference :

1, Folkman, J. Anti-angiogenesis: New concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* **1972**, *175*, 409-416.

2, Fan, T. P. D.; Jaggar, R.; Bicknell, R. Controlling the vasculature: angigenesis, anti-angiogenesis, and vascular targeting of gene therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, *16*,

57-66.

3, Liotta, L. A.; Kleinerman, J.; Saidel, G. M. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* **1974**, *34*, 997-1004.

4, Klagsbrun, M.; Moses, M. A.; Molecular angiogenesis. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R217-R224.

5, Senger, D. R.; Van De Water, L.; Brown, L. F.; Nagy, J. A.; Yeo, K. –T.; Yeo, T. –K.; Berse, B.; Jackman, R. W.; Dvorak, A. M.; Dvorak, H. F. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastat. Rev.* **1993**, *12*, 303-324.

6, Strawn, L. M.; McMahon, G.; App, H.; Schreck, R.; Kuchler, W. R.; Longhi, M. P.; Hui, T. H.; Tang, C.; Levitzki, A.; Gazit, A.; Chen, I.; Keri, G.; Orfi, L.; Risau, W.; Flamme, I.; Ullrich, A.; Hirth, K. P.; Shawver, L. K. Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3540-3545.

7, Kerbel, R. S. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* **1997**, *390*, 335-336.

8, Cursiefen, C.; Schonherr, U. Angiogenese und angiogenesehemung im auge. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd*. **1997**, *210*, 341-351.

9, Bold, G.; Altmann, K.-H.; Frei, J.; Lang, M.; Manley, P. W.; Traxler, P.; Wietfeld, B.; Bruggen, J.; Buchdunger, E.; Cozens, R.; Ferrari, S.; Furet, P.; Hofmann, F.; Martiny-Baron, G.; Mestan, J.; Rosel, J.; Sills, M.; Stover, D. Acemoglu, F.; Boss, E.; Emmenegger, R.; Lasser, L.; Masso, E.; Roth, R. Schlachter, C.; Vetterli, W.; Wyss, D.; Wood, J. M. New anilinophthalazines as potental and orally well absorbed inhibitors of the VEGF receptor tyrosine kinases useful as antagonists of tumor-driven angiogenesis. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2310-2323.

10, Sun, L.; Tran, N.; Liang, C.; Tang, F.; Rice, A.; Schreek, R.; Waltz, K.; Shawver, L. K. McMahon, G.; Tang, C. Design, synthesis and evaluation of substituted 3-[(3- or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidenyl]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptor tyrosine kinases. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5120-5130.

11, Basser, R.; Hurwitz, H.; Barge, A.; Davis, I.; DeBoer, R.; Holden, S. N.; McArthur, G.; McKinley, M.; Nairn, K.; Persky, M.; Rischin, D. Rosenthal, M.; Swaisland, H.; Eckhardt, S. G. Phase I pharmacokinetic and biological study of the angiogenesis inhibitor, ZD6474, in patients with solid tumors.
Processdings of the 37th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, San Francisco, May 2001; 21, Abstr, 396, 100a.

12, Hennequin, L. F.; Thomas, A. P.; johnstone, C.; Stokes, E. S. E.; Ple, P. A.; Lohmann, J.-J. M.; Ogilvie, D. J.; Dukes, M.; Wedge, S. R.; Curwen J. O. Kendrew, J. Lambert-van der Brempt, C. Design and structure-activity relationship of a new class of potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5369-5389.

嘉南大學