

学位論文

2-ピリジル構造を有するジケトピペラジン型
チューブリン重合阻害剤の創製研究

2018年1月

林 良樹

目次

| | |
|--|----|
| 略号 | 3 |
| 序論 | 5 |
| 第一章 新規ジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤 KPU-300 の創製 | |
| 序節 | 9 |
| 第一節 殺細胞活性に対するヘテロ環部位の影響の検討 | 16 |
| 第二節 イミダゾール環部位を修飾したベンゾフェノン型 ジケトピペラジン誘導体の構造活性相関検討 | 21 |
| 第三節 小括 | 27 |
| 第二章 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 の細胞生物学的評価 | |
| 序節 | 28 |
| 第一節 他の細胞株に対する KPU-300 の殺細胞活性評価 | 28 |
| 第二節 精製チューブリンに対する KPU-300 の活性評価 | 29 |
| 第三節 免疫染色を用いた細胞内微小管に対する KPU-300 の活性評価 | 30 |
| 第四節 小括 | 32 |
| 第三章 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 を基盤とした水溶性プロドラッグ創製 | |
| 序節 | 34 |
| 第一節 KPU-300 水溶性プロドラッグの創製 | 35 |
| 第二節 KPU-300 水溶性プロドラッグの評価 | 38 |
| 第三節 小括 | 39 |
| 総括 | 41 |

| | |
|------|----|
| 実験の部 | 43 |
| 引用文献 | 62 |
| 謝辞 | 68 |

略号一覧

本論文中に記載した略号を以下に記す。

| | |
|---------|---|
| Ac | Acetyl |
| aq | aqueous |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CuAAC | Cu-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindole |
| DIBAL-H | Diisobutylaluminium hydride |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's medium |
| DMF | N, N-Dimethylformamide |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide |
| EGTA | Ethylene glycol tetraacetic acid |
| Et | Ethyl |
| FBS | Fatal bovine serum |
| FT-IR | Fourier Transform Infrared Spectroscopy |
| Fucci | Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| HMNC | Human mononuclear cell |
| HPLC | High-performance liquid chromatography |
| HRMS | High-resolution Mass spectrometry |
| Me | Methyl |
| mp | Melting point |
| MS | Mass Spectrometry |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| Ph | Phenyl |
| PMS | Phenazine methosulfate |
| rt | room temperature |
| SD | Standard Deviation |
| SE | Standard Error |
| tBu | tertiary butyl |
| tert | tertiary |
| Tf | Trifluoromethanesulfonyl |

| | |
|-----|---------------------------------|
| THF | Tetrahydrofuran |
| TLC | Thin-layer chromatography |
| UV | Ultraviolet |
| WSC | Water-soluble carbodiimide, EDC |

序 論

微小管は、 α -チューブリン及び β -チューブリン一分子ずつより構成されるヘテロダイマーを基本単位とし、多数のチューブリンヘテロダイマーが重合したプロトフィラメントと呼ばれる鎖13本から形成される中空管状の細胞小器官である。真核細胞においては、細胞骨格の維持、細胞内輸送、紡錘体の形成などに関わる、細胞の生存・増殖に不可欠な構造である¹⁾。これら微小管の機能はチューブリンダイマーの重合・脱重合により生じる微小管の伸長・短縮に基づいており、有糸分裂に際しては特にダイナミックな動態を示す。すなわち、細胞全体に分布していた微小管は一度消失し、細胞両極に移動した中心体を起点に染色体中央の動原体へと向かう紡錘体を形成する。この紡錘体の形成と、紡錘体による染色体の分裂は細胞分裂における最も重要な過程の一つであることから、微小管は抗がん剤の有力な標的の一つとして広く知られている²⁻⁴⁾。

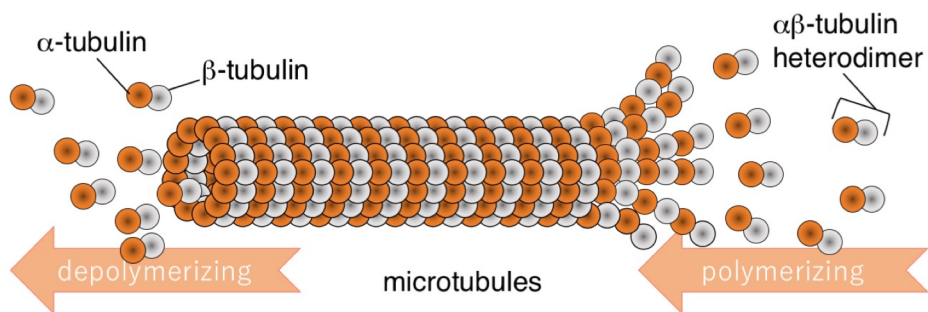


Figure 1. structure of tubulin and microtubules

微小管を標的とする化合物は、微小管の機能の根本にあたるチューブリンダイマーの重合、あるいは脱重合を阻害することを作用機序としている。この作用機序に基づき、微小管の機能を標的とするチューブリン作用薬は大きく二つに分類されている。

一つは微小管からのチューブリンヘテロダイマーの解離、すなわち脱重合を阻害することで微小管を高度に安定化させる化合物群であり、セイヨウイチイの樹皮より得られるタキサン類の化合物が有名である⁵⁻⁷⁾。パクリタキセル (1)、ドセタキセル (2) は乳癌をはじめとする様々な癌種に対し適応を有する抗がん剤である。

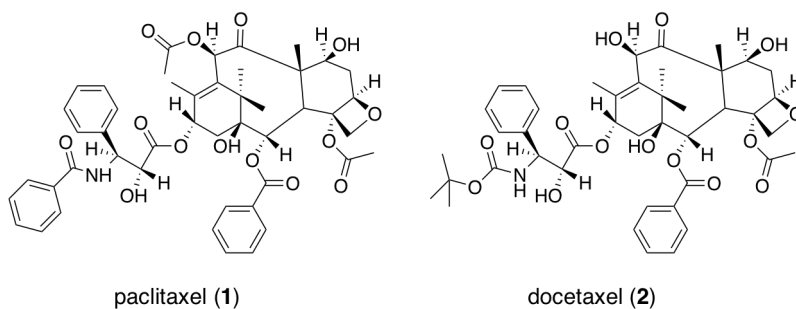


Figure 2. structures of paclitaxel (1) and docetaxel (2)

もう一つはチューブリンヘテロダイマーの重合を阻害し、微小管の形成を妨げる化合物群であり、ビンカ結合部位に結合するビンカアルカロイド類^{8,9)}やエリブリン (3)¹⁰⁻¹²⁾、並びにコルヒチン結合部位に作用するコルヒチン類¹³⁻¹⁵⁾がよく知られている。ビンカアルカロイド類は、ニチニチソウ由来のインドールアルカロイドであり、天然化合物としてビンブラスチン (4)、ビnkリスチン (5)、さらにその誘導体であるビンデシン (6)、ビノレルビン (7) が医薬品として承認されており、白血病やリンパ腫などを対象として臨床で用いられている。エリブリンはクロイソカイメン由来のポリエーテルマクロライドであるハリコンドリinB の合成アナログであり、手術不能又は再発乳癌に対して適応を有している。

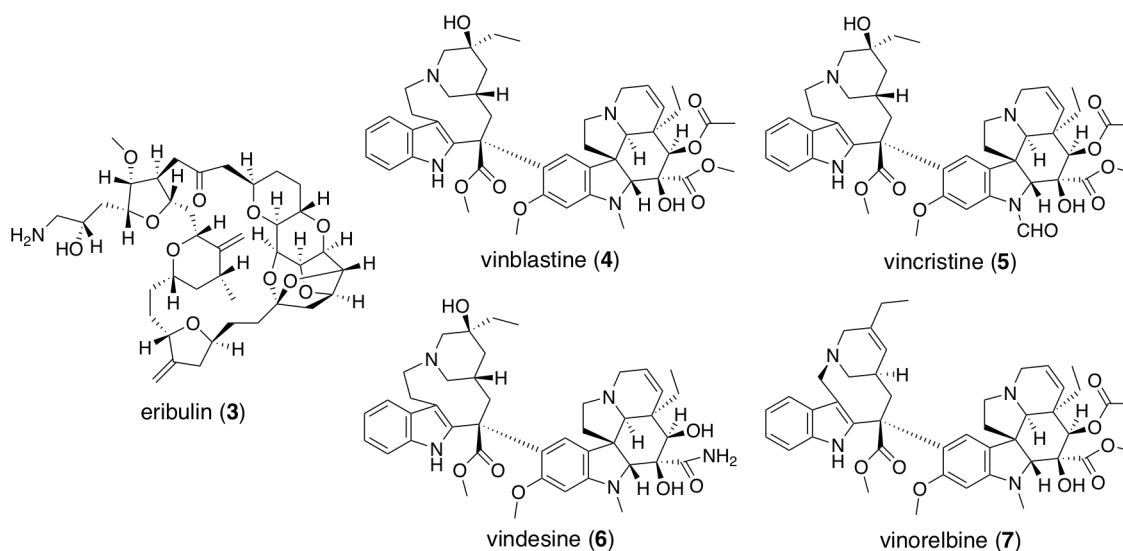


Figure 3. structures of eribulin and vinca alkaloids

一方、コルヒチン結合部位に結合する化合物には、コルヒチン (8)、コンブレタスタチン A4 (9a)^{16,17}やフェンスタチン (10)^{18,19}のように分子内に複数のメトキシ基を有するものが多いことが特徴である。唯一の承認薬であるコルヒチン自体は高い毒性から抗がん剤としての適応を持たず、痛風発作及び家族性地中海熱に対してのみ用いられている。近年、コルヒチン誘導体ZD6126 (11)^{20,21}をはじめとするコルヒチン結合部位に作用する化合物の中に、腫瘍近傍の未熟な腫瘍新生血管を選択的に障害する新生血管障害作用を有する化合物が見出され^{22,23}、コンブレタスタチン A4 (9a)、並びにそのリン酸塩型プロドラッグ体であるコンブレタスタチン A4P (9b)、ジケトピペラジン骨格を有するプリナブリン (12)²⁴⁻²⁶などがこの作用に基づく新たな作用機序を有する抗がん剤として臨床試験に進んでいる。

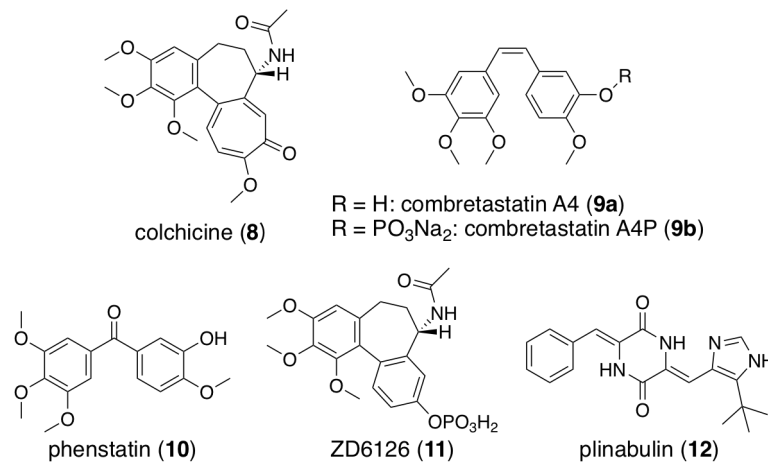


Figure 4. structures of colchicine site binders

これら微小管を標的とするチューブリン作用薬は、幅広い癌種に対する治療において欠くことのできない重要な医薬品であり、前臨床においても高い関心が寄せられている化合物群である。癌化学療法においては、腫瘍細胞が薬剤耐性を獲得し治療効果が減少してしまう例が多く²⁶⁻²⁹、同じ薬剤を長期間使い続けることが難しい場合が多い。すなわち、数に限りのある適応を有する抗がん剤を複数使う場面が多くなるため、治療の選択肢を広げるべく新たな抗がん剤の創製研究が世界中で精力的に展開されている。

そこで本論文では、チューブリン重合障害作用を有するジケトピペラジン化合物プリナブリン (12) とその誘導体に着目し、構造活性相関を検討することで新規抗がん剤の創製を目指した研究を行うこととした。

第一章では、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体を基としたヘテロ環部位の構造活性相関研究に基づく新規 2-ピリジル型ジケトピペラジン誘導体 KPU-300

の創製について述べる。ベンゾフェノン型誘導体においては、プリナブリンの活性発現に必須であるとされていた *tert*-ブチルイミダゾール環を他の環構造へと変換できる可能性が見出され、新たにベンゾフェノン構造を有するジケトピペラジン誘導体を8個合成し、2-ピリジル構造に置換した誘導体 KPU-300 を見出した。本誘導体は、プリナブリンを始めとするジケトピペラジン誘導体に不可欠であった五員環構造から脱却した初めての例となった。

第二章では、第一章で得られた新規誘導体 KPU-300 の詳細な *in vitro* 評価について述べる。KPU-300 は第一章にて殺細胞活性評価に用いた HT-29細胞以外の細胞系に対しても高い活性を示し、高いチューブリン親和性及びチューブリン重合阻害活性を示すことを明らかにした。免疫染色による観察では、KPU-300 によりM期 HeLa細胞の紡錘体形成を強く阻害しており、細胞周期をM期で停止させることを確認した。これらの結果から、KPU-300 の作用点はチューブリンであることが強く示唆された。

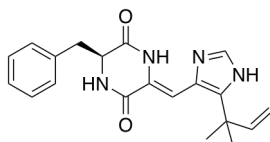
第三章では、KPU-300 の構造を基にした水溶性プロドラッグ型誘導体の合成と評価について述べる。ジケトピペラジン誘導体に共通の課題である水溶性の低さを改善するべく、アスパラギン酸由来の水溶性補助基を導入したエステラーゼ応答型プロドラッグを創製した。本プロドラッグは KPU-300 の 80万倍以上の水溶性を示し、エステラーゼによって KPU-300 を再生することを確認した。

以下に詳細を述べる。

第一章 新規ジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤 KPU-300 の創製

序節

はじめに、プリナブリンを含むジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の研究背景について述べる。本研究は、1997年に Kanoh らによって *Aspergillus ustus* より単離されたチューブリン重合阻害作用を有する天然ジケトピペラジン型化合物 (-)-フェニラヒスチン((-)-**13**; (-)-PLH) に端を発している³⁰⁾。本化合物の生物活性検討から、細胞周期を M 期で停止させ細胞死を誘導すること、コルヒチンと競合することが明らかにされ³¹⁾、チューブリン重合阻害薬のリード化合物として構造活性相関研究が展開された^{32,33)}。



(-)-phenylahistin ((-)-**13**)

Figure 5. structure of (-)-phenylahistin ((-)-**13**)

Table 1. に示した細胞増殖抑制試験により、以下の知見が得られている。

1. 立体異性体である (+)-PLH((+)-**13**) の活性は(-)-体よりも低い。
2. イミダゾール環側鎖のアルケン部位を還元しても活性は維持される。
3. ジケトピペラジン環とイミダゾール環間の二重結合は活性発現に必須。
4. イミダゾール環側鎖アルキル基には嵩高さが求められる。
5. ジケトピペラジン環窒素のメチル化は活性を消失させる。

Table 1. results of structure-activity relationship study based on (-)-PLH ((-)-**13**)

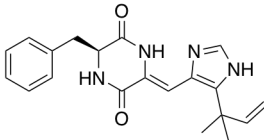
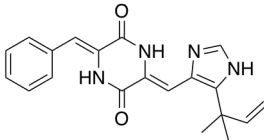
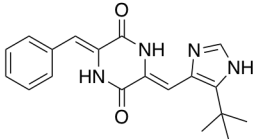
| compounds | structure | IC ₅₀ (μM) | |
|--|-----------|------------------------|---------------------------------|
| | | tubulin polymerization | P388 proliferation ^a |
| (-)-phenylahistin ((-)- 13) | | 25 | 0.21 ± 0.02 |
| (+)-phenylahistin (+)- 13) | | >200 | 10 ± 0.5 |
| 14 | | 30 | 0.23 ± 0.05 |
| 15 | | >200 | >200 |
| 16 | | >200 | 7.5 ± 0.5 |
| 17 | | >200 | >200 |
| 18 | | 100 | 0.95 ± 0.03 |
| 19 | | >200 | 160 ± 5.5 |

^aValues are mean ± SEM of three experiments.

また、(-)-フェニラヒスチン ((-)-**13**) のデヒドロ体であるデヒドロフェニラヒスチン (**20**) は強い細胞増殖抑制活性を示した³⁴⁾。この知見から、高活性なデヒドロフェニラヒスチン (**20**) の誘導体を探索した結果、イミダゾール環側鎖 1,1-

dimethylprop-2-enyl 基を *tert*-ブチル基へと変換した誘導体プリナブリン (**12**) を見出した^{24, 35)}。

Table 2. Cell proliferation inhibitory activities of dehydroPLH (**20**) and plinabulin (**12**)

| compounds | structure | P388 proliferation IC ₅₀ (nM) ^a | PC3 proliferation EC ₅₀ (nM) |
|--|---|--|--|
| (-)-phenylahistin ((-)-13) |  | 210 ± 20 | n.t. ^b |
| dehydrophenylahistin (20) |  | 36 ± 12.8 | 4.7 |
| plinabulin (12) |  | 31.8 ± 5.0 | 1 |

^aValues are mean ± SEM of five experiments. ^bn.t.:not tested

プリナブリン (**12**) はタキサン類やビンカアルカロイド類などの天然アルカロイド化合物と比較して遥かにシンプルな構造を有しており、さらなる有力な誘導体探索のリードとしても魅力的な化合物である。申請者の所属する研究室においては、後に述べる構造活性相関研究^{36,37)}の他、ジケトピペラジン型誘導体の課題の一つである水溶性の改善を目指し、アミノ酸由来の水溶性補助基を導入したエステルゼ応答型プロドラッグの開発³⁸⁻⁴⁰⁾、プリナブリンを抗体に担持させ、非共有結合型の抗体-薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugates; ADC) とした応用研究⁴¹⁾、結合部位の同定を目指し、光反応性基とビオチンタグを導入したケミカルプローブの開発⁴²⁻⁴⁴⁾、 γ -チューブリンに作用しうる新規機序を有する抗がん剤開発を目指した誘導体探索⁴⁵⁾が展開されている。さらに、Horsman らによるプリナブリンと放射線療法との併用⁴⁶⁾、Plazuk らによるフェロセン型誘導体の創製研究⁴⁷⁾、Wenbao らによるプリナブリン重水素置換体の創製研究^{48,49)}といった幅広い研究が展開されている。また、プリナブリンはチューブリン重合阻害による有糸分裂阻害作用及び腫瘍新生血管障害作用を示す²⁴⁾ことから臨床候補化合物として期待されており、腫瘍新生血管障害薬として臨床試験に進み⁵⁰⁾、現在ドセタキセルとの併用によるフェーズ III 試験⁵¹⁾及びニボルマブとの併用によるフェーズ I/II 試験⁵²⁾が進行中である。また、臨床試験において、プリナブリンをドセタキセルと併用することによりドセタキセルの用量規制因子である白血球減少、特に好中球減少を抑制することが見出され⁵³⁾、欧米において化学療法による好

中球減少症に対する顆粒球コロニー形成刺激因子（G-CSF）製剤フィルグラスチムとの比較試験⁵³⁾も行われている。

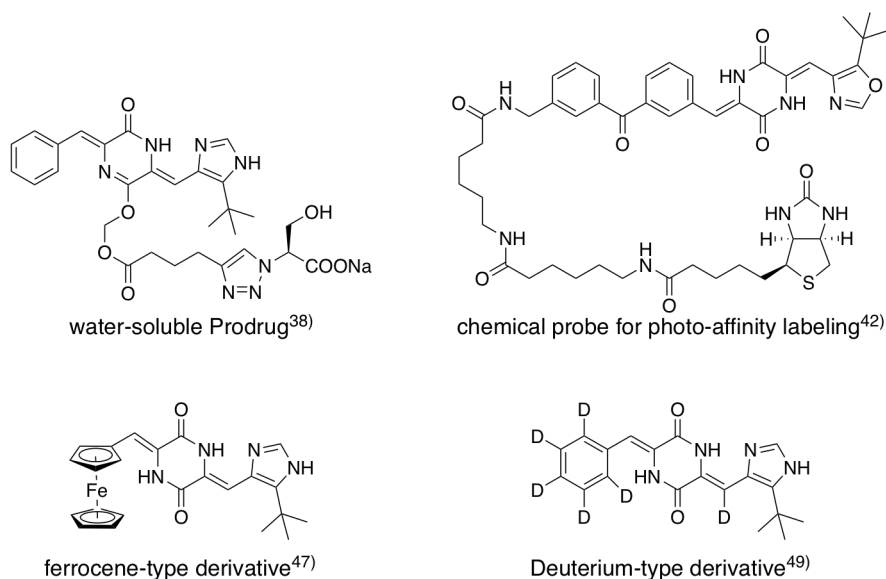


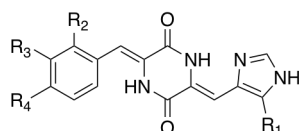
Figure 6. various researches focused on plinabulin (**12**)

続いて、プリナブリン (**12**) を基盤とした構造活性相関³⁶⁾の概要を以下に示す。

1. イミダゾール環側については、プリナブリン (**12**) の *tert*-ブチル基をイソプロピル基及びメチル基へと変換した誘導体 **21** 及び **22** の評価から、嵩高いアルキル基 (*tert*-ブチル基あるいはイソプロピル基) が活性向上に大きく寄与していることが見出された。したがって、以降ヘテロ環側構造を *tert*-ブチルイミダゾール環に固定して構造活性相関を検討した。
2. フェニル基側では、コルヒチン類縁体に多く見られるメトキシ基を導入したモノメトキシ誘導体 **23-25** では活性向上が見られず、複数のメトキシ基を導入した誘導体 **26-28** ではさらに活性が顕著に減弱したことから、プリナブリンのフェニル環は他のコルヒチン類縁体に見られる、メトキシ基を複数有するフェニル環とは異なる結合様式を取ることが示唆された。
3. **Table 3.** において R₃ にあたるフェニル基 3 位を修飾した誘導体 **24**, **30** は他の位置に同じ置換基を導入した誘導体と比較して高い活性を示した。特に、ベンゾイル基を導入した誘導体 KPU-105 (**32**) はリード化合物であるプリナブリン (**12**) よりも約 10 倍高い活性を示した。
4. フェニル基を他の環構造に変換した誘導体では活性向上は見られず³⁶⁾、特に **Figure 7.** に示した 2-ピリジル構造へと変換した誘導体 **33** の活性は完全に消失した。この 2-ピリジル基の窒素原子はジケトピペラジン環のもう一方のアミド水素と水素結合を形成しており、分子全体が平面性を有していることが結晶構造解析

より明らかにされた。プリナブリン (**12**) の結晶構造解析との比較から、イミダゾール環側には平面性が求められる一方で、フェニル基側はこの疑似三環構造からなる平面から外れることが必要であると示唆された。

Table 3. results of structure-activity relationship study based on plinabulin (**12**)³⁶⁾



| compounds | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | tubulin binding K _d (μM) | IC ₅₀ (nM) ^a |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|------------------------------------|
| plinabulin (12) | <i>t</i> -Bu | H | H | H | 1.0 ± 0.5 | 14.9 ± 3.8 |
| 21 | <i>i</i> -Pr | H | H | H | 1.1 ± 0.3 | 15.5 ± 1.9 |
| 22 | Me | H | H | H | 7.4 ± 2.3 | 339 ± 41 |
| 23 | <i>t</i> -Bu | OMe | H | H | n.t. ^b | 75.5 ± 25 |
| 24 | <i>t</i> -Bu | H | OMe | H | n.t. ^b | 26.1 ± 8.5 |
| 25 | <i>t</i> -Bu | H | H | OMe | n.t. ^b | 6570 |
| 26 | <i>t</i> -Bu | OMe | OMe | H | n.t. ^b | 868 |
| 27 | <i>t</i> -Bu | OMe | H | OMe | n.t. ^b | 5080 |
| 28 | <i>t</i> -Bu | H | OMe | OMe | n.t. ^b | 2020 |
| 29 | <i>t</i> -Bu | F | H | H | n.t. ^b | 30.0 ± 17 |
| 30 | <i>t</i> -Bu | H | F | H | 0.7 ± 0.1 | 13.1 ± 5.3 |
| 31 | <i>t</i> -Bu | H | H | F | 11.8 ± 2.4 | 501 |
| KPU-105 (32) | <i>t</i> -Bu | H | benzoyl | H | 0.62 ± 0.07 | 1.4 ± 0.4 |

^aValues are mean ± SEM of three experiments. ^bn.t.:not tested

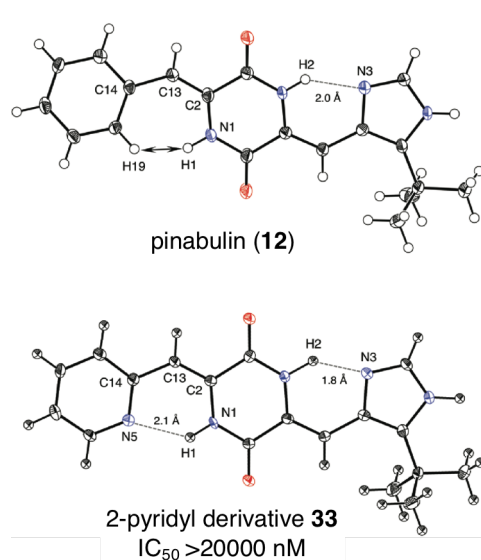
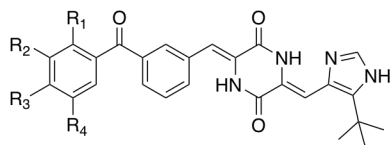


Figure 7. X-ray crystal structure of pinabulin (12) and 2-pyridyl derivative 33

本検討にて得られたベンゾフェノン型誘導体 KPU-105 (32, IC₅₀ = 1.4 nM) は、上記検討の誘導体の中でも特に強い殺細胞活性を示し、チューブリンとの親和性が上昇したこと、およびベンゾイル基の置換位置を変えた誘導体やフルオレノン型誘導体では活性が減弱したこと³⁷⁾から、フェニル環 3 位へのベンゾイル基の導入によりチューブリンとの新たな相互作用を形成し、これにより活性向上につながったと考えられた。そこで、このベンゾイル基についてさらなる最適化検討を行うべく、ハロゲン原子あるいはメトキシ基を導入した誘導体の合成と評価が進められた³⁷⁾。結果の一部をまとめた **Table 4.** に示すように、4 位にメトキシ基を導入した誘導体 36 ではわずかな活性減弱に留まったものの、2 位、3 位メトキシ誘導体 34, 35 及び複数箇所のメトキシ誘導体 37-40 では大幅な活性減弱が見られたことから、先のフェニル基における検討と同様、新たに導入したベンゾイル基もコルヒチン類縁体のフェニル基とは異なる結合様式であることが示唆された。一方、ハロゲン原子を導入した誘導体 41-46 は高い活性を維持しており、ベンゾイル基における修飾としては、4 位へのハロゲン原子、特にフッ素原子の導入が適していることを見出し、KPU-133 (43, IC₅₀ = 0.5 nM) の創製に至った。

Table 4. results of structure-activity relationship study based on KPU-105³⁷⁾

| compounds | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | IC ₅₀ (nM) ^a |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------------|
| KPU-105 (32) | H | H | H | H | 1.4 ± 0.4 |
| 34 | OMe | H | H | H | 360 ± 66 |
| 35 | H | OMe | H | H | 39 ± 12 |
| 36 | H | H | OMe | H | 3.8 ± 0.4 |
| 37 | OMe | OMe | H | H | 955 |
| 38 | OMe | H | OMe | H | 1800 |
| 39 | H | OMe | OMe | H | 7300 |
| 40 | H | OMe | OMe | OMe | 2500 |
| 41 | F | H | H | H | 3.0 ± 2.0 |
| 42 | H | F | H | H | 0.6 ± 0.1 |
| KPU-133 (43) | H | H | F | H | 0.5 ± 0.1 |
| 44 | Cl | H | H | H | 6.0 ± 0.5 |
| 45 | H | Cl | H | H | 2.0 ± 0.8 |
| 46 | H | H | Cl | H | 1.1 ± 0.0 |

^aValues are mean ± SEM of three experiments.

第一節 殺細胞活性に対するヘテロ環部位の影響の検討

前節にて述べたように、(-)-フェニラヒスチン ((-)-**13**) に端を発するジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤についての研究は、主としてフェニル環側に注目した構造活性相関により展開されてきた。一方で、イミダゾール環側に関する検討は、(-)-フェニラヒスチン ((-)-**13**) 及びプリナブリン (**12**) の初期的構造活性相関において、分岐アルキル鎖が活性発現に大きく寄与していること^{33,36)}、オキサゾール環でも同等の活性を示すこと⁵⁵⁾を確認するに留まっていた。特にベンゾフェノン構造を有する誘導體においては、*tert*-ブチルイミダゾール及び *tert*-ブチルオキサゾール環上の修飾例は、**Figure 8.** に示す結合部位の探索を目指したビオチン化ケミカルプローブ **47** の1例のみであった⁴⁴⁾。

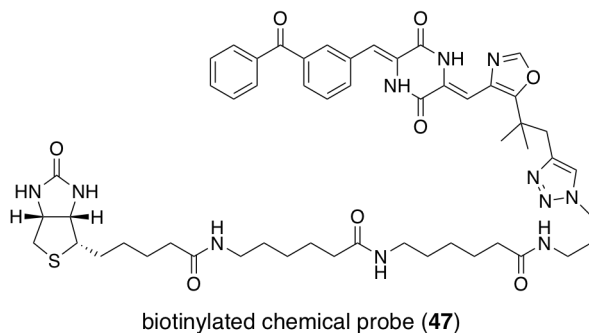


Figure 8. hetero ring modified derivative: structure of chemical probe **47**

以上のように、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導體においては、ヘテロ環部位に関する構造活性相関の知見は非常に少ない。そこで、このヘテロ環部位に焦点を当てた構造活性相関を検討することにより、新たな基本骨格の探索を行い、新規抗がん剤の創製を目指すこととした。

本研究を始めるにあたり、このヘテロ環構造を含むジケトピペラジン環側鎖構造の必要性を検討するため、**Figure 9.** に示すイミダゾール環部位を欠損させた誘導體 **48**, **49** を合成し、その殺細胞活性を評価することとした。

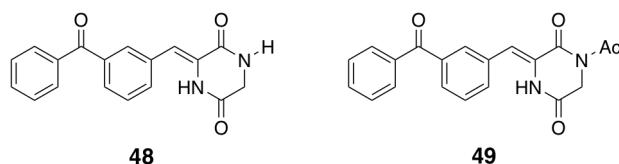
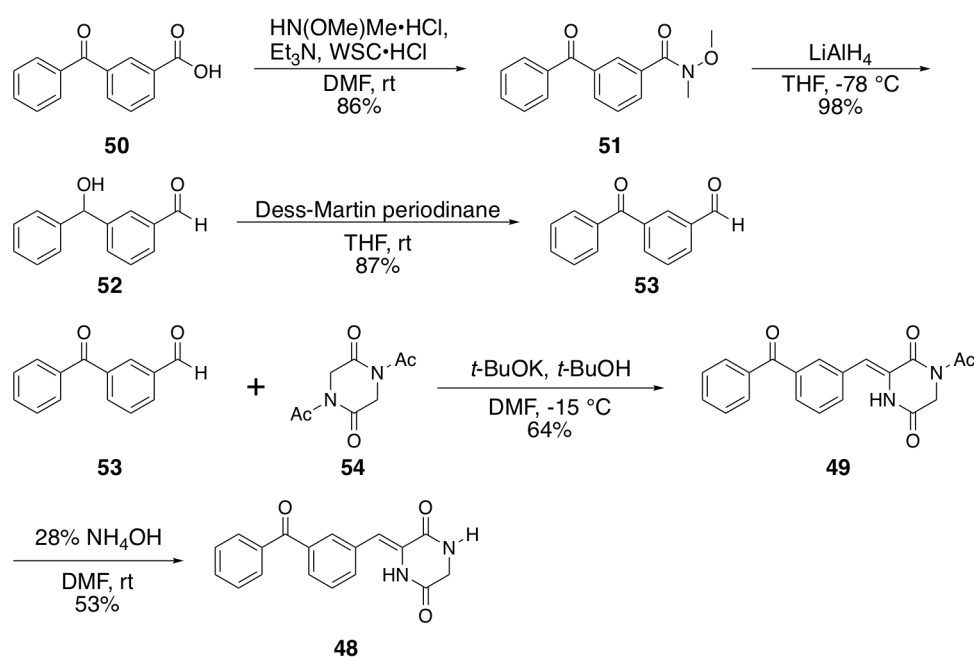


Figure 9. structures of imidazole-removal type derivative **48**, **49**

誘導體 **48**, **49** の合成を **Scheme 1.** に示す。3-ベンゾイル安息香酸 **50** をワインレブ

アミド **51** へと変換し、水素化アルミニウムリチウムにより還元することでアルデヒド **52** へと導いた。同時に還元されたカルボニル基を Dess-Martin 試薬により再度酸化することで 3-ベンゾイルベンズアルデヒド **53** を合成した。このアルデヒド **53** を塩基性条件下、無水 DMF 中にて *N,N'*-ジアセチルグリシン無水物 **54** に縮合することで、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体の共通中間体となるアセチル体 **49** を得た。得られたアセチル体 **49** の一部を DMF 中アンモニア水と反応させて脱アセチル体 **48** へと変換した。



Scheme 1. synthesis of imidazole-removal type derivative **48, 49**

得られたヘテロ環欠損型誘導体 **48, 49** をヒト結腸癌由来の HT-29 細胞を用いた殺細胞活性試験により評価した結果、両誘導体とも活性を完全に失っていた。従って、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体の活性発現には、ジケトピペラジン環上に何らかの側鎖構造を必要とすることが明らかとなった。

Table 5. cytotoxic activity of derivative **48**, **49** against HT-29 cell

| compounds | structure | IC ₅₀ (nM) |
|--------------------------|-----------|-------------------------|
| plinabulin (12) | | 14.9 ± 3.8 ^a |
| KPU-105 (32) | | 1.4 ± 0.4 ^a |
| 48 | | >20000 ^b |
| 49 | | 8800 ^b |

^aValues are mean ± SD of at least three independent experiments.

^bThese IC₅₀ values were only measured once because their activities were quite low.

続いて、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体におけるイミダゾール環側鎖アルキル基の活性への寄与を検討するべく、プリナブリン (**12**) において検討された変換と同様の修飾、すなわち *tert*-ブチル基をメチル基へと変換した誘導体 **55** を合成し、プリナブリン (**12**) における結果³⁶⁾と比較検討することとした。

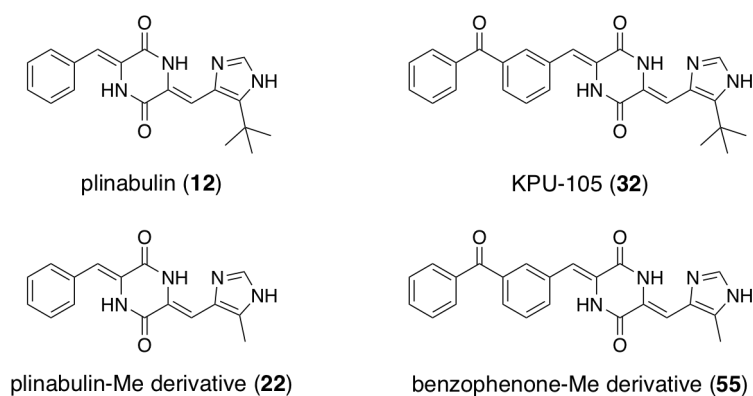
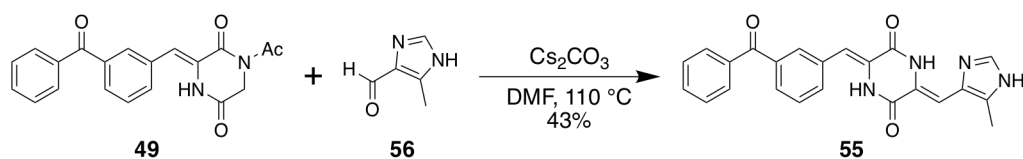


Figure 10. structures of alkyl group-modified derivative **55** and relational compounds

ベンゾフェノン型メチル誘導体 **55** は、Scheme 1. にて合成したベンゾフェノン型

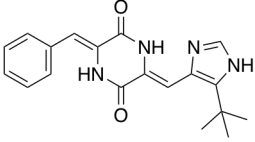
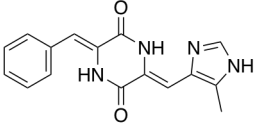
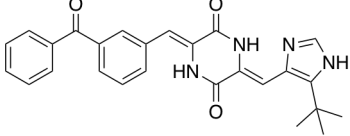
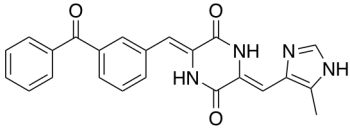
ジケトピペラジン誘導体の共通中間体 **49** に対し、DMF 中にて 4-メチル-5-ホルミルイミダゾール **56** をアルドール縮合させることにより合成した。



Scheme 2. synthesis of benzophenone-methyl derivative **55**

HT-29 細胞を用いた殺細胞活性評価の結果、**Table 6.** に示すように、プリナブリン (**12**) における検討と同様³⁶⁾、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体においても、*tert*-ブチル基からメチル基への変換により活性が低下する傾向を示した。しかしながら、ベンゾフェノン型メチル誘導体 **55** はいまだプリナブリンと同等の活性を維持していた。この結果は、ベンゾイル基の導入によるベンゾフェノン構造への変換によりチューブリンとの相互作用が増強され、活性に対するアルキル基の相対的な寄与がプリナブリン (**12**) よりも低下しているためではないかと考察した。この結果から、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体においては、プリナブリン (**12**) を含むフェニル型ジケトピペラジン誘導体において活性発現に必須であると考えられていた *tert*-ブチルイミダゾール構造を他の環構造へと誘導することが可能であると考え、同部位における構造活性相関の獲得と有力な新規誘導体の創製を目指し、誘導体合成に着手した。

Table 6. cytotoxic activity of methyl-type derivative **55** against HT-29 cell

| compounds | structure | IC ₅₀ (nM) ^a |
|--|---|------------------------------------|
| plinabulin (12) |  | 14.9 ± 3.8 |
| plinabulin-Me derivative (22) |  | 339 ± 41 |
| KPU-105 (32) |  | 1.4 ± 0.4 |
| benzophenone-Me derivative (55) |  | 15 ± 3.0 |

^aValues are mean ± SD of at least three independent experiments.

第二節 イミダゾール環部位を修飾したベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体の構造活性相関検討

ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体のイミダゾール環部位における構造活性相関を検討するため、導入する環構造としてベンゼン環並びにヘテロ芳香環を選択し、**Figure 11.** に示す 8 個の誘導体を合成し、評価することとした。

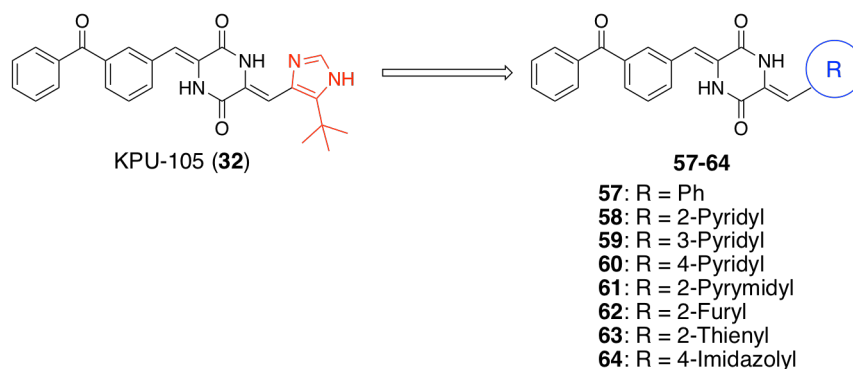
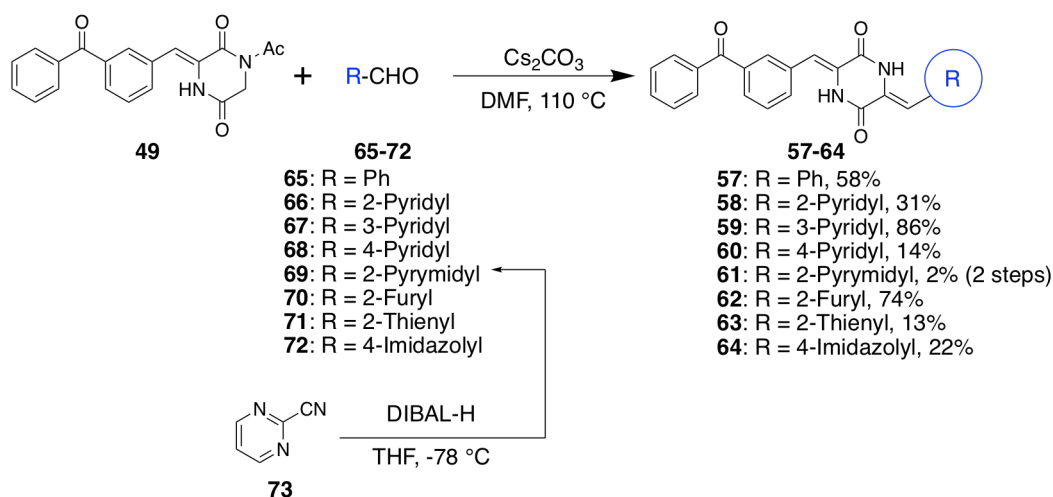


Figure 11. structures of imidazole-substituted derivative **57-64**

これら誘導体の合成は、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体の共通中間体 **49** に対し、各誘導体に対応するアルデヒド **65-72** を縮合することにより達成した。2-ホルミルピリミジン **69** は、2-シアノピリミジン **73** を DIBAL-H によって部分還元することで調製した。



Scheme 3. synthesis of imidazole-substituted derivative **57-64**

得られた誘導体 **57-64** について、HT-29 細胞を用いた殺細胞活性評価の結果を **Table**

7. に示す。

Table 7. cytotoxic activity of imidazole-substituted derivative **57-64** against HT-29 cell

| compounds | R | IC ₅₀ (nM) ^a |
|--------------------------|---|------------------------------------|
| plinabulin (12) | | 14.9 ± 3.8 |
| KPU-105 (32) | | 1.4 ± 0.4 |
| 57 | | 94.3 ^c |
| KPU-300 (58) | | 7.0 ± 1.1 |
| 59 | | >1000 |
| 60 | | >1000 |
| 61 | | 75.3 ± 8.1 |
| 62 | | 147 ^c |
| 63 | | >1000 |
| 64 | | >1000 |

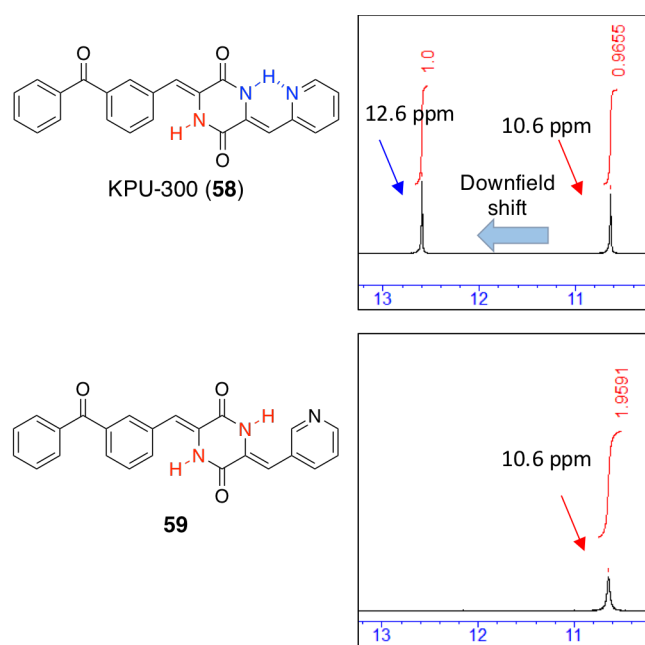
^aValues are mean ± SD of at least three independent experiments.

^b NA: Not Applicable. ^cValues are average from two independent experiments.

この結果から、以下に述べる 5 つの知見が得られた。

1. ピリジン環を導入した 3 種の誘導体の内、2-ピリジル型誘導体 (**58**, 以降 “KPU-300” と表記する) が高い殺細胞活性を示した一方で、3-ピリジル及び 4-ピリジル型誘導体 **59**, **60** は活性が消失した。窒素原子の位置が異なるのみであるこれらの誘導体間に大きな活性差が見られた原因を検討するために、KPU-300 (**58**) 及び 3-

ピリジル型誘導体 **59** の ^1H NMR スペクトルを測定したところ、**Figure 12.** に示したように、ジケトピペラジン環アミド窒素上の水素原子のシグナルに差が見られた。3-ピリジル型誘導体 **59** の赤で示した二つのアミド水素由来のシグナルは水素二つ分のピークとして同じ位置に検出された一方で、KPU-300 (**58**) のスペクトルでは、アミド水素由来のシグナルが約 2 ppm 離れた位置にそれぞれ水素一つ分のピークとして検出された。この低磁場へのシフトは (-)-フェニラヒスチン ((-)-**13**) の構造活性相関研究においても観察されており³³⁾、ジケトピペラジン環と側鎖ヘテロ環との間に水素結合が存在することを示す知見である。すなわち、KPU-300 (**58**) の構造中、青矢印で示したジケトピペラジン環アミド窒素上の水素原子はピリジン環 2 位の窒素と水素結合を形成し、赤矢印で示したもう一方の水素原子由来のシグナルと比べ低磁場領域へとシフトしたと考えられた。この検討から、ピリジル型誘導体においてもジケトピペラジン環と側鎖ヘテロ環の間に形成される水素結合の存在は活性に大きく影響することが示唆された。



These ^1H NMR spectra were measured in DMSO-*d*₆.

Figure 12. part of ^1H NMR spectra of KPU-300 (**58**) and 3-pyridyl derivative **59**

KPU-300 (**58**) の X 線結晶構造解析により、 ^1H NMR スペクトルから予想された通り、ピリジン環とジケトピペラジン環の間に水素結合を有すること、両環の二面角が 0.99° と両環はほぼ同一平面に存在することを確認した。両環と水素結合により形成される擬三環構造の高い平面性は、ジケトピペラジン型誘導体において活性発現に重要な因子であることが明らかとなっており^{33,36)}、ヘテロ環部位を修飾した誘導体におい

でも同じ傾向を示すことを見出した。一方で、ベンゾフェノンを構成する二つのフェニル環同士は、互いの水素原子の反発により二面角 48.2° と互いに異なる平面上に存在していた。ベンゾフェノン構造を平面に固定したフルオレノン誘導体では活性を示さないことを見出されており³⁷⁾、KPU-300 (**58**) はピリジン環側、ベンゾフェノン側ともに活性発現に適した構造を取っていることが明らかとなった。

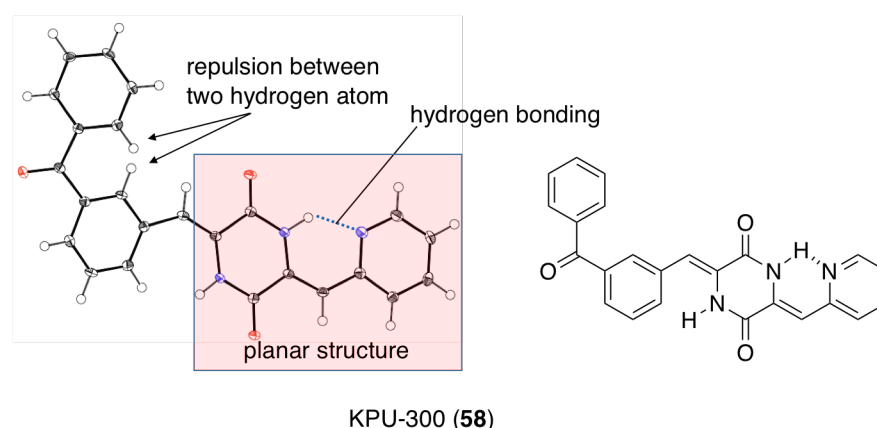
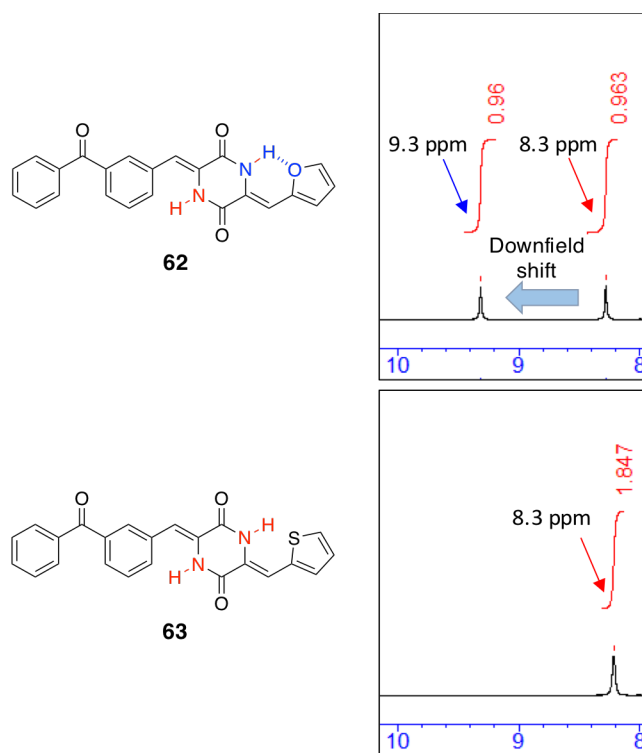


Figure 13. ORTEP drawing of X-ray crystal structure of KPU-300 (**58**)

2. 無置換のベンゼン環を導入したフェニル型誘導体 **57** は弱いながら活性を示したことに比べ、3-ピリジル型誘導体 **59** 及び 4-ピリジル型誘導体 **60** は活性を示さなかったことから、ピリジル型誘導体 **59**, **60** にはフェニル型誘導体 **57** よりも活性を低下させる要素が含まれていると考えられた。すなわち、先に述べたジケトピペラジン環との水素結合を持たないことに加え、2位以外への窒素原子の導入は、ジケトピペラジン誘導体とチューブリンとの相互作用に負の影響を与え、活性低下を引き起こしている可能性を見出した。これは、高い活性を示した 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 (**58**) に対して、更に窒素原子を導入した誘導体である 2-ピリミジル型誘導体 **61** で活性が減弱したことから同様に推察された。

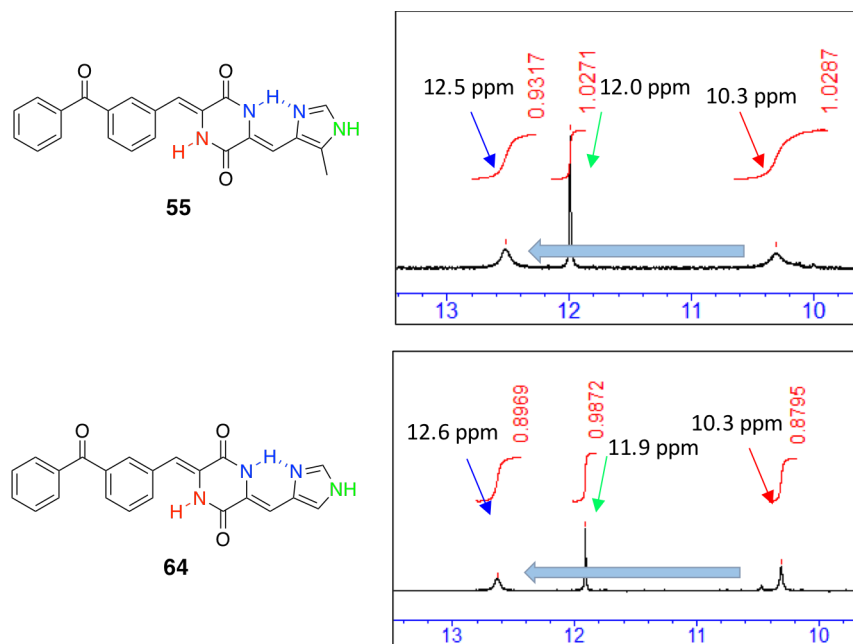
3. 2-フリル型誘導体 **62** と 2-チエニル型誘導体 **63** の ^1H NMR スペクトルを比較すると、**Figure 14.** に示すように、弱いながらも活性を示した 2-フリル型誘導体 **62** においてはジケトピペラジン環アミド窒素上水素原子の低磁場シフトが観察された一方で、活性を示さなかった 2-チエニル型誘導体 **63** のスペクトルにはこのような低磁場シフトは観察されなかった。従って、2-フリル型誘導体 **62** のみが水素結合を形成しており、五員環型誘導体においても水素結合が活性発現に寄与していることが推察された。



These ^1H NMR spectra were measured in CDCl_3 .

Figure 14. part of ^1H NMR spectra of 2-furyl derivative **62** and 2-thienyl derivative **63**

4. 一方で、無置換のイミダゾール環を導入した 4-イミダゾリル型誘導体 **64** は、**Figure 15.** に示すように、 ^1H NMR スペクトルにおいてジケトピペラジン環アミド窒素上水素原子の低磁場シフトを示し、ジケトピペラジン環との間に水素結合を有していることが確認されたにもかかわらず、殺細胞活性を示さなかった。同じ 4-イミダゾリル構造を有する KPU-105 (**32**) や前章にて合成したベンゾフェノン型メチル誘導体 **55** と比較すると、**Table 8.** に示すようにアルキル基の有無により活性が劇的に変化していることから、イミダゾール型ジケトピペラジン誘導体においては、イミダゾール環 5 位に存在するアルキル基は活性発現に必須の構造であることが示唆された。



These ^1H NMR spectra were measured in $\text{DMSO-}d_6$.

Figure 15. part of ^1H NMR spectra of 4-imidazolyl derivative **55** and **64**

Table 8. cytotoxic activities of benzophenone-imidazole type derivatives

| compounds | R | IC_{50} (nM) ^a |
|-----------------------|--------------|------------------------------------|
| KPU-105 (32) | <i>t</i> -Bu | 1.4 ± 0.4 |
| 55 | Me | 15 ± 3.0 |
| 64 | H | >1000 |

^aValues are mean \pm SD of at least three independent experiments.

5. 無置換ヘテロ環における比較では、2-ピリジル基を導入した KPU-300 (**58**) が高い活性を示したのに比べて、2-フリル基、2-チエニル基及び4-イミダゾリル基を導入した五員環型誘導体 **62-64** では2-フリル型誘導体 **62** に弱い活性があるのみであった。これより、ジケトピペラジン型誘導体の基本骨格としては五員環構造よりも六員環が適していることが示唆された。

第三節 小括

本章では、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体のイミダゾール環部位に着目した構造活性相関検討を展開した。

第一節では、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体におけるイミダゾール環構造の活性に対する影響を検討し、ジケトピペラジン誘導体の活性発現には、ジケトピペラジン環側鎖部位に何らかの構造を必要とすることを確認した。また、イミダゾール環側鎖アルキル基の活性への影響を検討し、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体においては活性に対するイミダゾール環側鎖アルキル基の寄与がプリナブリン (12) よりも低下している可能性を見出した。

第二節では、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体のイミダゾール環構造を他の環構造へと変換した誘導体を合成し、ヘテロ環部位における構造活性相関の検討を行った。その結果、プリナブリンを上回る高い活性を示す 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 (58) の獲得に成功した。KPU-300 とその窒素原子の配置が異なる構造異性体 59, 60 の比較から、ヘテロ環部位とジケトピペラジン環との間に形成される水素結合の存在、及び水素結合により形成される平面性の高い擬三環構造はベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体においても活性発現に重要であることを見出した。一方で、無置換の 4-イミダズリル型誘導体 64 は、この水素結合を有しているにも関わらず活性を示さなかったことから、イミダゾール環側鎖のアルキル基はイミダズリル型誘導体において活性発現に重要であることが示された。無置換の五員環誘導体では 2-フリル体 62 に弱い活性が認められるのみであったことから、ジケトピペラジン型誘導体の基本骨格としては五員環構造よりも六員環構造が適していることが示唆された。

本章における検討にて得られた 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 (58) は、ジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤研究の歴史においてヘテロ五員環構造から脱却した初めての例であり、臨床試験に進んでいるプリナブリン (12) よりも高い活性を示したことから、医薬品候補化合物として有望な化合物であると考えられる。また、アルキル基をはじめとする置換基の導入により活性向上が期待されるため、更なる誘導体合成のためのリードとしても期待される。

第二章 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 の細胞生物学的評価

序節

第一章にて創製した 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 (**58**) は、ジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤に必須と考えられていたヘテロ五員環構造から脱却した初の例であり、既存のジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤とは異なる性質を示す可能性が考えられた。そこで、本化合物について、精製チューブリンや細胞を用いた評価を行い、その詳細な性質を検討することとした。

第一節 他の細胞株に対する KPU-300 の殺細胞活性評価

第一章において構造活性相関の検討に用いたヒト結腸癌由来の HT-29 細胞に加え、他の細胞株に対する KPU-300 (**58**) の活性を評価するべく、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞に対する殺細胞活性を評価することとした。同時に、副作用や毒性の指標とするべく、ヒト正常細胞である初代培養ヒト線維芽細胞 NHSF46、及びヒト末梢血単核球 (HMNC) に対する殺細胞活性も同時に評価した。各細胞に対する殺細胞活性試験の結果を **Table 9** に示す。

Table 9. cytotoxic activities of KPU-300 (**58**) against various cells

| compounds | cytotoxic IC ₅₀ (nM) ^a | | | | |
|-------------------------|--|------------|-------------|-------------------|-------------------|
| | cancer cell line | | | normal cell | |
| | HT-29 | HeLa | A549 | NHSF46 | HMNC |
| plinabulin(12) | 14.9 ± 3.8 | 20.6 ± 3.2 | 35.7 ± 25.1 | n.t. ^b | n.t. ^b |
| KPU-300 (58) | 7.0 ± 1.1 | 5.4 ± 0.4 | 14.2 ± 1.2 | 77 ^c | 481 ± 73 |

^aValues are mean ± SD of at least three independent experiments.

^bn.t.: Not tested. ^cValues are average from two independent experiments.

KPU-300 (**58**) は HT-29 細胞に対する結果と同様、HeLa 細胞、A549 細胞に対してもプリナブリン (**12**) よりも強い殺細胞活性を示すことが明らかとなった。一方、正常細胞に対する殺細胞活性は、HT-29 細胞に対する殺細胞活性と比較して少なくとも 10 倍以上弱かったことから、癌細胞は正常細胞よりも KPU-300 (**58**) に感受性であることが見出された。

第二節 精製チューブリンに対する KPU-300 (58) の活性評価

続いて、KPU-300 (58) の殺細胞活性の発現機序がリードであるプリナブリン (12) と同じくチューブリン重合阻害であることを確認するべく、KPU-300 (58) のチューブリン重合阻害活性を評価することとした。また、KPU-300 (58) とチューブリンとの結合解離定数 K_d を算出し、チューブリンに対する親和性を評価することとした。

チューブリンが重合して微小管を形成すると、チューブリン分子の波長 350 nm 付近の光の吸収が増加することが知られている⁵⁶⁾。この知見に基づき、*in vitro* チューブリン重合バッファーの波長 350 nm における吸光度をモニタリングすることでチューブリンの重合度を測定し、化合物添加によるチューブリン重合への影響を評価した。チューブリン重合阻害活性は、重合開始 40 分後におけるコントロール群の吸光度を 100% とし、チューブリンの重合を 50% 抑制する KPU-300 (58) の濃度を IC_{50} 値として算出した。また、チューブリン分子は波長 290 nm の光によって励起され、300-450 nm の蛍光を発すること、一方で化合物がチューブリンに結合すると 355 nm 付近の蛍光が減少することが知られている⁴²⁾。すなわち、チューブリン-化合物結合体の量と化合物添加による蛍光強度の減少量は比例関係にある。この性質を利用し、結合解離定数 K_d を算出した。

Figure 16. に KPU-300 (58) によるチューブリン重合阻害試験の結果を示す。コントロール群では、経時的にチューブリンが重合したのに対し、KPU-300 (58) は濃度依存的にチューブリン重合を抑制した。コントロール群の重合率と比較し、チューブリン重合を 50% まで抑制する濃度を IC_{50} 値として算出したところ、**Table 10.** に示すように、リード化合物であるプリナブリン (12) と同等程度の活性を有することが明らかとなった。また、チューブリンとの親和性の指標となるチューブリン-化合物間の結合解離定数 K_d は 1.3 μM と、こちらもプリナブリン (12) と同等の結果であった。

Figure 16. inhibition of tubulin assembly by addition of KPU-300 (58)

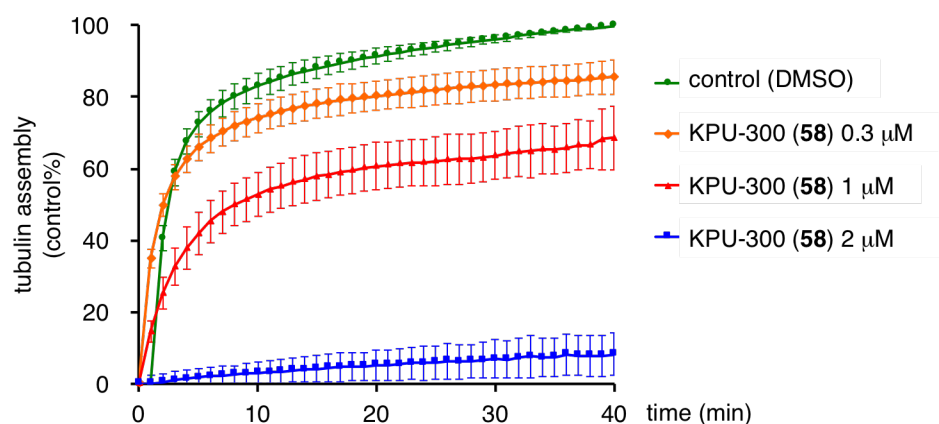


Table 10. the tubulin polymerization inhibitory activity and binding dissociation constant of KPU-300 (**58**)

| compounds | Inhibition of tubulin polymerization IC ₅₀ (μM) ^a | tubulin binding dissociation constant K _d (μM) ^a |
|--------------------------|--|---|
| plinabulin (12) | 1.8 ± 0.3 | 1.0 ± 0.5 |
| KPU-300 (58) | 1.2 ± 0.1 | 1.3 ± 0.3 |

^aValues are mean ± SD of at least three independent experiments.

第三節 免疫染色を用いた細胞内微小管に対する KPU-300 の活性評価

精製チューブリンを用いた第二節での検討に続いて、細胞内の微小管に対する KPU-300 (**58**) の活性を評価するべく、HeLa 細胞に対して免疫染色を行うことで微小管を可視化し、蛍光顕微鏡により生細胞における KPU-300 (**58**) の作用を観察することとした。

微小管は細胞周期に応じて大きく二つの様式で存在しており、細胞分裂の間に当たる間期においては、微小管は細胞全体に形成されており、細胞内輸送や細胞形態の維持に関わっている。一方で、細胞分裂を行う M 期では、二対に増殖した中心体それぞれを微小管形成中心として、凝集した染色体の中央に存在する動原体に向かう紡錘体を形成する¹⁾。Figure 17. に示すように、間期 HeLa 細胞では細胞全体に繊維状の微小管ネットワーク形成が観察できる。M 期 HeLa 細胞では、M 期中期における染色体の細胞中央への整列による中期板の形成と、細胞の両極に移動した中心体から伸長した微小管による二極紡錘体の形成が観察される。

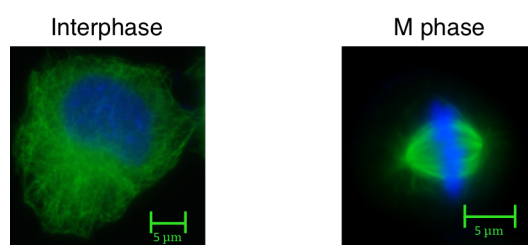


Figure 17. Immunostaining HeLa cell images in interphase and M phase. Cells were stained by DAPI (blue; DNA) and anti- α -tubulin antibody (green; tubulin).

一般に、チューブリン重合阻害薬であるコルヒチンやコンブレタスタチンなどは紡錘体の形成を阻害することがよく知られており、紡錘体形成を含む微小管の動態に対する KPU-300 (58) の影響を観察するべく、HeLa 細胞の微小管をマウス抗 α -チューブリン抗体及び蛍光標識された抗マウス IgG 抗体により緑色に、DNA を DAPI により青色に染色し、間期及び M 期それぞれの細胞を観察した。

Figure 18. に間期 HeLa 細胞の免疫染色像を示す。プリナブリン (12) や KPU-300 (58) を作用させると、コントロール群の HeLa 細胞内に高度に形成されていた長い繊維状の微小管が減少しており、高濃度の化合物を添加した細胞内には繊維状の微小管をほとんど観察できなかつた。

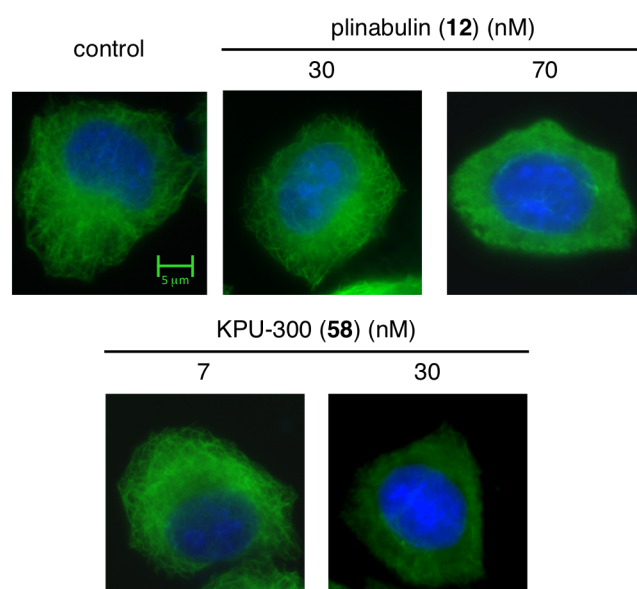


Figure 18. Immunostaining HeLa cell images in interphase. Cells were treated with compounds in indicated concentrations over 6 h. After treatment, cells were stained by DAPI (blue; DNA) and anti- α -tubulin antibody (green; tubulin).

続いて、**Figure 19.** に M 期 HeLa 細胞の免疫染色像を示す。プリナブリン (12) 及び KPU-300 (58) を作用させると、低濃度処理群でも染色体の整列が阻害されていること、さらに細胞内の各所から複数の紡錘体、すなわち多極化した紡錘体の形成が確認された。高濃度群では紡錘体構造が完全に消失し、染色体の整列も観察できなくなった。微小管は染色体の移動にもモータータンパクのレールとして関わっており、これらの現象は KPU-300 (58) によるチューブリン重合阻害に起因すると考えられた。

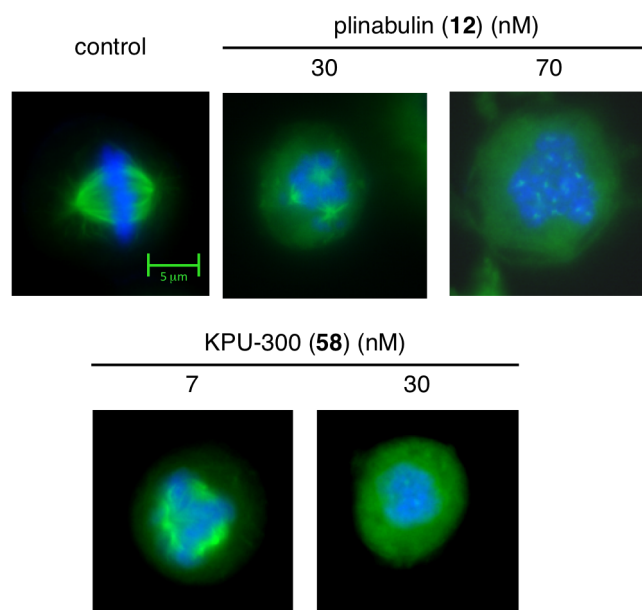


Figure 19. Immunostaining HeLa cell images in M phase. Cells were treated with compounds in indicated concentrations over 6 h. After treatment, cells were stained by DAPI (blue; DNA) and anti- α -tubulin antibody (green; tubulin).

第四節 小括

本章では、第一章での構造活性相関検討より得られた有力な 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 (**58**) に着目し、精製チューブリンや細胞を用いた実験を行った。

第一節では、構造活性相関検討に用いた HT-29 細胞以外の細胞に対する KPU-300 (**58**) の殺細胞活性評価を行った。抗がん剤としての有用性の指標として癌細胞株である HeLa 細胞及び A549 細胞、副作用や毒性の指標として正常細胞である初代培養ヒト線維芽細胞 NHSF46、及びヒト末梢血単核球 (HMNC) を用いた評価を行った結果、KPU-300 は HT-29 細胞を含めた 3 種の癌細胞株に対して高い殺細胞活性を示した。また、癌細胞株は正常細胞よりも高い感受性を示した。

第二節では、精製したチューブリンを用い、KPU-300 (**58**) のチューブリン重合阻害活性を評価し、さらにチューブリンとの親和性を結合解離定数として算出した。KPU-300 (**58**) はリード化合物であるプリナブリン (**12**) と同様に、濃度依存的にチューブリンの重合を阻害すること、及びチューブリンに対する高い親和性を有することを明らかとした。

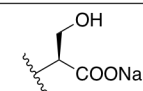
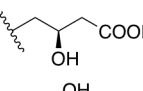
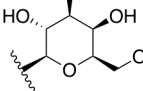
第三節では、免疫染色により微小管を可視化し、KPU-300 (58) の微小管ネットワーク及び紡錘体形成に対する作用を蛍光顕微鏡により観察した。KPU-300 (58) は間期 HeLa 細胞では微小管ネットワークの消失を、M 期 HeLa 細胞に対しては紡錘体形成や染色体移動を阻害することを確認した。

以上、本章での検討により、KPU-300 (58) は微小管を標的としたチューブリン重合阻害剤であることを確認した。また、KPU-300 (58) は放射線増感作用を示すことが報告されており⁵⁷⁾、臨床において外科的手術や化学療法と並び癌治療の要である放射線療法との併用により、相乗的な治療効果を期待できる化合物であると考えられる。

第三章 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 を基盤とした水溶性プロドラッグ創製

序節

2-ピリジル型誘導体 KPU-300 (**58**) は高い殺細胞活性を示す有望な化合物であるが、化合物の水溶性が非常に低く ($<0.1 \mu\text{g/mL}$)、臨床応用を目指す上ではその難水溶性の改善が課題であった。難水溶性はジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤に共通の課題であり、これらの化合物は、第一章にて確認した活性発現に必須の構造である分子内水素結合とそれに由来する平面性の高い擬三環構造による π - π スタッキングの形成が原因の一つであると考えられている。この難水溶性によってジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の臨床における投与方法も制限を受けており、プリナブリン (**12**) の臨床試験に際してはクレモホール EL を溶解補助剤として併用したプロピレングリコール溶液として供給され、注射剤として投与されている⁵⁰⁾。この溶解補助剤は過敏症の原因となりうることが知られており^{58,59)}、溶解補助剤を必要としない誘導体の開発が強く望まれていた。これまでに、プリナブリン (**12**) のジケトピペラジン環をモノラクチムへと変換し、同部位にアシルアセタール構造を有するリンカーを介して水溶性補助基を導入したエステル型プロドラッグが創製されている^{38,39)}。例として、3つのプロドラッグを **Figure 20.** に示す。

| compounds | R _{aq} | water solubility (mg/mL) | half-life (h) |
|-----------|---|--------------------------|-----------------|
| 74 |  | 6.38 | 1 |
| 75 |  | 0.85 | 0.37 |
| 76 |  | 0.075 | ND ^a |

^aND: not determined.

Figure 20. example of prodrug; structure and water-solubility of plinabulin-prodrug **74-76**

水溶性補助基としてアミノ酸であるセリン由来の構造を導入したプロドラッグ **74** は親化合物と比較して1万倍もの水溶性を示し、**Figure 21.** に示すように *in vitro* においてエステラーゼにより速やかに加水分解され親化合物へと再生することが明らかとなっている。この時同時に生じるリンカー由来の化合物 **77** は毒性を示さず、ホルムアルデヒドは速やかに二酸化炭素へと代謝されるため、副作用の原因となる可能性

は低いと考えられた⁶⁰⁾。導入する水溶性補助基の構造とプロドラッグ体の水溶性に関する検討が既に報告されており³⁹⁾、分子内に4つのヒドロキシ基を有する β -D-ガラクトースを水溶性補助基とした**76**はわずかな水溶性上昇しか示さなかったことから、水溶性補助基としてはヒドロキシ基よりもイオン化したカルボキシル基の寄与が大きいことが示されている。

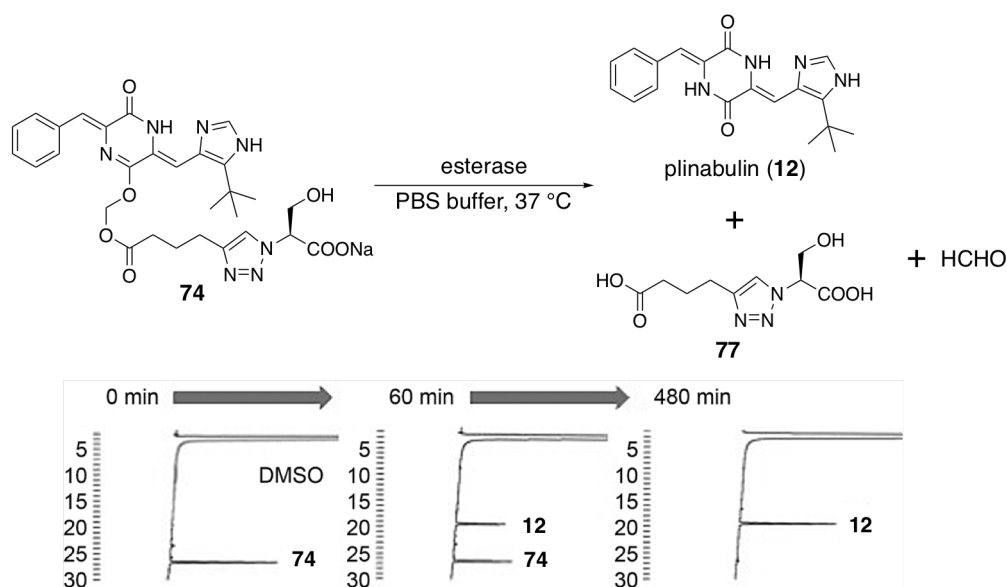


Figure 21. time course hydrolysis of plinabulin-prodrug **74** by esterase

本プロドラッグ化法は、モノラクチムへと変換したジケトピペラジン環を修飾部位としているため、プリナブリンと同様ジケトピペラジン環を有する KPU-300 (**58**)にも適用できると期待された。そこで、本手法を用いて水溶性を改善した KPU-300 プロドラッグ体の創製に着手することとした。

第一節 KPU-300 水溶性プロドラッグの創製

KPU-300 (**58**) を水溶性プロドラッグへと誘導するにあたって、水溶性補助基の検討を行うこととした。先行研究で親化合物としていたプリナブリン (**12**) に比べ、KPU-300 (**58**) は非極性なベンゾイル基を導入しているため、さらに水溶性が低下している可能性が懸念された。そこで、水溶性の大幅な上昇を目指し、分子内に2つのカルボン酸を有する L-アスパラギン酸の構造を水溶性補助基に選択し、活性向上に大

きく寄与すると期待されるカルボン酸塩構造を分子内に 2 つ導入することにより水溶性の確保を期待した KPU-300 水溶性プロドラッグ **78** を設計した。

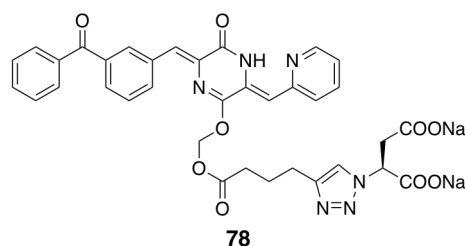
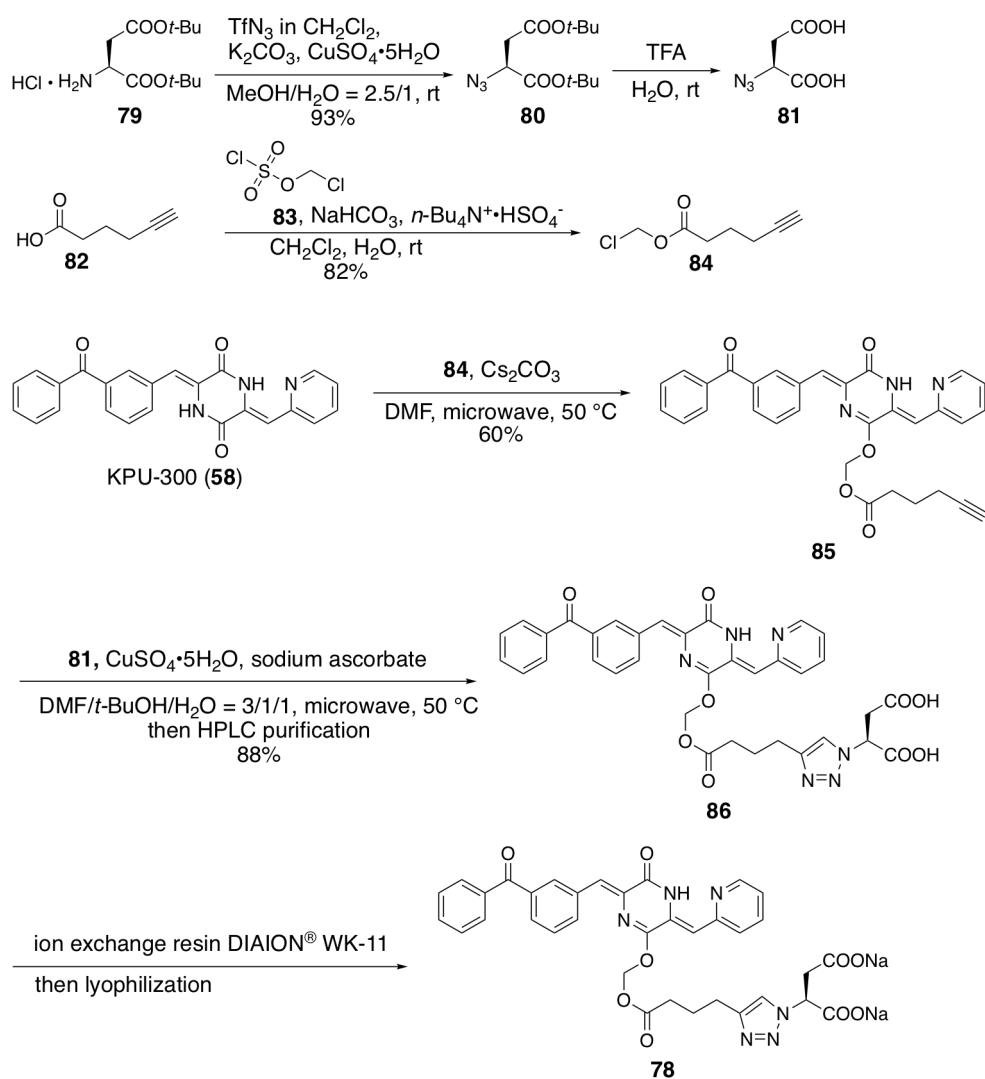


Figure 22. structure of designed aspartic acid-type water-soluble KPU-300-prodrug **78**

本プロドラッグは、以下に示す **scheme 4**. により合成した。

アジ化ナトリウムとトリフルオロメタンスルホン酸無水物より調製したトリフルオロメタンスルホン酸アジド^{61,62)}をジ-*tert*-ブチル L-アスパラギン酸塩酸塩 **79** と反応させ、アミノ基をアジド基へと変換したアジド型アスパラギン酸誘導体 **80** を得た。得られたアスパラギン酸誘導体 **80** の *tert*-ブチル基を TFA により脱保護し、水溶性ユニット **81** を合成した。一方で、5-ヘキシシン酸 **82** に対してクロロメチルクロロスルホン酸 **83** を反応させてクロロメチル体 **84** を合成し、得られた 5-ヘキシシン酸クロロメチル **84** をマイクロウェーブ照射下 50 °C にて KPU-300 (**58**) と反応させ、KPU-300 アルキン体 **85** を合成した。得られた KPU-300 アルキン体 **85** に対し、クリック反応の一つである CuAAC 反応⁶³⁻⁶⁶⁾を用いて水溶性ユニット **81** を導入し、高速液体クロマトグラフィーにより精製することでカルボン酸体 **86** を得た。メタクリル酸系陽イオン交換樹脂 DIAION® WK-11 を用いてイオン交換を行ってナトリウム塩へと変換し、凍結乾燥により溶媒を除去し目的の KPU-300 プロドラッグ体 **78** を得た。



Scheme 4. synthesis of water-soluble KPU-300-prodrug **78**

なお、中間体である KPU-300 アルキン体 **85** の構造は、**Figure 23.** に示すように X 線結晶構造解析により確認した。

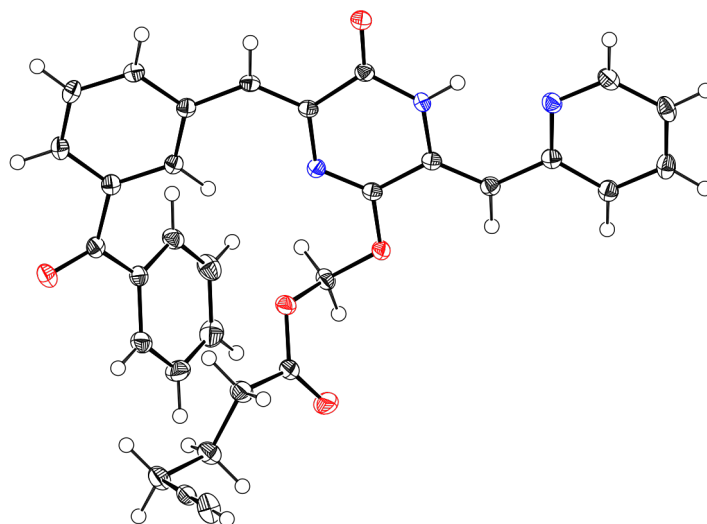


Figure 23. ORTEP drawing of X-ray crystal structure of alkyne **85**

第二節 KPU-300 水溶性プロドラッグの評価

第一節にて得られた KPU-300 水溶性プロドラッグ **78** の機能を評価するべく、水に対する溶解度、及びエステラーゼによる加水分解実験を行い、その水溶性とプロドラッグとしての機能を確認することとした。

HPLC を用いてプロドラッグ **78** 及び親化合物である KPU-300 (**58**) の検量線を作成し、各々の水に対する溶解度を算出した。プロドラッグ **78** の溶解度は 80 mg/mL と KPU-300 (**58**) の溶解度 (<0.1 µg/mL) を 80 万倍以上も改善することに成功し、十分な水溶性の獲得に成功した。期待通り、分子内に 2 つのカルボン酸塩構造を導入することでセリン型のプリナブリンプロドラッグを超える水溶性を獲得できたことから、ジカルボン酸塩型プロドラッグの有用性を示す結果となった。

また、ブタ肝エステラーゼを用いた加水分解実験により、**Figure 24.** に示すように経時的なプロドラッグ **78** の減少 (半減期: 8.7 時間) と親化合物である KPU-300 (**58**) の再生が確認された。なお、48 時間後において、20%程度のプロドラッグ体 **78** の残存が認められた。そこで、加水分解実験の 48 時間後における反応液の上清及び生じていた沈殿物を分析したところ、上清にはプロドラッグ体 **78** は存在せず、沈殿に含まれていることが明らかとなった。すなわち、プロドラッグ体 **78** の残存は、再生した KPU-300 (**58**) が未分解のプロドラッグ体 **78** を巻き込みながら析出したためであると考えられる。

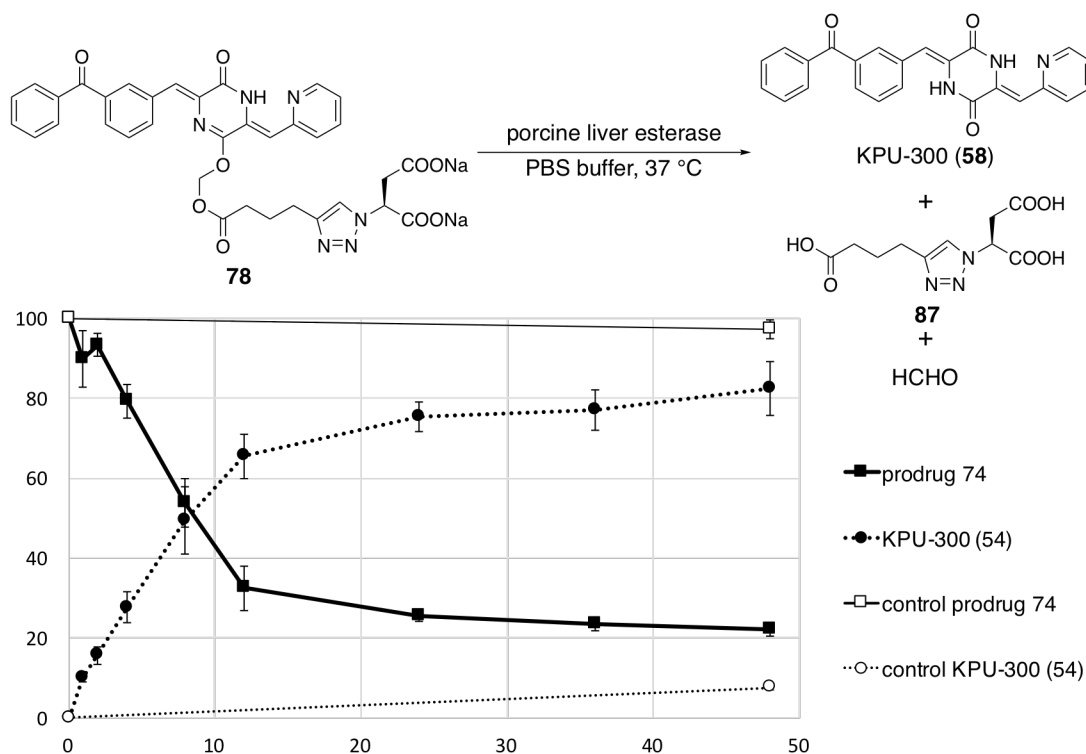


Figure 24. time course hydrolysis of KPU-300-prodrug **78** by esterase

以上より、難水溶性である KPU-300 (**58**) に対しアルキン化及び CuAAC 反応を行い、水溶性補助基としてアスパラギン酸由来のジカルボン酸構造を導入することにより、高い水溶性を有するエステラーゼ応答型の KPU-300 水溶性プロドラッグ **78** の合成に成功した。

第三節 小括

本章では、KPU-300 (**58**) の非常に低い水溶性の改善を目指し、プリナブリン (**12**) のプロドラッグ合成法を KPU-300 に適用することとし、KPU-300 プロドラッグの合成と評価を行った。

第一節でのプロドラッグ設計にあたり、KPU-300 はベンゾイル構造の導入により、その水溶性はプリナブリンよりもさらに低下している懸念があった。そこで、高い溶解性が期待されるカルボン酸塩構造に着目し、ジカルボン酸構造を有するアスパラギン酸の構造を水溶性補助基として選択し、プロドラッグ体の合成に成功した。

第二節では、第一節にて得られた KPU-300 プロドラッグ体の溶解度を算出した。期待通り、ジカルボン酸塩としたプロドラッグ体は 80 mg/mL と、親化合物に比べて 80 万倍以上もの良好な溶解性を示すことを確認した。また、ブタ肝エステラーゼを用いた加水分解実験により、このプロドラッグはエステラーゼによって加水分解され、親化合物である KPU-300 を再生することを確認した。

総 括

本論文は、『2-ピリジル構造を有するジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の創製研究』と題した、天然環状ジペプチド(-)-フェニラヒスチンに端を発するジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の構造活性相関並びに高活性誘導体の獲得とその臨床応用を志向した修飾を目指した研究に関して、全三章にまとめたものである。

微小管を標的とするチューブリン作用薬は、幅広い癌領域において欠くことのできない重要な医薬品であり、前臨床においても高い関心が寄せられている化合物群である。癌化学療法において、切れ味の鋭い分子標的薬が次々と創製されているが、分子標的薬を適応できない癌種も多く、細胞傷害性抗がん剤の需要はいまだ高い。加えて、抗がん剤を用いた癌化学療法では、副作用の発現による投与継続困難や腫瘍の薬剤耐性獲得などにより薬剤の選択肢が徐々に減少してしまうことから、新たな抗がん剤の創製は全世界的に進められている課題の一つである。

そこで本論文では、チューブリン重合阻害作用を有するジケトピペラジン化合物であるプリナブリンとその誘導体に着目し、構造活性相関を検討することで新規抗がん剤の創製を目指した研究を行うこととし、以下に示す知見を得ることができた。

第一章では、ベンゾフェノン型ジケトピペラジン誘導体を基としたヘテロ環部位の構造活性相関研究に基づき、2-ピリジル型誘導体 KPU-300 の創製に至った。本誘導体は、プリナブリンを始めとするジケトピペラジン誘導体に不可欠であった五員環構造から脱却した初めての例であり、これまでのジケトピペラジン誘導体から一線を画した新たな抗がん剤の創製に繋がる成果であった。

第二章では、第一章で得られた新規誘導体KPU-300 の詳細な*in vitro*評価を展開した。KPU-300 は高いチューブリン親和性及びチューブリン重合阻害活性を示し、複数の癌細胞株に対して高い殺細胞活性を示すことを明らかにした。免疫染色による観察から細胞周期をM期で停止させることを確認し、KPU-300 の作用機序がチューブリン重合阻害であることを裏付ける結果を得た。

第三章では、KPU-300 の構造を基に、水溶性を改善したエステラーゼ応答型プロドラッグを創製した。本プロドラッグはKPU-300 の80万倍以上の水溶性を示し、エステラーゼによってKPU-300 を再生することを確認した。ジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の臨床応用における大きなハードルである難水溶性を克服できる本プロドラッグ体の創製は、KPU-300 を含むジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の医薬分野への応用の道を開く有益な知見であると考えられる。

本研究では医薬品候補となり得る新規誘導体 KPU-300 を創製できたことに加え、さらなる誘導体探索の基盤となるピリジル型の新規骨格を提案できた。ジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤において開発創成期から続いてきた五員環構造からの脱却により、構造の自由度が劇的に増加し、さらなる有力な誘導体の創製、ひいては新規医薬品の開発へとつながる成果となるものであると考えている。本研究の成果を通じて、医薬品開発や科学のさらなる発展に貢献できれば幸いである。

実験の部

本研究に際し、使用した分析機器等は以下の通りである。

¹H NMR

Varian Mercury-300 NMR Spectrometer (300 MHz)

Bruker DPX-400 NMR spectrometer (400 MHz)

内部標準として、テトラメチルシラン (0.00 ppm) を用い測定した。

¹³C NMR

Varian Mercury-300 NMR Spectrometer (75 MHz)

Bruker DPX-400 NMR spectrometer (100 MHz)

内部標準として、重クロロホルム由来の残留溶媒ピーク (77.05 ppm)、重 DMSO 由来の残留溶媒ピーク (39.52 ppm)、または重メタノール由来の残留溶媒ピーク (49.00 ppm)を用いた。

NMR スペクトルの記載は以下の略号に従うものとする。

S: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, quint: quintet, m: multiplet, br: broad.

質量分析

Waters q-TOF Ultima API

融点測定

Yanaco MP-500D 微量融点測定装置を用いて測定した。融点は未補正である。

赤外吸収スペクトル

JASCO FT/IR4100 を用いて測定した。

X 線結晶構造解析

Bluker Apex2 Ultra

比旋光度測定には、日本分光 自動旋光計 P-1030 を用いた。

高速液体クロマトグラフィー

精製には SunFire C18 OBD Prep Column, 100Å, 5 μm, 19 mm X 150 mm を用い、溶出には 0.1% TFA を含むアセトニトリルと 0.1% TFA を含む milli Q 水を用いた。

反応解析には SunFire C18 Column, 100Å, 5 μm, 4.6 mm X 150 mm を用い、溶出には

0.1% TFA を含むアセトニトリルと無添加の milli Q 水を用いた。

カラムクロマトグラフィーによる分離精製には、関東化学株式会社より購入した Silica gel 60N (spherical, neutral) (40-50 μm)を用いた。

薄層クロマトグラフィーによる分析には、Merck Silica gel 60F₂₅₄を用いた。

無水 DMF は関東化学株式会社から購入したものを使用した。

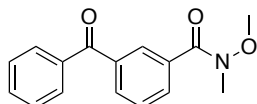
無水 THF は関東化学株式会社又は和光純薬株式会社から購入したものを使用した。

その他の試薬については、特に記載のない限り市販のものを購入し、そのまま用いた。

合成の部

第一章の合成

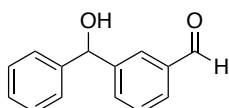
3-Benzoyl-*N*-methoxy-*N*-methylbenzamide (**51**)



51

To the solution of 3-benzoylbenzoic acid **50** (850 mg, 3.76 mmol) in DMF (40 mL) were added *N,O*-dimethyl hydroxylamine hydrochloride (385 mg, 3.95 mmol), Et₃N (0.55 mL, 3.95 mmol), and WSC·HCl (757 mg, 3.95 mmol). After the mixture was stirred for 5 h at room temperature, the solvent was removed in vacuo and the residue was dissolved in EtOAc, washed with 10% citric acid, 10% NaHCO₃, and brine, dried over Na₂SO₄. The solvent was removed in vacuo to give a colorless oil of compound **51** (0.95 g, 86%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (t, 1H, *J* = 1.5 Hz), 7.91 (dd, 2H, *J* = 1.6, 7.5 Hz), 7.78–7.81 (m, 2H), 7.46–7.60 (m, 4H), 3.56 (s, 3H), 3.37 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 196.0, 168.9, 137.4, 137.1, 134.2, 132.7, 132.0, 131.9, 130.0, 129.7, 128.4, 128.2, 61.2, 33.5; HRMS (EI): *m/z* 269.1045 (M⁺) (calcd for C₁₆H₁₅NO₃: 269.1052).

3-(Hydroxy(phenyl)methyl)benzaldehyde (**52**)

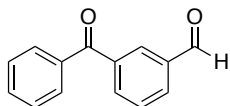


52

To a solution of Weinreb amide **51** (505 mg, 1.87 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added portionwise LiAlH₄ (85.4 mg, 2.25 mmol) at -78 °C under an argon atmosphere, and the mixture was stirred for 2.5 h at the same temperature. After the mixture was quenched with H₂O at -78 °C, EtOAc was added and the resulting precipitate was removed by Celite filtration. The filtrate was washed with H₂O and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated in vacuo to give an oil of compound **52** (390 mg, 98%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.98 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.78 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.66 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.49 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.27–7.37 (m, 5H), 5.92 (d, 1H), 2.39 (d, 1H); ¹³C NMR (75 MHz,

CDCl₃) δ 192.3, 144.9, 143.2, 136.5, 132.5, 129.2, 128.8, 128.0, 127.6, 126.6, 75.7; HRMS (CI): m/z 213.0924 (M+H)⁺ (calcd for C₁₄H₁₃O₂: 213.0915).

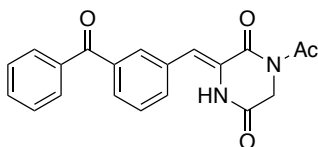
3-Benzoylbenzaldehyde (**53**)



53

To a solution of aldehyde **52** (102 mg, 0.48 mmol) in THF (5 mL) was added Dess-Martin periodinane (305 mg, 0.72 mmol), and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. After the mixture was quenched by the addition of saturated NaHCO₃aq. (1.5 mL) and saturated Na₂S₂O₃aq. (1.5 mL), EtOAc was added, and the organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated in vacuo. The residual oil was purified by silica gel column chromatography using hexane/EtOAc (4:1) as an eluent to give a colorless oil of compound **53** (88 mg, 87%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.09 (s, 1H), 8.28 (t, 1H, $J = 1.6$ Hz), 8.07–8.13 (m, 2H), 7.79–7.83 (m, 2H), 7.61–7.71 (m, 2H), 7.51 (dd, 2H, $J = 7.7, 7.1$ Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 195.4, 191.4, 138.5, 136.8, 136.3, 135.4, 133.0, 132.6, 131.3, 130.0, 129.2, 128.6; HRMS (EI): m/z 210.0684 (M⁺) (calcd for C₁₄H₁₀O₂: 210.0681).

(Z)-N-acetyl-3-(3-benzoylbenzylidene)piperazine-2,5-dione (**49**)

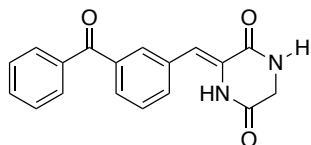


49

To a solution of 3-benzoylbenzaldehyde **53** (10.0 g, 47.6 mmol) in DMF (420 mL) was added *N,N*-diacetylpiperazine-2,5-dione **54** (11.3 g, 57.1 mmol), and the solution was repeatedly evacuated over a short period of time to remove oxygen and flush the solution with Ar. A solution of potassium *tert*-butoxide (5.60 g, 50.0 mmol) in DMF (50.0 mL) and *tert*-butanol (50.0 mL) was then added dropwise under an Ar atmosphere at -15 °C. The resultant mixture was stirred at -15 °C. After 2.5 h stirring, the mixture was added to 10% citric acid (120 mL) and stirred for an additional 30 min. The solvent was removed by evaporation, and the residue was dissolved in CHCl₃, washed with 10% citric acid and brine, dried over Na₂SO₄, and

concentrated *in vacuo*. The resulting residue was purified by column chromatography on silica-gel using CHCl₃-MeOH (200:1 to 30:1) as an eluent. The product was recrystallized from EtOAc-Et₂O to give a white solid of the desired compound **49** (10.7 g, 64%); mp 182–184 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 3206, 3060, 2937, 1696, 1678, 1648, 1637, 1597; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.53 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.81–7.72 (m, 3H), 7.65–7.53 (m, 3H), 7.49 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 2.65 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.9, 172.5, 163.3, 160.0, 138.8, 137.0, 133.08, 133.06, 132.4, 130.7, 130.2, 130.1, 129.5, 128.6, 126.8, 118.9, 46.2, 27.4; HRMS (ESI): *m/z* 349.1180 [M+H]⁺ (Calcd for C₂₀H₁₇N₂O₄: 349.1188).

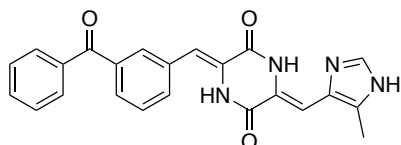
(Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)piperazine-2,5-dione (48)



48

To a solution of (*Z*)-*N*-acetyl-3-(3-benzoylbenzylidene)piperazine-2,5-dione **49** (13 mg, 0.0373 mmol) in DMF (2 mL) was added 28% NH₄OH (0.26 mL, 4.29 mmol). The mixture was then stirred for 2 h at room temperature. After the solvent had been removed by evaporation, the residue was dissolved in AcOEt, washed with 10% NaHCO₃ and brine, and dried over Na₂SO₄. Concentration *in vacuo* gave a white solid of the desired compound **48** (6.0 mg, 53%); mp 205–207 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 3198, 3058, 1682, 1661, 1632, 1594, 1448, 1277; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (br s, 1H), 7.83–7.74 (m, 4H), 7.65–7.47 (m, 5H), 7.01 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.24 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 196.0, 162.9, 159.5, 138.9, 137.2, 133.2, 133.0, 132.1, 130.3, 130.2, 130.0, 129.6, 128.7, 126.2, 115.4, 45.6; HRMS (ESI): *m/z* 329.0896 [M+Na]⁺ (Calcd for C₁₈H₁₄N₂O₃Na: 329.0902).

(3Z,6Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-((5-methyl-1H-imidazol-4-yl)methylene)piperazine-2,5-dione (55)



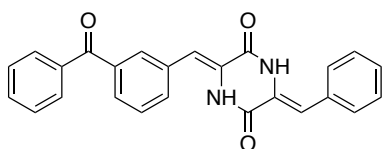
55

To a solution of (*Z*)-*N*-acetyl-3-(3-benzoylbenzylidene)piperazine-2,5-dione **49** (50 mg, 0.144 mmol) in DMF (2.0 mL) was added 4-methyl-5-imidazolecarboxaldehyde **56** (19.0 mg,

0.173 mmol). The solution was repeatedly evacuated over a short period of time to remove oxygen. The solution was then flushed with Ar. Cs₂CO₃ was then added (70.4 mg, 0.216 mmol) and the evacuation-flushing process was repeated again. The resultant mixture was stirred at 110 °C for 2 h, and the progression of the reaction was monitored by TLC. After the reaction had finished, the solvent was removed by evaporation and the residue was dissolved in CHCl₃, washed with 10% NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The product was purified by column chromatography using CHCl₃-MeOH as an eluent to give a yellow solid **55** (24.7 mg, 43%); mp 191–194 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 3196, 3062, 1684, 1661, 1635, 1596, 1419; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.52 (br s, 1H), 11.99 (s, 1H), 10.31 (br s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.85–7.79 (m, 3H), 7.78–7.74 (m, 1H), 7.74–7.67 (m, 1H), 7.66–7.62 (m, 1H), 7.61–7.56 (m, 3H), 6.80 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 2.32 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 195.6, 157.6, 156.1, 137.4, 136.9, 135.1, 133.6, 133.3, 132.8, 132.5, 130.2, 129.82, 129.79, 129.2, 128.8, 128.6, 127.8, 123.5, 112.6, 104.2, 9.1; HRMS (ESI): *m/z* 399.1453 [M+H]⁺ (Calcd for C₂₃H₁₉N₄O₃: 399.1457).

Compounds **57-60** and **62-64** were synthesized from compound **49** and corresponding aldehyde **65-68** and **70-72** according to the procedure described for the synthesis of **55**.

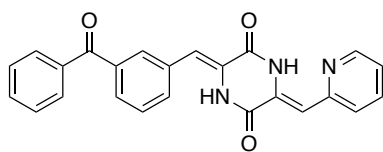
1-2-4. (3*Z*,6*Z*)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-benzylidenepiperazine-2,5-dione (**57**)



57

Yield of 58% from **49** and benzaldehyde **65**; mp 247–249 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 3212, 3060, 1686, 1655, 1630, 1597, 1412; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.54 (br s, 1H), 10.30 (br s, 1H), 7.88–7.80 (m, 3H), 7.80–7.75 (m, 1H), 7.74–7.64 (m, 2H), 7.63–7.51 (m, 5H), 7.48–7.37 (m, 2H), 7.37–7.29 (m, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.78 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 195.5, 158.1, 157.7, 137.4, 136.8, 133.42, 133.37, 133.1, 132.8, 130.2, 129.8, 129.3, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.2, 127.5, 126.3, 115.1, 113.8; HRMS (ESI): *m/z* 417.1209 [M+Na]⁺ (Calcd for C₂₅H₁₈N₂O₃Na: 417.1215).

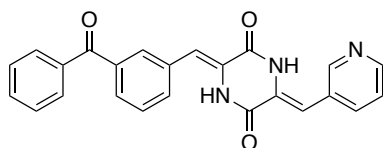
(3Z,6Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-(pyridine-2-ylmethylene)piperazine-2,5-dione (KPU-300) (58)



58

Yield of 31% from **49** and 2-pyridinecarboxaldehyde **66**; mp 263–266 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3073, 3053, 1692, 1653, 1643, 1587, 1355; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.60 (s, 1H), 10.64 (s, 1H), 8.73 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 7.95–7.76 (m, 5H), 7.74–7.64 (m, 3H), 7.64–7.56 (m, 3H), 7.41–7.35 (m, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.73 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 195.5, 156.9, 156.6, 154.6, 148.5, 137.8, 137.4, 136.8, 133.5, 133.2, 132.8, 131.0, 130.3, 129.8, 129.1, 128.8, 128.6, 127.1, 126.5, 122.5, 114.4, 107.7; HRMS (ESI): m/z 418.1171 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$: 418.1168).

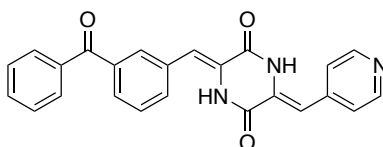
(3Z,6Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-(pyridine-3-ylmethylene)piperazine-2,5-dione (59)



59

Yield of 86% from **49** and 3-pyridinecarboxaldehyde **67**; mp 258–260 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3204, 3055, 3036, 1686, 1654, 1630, 1595, 1413; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.64 (s, 2H), 8.69 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.48 (dd, $J = 4.8, 1.5$ Hz, 1H), 7.93 (dt, $J = 8.1, 1.8$ Hz, 1H), 7.88–7.74 (m, 4H), 7.73–7.64 (m, 2H), 7.63–7.55 (m, 3H), 7.42 (dd, $J = 7.9, 4.9$ Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.76 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 195.5, 157.9, 157.8, 150.2, 148.4, 137.4, 136.8, 136.2, 133.4, 132.8, 131.9, 130.2, 129.8, 129.4, 129.0, 128.9, 128.6, 128.2, 127.5, 123.5, 114.0, 111.4; HRMS (ESI): m/z 396.1351 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$: 396.1348)

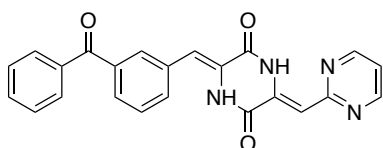
(3Z,6Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-(pyridine-4-ylmethylene)piperazine-2,5-dione (60)



60

Yield of 14% from **49** and 4-pyridinecarboxaldehyde **68**; mp 258–260 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3215, 3056, 1692, 1657, 1633, 1593, 1415; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.63 (br s, 2H), 8.57 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 7.88–7.74 (m, 4H), 7.73–7.64 (m, 2H), 7.63–7.55 (m, 3H), 7.50–7.44 (m, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.69 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 195.5, 157.9, 157.6, 149.8, 140.6, 137.4, 136.8, 133.4, 133.3, 132.9, 130.3, 129.8, 129.6, 129.1, 128.9, 128.6, 127.4, 123.6, 114.4, 111.5; HRMS (ESI): m/z 396.1341 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$: 396.1348).

(3Z,6Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-(pyrimidine-2-ylmethylene)piperazine-2,5-dione (61)

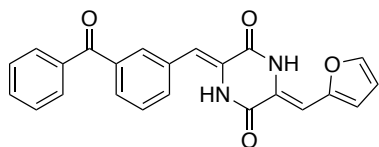


61

To a solution of 2-cyanopyrimidine **73** (208 mg, 2.0 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was added dropwise DIBAL-H (a 1.0 M solution in toluene 2.4 mL, 2.4 mmol) at -78 °C under an Ar atmosphere. The cooling bath was then removed and the reaction mixture was stirred for 2 h at 0 °C. The reaction mixture was quenched by the addition of MeOH-AcOH (2:1), and a saturated solution of Rochelle salt was added. The mixture was then stirred for an additional 30 min at room temperature, extracted with CHCl_3 , and washed with 10% NaHCO_3 and brine. The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The resultant aldehyde **69** was difficult to purify; therefore, the residue was used directly without further purification. The residue was dissolved in DMF (0.5 mL), and (*Z*)-*N*-acetyl-3-(3-benzoylbenzylidene)piperazine-2,5-dione **49** (30 mg, 0.086 mmol) was added to the solution. The mixture was repeatedly evacuated over a short period of time to remove the oxygen, and the flask was flushed with Ar. Cs_2CO_3 was then added (53.3 mg, 0.16 mmol) and the evacuation–flushing process was repeated again. The resultant mixture was stirred at 110 °C for 2 h, and the progression of the reaction was monitored using TLC. After the reaction had finished, the solvent was removed by evaporation, and the residue was dissolved in CHCl_3 , washed with 10% NaHCO_3 and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was purified by column chromatography using CHCl_3 -MeOH as an eluent to give a yellow solid **61** (7.6 mg, 2%); mp 256–259 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3204, 3064, 1697, 1678, 1645, 1568, 1556, 1403; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.02 (s, 1H), 10.81 (br s, 1H), 8.95 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.87–7.79 (m, 3H), 7.73–7.65 (m, 2H), 7.65–7.56 (m, 3H), 7.42 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.59 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 195.5, 163.5, 157.4, 156.9, 156.5, 137.4, 136.8, 134.9, 133.6, 132.9, 130.4, 129.8, 129.2, 128.8, 128.6,

118.7, 115.2, 107.1; HRMS (ESI): m/z 419.1117 $[M+Na]^+$ (Calcd for $C_{23}H_{16}N_4O_3Na$: 419.1120).

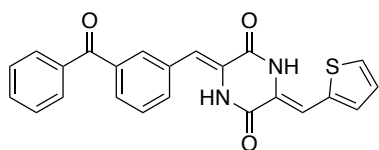
(3Z,6Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-(furan-2-ylmethylene)piperazine-2,5-dione (62)



62

Yield of 74% from **49** and 2-furaldehyde **70**; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 10.51 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 7.91 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.84 (br s, 1H), 7.84–7.76 (m, 3H), 7.73–7.63 (m, 2H), 7.61–7.54 (m, 3H), 6.88 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz), 6.86 (s, 1H), 6.68–6.63 (2H, m); HRMS (ESI) m/z : 385.1188 $[M+H]^+$ (Calcd for $C_{23}H_{16}N_2O_4$: 385.1188).

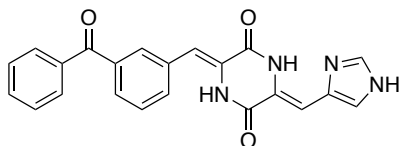
(3Z,6Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-(thiophene-2-ylmethylene)piperazine-2,5-dione (63)



63

Yield of 14% from **49** and 2-thiophenecarboxaldehyde **71**; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 10.51 (br s, 1H), 9.86 (br s, 1H), 7.87–7.76 (m, 4H), 7.74–7.64 (m, 3H), 7.62–7.52 (m, 4H), 7.18 (t, 1H, $J = 4.4$ Hz), 6.95 (s, 1H), 6.84 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z : 401.0955 $[M+H]^+$ (Calcd for $C_{23}H_{16}N_2O_3S$: 401.0960).

(3Z,6Z)-3-(3-benzoylbenzylidene)-6-(1H-imidazol-4-ylmethylene)piperazine-2,5-dione (64)

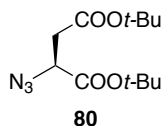


64

Yield of 22% from **49** and 4-imidazolcarboxaldehyde **72**; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 12.62 (br s, 1H), 11.91 (s, 1H), 10.31 (br s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.85–7.79 (m, 3H), 7.79–7.73 (m, 1H), 7.73–7.62 (m, 2H), 7.62–7.54 (m, 4H), 6.82 (s, 1H), 6.67 (s, 1H); HRMS (ESI) m/z : 385.1301 $[M+H]^+$ (Calcd for $C_{22}H_{16}N_4O_3$: 385.1313).

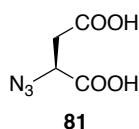
第三章の合成

(*S*)-di-*tert*-butyl 2-azidosuccinate (**80**)



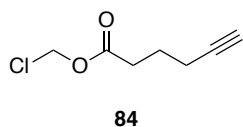
Tf₂O (0.54 mL, 3.38 mmol) was added dropwise to a solution of NaN₃ (1.1 g, 16.9 mmol) in CH₂Cl₂ (6.0 mL) and H₂O (2.5 mL) at 0 °C. After being stirred for 2 h at room temperature, the mixture was diluted with CH₂Cl₂ and the water layer was extracted with CH₂Cl₂. The extracts were washed with sat. Na₂CO₃ aq., and gave the solution of TfN₃ in CH₂Cl₂. The resultant solution of TfN₃ in CH₂Cl₂ was added dropwise to a solution of H-*L*-Asp(O*t*Bu)-O*t*Bu·HCl **79** (480 mg, 1.70 mmol), K₂CO₃ (0.3 g), and CuSO₄·5H₂O (5.5 mg) in H₂O/MeOH (7 mL/11 mL). After being stirred for overnight at room temperature, the mixture was concentrated and the residual oil was purified through silica gel column chromatography (Hexane : AcOEt = 4 : 1) to give (*S*)-di-*tert*-butyl 2-azidosuccinate **80** (429 mg, 92.9%) as a yellow oil. [α]_D²⁵ -65.41° (*c* 1.09, CH₃CN); IR (neat) cm⁻¹: 2980, 2935, 2110, 1734, 1369, 1257, 1150; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.18 (dd, *J* = 5.6 and 7.7 Hz, 1H), 2.73 (dd, *J* = 5.6 and 15.5 Hz, 1H), 2.58 (dd, *J* = 7.8 and 16.6 Hz, 1H), 1.51 (s, 9H), 1.47 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 168.8, 168.2, 83.2, 81.6, 59.1, 37.3, 28.0, 27.9; HRMS (ESI) *m/z* 294.1439 [M+Na]⁺ (Calcd for C₁₂H₂₁N₃O₄Na: 294.1430).

(*S*)-2-azidosuccinic acid (**81**)



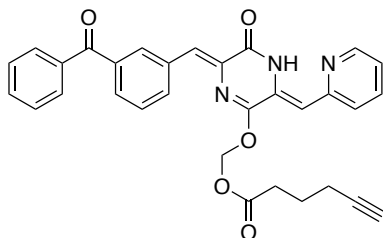
TFA (3.0 mL) was added to a solution of (*S*)-di-*tert*-butyl 2-azidosuccinate **80** (50 mg) in H₂O (2.0 mL) at room temperature. After being stirred for overnight at room temperature, the mixture was concentrated and co-evaporated with benzene. The residue as a yellow oil (34.2 mg) was used without further purification. ¹H NMR (400 MHz, D₂O (*OH* was exchanged with D₂O)): δ 4.58 (dd, *J* = 5.3 and 6.5 Hz, 1H), 3.01–2.88 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 177.0, 176.4, 61.5, 38.8; HRMS (ESI) *m/z* 182.0181 [M+Na]⁺ (Calcd for C₄H₅N₃O₄Na: 182.0178).

Chloromethyl hex-5-ynoate (**84**)



To a solution of 5-hexynoic acid **82** (300 mg, 2.68 mmol), NaHCO₃ (1.00 g, 11.9 mmol) and tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate (100 mg, 0.27 mmol) in H₂O/CH₂Cl₂ (3/2) (15 mL) was added a solution of chloromethyl chlorosulfate **83** (564 mg, 3.60 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) at rt. After being stirred at rt for 1 h vigorously, the residual mixture was quenched by water. The mixture was extracted with CHCl₃, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residual oil was purified through silica gel column chromatography (Hexane : AcOEt = 10 : 1) to give Chloromethyl hex-5-ynoate (**84**) (349 mg, 81%) as a colorless oil. IR (neat) cm⁻¹: 3301, 2946, 2118, 1762, 1417, 1373, 1340, 1309, 1260, 1225, 1129, 1029, 721; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.71 (s, 2H), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.29 (td, *J* = 6.9 and 2.6 Hz, 2H), 1.99 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.88 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.12, 82.84, 69.47, 68.63, 32.56, 23.18, 17.69; HRMS (ESI) *m/z* 183.0189 [M+ Na]⁺ (Calcd for C₇H₉ClO₂Na 183.0189).

(((3*Z*,6*Z*)-6-(3-benzoylbenzylidene)-5-oxo-3-(pyridin-2-ylmethylene)-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methyl hex-5-ynoate (**85**)

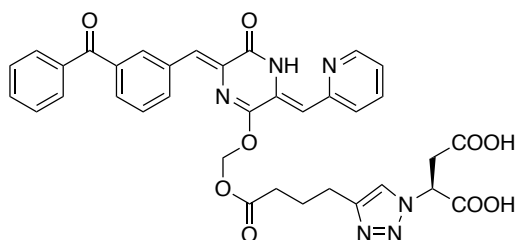


85

To a solution of KPU-300 (**58**) (50 mg, 0.13 mmol) in anhydrous DMF (1.0 mL) were added Cs₂CO₃ (90.5 mg, 0.28 mmol) and chloromethyl 5-hexynoate **84** (40.5 mg, 0.25 mmol), and the mixture was stirred for 15 min at 50 °C under microwave irradiation. The mixture was cooled to room temperature and the solvent was removed in vacuo. The residue was diluted with CHCl₃ and water, and the water layer was extracted with CHCl₃. The extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residual oil was purified through silica gel column chromatography (CHCl₃ : MeOH = 100 : 1) to give the alkyne **85** (39.1 mg, 60%) as a yellow solid. m.p. 149.4–150.0 °C; IR (KBr) cm⁻¹: 3277, 1751, 1673, 1652, 1605, 1585, 1319, 1130, 977; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 12.71 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.64 (dd, *J*

= 1.1 and 5.0 Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.84–7.82 (m, 2H), 7.80 (dt, $J = 1.3$ and 7.8 Hz, 1H), 7.70 (dt, $J = 1.8$ and 7.7 Hz, 1H), 7.61 (tt, $J = 1.3$ and 7.4 Hz, 1H), 7.57–7.47 (m, 3H), 7.46 (s, 1H), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.19 (ddd, $J = 1.0, 5.0,$ and 7.5 Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.85 (s, 2H), 2.51 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.25 (dt, $J = 2.6$ and 6.9 Hz, 2H), 1.96 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.85 (quint, $J = 7.2$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 196.6, 172.0, 159.5, 155.2, 152.4, 148.6, 138.0, 137.7, 136.9, 135.8, 135.0, 133.2, 132.5, 132.2, 130.4, 130.1, 128.9, 128.6, 128.4, 128.1, 125.9, 122.1, 106.0, 83.0, 81.3, 69.4, 32.6, 23.2, 17.7; HRMS (ESI) m/z 520.1871 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_5$: 520.1872).

(S)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-(3-benzoylbenzylidene)-5-oxo-3-(pyridin-2-ylmethylene)-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)succinic acid (86)

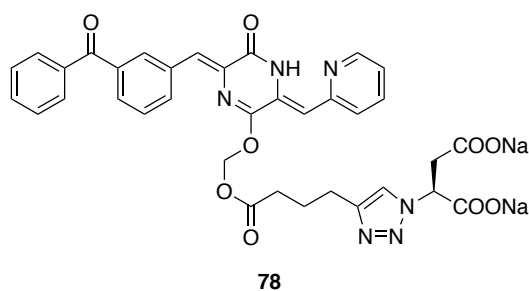


86

To a solution of alkyne **85** (20.5 mg, 39.5 μmol) in DMF (0.79 mL) and *t*-BuOH (0.26 mL) were added a solution of azide **10** (12.5 mg, 79.0 μmol) in H_2O (0.26 mL), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.89 mg) and sodium ascorbate (2.1 mg), and the mixture was stirred for 10 min at 50 $^\circ\text{C}$ under microwave irradiation. Then the mixture was cooled to room temperature and solvent was removed in vacuo. The residue was diluted with AcOEt and H_2O and the water layer was extracted with AcOEt. The extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The residual oil was purified through reverse phase high performance liquid chromatography (SunFireTMPrepC18 OBDTM 19 \times 150 mm (5 μm , 12 nm), gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 50 : 50 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 30 : 70 over 20 min, Flow rate: 6.00 mL/min, UV: 365 nm and 230 nm) to give the carboxylic acid **86** (23.5 mg, 88%) as a yellow solid. m.p. 121.3–122.6 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +3.60^\circ$ (c 0.14, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.82 (s, 1H), 8.62 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.82–7.71 (m, 5H), 7.64 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.58–7.50 (m, 3H), 7.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.27 (dd, $J = 4.9$ and 7.5 Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.77 (s, 2H), 5.68 (dd, $J = 6.0$ and 7.8 Hz, 1H), 3.31–3.28 (overlapped with MeOH, 2H), 2.70 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.95 (quint, $J = 7.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 198.5, 173.3, 173.0, 171.0, 161.2, 156.4, 153.9, 149.6, 147.8, 139.4, 138.9, 138.6, 137.3, 136.2, 134.0, 133.9,

133.4, 131.5, 131.1, 129.8, 129.7, 129.6, 128.7, 127.7, 124.2, 123.7, 107.8, 82.9, 60.8, 37.2, 33.9, 25.4, 25.3; IR (KBr) cm^{-1} : 3056, 1748, 1654, 1605, 1558, 1320, 1133, 984; HRMS (ESI) m/z 679.2154 (Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_9$: 679.2153).

sodium **(S)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-(3-benzoylbenzylidene)-5-oxo-3-(pyridine-2-ylmethylene)-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)succinate (78)**



The carboxylic acid (10.5 mg) was eluted with a solvent of $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1) through ion exchange resin (≥ 2.5 meq/mL, 2mL) at room temperature. The eluent was filtrated with $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1) and concentrated. The residue was lyophilized to give the titled sodium salt **78** as an orange solid. m.p. 185.4–187.0 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +40.40^\circ$ (c 0.08, MeOH); IR (KBr) cm^{-1} : 3142, 1749, 1683, 1654, 1604, 1558, 1396, 1320, 1208, 1133, 991; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD (NH was exchanged with CD_3OD .)): δ 8.68 (s, 1H), 8.52 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.80–7.68 (m, 4H), 7.65 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.54 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.46 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.19 (dd, $J = 4.9$ and 7.5 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.71 (s, 2H), 5.50 (dd, $J = 4.3$ and 10.3 Hz, 1H), 3.19–2.97 (m, 2H), 2.70 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.45 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.96 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 198.4, 178.0, 175.6, 173.5, 160.9, 156.3, 153.7, 149.5, 147.1, 139.1, 138.8, 138.5, 137.4, 136.1, 134.0, 133.9, 133.3, 131.4, 131.1, 129.8, 129.7, 129.5, 128.5, 127.7, 123.6, 123.3, 107.8, 83.0, 65.5, 41.9, 34.0, 25.6, 25.4; HRMS (ESI) m/z 723.1795 (Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_9\text{Na}_2$: 723.1791).

評価の部

第一章

HT-29 細胞培養条件

ヒト結腸腺癌由来の HT-29 細胞は ATCC より購入し、10%FBS を含む McCoy's 5A 培地を用い、37 °C、湿潤環境下、5%CO₂ 雰囲気にて培養した。

XTT/PMS を用いた殺細胞活性試験 (HT-29 cells)

化合物添加前日に 96 ウェルプレートに HT-29 細胞を 2500 細胞/ウェルになるように撒く。DMSO 溶液として調製した化合物のストック溶液を連続希釈して目的の最終濃度になるよう細胞に添加し、48 時間培養後、25 μM の PMS を含む 0.1 mg/mL の XTT-PBS 溶液を細胞に添加し、さらに 2 時間培養した。生成したホルマザン色素由来の 492 nm の吸光をプレートリーダー (TECAN SAFIRE) を用いて測定した。690 nm の吸光をコントロールとして非特異的吸光を補正した。

各化合物の最終濃度は以下の通りである。

KPU-300 (**58**): 0.1-100 nM; **55**, **57**, and **59-64**: 1-1000 nM; **48**, **49**: 0.002-20000 nM.

第二章

HeLa 細胞培養条件

ヒト子宮頸部上皮癌由来の HeLa 細胞は 10%非動化 FBS を含む DMEM 培地を用い、37 °C, 5% CO₂ 雰囲気下にて培養した。

A549 細胞培養条件

ヒト肺癌由来の A549 細胞は 10%非動化 FBS を含む DMEM 培地を用い、37 °C, 5% CO₂ 雰囲気下にて培養した。

WST-8 を用いた細胞増殖試験 (HeLa and A549 cells)

HeLa 細胞及び A549 細胞に対する殺細胞活性は、 3×10^4 cells/mL に調整した細胞に対して化合物を 48 時間作用させることで算出した。細胞増殖は WST-8 cell counting kit を用いて測定した。

NHSF46 細胞培養条件

ヒト皮膚由来正常二倍体線維芽細胞 NHSF46 は、理研バイオリソースセンターより購入し、100 units/mL ペニシリン及び 100 µg/mL ストレプトマイシンを含む 10%FBS を含む MEM α 培地にて 37 °C、湿潤環境下、5%CO₂ 雰囲気にて培養した。

HMNC 培養条件

ヒト末梢血単核細胞 (HMNC) は Cell Applications, Inc. (san Diego, USA) より購入し、血球細胞培養培地で 37 °C、湿潤環境下、5%CO₂ 雰囲気にて培養した。

XTT/PMS を用いた殺細胞活性試験 (NHSF46 cells)

NHSF46 細胞に対する殺細胞活性評価は、HT-29 細胞と同じ条件により行われた。生成したホルマザン色素の 490 nm の吸収を Model 680 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) にて測定し、2 回の試験より得られた平均値を IC₅₀ 値として示した。

WST-1 を用いた殺細胞活性試験 (HMNC)

96 ウェルプレートに 2.5×10^4 cells/well となるように HMNC を撒き、KPU-300 (58) を最終濃度 2–2000 nM となるように細胞に添加した。48 時間後、10 μ L の WST-1 reagent (Roche Diagnostics GmbH, Germany) を各ウェルに添加し、さらに 2 時間培養したのちに生成したホルマザン色素の 450 nm の吸光を Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, K.K., USA) により測定した。620 nm の吸光をコントロールとして非特異的吸光を補正した。IC₅₀ 値は、3 回の試験の平均 \pm 標準偏差として算出した。

***In vitro* チューブリン重合試験**

チューブリンはブタの脳から精製した⁶⁷⁾。濁度試験は 1mM GTP, 1M glutamate を含む pH 6.8 の RB バッファー (100 mM MES, 1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl₂ を含む) 中で 1 mg/mL のチューブリンを重合させ、37 °C における 350 nm の吸光を thermostatic spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA)によりモニターした。

チューブリン結合試験

MES バッファー (0.1 M MES, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM GTP, pH 6.8) 中 37 °C でブタチューブリン 0.5 μ M と 1% DMSO を含む各濃度の化合物を 1 時間インキュベートし、それぞれの蛍光 (ex: 295 nm, em: 300–450 nm) を FP-6200 Spectrofluorometer (JASCO, JAPAN) により測定した。

免疫染色

3×10^4 cells/mL に調整した HeLa 細胞を滅菌したカバーガラス上に置き、化合物を 6 時間作用させた。カバーガラスを -20°C のメタノールで 5 分固定化し、0.5% の BSA を含む PBS バッファー (PBS-B) で洗浄した。カバーガラスを抗 α -チューブリン抗体 (sc-32293, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 入りの PBS-B で覆い、 37°C 、湿潤環境下 1 時間後に PBS-B で 2 度洗浄したのちに緑色蛍光タンパクである Alexa Fluor 488-結合型抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を含む PBS-B で 30 分インキュベートした。最後にカバーガラスを PBS で洗浄し、0.1 mg/mL の DAPI 溶液 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて核を染色した。染色体と微小管は Leica LAS AF 6000 蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) で観察した。

第三章

溶解度測定

プロドラッグ体 **78** 及び KPU-300 (**58**) を精製水に飽和させ、激しく攪拌した後、25 °C、15 分間超音波処理し、得られた飽和溶液を 0.2 μm の遠心フィルターでろ過し、ろ液を HPLC にて分析した。得られたピーク面積と、濃度既知の DMSO 溶液を連続希釈することにより作成した検量線により溶解度を算出した。

エステラーゼによる *In vitro* 加水分解試験

プロドラッグ体 **78** の 1.630 $\mu\text{mol/L}$ PBS 溶液を作成し、3 つのエッペンドルフチューブにそれぞれ 50 μL , 50 μL , 400 μL 分注する。50 μL のエッペンドルフチューブ二つはそれぞれエステラーゼ非存在下のコントロールとして、それぞれ 0 時間、48 時間後に HPLC 分析を行った。400 μL 分注したエッペンドルフチューブにブタ肝エステラーゼの硫酸アンモニウム懸濁液を 44.32 unit 添加し、50 μL ずつ 8 つのエッペンドルフチューブに分注する。この 8 つ及び 48 時間のコントロールを 37 °C の恒温槽にてインキュベートし、それぞれ 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 時間後に DMSO 150 μL を添加して反応をクエンチし、HPLC にてプロドラッグ体の減少及び KPU-300 (**58**) の再生を観察した。独立した三回の実験から半減期を算出した。

引用文献

- 1) Nogales, E. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 277-302 (2000).
- 2) Zhou, J., Giannakakou, P. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, **5**, 65-71 (2005).
- 3) Dumontet, C., Jordan, M. A. *Nat. Rev. Drug Disc.*, **9**, 790-803 (2010).
- 4) Shi, Q., Chen, K., Morris-Natschke, S. L., Lee, K. H. *Curr. Pharm. Des.*, **4**, 219-248 (1998).
- 5) Suffness, M., Wall, M. E., Suffness, M. Ed. CRC Press: Boca Raton, FL, **1995**, p 3.
- 6) Mekhail, T. M., Markman, M. *Expert Opin. Pharmacother.*, **3**, 755-766 (2002).
- 7) Kingston, D. G., Snyder, J. P. *Acc. Chem. Res.*, **47**, 2682-2691 (2014).
- 8) Rowinsky, E. K., Donehower, R. C. *Pharmacol. Ther.*, **52**, 35-84 (1991). *College Press: Ames, IA*, **1955**, Chapter 1.
- 9) Rutkauskiene, G., Labanauskas, L. *medicina (Kaunas)*, **41**, 1026-1034 (2005).
- 10) Towle, M. J., Salvato, K. A., Budrow, J., Wels, B. F., Kuznetsov, G., Aalfs, K. K., Welsh, S., Zheng, W., Seletsky, B. M., Palme, M. H., Habgood, G. J., Singer, L. A., Dipietro, L. V., Wang, Y., Chen, J. J., Quincy, D. A., Davis, A., Yoshimatsu, K., Kishi, Y., Yu, M. J., Littlefield, B. A. *Cancer Res.*, **61**, 1013-21 (2001).
- 11) Schöffski, P., Ray-Coquard, I. L., Cioffi, A., Bui, N. B., Bauer, S., Hartmann, J. T., Krarup-Hansen, A., Grünwald, V., Sciot, R., Dumez, H., Blay, J. Y., Le Cesne, A., Wanders, J., Hayward, C., Marreaud, S., Ouali, M., Hohenberger, P. *Lancet Oncol.*, **12**, 1045-52 (2011).
- 12) Okouneva, T., Azarenko, O., Wilson, L., Littlefield, B. A., Jordan, M. A. *Mol Cancer Ther.*, **7**, 2003-2011 (2008).
- 13) Hastie, S. B. *Pharmacol. Ther.*, **51**, 377-401 (1991).
- 14) Eigsti, O. J., Dustin, P. Jr. *Iowa State College Press: Ames, IA*, (1955), Chapter 1.
- 15) Ludford, R. J. *J. Natl. Cancer Inst.*, **6**, 89-101 (1945).
- 16) Lin, C. M., Ho, H. H., Pettit, G. R., Hamel, E. *Biochemistry*, **28**, 6984-6991 (1989).
- 17) Pettit, G. R., Singh, S. B., Boyd, M. R., Hamel, E., Pettit, R. K., Schmidt, J. M., Hogan, F. *J. Med. Chem.*, **38**, 1666-1672 (1995).
- 18) Pettit, G. R., Grealish, M. P., Herald, D. L., Boyd, M. R., Hamel, E., Pettit, R. K. *J. Med. Chem.*, **43**, 2731 (2000).
- 19) Pettit, G. R., Toki, B., Herald, D. L., Verdier-Pinard, P., Boyd, M. R., Hamel, E., Pettit, R. K. *J. Med. Chem.*, **41**, 1688 (1998).
- 20) Davis, P. D., Dougherty, G. J., Blakey, D. C., Galbraith, S. M., Tozer, G. M., Holder, A. L., Naylor, M. A., Nolan, J., Stratford, M. R. L., Chaplin, D. J., Hill, S. A. *Cancer Res.*, **62**, 7247-7253 (2002).
- 21) Micheletti, G., Poli, M., Borsotti, P., Martinelli, M., Imberti, B., Taraboletti, G., Giavazzi,

- R., *Cancer Res.*, **63**, 1534-1537 (2003).
- 22) Remick, S. C. *Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside*, **3**, 16-23 (2002).
- 23) Pilat, M. J., LoRusso, P. M. *J. Cell. Biochem.*, **99**, 1021-1039 (2006).
- 24) Nicholson, B., Lloyd, G. K., Miller, B. R., Palladino, M. A., Kiso, Y., Hayashi, Y., Neulteboom, S. T. C. *Anti-Cancer Drugs*, **17**, 25-31 (2006).
- 25) Mita, M. M., Spear, M. A., Yee, L. K., Mita, A. C., Heath, E. I., Papadopoulos, K. P., Federico, K. C., Reich, S. D, Romero, O., Malburg, L., Pilat, M., Lloyd, G. K., Neuteboom, S. T. C., Cropp, G., Ashton, E., LoRusso, P. M. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 5892-5899 (2010).
- 26) Ferrer, E., Boloś, J., Castañer, R. *DrugsFuture*, **35**, 11-15 (2010).
- 27) Volm, M. *Anticancer Res.*, **18**, 2095-2917 (1998).
- 28) Ferlini, C., Ojima, I., Distefano, M., Gallo, D., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., Mancuso, S., Scambia, G. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, **3**, 133-138 (2003).
- 29) Kavallaris, M. *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 194-204 (2010).
- 30) Kanoh, K., Kohno, S., Asari, T., Harada, T., Katada, J., Muramatsu, M., Kawashima, H., Sekiya, H., Uno, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2847-2852 (1997).
- 31) Kanoh, K., Kohno, S., Katada, J., Takahashi, J., Uno, I. *J. Antibiotics*, **52**, 134-141 (1999).
- 32) Kanoh, K., Kohno, S., Katada, Hayashi, Y., Muramatsu, M, Uno, I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1130-1133 (1999).
- 33) Kanoh, K., Kohno, S., Katada, J., Takahashi, J., Uno, I., Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1451-1457 (1999).
- 34) Kanzaki, H., Yanagihara, S., Kanoh, K., Nitoda, T. *J. Antibiotics*, **55**, 1042-1047 (2002).
- 35) Palladino, M. A., Lloyd, G. K., Hayashi, Y., Nicholson, B. U. S. Patent 2005/0197344 A1 (2005).
- 36) Yamazaki, Y., Tanaka, K., Nicholson, B., Deyanat-Yazdi, G., Potts, B., Yoshida, T., Oda, A., Kitagawa, T., Orikasa, S., Kiso, Y., Yasui, H., Akamatsu, M., Chinen, T., Usui, T., Shinozaki, Y., Yakushiji, F., Miller, B. R., Neuteboom, S., Palladino, M., Kanoh, K., Lloyd, G. K., Hayashi, Y. *J. Med. Chem.*, **55**, 1056-1071 (2012).
- 37) Yamazaki, Y., Sumikura, M., Masuda, Y., Hayashi, Y., Yasui, H., Kiso, Y., Chinen, T., Usui, T., Yakushiji, F., Potts, B., Neuteboom, S., Palladino, M., Lloyd, G. k., Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 4279-89 (2012).
- 38) Yakushiji, F., Tanaka, H., Muguruma, K., Iwahashi, T., Yamazaki, Y., Hayashi, Y. *Chem. Eur. J.*, **17**, 12587-12590 (2011).
- 39) Yakushiji, F., Tanaka, H., Muguruma, K., Iwahashi, T., Yamazaki, Y., Hayashi, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 877-881 (2012).
- 40) Yakushiji, F., Muguruma, K., Hayashi, Y., Shirasaka, T., Kawamata, R., Tanaka, H.,

- Yoshiwaka, Y., Taguchi, A., Takayama, K., Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 3623-3630 (2017).
- 41) Muguruma, K., Yakushiji, F., Kawamata, R., Akiyama, D., Arima, R., Shirasaka, T., Kikkawa, Y., Taguchi, A., Takayama, K., Fukuhara, T., Watabe, T., Ito, Y., and Hayashi, Y. *Bioconjug. Chem.*, **27**, 1606-1613 (2016).
- 42) Yamazaki, Y., Kohno, K., Yasui, H., Kiso, Y., Akamatsu, M., Nicholson, B., Deyanat-Yazdi, G., Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G. K., Hayashi, Y. *ChemBioChem*, **9**, 3074-3081 (2008).
- 43) Yamazaki, Y., Sumikura, M., Hidaka, K., Yasui, H., Kiso, Y., Yakushiji, F., Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 3169-3174 (2010).
- 44) Yamazaki, Y., Kido, Y., Hidaka, K., Yasui, H., Kiso, Y., Yakushiji, F., Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 595-602 (2011).
- 45) Chinen, T., Liu, P., Shioda, S., Pagel, J., Cerikan, B., Lin, T. C., Gruss, O., Hayashi, Y., Takeno, H., Shima, T., Okada, Y., Hayakawa, I., Hayashi, Y., Kigoshi, H., Usui, T., Schiebel, E. *Nat. commun.*, **6**, 8722 (2015).
- 46) Bertelsen, L. B., Shen, Y. Y., Nielsen, T., Stodkilde-Jorgensen, H., Lloyd, G. K., Siemann, D. W., Horsman, M. R. *Int. J. Radiat. Biol.*, **11**, 1126-1134 (2011).
- 47) Wieczorek, A., Błauż, A., Zakrzewski, J., Rychlik, B., Plażuk, D., *ACS Med. Chem. Lett.*, **7**, 612-617 (2016).
- 48) Ding, Z., Hou, Y., Wang, S., Sun, T., Ma, M., Guan, H., Li, W. *Mol. Divers.*, **21**, 577-583 (2017).
- 49) Ding, Z., Cheng, H., Wang, S., Hou, Y., Zhao, J., Guan, H., Li, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 1416-1419 (2017).
- 50) Millward, M., Mainwaring, P., Mita, A., Federico, K., Lloyd, G. K., Reddinger, N., Nawrocki, S., Mita, M., Spear, M. A. *Invest. New Drugs*, **30**, 1065-1073 (2012).
- 51) <https://www.clinicaltrials.gov>, NCT02504489.
- 52) <https://www.clinicaltrials.gov>, NCT02812667 and NCT02846792.
- 53) Blayney, D. W., Bazhenova, L., Lloyd, G. K., Huang, L., Mohanlal, R. *Blood*, **128**, 2508 (2016).
- 54) <https://www.clinicaltrials.gov>, NCT03102606.
- 55) Palladino, M., Lloyd, G. K., Hayashi, Y. U. S. Patent 2007/ 0078138 A1 (2007).
- 56) Gaskin, F., Cantor, R. C. *J. Mol. Biol.*, **89**, 737-758 (1974).
- 57) Okuyama, K., Kaida, A., Hayashi, Y., Hayashi, Y., Harada, K., Miura, M., *PLoS One* **10**, e0145995/1-e0145995/18 (2015).
- 58) Dye, D., Watkins, J. *Br. Med. J.*, **280**, 1353 (1980).

- 59) Kloover, J. S., den Bakker, M. A., Gelderblom, H., van Meerbeeck, J. P., *Br. J. Cancer*, **90**, 304-305 (2004).
- 60) Totsuka, K., Shimizu, K., Konishi, M., Yamamoto, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 757-761, (1992).
- 61) Alper, P. B., Hung, S.-C., Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6029-6032 (1996).
- 62) Lundquist J. T. 4th, Pelletier, J. C., *Org. Lett.*, **3**, 781-783 (2001).
- 63) Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2004-2021 (2001)
- 64) Kolb, H. C., Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today*, **8**, 1128-1137 (2003).
- 65) Patterson, D. M., Nazarova, L. A., Prescher, J. A. *ASC Chem. Biol.*, **9**, 592-605 (2014).
- 66) Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2596-2599 (2002).
- 67) Castoldi, M., Popov, A. V. *Protein Expr. Purif.*, **32**, 83-88 (2003).

学位申請論文

(1)

Development of a New Benzophenone-Diketopiperazine-Type Potent Antimicrotubule Agent Possessing a 2-Pyridine Structure

Yoshiki Hayashi, Haruka Takeno, Takumi Chinen, Kyohei Muguruma, Kohei Okuyama, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, Masahiko Miura, Takeo Usui, Yoshio Hayashi. *ACS Med. Chem. Lett.*, **5**, 1094-1098 (2014).

参考論文

(1)

Click strategy using disodium salts of amino acids improves the water solubility of plinabulin and KPU-300

Fumika Yakushiji, Kyohei Muguruma, Yoshiki Hayashi, Takuya Shirasaka, Ryosuke Kawamata, Hironari Tanaka, Yushi Yoshiwaka, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi.

Bioorg. Med. Chem., **25**, 3623-3630 (2017).

(2)

KPU-300, a novel benzophenone-diketopiperazine-type anti-microtubule agent with a 2-pyridyl structure, is a potent radiosensitizer that synchronizes the cell cycle in early M phase
Kohei Okuyama, Atsushi Kaida, Yoshiki Hayashi, Yoshio Hayashi, Kiyoshi Harada, Masahiko Miura.

PLoS One **10**, e0145995/1-e0145995/18 (2015).

(3)

The γ -tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle

Takumi Chinen, Peng Liu, Shuya Shioda, Judith Pagel, Berati Cerikan, Tien-chen Lin, Oliver Gruss, Yoshiki Hayashi, Haruka Takeno, Tomohiro Shima, Yasushi Okada, Ichiro Hayakawa, Yoshio Hayashi, Hideo Kigoshi, Takeo Usui, Elmar Schiebel.

Nature Communications **6**, Article number: 8722 (2015).

(4)

Synthesis and structure-activity relationships of benzophenone-bearing diketopiperazine-type anti-microtubule agents

Yuri Yamazaki, Makiko Sumikura, Yurika Masuda, Yoshiki Hayashi, Hiroyuki Yasui, Yoshiaki Kiso, Takumi Chinen, Takeo Usui, Fumika Yakushiji, Barbara Potts, Saskia Neuteboom, Michael Palladino, George Kenneth Lloyd, Yoshio Hayashi.

Bioorg. Med. Chem., **20**, 4279-89 (2012).

(5)

Unusual expression of red fluorescence at M phase induced by anti-microtubule agents in HeLa cells expressing the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)

Asumi Honda-Uezono, Atsushi Kaida, Yasuyuki Michi, Kiyoshi Harada, Yoshiki Hayashi, Yoshio Hayashi, Masahiko Miura.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **428**, 224-229 (2012).

謝辞

本研究に際し、終始ご厚情なる御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部 薬品化学教室 林 良雄教授に甚大なる感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部 野水 基義教授、三浦 剛教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、親身な御指導と御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部薬品化学教室 谷口 敦彦講師、高山 健太郎講師、田口 晃弘助教、北海道大学大学院薬学研究院 薬師寺 文華講師、並びに山崎 有理博士に心より感謝致します。

本研究期間中に共に研究に打ち込み、卒研究生として御支援を頂きました東京薬科大学 篠崎 雄希修士、嶽野 遥氏、片渕 礼菜氏、中澤 大輝氏、島田 千尋氏、久保木 里衣氏、佐久間 千尋氏に深く感謝致します。

本学薬品化学教室に所属のセドリック レンティール博士、濱田 圭佑氏、内山 千尋氏、小林 清孝氏を始め、薬品化学教室に在籍中、並びに卒業生の皆様に感謝致します。

チューブリン及び細胞を用いた実験に関して、多大な御指導、御助力をいただきました、筑波大学大学院 生命環境科学研究科 臼井 健郎 准教授、知念 拓実博士に深く感謝いたします。

正常細胞を用いた試験を始め、多くの実験に関して、多大なる御指導、御協力をいただきました、東京医科歯科大学 口腔放射線腫瘍学分野 三浦 雅彦教授、奥山 紘平博士に深く感謝いたします。

X線解析、質量分析にてお世話になりました、本学中央分析センターの皆様に感謝致します。

本研究の一部はJSPS特別研究員奨励費JP20178509の助成を受けて遂行されました。御礼申し上げます。

大学学部からの同期として、研究及び勉学に共に切磋琢磨しあった友人である六車共平氏、原喜偉氏に感謝いたします。

最後に、筆者を経済的、精神的に支え、陰ながら応援をいただきました父敦夫、母一美、弟克哉に心から感謝すると共に本論文を捧げます。

2018年1月9日
林 良樹