

学位論文

チューブリン重合阻害剤 **Plinabulin** の
水溶性および腫瘍指向性プロドラッグの創製研究

2018年1月

六車 共平

目 次

略号		3
序論		6
本論		
第一章	Plinabulin 水溶性プロドラッグの創製	
序節		12
第一節	Plinabulin 水溶性プロドラッグの設計	15
第二節	Plinabulin 水溶性プロドラッグの合成	17
第三節	Plinabulin 水溶性プロドラッグの機能評価	20
第四節	ジカルボン酸型水溶性プロドラッグの合成と機能評価	23
第五節	小括	27
第二章	抗体結合ペプチドを用いた抗体-Plinabulin 複合体の創製	
序節		28
第一節	Plinabulin-抗体結合ペプチド架橋体の合成	32
第二節	固相ジスルフィド架橋法 (SPDSL)	34
第三節	固相ジスルフィド架橋法による Plinabulin-抗体結合ペプチド架橋体の合成	36
第四節	Plinabulin-SS-Z33 架橋体の機能評価	39
第五節	他の抗体への応用	43
第六節	小括	45
第三章	固相ジスルフィド架橋法による難水溶性薬物-水溶性化合物の架橋体合成	
序節		46
第一節	活性ジスルフィド体合成における条件検討 (First step)	49
第二節	ジスルフィド交換反応における条件検討 (Second step)	52
第三節	Plinabulin とチオール含有水溶性化合物の架橋体合成	57
第四節	小括	60

総括	61
実験の部	63
引用文献	91
謝辞	99

略号

本論文中に記載した略号を以下に示す。

Ac : acetyl

Acp : 6-aminocaproic acid

ADC : antibody-drug conjugate

ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADMET : absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity

Ala : Alanine

AN : Gutmann's acceptor number

aq. : aqueous

Arg : Arginine

Arg₈ : Octaarginine

Asn : Asparagine

Asp : Aspartic acid

Bn : benzyl

CD : circular dichroism

CuAAC : Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition

Cys : Cysteine

1,2-DCE : 1,2-dichloroethane

DIPCI : diisopropylcarbodiimide

DIPEA : diisopropylethylamine

DKP : 2,5-diketopiperazine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMF : *N,N*-dimethylformamide

DMSO : dimethylsulfoxide

DN : Gutmann's donor number

DTT : dithiothreitol

EDT : 1,2-ethanedithiol

Et : ethyl

FBS : Fetal bovine serum

Fmoc : 9-fluorenylmethyloxycarbonyl

FT-IR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Gln : Glutamine

Glu : Glutamic acid

Gly : Glycine
HER2 : human epidermal growth factor receptor 2
His : Histamine
HOBt : 1-hydroxybenzotriazole
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
HRMS : High-Resolution Mass Spectrometry
Ile : Isoleucine
LDA : lithium diisopropylamide
Leu : Leucine
LHMDS : lithium hexamethyldisilazide
LRMS : Low-Resolution Mass Spectrometry
Lys : Lysine
Me : methyl
Met : Methionine
MOE : Molecular Operating Environment
mp : melting point
MS : Mass Spectrometry
MW : micro wave
N.B. : no binding
NCEs : new chemical entities
N.D. : not detected
NMR : Nuclear Magnetic Resonance
Npys : 3-nitro-2-pyridinesulfonyl
PDB : Protein Data Bank
PDC : peptide-drug conjugate
PEG : polyethylene glycol
Pbf : *N*- ω -2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Phe : Phenylalanine
PMB : *p*-methoxybenzyl
Pro : Proline
quant. : quantitative yield
rt : room temperature
SD : standard deviation
SE : standard error
Ser : Serine
SPDSL : Solid-phase-assisted disulfide ligation

SPR : Surface plasmon resonance

*t*Bu : tertiary butyl

TFA : trifluoroacetic acid

TLC : Thin-Layer Chromatography

Trt : trityl

Tyr : Tyrosine

UV : ultraviolet

VDA : vascular disrupting agent

序 論

医薬品の研究開発において、主薬効の弱い医薬候補化合物は薬としての臨床開発が進められることはないため、これまでの創薬研究では化合物の薬理活性の向上が重要視されてきた。一般的に、三次元構造を活性配座に固定するように化合物の構造を誘導することで、受容体などの薬理標的分子に作用しやすくなり、薬理活性の向上が期待できる。そのため、化合物の構造をより活性配座に固定された硬い分子へと誘導することで、高い薬理活性を示す化合物が創出されてきた。しかしながら、その結果として薬理活性は強いものの物性の悪い化合物が増えている。実際、医薬候補化合物群である NCEs (new chemical entities) の 40%以上は難水溶性化合物であると、2012 年に Savjani らにより報告された。¹⁾ 溶解性のような物理化学的な性質は薬物自体の ADMET (吸収、分布、代謝、排泄、毒性) にも広く影響することから^{1,2)}、近年の創薬研究においては主薬理活性のみではなく物理化学的な性質などの様々な補助的な性質を両立させるため、生体内への投与により性質を変換する薬も研究・開発されることが増えている。

生体内において、化学構造自体を変換し、異なる機能を示す薬は多く存在している。これらはアンテドラッグ (ソフトドラッグ) やプロドラッグと呼ばれ、臨床でも利用されている。アンテドラッグは、1982 年に Lee らにより『生体内での化学反応を受け

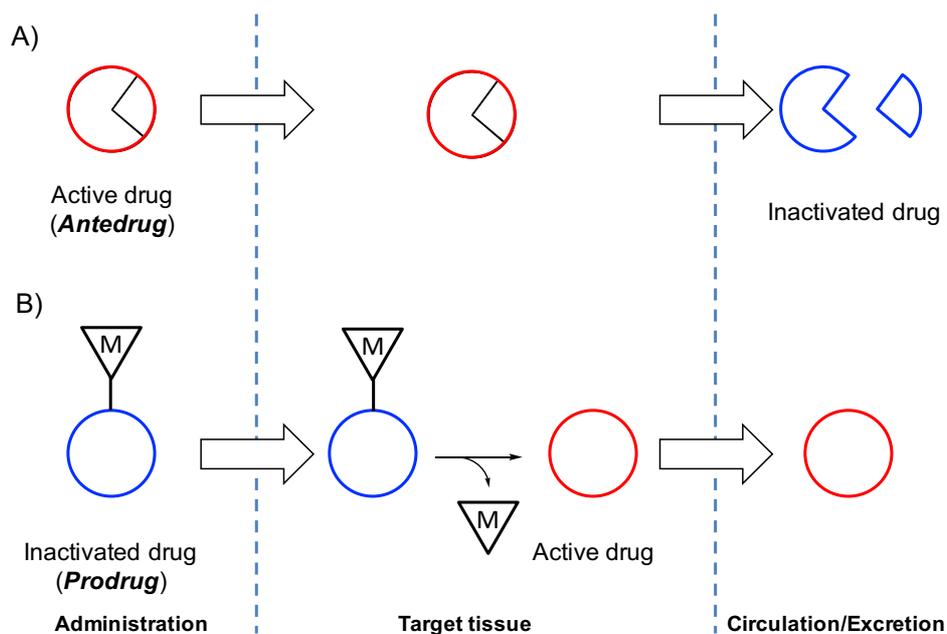


Figure 1. Concept of antedrug and prodrug.³⁾

ることにより不活化する薬』と提唱された (Figure 1A)。³⁾ 化合物をアンテドラッグとする目的は明瞭であり、局所作用を期待する薬に対して生体内で分解されやすい構造を導入することで、吸収されたのちに速やかに分解され全身性の副作用を低減することにある。塗り薬や吸入剤、点眼剤としてのステロイド (Fluticasone propionate⁴⁾、Loteprednol etabonate⁵⁾ など) がこれに分類される。一方、プロドラッグは 1958 年に Albert により『そのもの自体は薬理活性を示さず、生体内において一段階あるいは多段階の変換を受けることで薬理活性を示す化合物』と定義された (Figure 1B)。⁶⁾ 化合物をプロドラッグとする目的は様々であり、修飾する官能基 (M; Modifier) の性質を変えることで、化合物に様々な機能を付与することができる。例えば、脂溶性官能基やトランスポーターに認識される構造を薬物に導入することで、消化管からの吸収性を改善することができる (例: Fursultiamine hydrochloride⁷⁾、Valaciclovir hydrochloride⁸⁾ など)。また、逆に難溶性薬物に対し極性構造を導入することで、注射用水や生理食塩水などに対する溶解性を向上させることも可能である (例: Chloramphenicol sodium succinate⁹⁾、Dexamethasone sodium phosphate¹⁰⁾ など)。

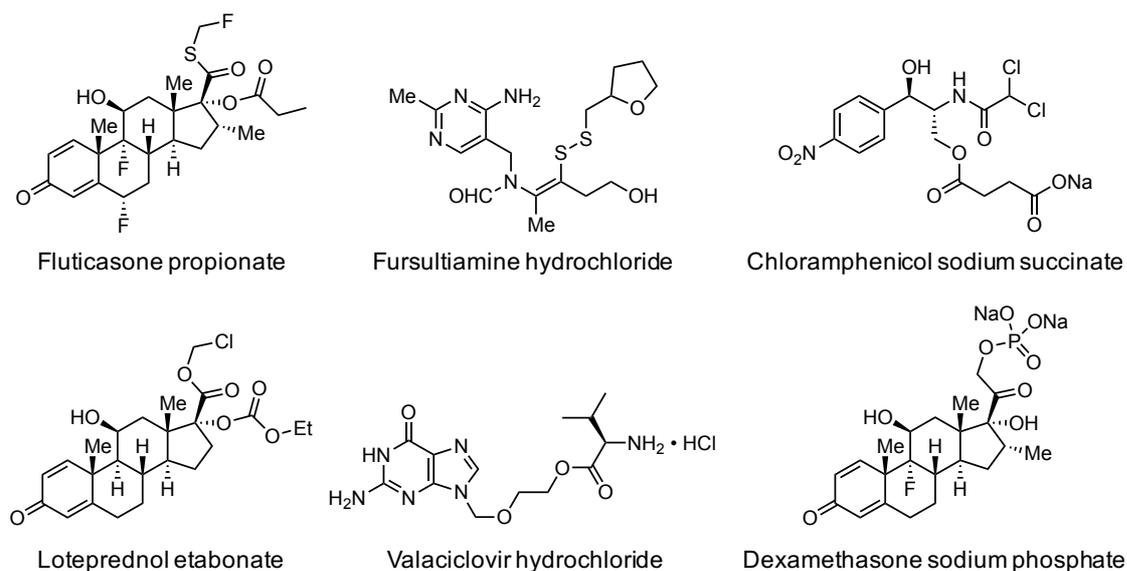
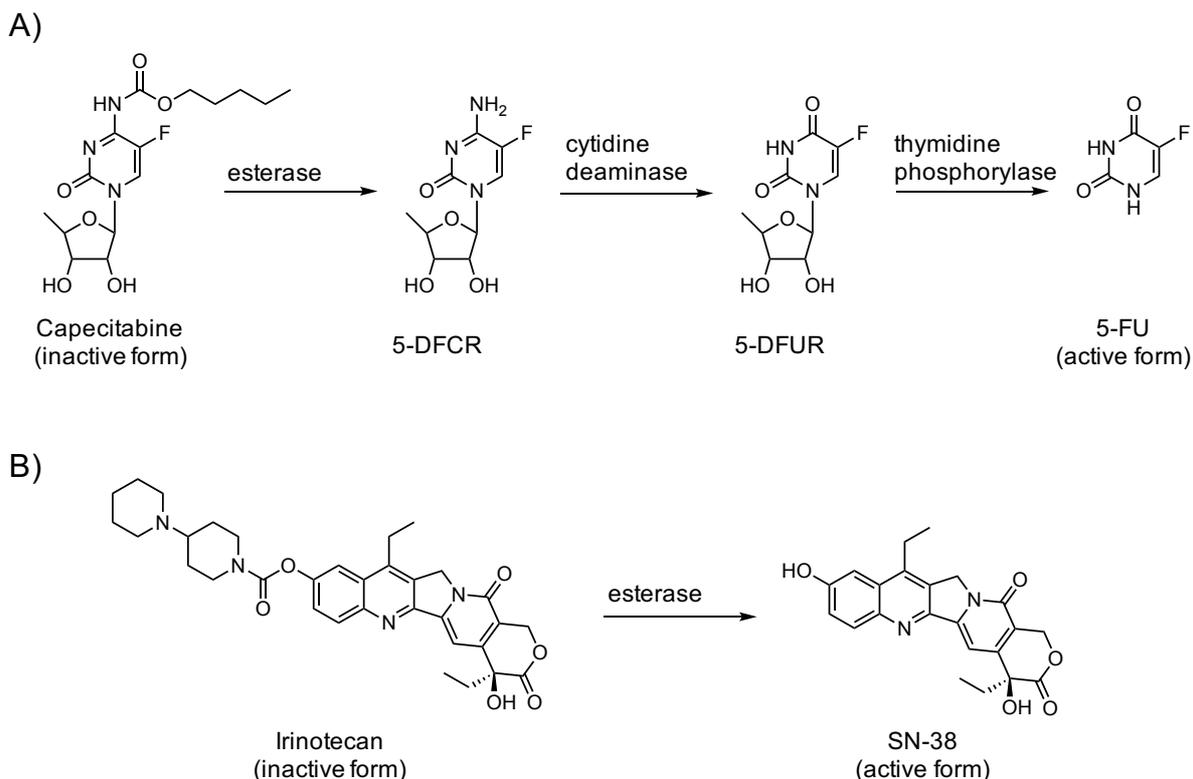


Figure 2. Structures of antedrugs and prodrugs in crinaical used.

プロドラッグ戦略は抗がん剤領域において特に重要である。細胞毒性の強い抗がん剤は、腫瘍細胞のみならず正常細胞をも障害するため、副作用の危険性が高くなる。そのため、プロドラッグ化により毒性をマスクしておき、標的部位においてのみ活性化する抗腫瘍薬が望まれている。例えば、5-fluorouracil (5-FU) は幅広い固形癌に用いられる抗がん剤である。そのプロドラッグであるカペシタビンは経口投与されるが、吸収過程では代謝されないため細胞毒性を示さない。カペシタビンは体内への吸収後、肝臓のエステラーゼにより加水分解され 5'-deoxy- 5-fluorocytidine (5-DFCR) となる。5-DFCR は腫瘍組織に過剰発現している cytidine deaminase によって脱アミノ化された後、thymidine phosphorylase により代謝され、活性本体である 5-fluorouracil (5-FU) となることで初めて抗がん作用を発揮する (Scheme 1A)¹¹⁾。この薬剤は多段階の活性化過程を有しているため、5-FU と比べて副作用の危険性が少なく、外来患者への経口投与に使われるほど安全性の高い薬剤である。他の例としてイリノテカンには、水溶性の乏しい活性本体である SN-38 にピペリジノピペリジノカルボニル基を付与することで水溶性を向上させた薬剤である。¹²⁾ 水溶性を補助している官能基が生体内酵素により加水分解されることで、強い活性を示す (Scheme 1B)。



Scheme 1. Activation mechanism of A) Capecitabine and B) Irinotecan.

生体内で構造を変換することで活性を示す薬剤（プロドラッグ）に関する近年の報告では、抗がん剤をデンドリマー¹³⁾ や抗体¹⁴⁾、ペプチド¹⁵⁾ などの受動的または能動的な薬物送達能を有するキャリアー分子に架橋した化合物がある（Figure 3）。薬をキャリアーに結合させることで目的の組織に選択的に送達した後、標的組織において薬を架橋しているリンカーを切断することで、活性本体の構造へと戻る。これらは、プロドラッグと呼ばれることは少ないが、プロドラッグとしての性質を有しているものである。

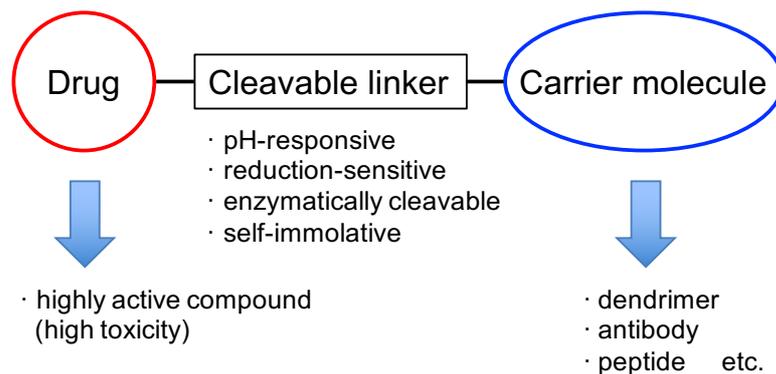


Figure 3. Carrier molecule-drug conjugate.

以上のように、薬の安全性や有用性を考えた際に、プロドラッグは合理的な戦略である。近年では、開発されている薬物の中でプロドラッグの占める割合は大きなものとなっており、低分子医薬品の 5~7%はプロドラッグであると言われている。¹⁶⁾ どのプロドラッグに関しても共通している点は、機能を補助また活性をマスクする官能基が生体内において切断され、活性本体となることで初めて薬として機能することである。生体内で構造を変換することで活性を示す薬剤（プロドラッグ）は近年の医薬品開発、特に抗がん剤領域において重要な概念である。

筆者の所属する研究室では、*Aspergillus ustus* から単離された *S*-(-)-Phenylahistin (**1**)¹⁷⁾ をリード化合物とし、構造活性相関研究を実施することで、チューブリン重合阻害剤 Plinabulin¹⁸⁾ (NPI-2358/KPU-2) (**2**) を創出した（Figure 4）。チューブリン重合阻害剤は、真核細胞における細胞骨格の主要な構成成分である微小管の形成を妨げることにより、活性を示す抗がん剤である。¹⁹⁾ 実際に臨床で用いられている医薬品としてはビンカアルカロイド類がこれに分類される。また、コンブレタスタチンリン酸プロドラッグ（Fosbretabulin/CA-4-P）²⁰⁾ を例として、腫瘍部新生血管障害剤（vascular disrupting agent, VDA）²¹⁾ としての作用を有するものがチューブリン重合阻害剤の中に見出されている。VDA とは腫瘍部位周辺において誘導される未熟な新生血管を遮断す

ることにより、腫瘍組織への酸素や栄養の供給を断つことで腫瘍を壊死、退縮へと導く薬剤であり、Plinabulin も VDA 作用を有していることがすでに報告されている。^{21e)}

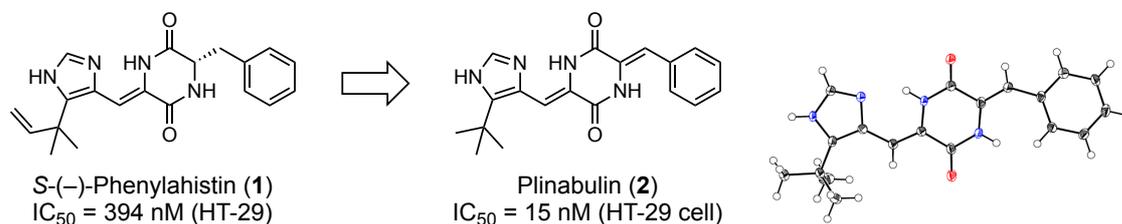


Figure 4. Structures of S-(-)-Phenylahistine (1) and Plinabulin (2), and X-ray crystal structure of Plinabulin (2) (CCDC831562).

Plinabulin は、非小細胞肺癌に対する治療薬として米中において第三相臨床試験が進行中である。²²⁾ しかし、注射剤としての開発が進行しているにも関わらず、その水溶性は極めて低い (Solubility in H₂O < 0.1 μg/mL)。そのため、40% クレモホール EL/60% プロピレングリコール溶液として供給されており (Plinabulin 濃度: 4 mg/mL)、^{21b)} この溶液を 5%ブドウ糖水溶液に 1:20-200 の割合で希釈したのちに、静脈内投与されている。しかし、ここで用いられている溶解補助剤 (クレモホール EL) は過敏症を誘発する可能性が知られている。²³⁾ そのため、副作用防止や患者負担軽減の観点より、水溶性の優れた Plinabulin 誘導体の創出が望まれている。

Plinabulin の構造上の特徴として、X 線結晶構造解析および ¹HNMR の結果よりイミダゾール環の sp²窒素と 2,5-diketopiperazine (DKP) 環のアミド NH が分子内水素結合を形成しており、擬三環性構造をとることが明らかとなっている (Figure 4)。この構造に起因する高い平面性および、分子内水素結合による水和可能な極性構造の消費により、比較的極性が高く見える構造であるが (CLogP = -0.601, calculated by ChemDraw Professional ver. 16.0)、極めて低い水溶性を示す化合物である。また、これまでの構造活性相関研究の結果から、高い抗腫瘍活性の発現に擬三環性構造が重要な役割を果たしているとされており、活性本体自体の水溶性向上は困難であることが示唆されている。^{18b)}

以上のように、Plinabulin は有用なチューブリン重合阻害作用に基づく抗腫瘍活性を有する一方で、近年の医薬候補化合物群を代表する難水溶性という特徴を有する。そのため、本化合物に対するプロドラッグ化研究は難水溶性化合物群の医薬展開への新たな知見を与えることが期待される。そこで本博士論文研究において、Plinabulin のプロドラッグ化研究を実施し、創薬における化合物の溶解性に起因する問題に対し、化学的な視点から解決策を提案した。

本博士論文では、第一章にて、クリックケミストリーを適用した **Plinabulin** のプロドラッグ合成法を確立し、水溶性プロドラッグの合成および評価を実施した。第二章では、**Plinabulin** とペプチドの架橋体を合成し、抗体薬物複合体 (ADC) を形成することで、水溶性のみならず腫瘍指向性の向上したプロドラッグを合成した。第三章では、第二章で考案した固相ジスルフィド架橋法 (**Solid-phase-assisted disulfide ligation, SPDSL**) の反応条件を検討した。

第一章 Plinabulin 水溶性プロドラッグの創製

序説

序章で述べたようにチューブリン重合阻害剤 Plinabulin は有望な医薬候補化合物であるものの、水溶性が低いこと（溶解度 $< 0.1 \mu\text{g/mL}$ ）が問題である。現在はアレルギーを発症する危険性が知られている溶解補助剤を用いて投与されている。そこで、本研究では溶解補助剤を必要としない水溶性プロドラッグの創製をめざした。

以前より、Plinabulin の水溶性プロドラッグ合成が当研究室の岩橋らにより検討されてきている。水溶性プロドラッグの設計には様々な水溶性補助基が用いられ、特に生体内ホスファターゼにより分解されることで親化合物を再生するリン酸付加体が多く利用されている。²⁴⁾ そこで、最初のアプローチとして、Plinabulin のイミダゾール環または DKP 環の窒素原子を修飾部位と定め、水溶性補助基としてリン酸構造を導入した Plinabulin のリン酸プロドラッグ **3** または **4** の合成が計画された (Figure 5)。

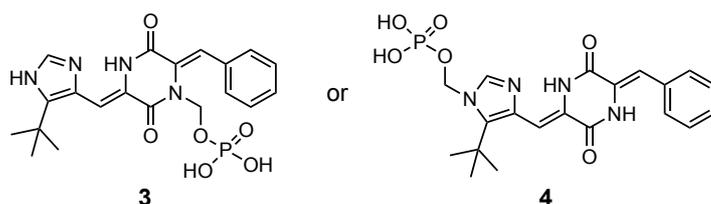
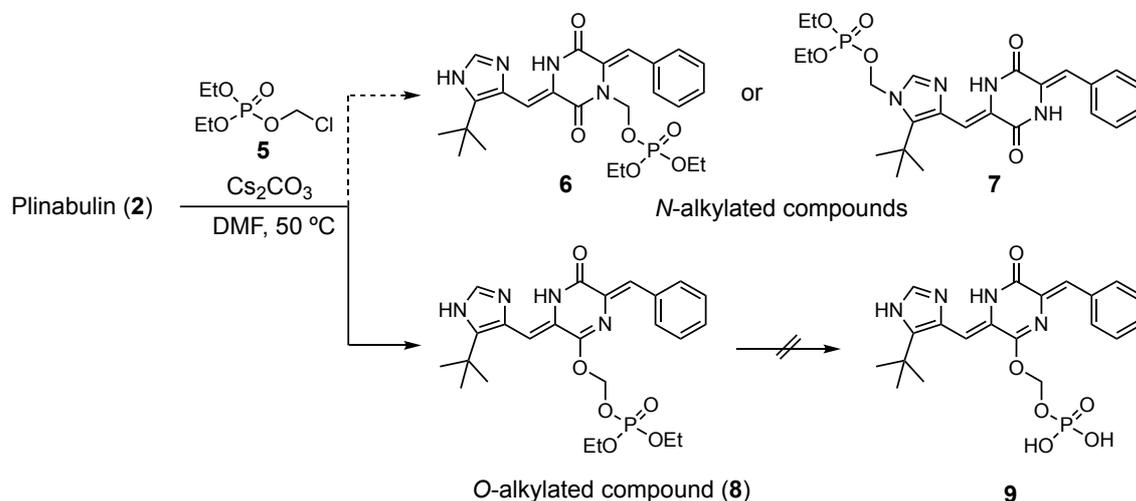


Figure 5. Target compounds of phosphate-type prodrug of Plinabulin.

Plinabulin (**2**) は極性官能基の少ない小分子であるため、修飾点が限られているが、chloromethyl diethyl phosphate²⁵⁾ (**5**) を塩基性条件下で反応させることにより *N*-アルキル化された化合物 **6** または **7** が得られるものと期待した (Scheme 2)。ところが、所望のリン酸エステル体は得られず、異なる生成物が選択的に得られた。得られた化合物の X 線結晶構造解析を行ったところ、化合物 **5** が DKP 環のカルボニル酸素と反応し、DKP 環のラクタム構造がラクチム構造に変化した化合物 **8** が得られたことが明らかとなった (Figure 6)。これは Plinabulin 上の窒素原子が置換基の立体障害や分子内水素結合の影響で反応性が低いことに加え、DKP 環がモノラクチム構造となることで長い共役系を形成したことにより、より安定な生成物が得られたと考えられる。

続いて、当初の目的化合物とは異なるリン酸プロドラッグ **9** を得るためにモノラクチム体 **8** のリン酸エチルエステルの加水分解を試みた。しかし、生成物の安定性が乏

しく、目的物を単離、同定することは出来なかった (Scheme 2)。以上より、リン酸エステル型プロドラッグへの誘導は断念したが、本合成研究の結果、Plinabulin のプロドラッグを設計する上で DKP 環上のカルボニル酸素が修飾可能であることを見出した。



Scheme 2. Synthesis of phosphate-type prodrug of Plinabulin.

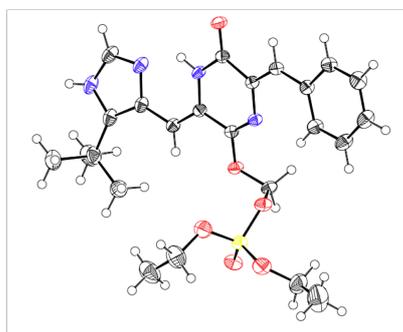
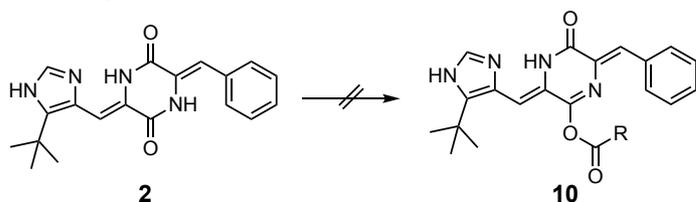


Figure 6. X-ray crystal structure of phosphate **8** (CCDC-829269).

続く検討では、エステラーゼにより分解され、親化合物を再生するプロドラッグとして、エステル型プロドラッグ **10** を設計し、合成を試みた。しかし DKP 環の直接的な *O*-アシル化反応は進行しないことが明らかとなった (Figure 7A)。すなわち、DKP 環はリン酸プロドラッグ **9** で観察されたように、*O*-アルキル化のみが可能であることが示唆された。そこで、エステルの加水分解により切断可能なアシルアセタール構造をリンカーとし、*O*-アルキル化することで、水溶性の α -アミノ酸構造の導入を検討した (Figure 7B)。*O*-アルキル化反応は強塩基性条件下で行なわれているため、極性官能基 (α -アミノ基) を保護して反応する必要がある。そこで、保護アミノ酸を導入後

に脱保護を行うことでプロドラッグ体の合成を試みた。その結果、*O*-アルキル化体 **11** は得られたものの、リン酸プロドラッグ **9** と同様に脱保護工程において化合物のリンカー構造が分解してしまったため、水溶性の向上したプロドラッグ体の獲得には至らなかった。

A) *O*-Acylation



B) *O*-Alkylation

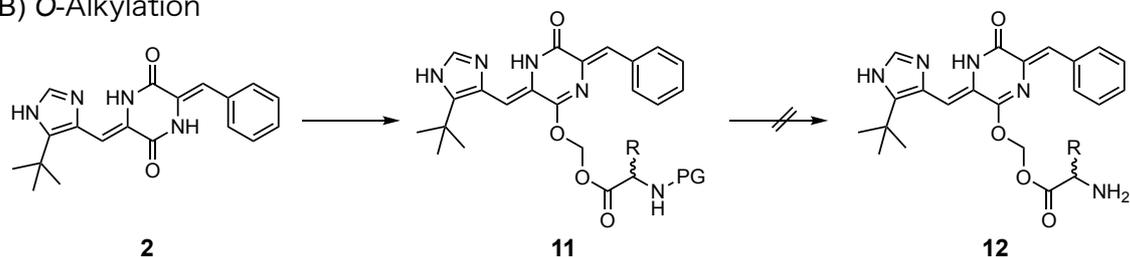


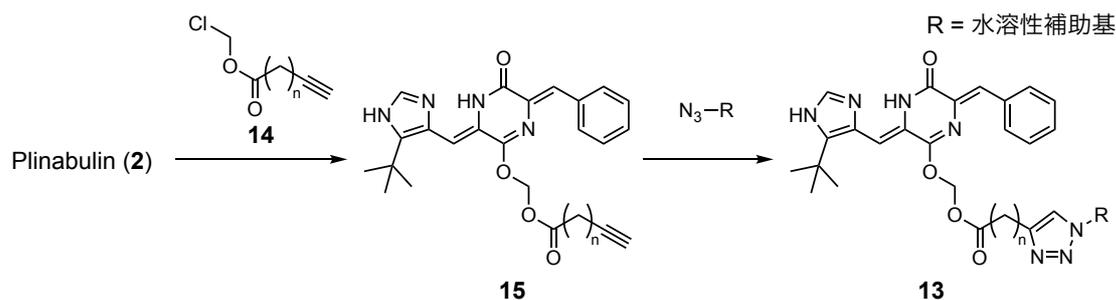
Figure 7. Failed synthesis strategies of Plinabulin prodrugs.

ここまでの検討により、Plinabulin は DKP 骨格のモノラクチム構造への変換を伴う *O*-アルキル化により修飾可能であることが明らかとなった。しかし、修飾後に極性官能基を露出させる脱保護の工程を行うと、分解してしまうという問題点が示された。そのため、脱保護過程を必要としない直接的に水溶性補助基を導入する手法によるプロドラッグ合成が必要である。

第一節 Plinabulin 水溶性プロドラッグの設計

先行研究により、Plinabulin の DKP 骨格をモノラクチム構造とすることで官能基を導入できることが明らかとなったものの、リンカー構造が不安定であるため、脱保護過程を必要としない水溶性補助基の直接的導入が必須であった。そこで、筆者は官能基許容性が高い生体直交型の反応 (bioorthogonal reaction) であるクリックケミストリー²⁶⁾ に着目した。クリックケミストリーは 1) 高収率、2) シンプルな構造を持つ分子同士の反応、3) 少ない副生成物、4) 実験操作が簡便、5) 水中でも反応が進行、といった特徴を有する反応である。特に、CuAAC (copper catalyzed alkyne azide cycloaddition)²⁷⁾ 反応はアルキンとアジドが一価銅の存在下において、選択的に環化付加する反応であり、タンパク質などの官能基の集合体に対しても選択的に反応するため、抗体修飾や細胞表面の修飾などの夾雑な系においても利用されている。²⁸⁾ そのため、本反応は Plinabulin のプロドラッグ合成において、直接的な極性官能基の導入に適う反応であると考えた。

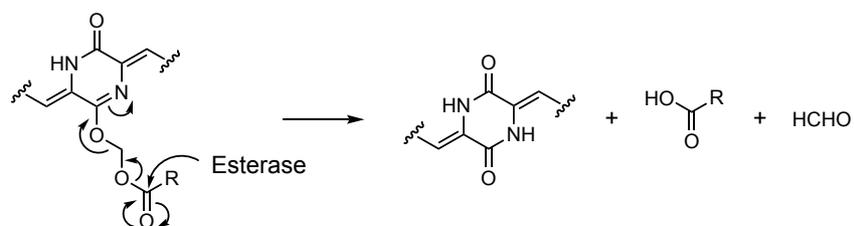
本研究では、Scheme 3 で示すプロドラッグ **13** の合成を立案した。まず、Plinabulin に対し、アシルアセタールリンカー **14** を反応させることで、アルキン構造を導入した **15** とする。その後、無保護の極性官能基 (R) を有するアジド体と CuAAC 反応を実施する事で、水溶性補助基を有するプロドラッグ **13** の直接的な合成が可能であると考えた。リンカー鎖長はプロドラッグ研究において重要な因子ではあるが、類似構造の中で最も安価に入手可能な hex-5-ynoic acid (**16**, n = 3) を用いることとした。



Scheme 3. Synthesis strategy of the water-soluble prodrug of Plinabulin by using CuAAC reaction.

設計したプロドラッグ **13** はアシルアセタールリンカー構造を介して水溶性補助基と結合しているため、エステラーゼによりエステル構造が分解されることで、親化合物である Plinabulin を再生する (Scheme 4)。この際、水溶性のリンカー構造とホルム

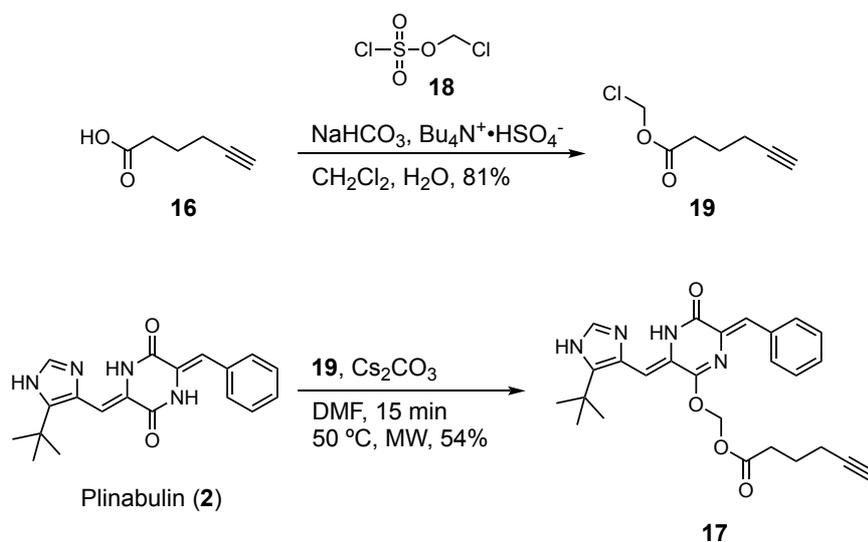
アルデヒドの放出を伴う。ここで、発生するホルムアルデヒドは生体内にて素早く代謝され二酸化炭素となり、呼気中から排泄されるため²⁹⁾、副作用を引き起こす可能性は低いものである。また、高容量で用いられる抗菌薬に利用されているリンカー構造であるが³⁰⁾、本構造由来の副作用は報告されていないことから、抗がん剤において問題となる可能性は低いと考えられる。



Scheme 4. Reproduction mechanism of prodrug of Plinabulin.

第二節 Plinabulin 水溶性プロドラッグの合成

まず初めに、CuAAC 反応に用いる反応基質として、Plinabulin のアルキン誘導体 **17** の合成を行った。市販の hex-5-ynoic acid (**16**) を chloromethyl chlorosulfate (**18**)³¹⁾ によりクロロメチルエステル化することで、リンカー構造である **19** を収率 81%で獲得した (Scheme 5)。続いて、得られた **19** を Plinabulin と塩基性条件下、反応させることでアルキン体 **17** の合成を試みた。NaH、LDA、LHMDS などの塩基を用いた場合、反応は進行せず原料のみが回収された一方で、炭酸セシウムを塩基として用いた際に反応が進行した。マイクロ波を照射下、50 °C で反応させることで、54%の収率でアルキン体 **17** を得た。X 線結晶構造解析の結果、アルキン体 **17** もリン酸型プロドラッグ中間体 **8** と同様に DKP 環がモノラクチムへと変換され、*O*-アルキル化により修飾されていることが示された (Figure 8)。



Scheme 5. Synthesis of alkyne derivative of Plinabulin **17**.

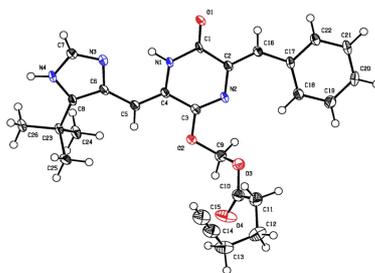


Figure 8. X ray crystal structure of alkyne **17** (CCDC-829268).

続いて、CuAAC 反応により導入する水溶性構造 (R) として、側鎖構造を持たないアミノ酸であるグリシン、側鎖に水酸基を含むアミノ酸であるセリンおよびカルニチン、単糖としてガラクトースのそれぞれのアジド体 **20-23** を選択した (Figure 9)。ガラクトース誘導体については、1 位の水酸基がアジドに置換されているものを用いることで、ヘミアセタール構造による平衡が無く、誘導体合成及び評価が容易である。また、本化合物は市販されていることから 1-azido-1-deoxy- β -D-galactopyranoside (**23**) を適用することとした。

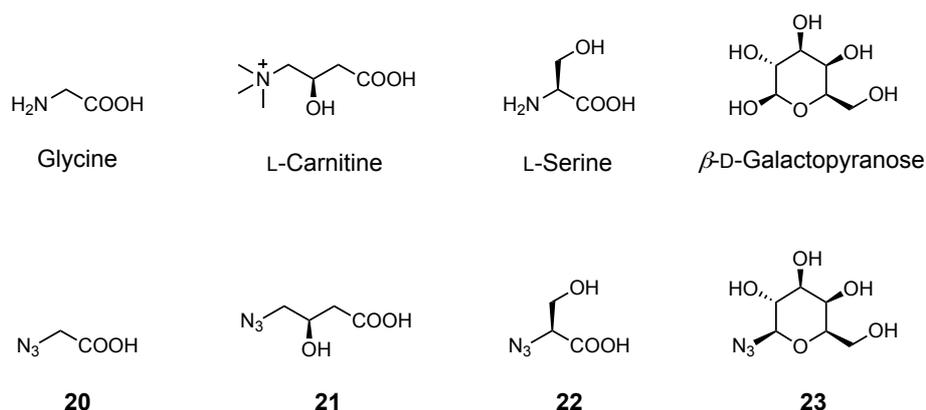
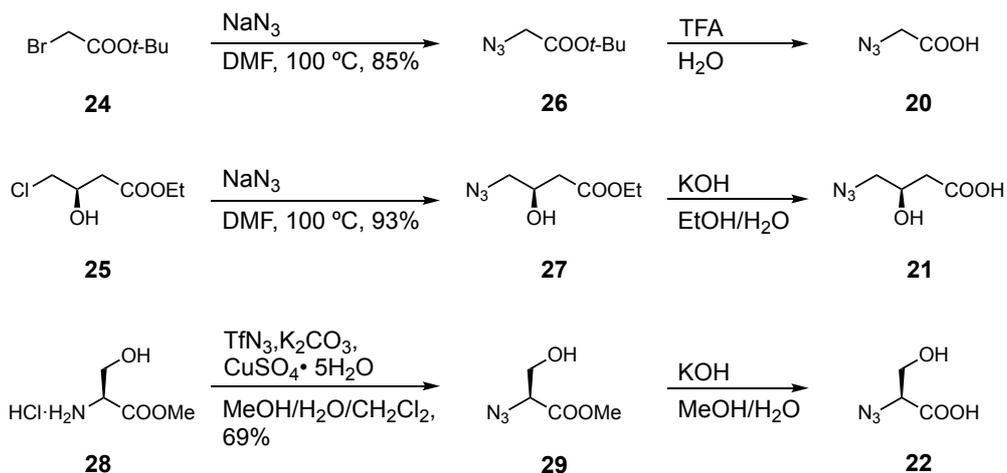


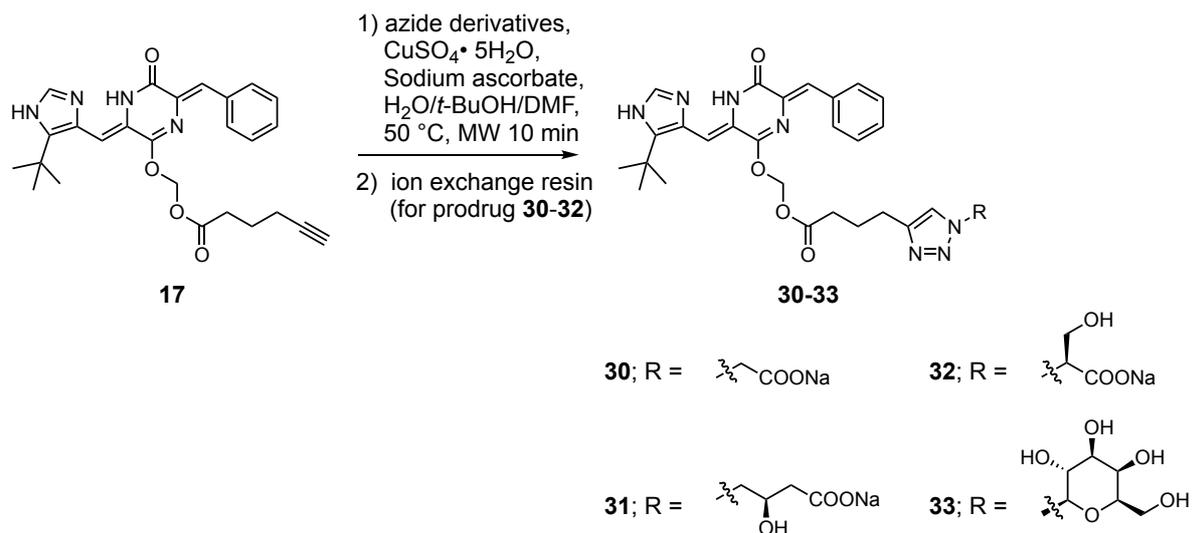
Figure 9. Azide derivatives for the water-solubilizing moiety.

アジド化アミノ酸 **20-22** の合成を Scheme 6 に示す。グリシンおよびカルニチン様のアジド誘導体 **20, 21**³²⁾ の合成では、ハロゲン体 **24** または **25** を出発物質とした sodium azide による求核置換反応により **26** または **27** とした。セリン様構造を有するアジド誘導体 **22** は、トリフラートアジドをジアゾ基供与体³³⁾ として用いた反応により、L-セリンメチルエステル塩酸塩 **28** の α -アミノ基をアジド化することで **29** とした。各アミノ酸のアジド誘導体 **26, 27, 29** のカルボン酸の保護基は TFA 処理または水酸化カリウムによる鹼化により、*t*Bu エステル、エチルエステル、メチルエステルを脱保護し、目的の水溶性構造を有するアジド誘導体 **20-22** を得た。



Scheme 6. Synthesis of azide derivatives.

先に合成したアルキン体 **17** と各水溶性アジド誘導体 **20-23** を、 $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}/\text{DMF} = 1:1:1$ の混合溶媒中、アスコルビン酸ナトリウムの還元作用により系中で生じた一価銅の存在下、CuAAC 反応に付すことで、水溶性官能基を導入したプロドラッグ体を 66-79% の収率で獲得した。カルボン酸構造を有するプロドラッグについては、HPLC 精製後にメタクリル酸系の弱酸性イオン交換樹脂を用いることで溶解性のより優れたナトリウム塩 **30-32** へと変換した (Scheme 7)。



Scheme 7. Synthesis of water-soluble prodrugs **30-33** by the CuAAC reaction.

第三節 Plinabulin 水溶性プロドラッグの機能評価

前節で合成した水溶性プロドラッグ **30-33** の水への溶解性を評価した。各プロドラッグ体の飽和水溶液を分析 HPLC で解析することで算出した飽和濃度を水溶性とした。その結果、親化合物である Plinabulin と比較して、全てのプロドラッグ体において、水溶性が大きく向上した (Table 1)。各プロドラッグ間を比較すると、セリン型プロドラッグ **32** が最も水溶性が高く (6.38 mg/mL)、次いで、カルニチン型プロドラッグ **31** (0.85 mg/mL) である。アミノ酸側鎖を持たないグリシン型プロドラッグ **30** は溶解度が 0.59 mg/mL であり、側鎖水酸基の水溶性への寄与により、上記二つの誘導体の方が優れた水溶性となる結果になった。一方で、ガラクトース構造を導入したプロドラッグ **33** は 0.0075 mg/mL と Plinabulin より水溶性が改善したものの、アミノ酸を導入した誘導体と比較して大きく劣る水溶性であった。この結果より、一般的に高い水溶性を有すると考えられている単糖の構造であっても、本水溶性プロドラッグ研究においては十分な水溶性の補助にはならないことが明らかとなり、カルボン酸のナトリウム塩構造の影響が極めて大きいことが示された。

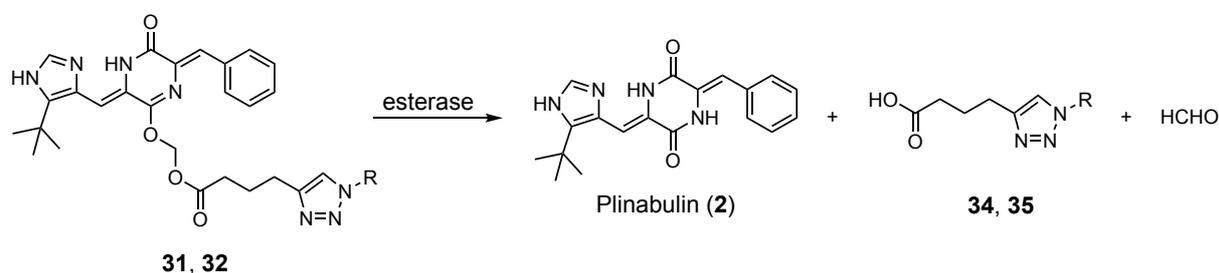
Table 1. Water solubility and half-life of the prodrugs **30-33**.

Entry	Compounds	Water solubility (mg/mL)	Half-life (h)
1	2: Plinabulin	< 0.0001	–
2	30: R =	0.59	ND
3	31: R =	0.85	0.37
4	32: R =	6.38	1
5	33: R =	0.0075	ND

ND: Not determined.

水溶性の向上した誘導体が獲得できたものの、プロドラッグとして機能するためには、親化合物へと確実に再生する必要がある。合成したプロドラッグ体はエステラーゼにより分解されることで親化合物を再生することを想定しているため、ブタ肝エステラーゼによる酵素加水分解反応を実施した (Table 1 and Scheme 8)。分析 HPLC により反応を経時的に観察した結果、セリン構造を導入した化合物 **32** は親化合物 **2** を再生したことから、プロドラッグとして機能する事が明らかとなった (Figure 10)。カルニチン型プロドラッグ **31** も同様に親化合物の再生を確認することができたが、グリシン型プロドラッグ **30** およびガラクトース型プロドラッグ **33** は測定溶媒である PBS に対する溶解性が十分ではなく、酵素加水分解反応の実施が困難であった。溶解を補助するために DMSO や MeOH の添加を試みたが、有機溶媒の濃度や種類により、半減期が大きく変化し、酵素活性に影響を与えている事が示唆されたため、加水分解反応の評価を断念した。

酵素加水分解反応の経時変化のグラフ (Figure 11) より反応の半減期を算出したところ、カルニチン型プロドラッグ **31** では 0.37 h (22.4 min)、セリン型プロドラッグ **32** では 1 h で親化合物 **2** を再生することが明らかとなった (Table 1)。これら二つのプロドラッグは類似する 3-ヒドロキシプロピオン酸構造を有するにも関わらず、半減期が倍以上異なる結果を与えた。



Scheme 8. The hydrolysis of prodrugs by porcine liver esterase.

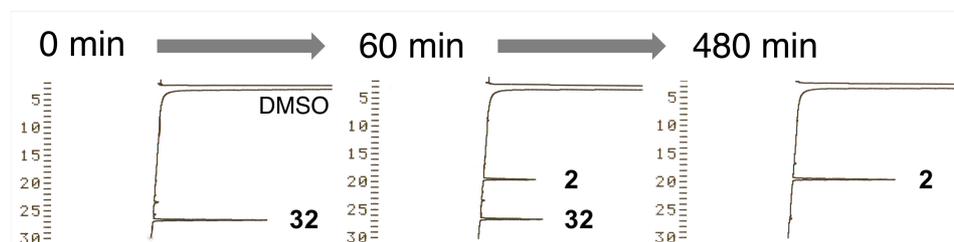


Figure 10. HPLC chromatograms during the esterase hydrolysis of the prodrug **32**. HPLC conditions are a linear gradient starting from 10% CH₃CN in 0.1% TFA aq. to 40% CH₃CN in 0.1% TFA aq., over 30 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm.

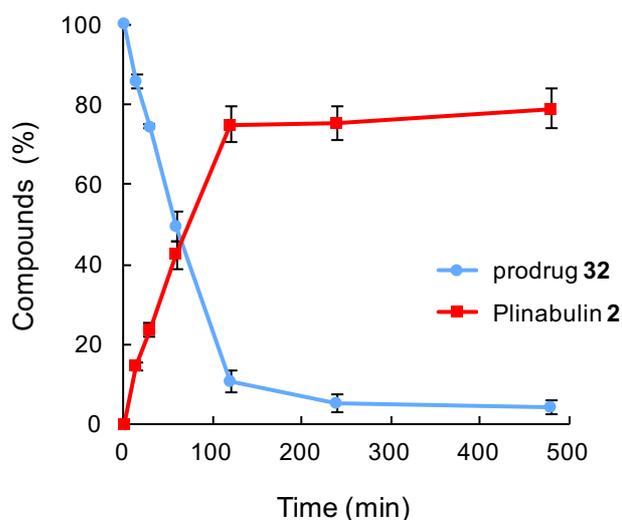
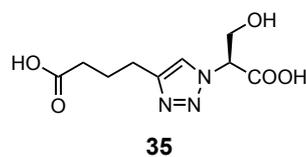


Figure 11. Time course of the hydrolysis of prodrug **32** by the porcine liver esterase.

プロドラッグ研究において、プロドラッグの分解後に副生される修飾基の毒性がしばしば問題とされるため、セリン型プロドラッグ **32** および再生後に放出されると考えられるトリアゾール **35** の殺細胞活性評価を行なった (Table 2)。Positive control の Plinabulin (**2**) が 13.5 ± 2.2 nM の IC_{50} を示したのに対し、セリン型プロドラッグ **32** は 101.4 ± 5.7 nM の殺細胞活性を示し、10 倍程度低い活性であった。トリアゾール **35** は 2 mM の濃度においても顕著な細胞毒性を示さなかった。

Table 2. Cytotoxicity of prodrug **32** and linker **35**.

Entry	Compounds	IC_{50} (nM)
1	Plinabulin (2)	13.5 ± 2.2
2	32	101.4 ± 5.7
3	35	> 2 mM
4	Colchicine	16.6 ± 0.9 nM



第四節 ジカルボン酸型水溶性プロドラッグの合成と機能評価

前節のカルニチン型プロドラッグ **31** とセリン型プロドラッグ **32** は水溶性補助基として類似した 3-ヒドロキシプロピオン酸構造を有するにも関わらず、水溶性 (0.85 mg/mL vs 6.38 mg/mL) と半減期 (0.37 h vs 1 h)、共に差を示した。すなわち、水溶性官能基 (R) に導入する構造の微細な違いにより水溶性および半減期に大きく影響することが示唆された。そこで、水溶性補助基 (R) の構造を変換する事で、更なる水溶性の向上、および異なる半減期を有するプロドラッグの合成が可能と考えた。

カルボン酸のナトリウム塩構造が優れた水溶性補助基であることが前節において示されたため、更なる水溶性の向上を期待し、側鎖にカルボン酸構造を有するアミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸様の構造を有するプロドラッグ体の合成に取り組むこととした (Figure 12)。また、酵素による加水分解反応は基質の構造に加え、基質が有する立体化学に影響を受ける事が一般的に知られており、半減期の違いは水溶性補助基 (R) の立体化学が影響する可能性が考えられる。そこで、L-アミノ酸、D-アミノ酸を利用し立体の異なるプロドラッグの合成も併せて実施した。

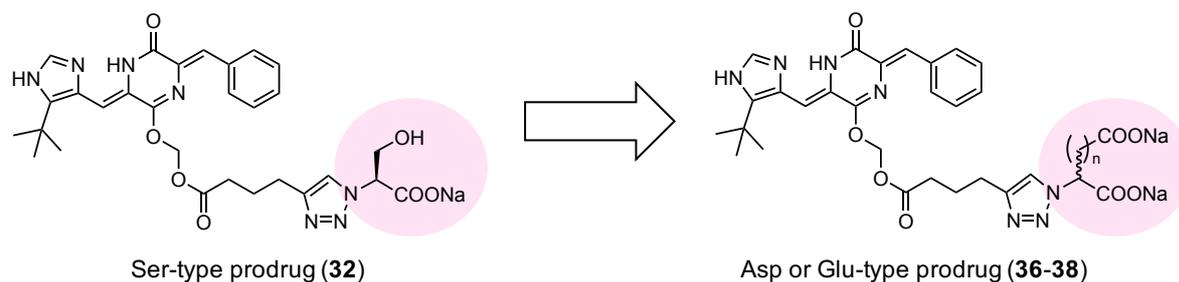
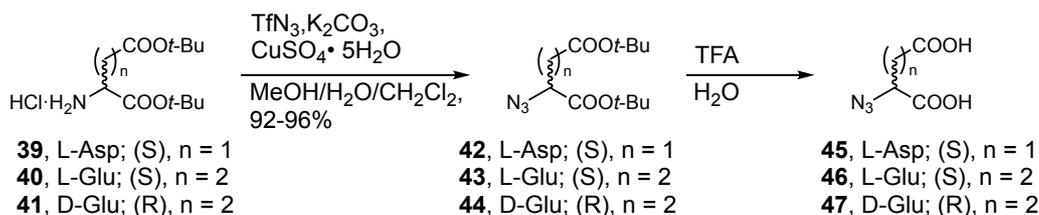


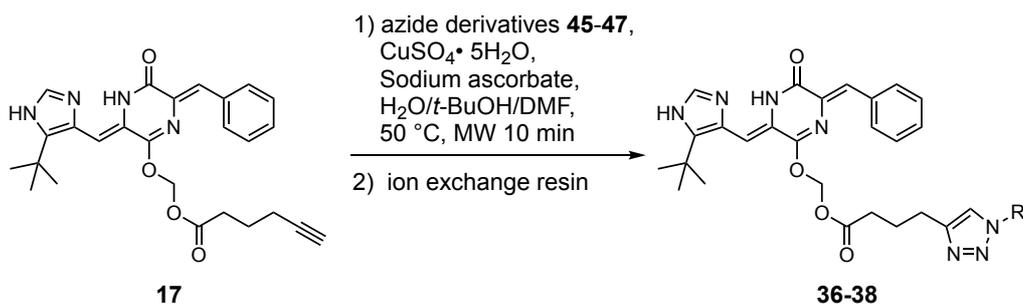
Figure 12. Structures of dicarboxylic acid (Asp or Glu)-type prodrugs of Plinabulin.

プロドラッグ **36-38** はセリン型プロドラッグ **32** と同様に合成した (Scheme 9 and 10)。L-アスパラギン酸ジ *tert*-ブチルエステル塩酸塩、L- 又は D-グルタミン酸ジ *tert*-ブチルエステル塩酸塩 (**39-41**) を出発原料とし、トリフルオロメタンスルホン酸アジドを反応させることで、アジド体 **42-44** を 92-96% の収率で得た。続く酸処理により、*tert*-ブチルエステルを脱保護する事でアジド誘導体 **45-47** を合成し、これらの化合物を精製することなく次の反応に用いた。



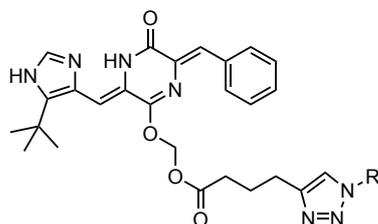
Scheme 9. Synthesis of azide derivatives with dicarboxylic acid.

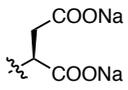
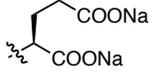
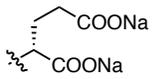
前節と同様に、共通中間体であるアルキン体 **17** に対して、合成したアジド誘導體 **45-47** を CuAAC 反応に付したのちに、メタクリル酸系弱酸性イオン交換樹脂を用いて、ジカルボン酸構造をナトリウム塩へと変換することで、ジカルボン酸構造を有するプロドラッグとして、アスパラギン酸型プロドラッグ **36** および L-、D-グルタミン酸型プロドラッグ **37, 38** を得た。



Scheme 10. Synthesis of dicarboxylic acid-type prodrugs by the CuAAC reaction.

合成したジカルボン酸型プロドラッグ **36-38** の飽和水溶液を解析することで水に対する溶解度を評価した (Table 3)。ジカルボン酸構造を有するプロドラッグ **36-38** は 100 mg/mL 以上の極めて高い水溶性を示し、親化合物である Plinabulin (**2**, 溶解度 < 0.1 μg/mL) と比して、100 万倍以上の水溶性改善を示した。極性官能基としてカルボン酸と水酸基の双方を有するセリン型プロドラッグ体 (**32**, 溶解度 = 6.38 mg/mL) と比較しても約 16 倍水溶性が向上する結果となった。

Table 3. Water solubility and half-life of the prodrugs **36-38**.

Entry	Compounds	Water solubility (mg/mL)	Half-life (h)
1	2: Plinabulin	< 0.0001	–
2	36: R = 	>100	12.0 ± 1.9
3	37: R = 	>100	5.4 ± 0.2
4	38: R = 	>100	9.0 ± 0.7

The values represent the mean ± SD from at least three independent assays.

前節と同様にブタ肝エステラーゼを用いた酵素加水分解反応を実施した。HPLCにより酵素加水分解反応を経時的に観察した結果、副反応を起こすことなく目的とする親化合物を再生した (Figure 13)。経時変化のグラフより半減期を算出したところ、L-Glu体 **37**の半減期は 5.4 ± 0.2 h、D-Glu体 **38**の半減期は 9.0 ± 0.7 hと算出された (Table 3)。L-グルタミン酸型プロドラッグ **37**の方が速く酵素による加水分解反応を受けるという結果になった。一般的に生体内に存在するアミノ酸はL体であり、L-グルタミン酸型プロドラッグの方が使用したブタ肝エステラーゼに認識されやすいため半減期が短くなったものと考察できる。本プロドラッグの構造は加水分解を受けるエステルから不斉点が離れているにも関わらず、エステラーゼによる加水分解反応に大きく影響を与えることが明らかとなった。一方、高い水溶性を示したL-アスパラギン酸型プロドラッグ体 **36**の半減期は 12.0 ± 1.9 hとなった。本プロドラッグ **36**はL-グルタミン酸型プロドラッグ体 **37**よりも1炭素短いことから、酵素に立体的に認識されやすく、半減期が短くなると予想されたが、L-グルタミン酸型プロドラッグよりも大幅に延長するという予想に反した結果が得られた。

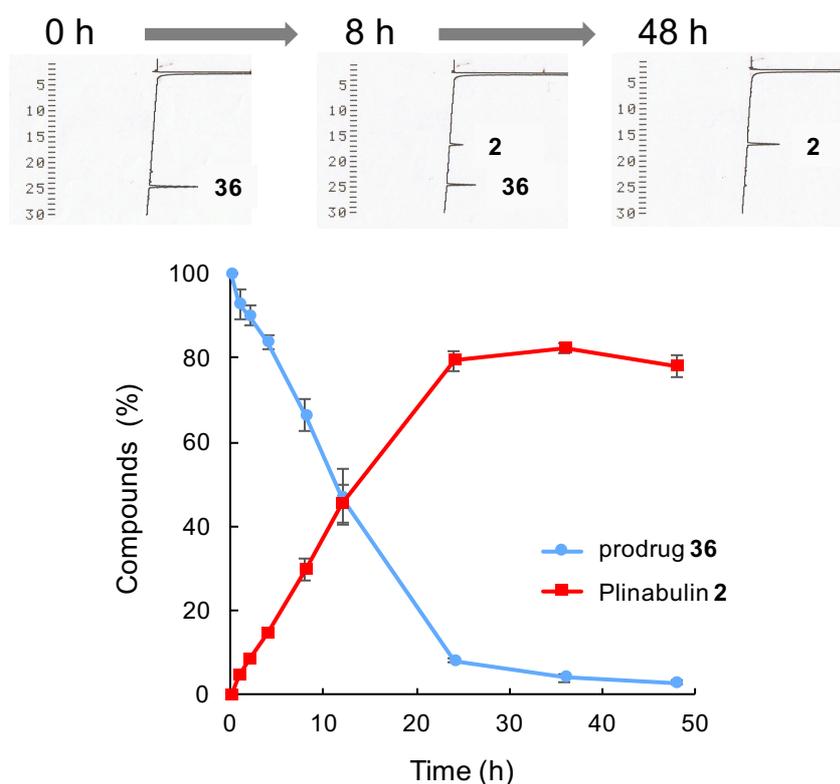


Figure 13. HPLC chromatograms and time course of the hydrolysis of prodrug **36** by the porcine liver esterase. HPLC conditions are a linear gradient starting from 10% CH₃CN in 0.1% TFA aq. to 40% CH₃CN in 0.1% TFA aq., over 30 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm.

本評価に用いたブタ肝エステラーゼの詳細な三次元構造は解かれていないが、相同性の高い（配列相同性：75%）³⁴⁾ ヒト肝エステラーゼの X 線結晶構造は知られている（PDB: 1MX1, ヒトカルボキシエステラーゼ (EC3.1.1.1)）³⁵⁾。この X 線結晶構造より、エステラーゼの活性中心でトリアッドを形成している Ser221、His468、Glu354 の周辺の基質ポケットは多くの疎水性残基により形成されていることが明らかにされている。今回、*in vitro* エステラーゼ試験に用いているのは種の異なるブタ肝エステラーゼではあるが、生体内ではコレステロールエステル、脂肪酸のような疎水性分子を基質¹⁶⁾にし、同様の働きをしていることから、同じように疎水性ポケットを形成していると考えられる。そのため、極性基が水溶性補助基部位に、より密集したアスパラギン酸型プロドラッグは疎水性ポケットへの親和性が低下し、半減期がグルタミン酸型プロドラッグよりも大幅に延長したものと考察した。実際に、他のプロドラッグ誘導体においても水溶性が高い（極性が高い）ほど半減期が長くなる傾向が得られている（Table 1 and 3）。

第五節 小括

第一章では、近年の医薬候補化合物群の特徴である難水溶性という性質を有する「チューブリン重合阻害剤 Plinabulin (2, 溶解度 < 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)」の水溶性改善を目的としたプロドラッグの合成、およびその機能評価について述べた。水溶性プロドラッグの合成において、保護基を用いずに水溶性構造を直接的に導入するため、クリックケミストリーの一つである CuAAC 反応を適用した。その結果、Plinabulin の水溶性プロドラッグを 7 種合成することに成功した。本手法により合成したプロドラッグは導入する官能基の構造により、水溶性は大きく異なり (溶解度 0.0075-100 mg/mL)、ジカルボン酸誘導体 36-38 において特に高い水溶性を示した。

これらのプロドラッグは *in vitro* の系において、エステラーゼにより加水分解され、親化合物である Plinabulin を再生したことから、プロドラッグとして機能することが示された。また、水溶性置換基の構造や立体化学がエステラーゼ加水分解反応の半減期に大きく影響することが明らかとなった ($t_{1/2} = 0.37\text{-}12 \text{ h}$)。すなわち、本プロドラッグは導入する水溶性官能基を適当な構造とすることで、親化合物が再生するまでの時間を調節できることが示唆された。

現在、実施されている臨床試験における Plinabulin の供給濃度は 4 mg/mL であることから、本章において合成したプロドラッグは実用に耐えうるものであると考えられる。また、本プロドラッグ合成法は、CuAAC 反応をプロドラッグ合成に適用した初の例である。DKP 環を修飾点としていることから、他の DKP 環構造を有する医薬候補化合物³⁶⁾ に関しても、同様の修飾法によりプロドラッグ化できるものと期待する。

第二章 抗体結合ペプチドを用いた抗体-Plinabulin 複合体の創製

序節

第一章では CuAAC 反応を応用した Plinabulin の水溶性プロドラッグ合成研究を展開した。合成したプロドラッグは導入する官能基 (R) の構造を変更することで、容易にその性質を変換する。そこで、R に抗体 Fc 部位に対して選択的に結合する性質を有するペプチドを導入することで、抗体と複合体を形成する性質を有する腫瘍指向性プロドラッグの創製が可能であると考えた (Figure 14)。すなわち、Plinabulin の抗体-薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate; ADC) への応用である。

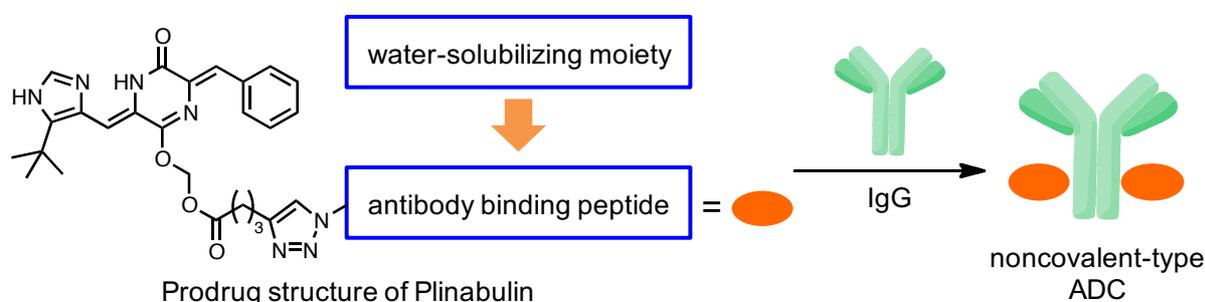


Figure 14. Noncovalent-type antibody drug conjugate by the antibody binding peptide.

抗体薬物複合体 (Antibody-drug conjugate; ADC)

抗体薬物複合体 (Antibody-drug conjugate; ADC) は、抗体の抗原特異性を利用し、標的部位に薬剤を効率的に送達することを目的とした抗体医薬である。現在、承認を取得している ADC は、Trastuzumab emtansine **48** (T-DM1、カドサイラ[®])³⁷⁾ や Brentuximab vedotin **49** (アドセトリス[®])³⁸⁾、Gemtuzumab ozogamicin **50** (マイロターゲット[®])³⁹⁾ の三種類である (Figure 15)。また、抗体と放射性核種との架橋体である Ibritumomab tiuxetan (ゼヴァリン[®])⁴⁰⁾、Tositumomab-¹³¹I (ベキサール[®]、日本では未承認)⁴¹⁾ も広義には含まれる。現在もなお、世界各地で、50 種類以上の ADC の臨床試験が実施されており¹⁴⁾、今後更なる活躍が期待される医薬品の形態である。しかし、多くの ADC に関する研究が実施されているにも関わらず、抗体の修飾法は様々であり⁴²⁾、ゴールドスタンダードとなるような手法はまだ確立されていない。

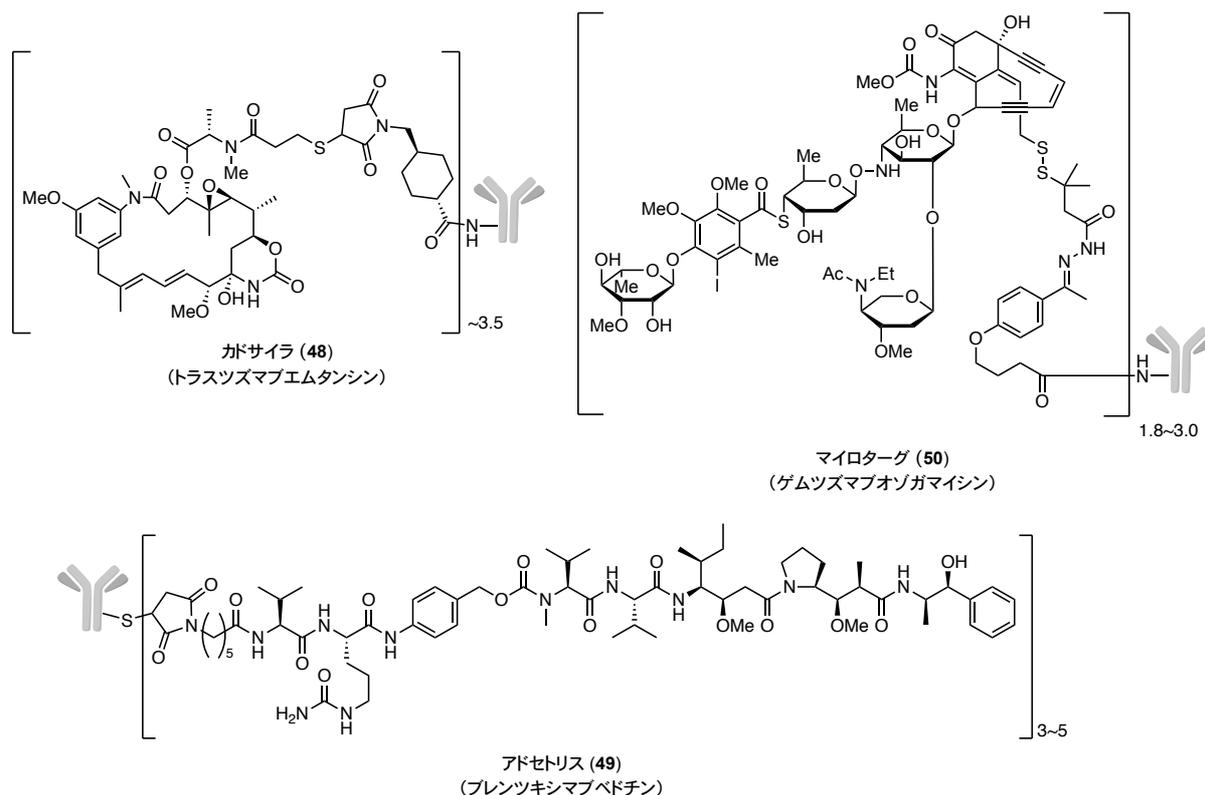


Figure 15. Structures of approved ADCs.

ADCの一般的な調製方法は以下の例が上げられる。

1. 縮合剤や活性エステルを利用した抗体表面に露出している Lys 側鎖アミノ基に対する非特異的な修飾⁴³⁾

最も古典的かつ一般的な手法であり、Trastuzumab emtansine **48**はこの手法により調製されている。抗体の Lys をランダムに修飾するため、修飾分子数および修飾部位の制御が困難であり、生成物の均質性が低くなってしまうことは医薬品開発上の欠点である。また、抗体の抗原認識部位に修飾が起きた場合は、抗体の機能低下が起きる可能性が高い。

2. 天然の抗体が有する構造を試薬により改変し、生成した構造に対する選択的な修飾⁴⁴⁾

抗体ヒンジ部などに存在するジスルフィド結合を dithiothreitol (DTT) などの還元剤により切断し、その露出した SH 基に対する選択的な修飾がよく行われる。Brentuximab vedotin **49**はこの手法により調製されている。また、過ヨウ素酸により、糖鎖構造を酸化し、アルデヒドを生成した後、ヒドロキシルアミン化合物とオキシムライゲーションによって架橋体を形成する手法も実施されている。本手法は比較的均質性の高い ADC が得られるものの、煩雑な前処理が必要であることに加え、抗体自身の構造に影響

響を与えてしまうことから、抗体本来の機能（抗体としての安定性、ADCC（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）活性など）を低下させる可能性がある。

3. 抗体作成時にシステイン（チオール）や変異アミノ酸を遺伝子工学的に導入し、その部位に対する選択的な修飾⁴⁵⁾

本手法は、目的の部位に人為的に架橋可能な構造を導入できるため、均一性高くADCを得ることができる。天然以外のアミノ酸をタンパク質中に導入する手法も広く研究されている。しかし、抗体の遺伝子配列自体に変異を入れる必要があり、さらに、本手法は使用したい抗体の遺伝子をオーダーメイドで改変しなければならず、汎用性の面やコストの面で問題が残されている。

4. 酵素により抗体表面に存在する基質配列に対する修飾⁴⁶⁾

transglutaminase を用いた手法が報告されている。直鎖脂肪鎖のアミノ基と抗体上の基質配列を有するグルタミン側鎖を縮合することができる。しかし、現在、報告されている手法では、抗体のアミノ酸配列を酵素認識配列へと変換する必要があるため、項目3で挙げた問題点が共通する。

上記のように抗体修飾法は、いまだ完成された技術では無く、改善すべき点を有している。理想的な抗体修飾法は、1) 抗体修飾部位が一定であり、2) 抗体の抗原結合能に影響を与えず、3) 還元などの前処理や遺伝子改変などを必要としないもので、さらには、4) 様々なサブクラスの抗体へも応用可能なものである。

抗体結合ペプチド

抗体Fc部位に特異的に結合する分子はいくつか知られており、Protein Aが代表的である。⁴⁷⁾ Protein Aは*Staphylococcus aureus*の細胞壁を構成するタンパク質であり、抗体結合能を有することからアフィニティーカラムとして抗体精製によく利用されている。^{47b)} 508残基のアミノ酸から成るProtein Aは、5つの抗体結合ドメイン（A、B、C、D、E domain）を有しており、それぞれ異なる抗体結合特性を示す。特に、B-domain（58残基）に関しては盛んに研究されており、ビオチンやナノ粒子、蛍光色素などと架橋体を形成することで、これら化合物と抗体との複合体形成に利用されている。⁴⁸⁾ また、Braisteadらは、1996年にB-domainから誘導された化学的により安定なZ-domain⁴⁹⁾の構造をファージディスプレイ法により最適化することで、ヒトIgG₁への高い結合活性を有するZ33ペプチド（ $K_d = 8.2$ nM, in house data, FNMQQRRRFYEAL-HDPNLNEEQRNAKIKSIRDD）を見出した（Figure 16）。⁵⁰⁾

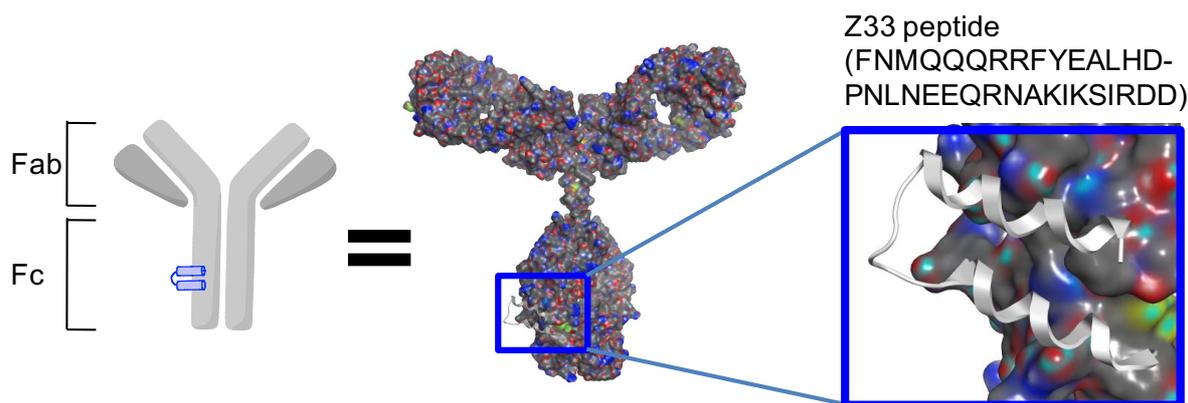


Figure 16. Structural models of the Z33 peptide binding to human IgG₁ on the basis of cocrystal of its parent peptide, B-domain, and human IgG₁ (PDB: 1FC2⁵¹), 2IG2⁵²). Z33 peptide was shown as a white ribbon.

33 残基のアミノ酸からなる Z33 ペプチドは、その比較的小さい構造から固相ペプチド合成法により化学合成可能であり、扱いやすい分子ツールである。そこで、前章で検討した Plinabulin の水溶性プロドラッグにおいて、水溶性置換基部位 (R) の代わりに Z33 ペプチドを導入することで、Fc 部位選択的に結合する性質を有する Plinabulin プロドラッグ誘導体を得られるものと考えた。本プロドラッグは単に抗体と混ぜるのみで、抗体 Fc 部位へ非共有結合的ではあるが選択的に結合し、ADC を形成することが期待される。すなわち腫瘍指向性を付与したプロドラッグを創製できるものである。まず初めに、Z33 ペプチドの N 末端または C 末端に Plinabulin 構造を架橋した **51** または **52** の合成を計画した (Figure 17)。

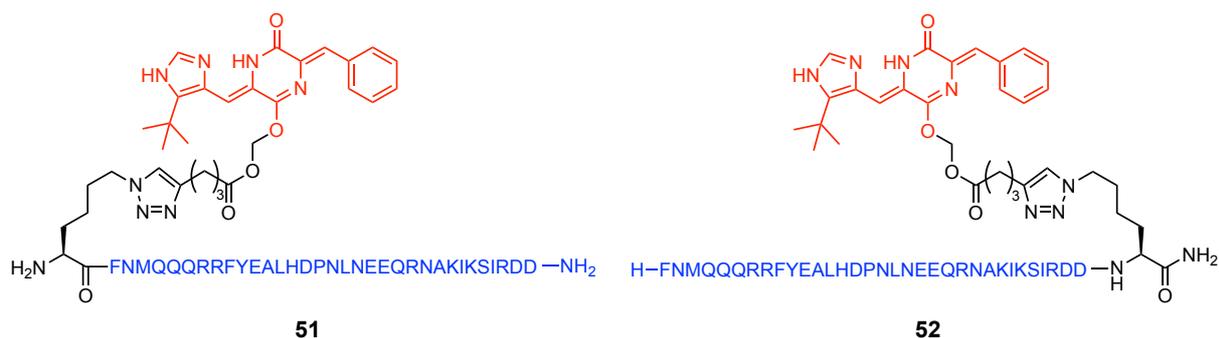


Figure 17. Structures of Plinabulin prodrugs for the formation of noncovalent-type antibody-drug conjugate (ADC).

第一節 Plinabulin-抗体結合ペプチド架橋体の合成

抗体 Fc 部位結合ペプチドを介した抗体との複合体形成による Plinabulin の腫瘍指向性付与を目的として、CuAAC 反応による Plinabulin と Z33 ペプチドの架橋体 **51**, **52** の合成を実施した。Z33 ペプチドの N 末端または C 末端にアジドリジン⁵³⁾ を挿入したペプチド (K(N₃)Z33 または Z33K(N₃)) を Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 固相ペプチド合成法⁵⁴⁾ により合成した (Figure 18)。合成したペプチドの CD スペクトルを測定したところ、207 nm と 222 nm に負の極大を示したため、 α -helix 構造⁵⁵⁾ をとっていることが示唆されたが、C 末端を修飾したペプチドである Z33K(N₃)では helix 性の向上が確認された (Figure 19)。

各ペプチドの抗体に対する結合能の評価は、表面プラズモン共鳴法 (Surface plasmon resonance, SPR) により行なった。センサーチップ上に固定化した抗 HER2 抗体 (Herceptin, human IgG₁) に対する解離定数 (K_d) および速度定数 (k_{on} , k_{off}) を評価した (Table 4)。N 末端を修飾した場合、Z33 ペプチドとほぼ同等の性質を示したが (Entry 2)、C 末端を修飾した際には解離、結合速度定数のどちらも早くなる結果が得られた (Entry 3)。CD スペクトルの結果も含めると、N 末端修飾の方が Z33 ペプチド本来の機能への影響が小さいことが示唆された。

Z33: FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD
 K(N₃)Z33: FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDK(N₃)
 Z33K(N₃): K(N₃)FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD

Figure 18. Sequences of Z33 derivatives containing an azide. K(N₃): azido-lysine.

Table 4. Binding kinetics of the Z33 derivatives consisting of azido-lysine against Herceptin (human IgG₁)

Entry	Compd.	k_{on} (1/Ms × 10 ⁶)	k_{off} (1/s × 10 ⁻³)	K_d (nM)
1	Z33	2.06 ± 0.003	16.9 ± 0.03	8.2 ± 0.02
2	K(N ₃)Z33	2.06 ± 0.006	17.2 ± 0.05	8.3 ± 0.03
3	Z33K(N ₃)	2.94 ± 0.005	24.3 ± 0.04	8.3 ± 0.02

Herceptin (2000 RU) was immobilized onto a CM5 sensor chip. K(N₃): azido-lysine.

The values represent mean ± S.E.

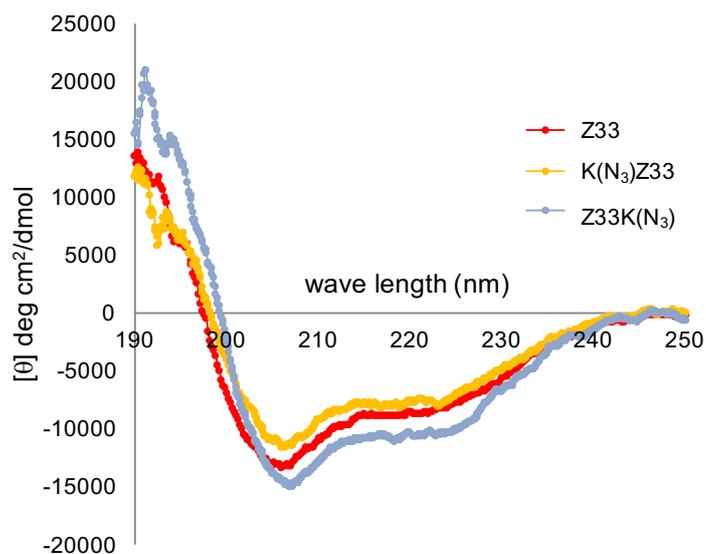
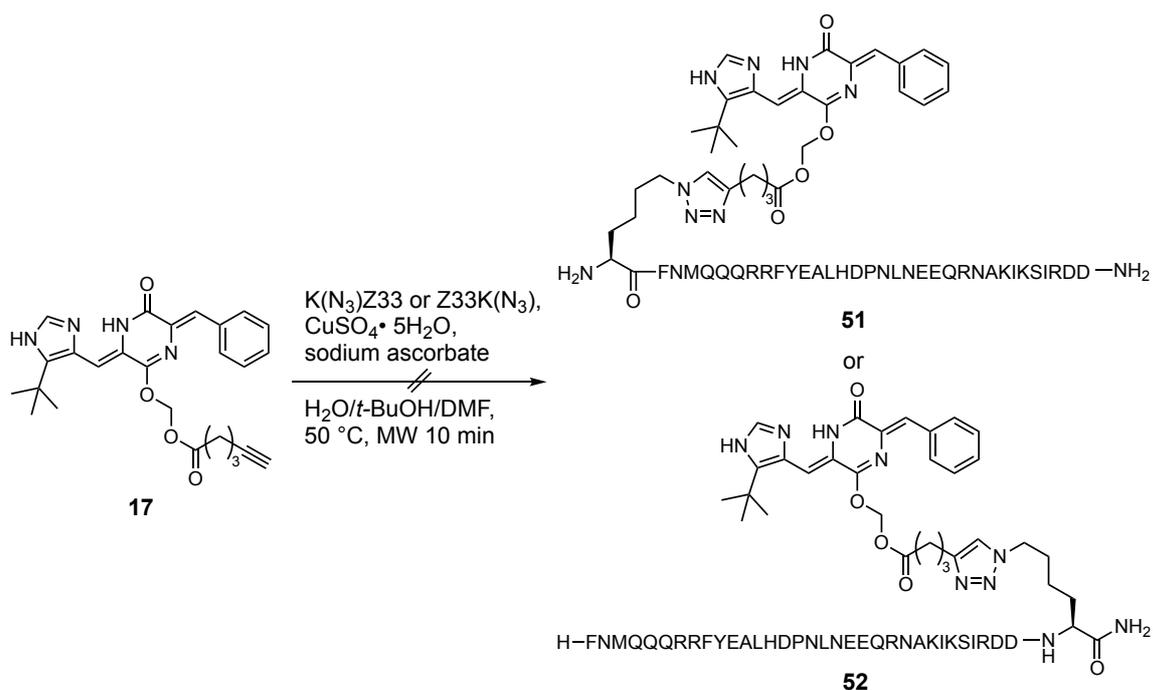


Figure 19. Circular dichroism (CD) spectra of Z33 derivatives.

続いて、アルキン **17** と $K(N_3)Z33$ または $Z33K(N_3)$ を基質として CuAAC 反応を行うことで、Z33-Plinabulin (**51**)、Plinabulin-Z33 (**52**) の獲得をめざした (Scheme 11)。しかし、これまでの反応条件においてクリック反応を実施したところ、反応溶液がゲル化する現象が観察され、目的とする架橋体を得ることができなかった。この原因は、Plinabulin 誘導体 **17** とペプチドの二つの化合物が極度に異なる物理化学的性質 (主に溶解性) を有していることから、同一溶媒系での反応が困難であったと考察した。

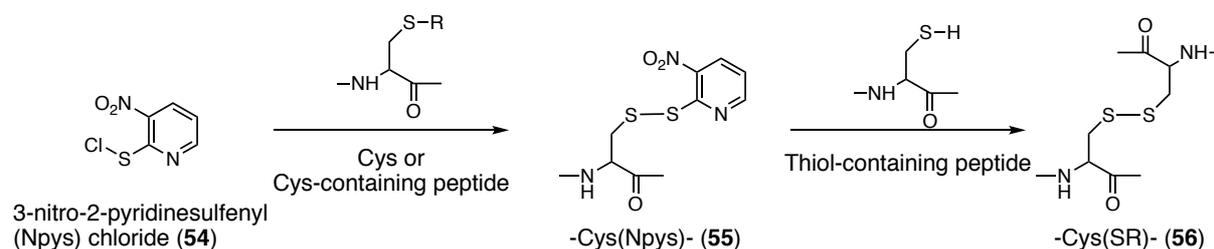


Scheme 11. Failed synthesis strategy using the CuAAC reaction.

第二節 固相ジスルフィド架橋法 (SPDSL)

前節において、Plinabulin と Z33 ペプチドの架橋体を得るために CuAAC 反応を実施したが、架橋する二つの化合物の溶解性などの性質が大きく異なるため、同一溶媒系での反応が困難であった。そのため、Plinabulin と Z33 ペプチドの架橋体を獲得するには、反応基質の溶媒への溶解性によらない合成手法が必要である。そこで、筆者は所属研究室で独自に開発した 3-nitro-2-pyridyl sulfenyl (Npys) 構造⁵⁶⁾を利用した固相担持型ジスルフィド架橋試薬 **53**⁵⁷⁾に着目した。

Npys は一般的にチオールの保護基として利用されており、そのクロロ化体 (**54**) はチオールやスルフィド化合物と反応することで、ジスルフィド化合物 **55** となる。このジスルフィドは活性ジスルフィドとして働くことが知られており、他のチオールが存在すると選択的にジスルフィド交換反応が進行し、架橋体 **56** を形成する (Scheme 12)。⁵⁶⁾ 筆者の所属する研究室では、活性ジスルフィド構造がチオール選択的に反応する性質を利用した固相担持型のビオチン標識試薬 (KSH-1) やオクタアルギニン標識試薬 (KSH-2) を報告している。⁵⁸⁾



Scheme 12. 3-nitro-2-pyridyl sulfenyl (Npys) group.

また一方で、この Npys 構造を樹脂上に担持した Npys-Cl 樹脂 **53** を利用することで、ペプチド間のジスルフィド架橋反応を行なった後に、主鎖アミド結合を形成する新しいジスルフィド先導型のペプチド合成手法を報告した。⁵⁷⁾ 本樹脂 **53** は固相担体として両親媒性の PEG resin “ChemMatrix[®] resin”⁵⁹⁾ を用いていることから、水系溶媒、有機溶媒のどちらの反応においても使用可能である。すなわち、溶解性の大きく異なる化合物同士の架橋反応に適用できる可能性を有している。そこで、固相担持試薬 **53** を用いた固相ジスルフィド架橋法 (Solid-Phase-assisted DiSulfide Ligation, SPDSL) による Plinabulin と Z33 ペプチドの架橋体合成を考案した。

Figure 20 に SPDSL の概略図を示す。Npys-Cl 樹脂 **53** は Npys-Bn 樹脂 **57** に対し、クロロスルフェニル化することにより調製できる。⁵⁷⁾ SPDSL の一段階目として、難水溶

性の薬物 (Drug; Plinabulin) のスルフィド誘導体を有機溶媒中において、Npys-Cl 樹脂 **53** と反応させることで、活性ジスルフィド構造を有する樹脂 **58** とする。その後、水系溶媒中において、チオール含有水溶性化合物 (Peptide-SH; Z33 ペプチド) とジスルフィド交換反応を行うことで、反応基質の物性に寄らず、難水溶性化合物と水溶性化合物のジスルフィド架橋体 **59** の合成が可能であると考えた。本反応は樹脂を介する反応であるため、一段階目と二段階目における反応溶媒の置換が容易に達成できる特徴を有している。そこで、本 SPDSL 反応により Plinabulin と Z33 ペプチドのジスルフィド架橋体を合成することとした。

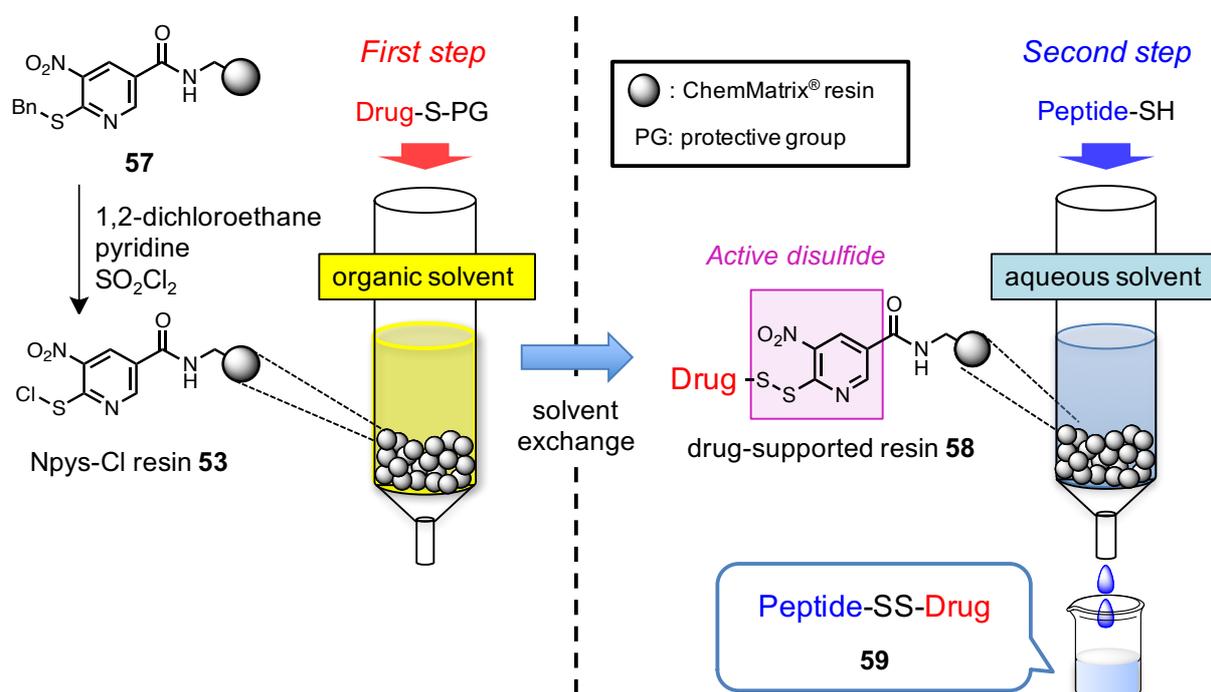
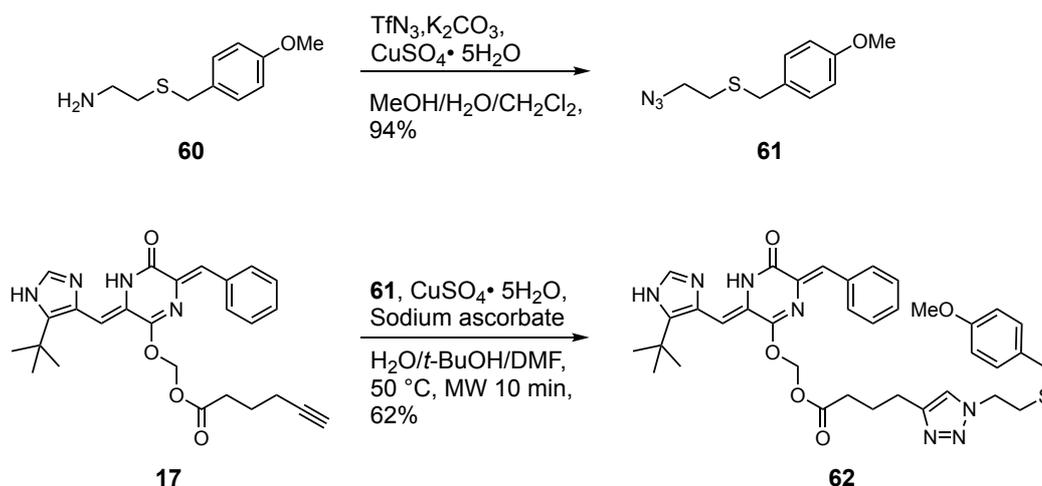


Figure 20. Solid-phase assisted disulfide ligation (SPDSL).

第三節 固相ジスルフィド架橋法による Plinabulin-抗体結合ペプチド架橋体の合成

固相ジスルフィド架橋法 (SPDSL) は、スルフィドとチオールを有する化合物間を架橋する反応である。そのため、Plinabulin のスルフィド誘導体およびチオール含有 Z33 ペプチドを反応基質として合成する必要がある。Plinabulin のスルフィド誘導体 **62** は、第一章における合成中間体である Plinabulin のアルキン誘導体 **17** に対し、別途合成した (2-azidoethyl)(4-methoxybenzyl)sulfane **61** を CuAAC 反応に付すことにより 62%の収率で合成した (Scheme 13)。チオール含有 Z33 ペプチドは、第一節における知見を基に修飾点を N 末端と定め、Fmoc 固相ペプチド合成法によりグリシンを介してシステインを導入した Cys-Gly-Z33 を合成した。また抗体に対する結合能を示さないネガティブコントロールとして Z33 の逆配列を有する Cys-Gly-Z33(retro) も合成した (Figure 21)。

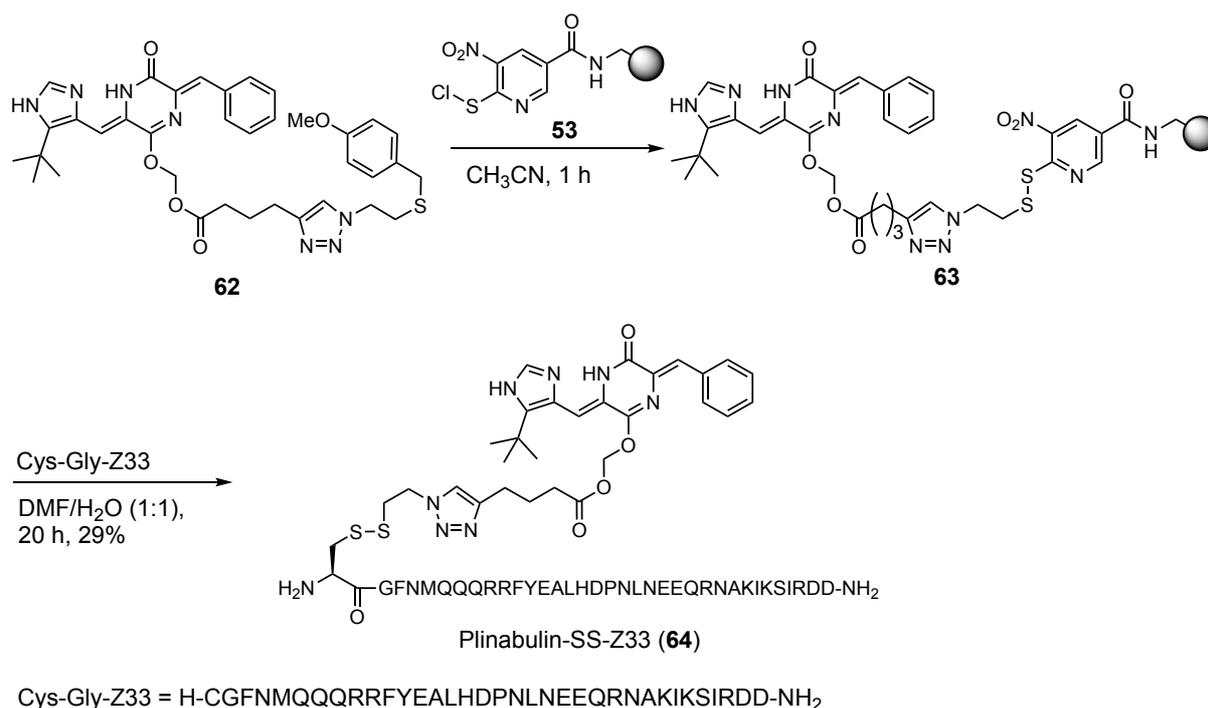


Scheme 13. Synthesis of sulfide derivative of Plinabulin **62**.

Cys-Gly-Z33 H-CGFNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD-NH₂
Cys-Gly-Z33(retro) H-CGDDRISKIKANRQEENLNPDLAEYFRRQQQMNF-NH₂

Figure 21. Building blocks for the solid-phase assisted disulfide ligation (SPDSL).

Scheme 14 に示すように、固相ジスルフィド架橋法 (SPDSL) を実施した。5 当量の Npys-Bn 樹脂 **57** を塩化スルフルルにより活性化し、Npys-Cl **53** とした後、スルフィド **62** をアセトニトリル中で反応させた。HPLC で反応を追跡したところ、一時間後には反応溶液中のスルフィド **62** が消失し、代わりに *p*-methoxybenzylalcohol のピークが観察された (Figure 22A)。すなわち、Plinabulin 構造が活性ジスルフィドとして固相上に担持され、樹脂 **63** を形成したと考えられる。樹脂 **63** を CH₃CN および H₂O で洗浄後、H₂O/DMF = 1 : 1 溶媒に溶解した Cys-Gly-Z33 を加えることでジスルフィド交換反応を行った。反応の経時変化を Figure 22B に示す。出発物質である Cys-Gly-Z33 のピークが時間の経過により徐々に減少し、20 h 後には消失した。いくつかの副生成物が観察されるものの、Plinabulin-SS-Z33 (**64**) 架橋体のピークが新たに現れた。反応後の樹脂を濾去したのちに、HPLC にて精製することで目的である架橋体 **64** を収率 29% で得た。また、Cys-Gly-Z33(retro)の架橋体 **65** を同様の方法により 29%の収率で合成した。



Scheme 14. Synthesis of Plinabulin-SS-Z33 (**64**) by the SPDSL.

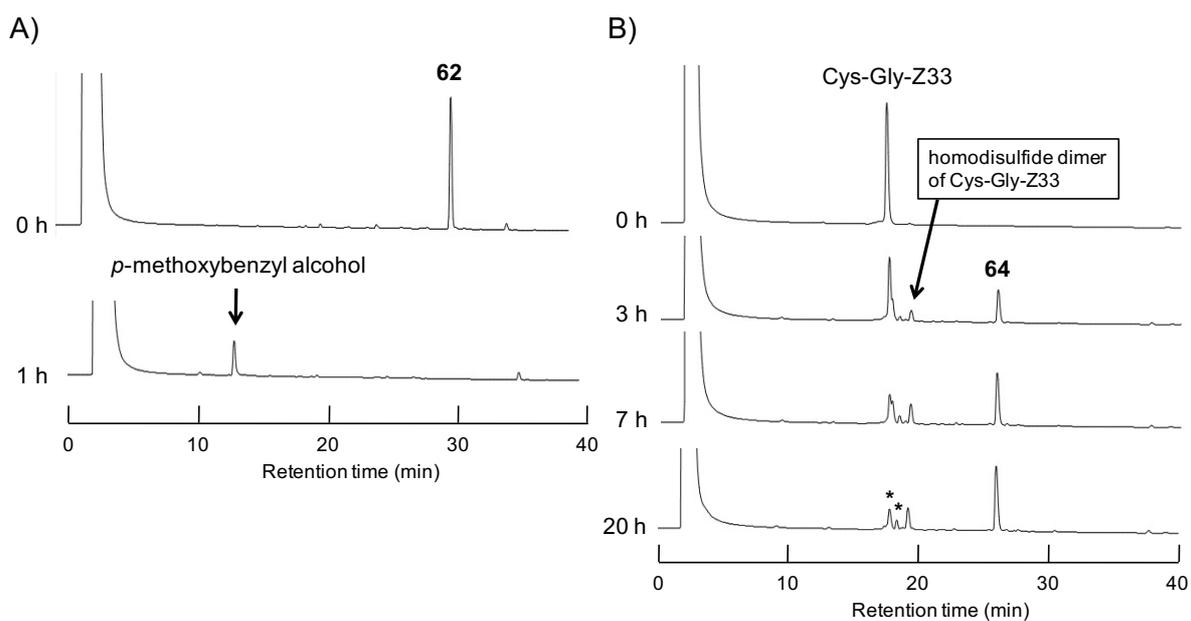


Figure 22. HPLC analysis of A) the loading of sulfide derivative **62** to the resin (first step) and B) formation of Pliabulin-SS-Z33 **64** by the disulfide exchange reaction (second step). HPLC conditions are a linear gradient starting from A) 5% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA to 85% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA or B) 10% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA to 50% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA, over 40 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm. *unidentified byproduct.

第四節 Plinabulin-SS-Z33 架橋体の機能評価

架橋体 **64**, **65** の二次構造を CD スペクトルにより解析した (Figure 23)。Plinabulin-SS-Z33 **64** と Plinabulin-SS-Z33(retro) **65** のどちらも Z33 ペプチドと同様に 207 nm および 222 nm に負の極大を有していることから、 α -helix 構造であることが示唆されたが、Z33 ペプチドと比較すると若干の変化を示した。しかし、Reed の式⁶⁰⁾に基づき α -helix 性を算出したところ、Z33 ペプチド(25%)と Plinabulin-SS-Z33 **64**(24%)は、同程度の α -helix 性であった。

抗体 Fc 部位への結合能を表面プラズモン共鳴法により評価した結果を Table 5 に示す。Sensorgram を 1:1 binding model で解析した結果、架橋体 **64** は $K_d = 46.6$ nM の抗体結合能を示した。元の Z33 ペプチド ($K_d = 8.2$ nM) と比較すると、劣るものの、抗体結合能を有する Plinabulin 架橋体の獲得に成功した。すなわち抗体と Plinabulin の非共有結合的な複合体が得られたことが示唆された。一方で、ネガティブコントロールとして合成した架橋体 **65** は期待通り抗体に対して親和性を示さなかった。

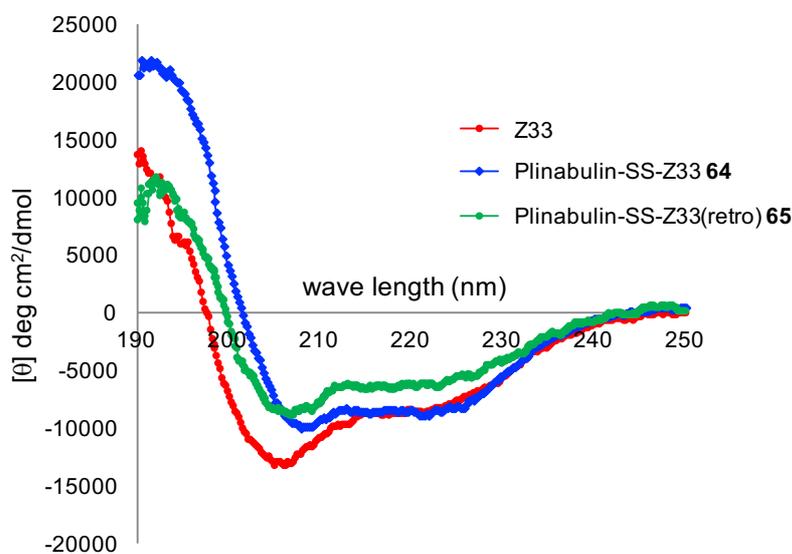


Figure 23. Circular dichroism (CD) spectra of Z33 derivatives.

Table 5. Binding kinetics for Herceptin (human IgG₁ antibody).

Compd.	k_{on} (1/Ms $\times 10^6$)	k_{off} (1/s $\times 10^{-3}$)	K_d (nM)
Z33	2.06 \pm 0.003	16.9 \pm 0.03	8.2 \pm 0.02
Cys-Gly-Z33	1.13 \pm 0.006	5.2 \pm 0.03	4.6 \pm 0.04
Pliabulin-SS-Z33 (64)	0.13 \pm 0.001	6.0 \pm 0.05	46.6 \pm 0.5
Pliabulin-SS-Z33(retro) (65)	N.B.	N.B.	N.B.

N.B.: no binding

架橋体 **64** による ADC の形成が示唆されたため、抗体として Herceptin (抗 HER2 抗体) を用い、SKBR-3 (HER2 過剰発現ヒト乳がん細胞) および MCF-7 (HER2 低発現乳がん細胞) に対する殺細胞活性を評価した。96 well plate 中で抗体と架橋体 **64** を事前に混ぜ、1 h、37 °C でインキュベートする事で ADC を形成させた後、5000 cells/well の細胞に対して添加し、37 °C でインキュベートした。72 h 後、WST-1 試薬を加え、吸光度を測定する事で細胞生存率を算出した。ここでは、通常の FBS よりも IgG 含量の少ない Supper Low IgG FBS を用いることで、よりシンプルな評価系とした。その結果を Figure 24 に示す。SKBR-3 細胞において、Pliabulin-SS-Z33 **64** 単独、または Herceptin 単独と比較して、どちらも添加することで非共有結合的な ADC を形成させた際に有為な細胞毒性を示した (Figure 24A)。一方で、抗原発現量の少ない MCF-7

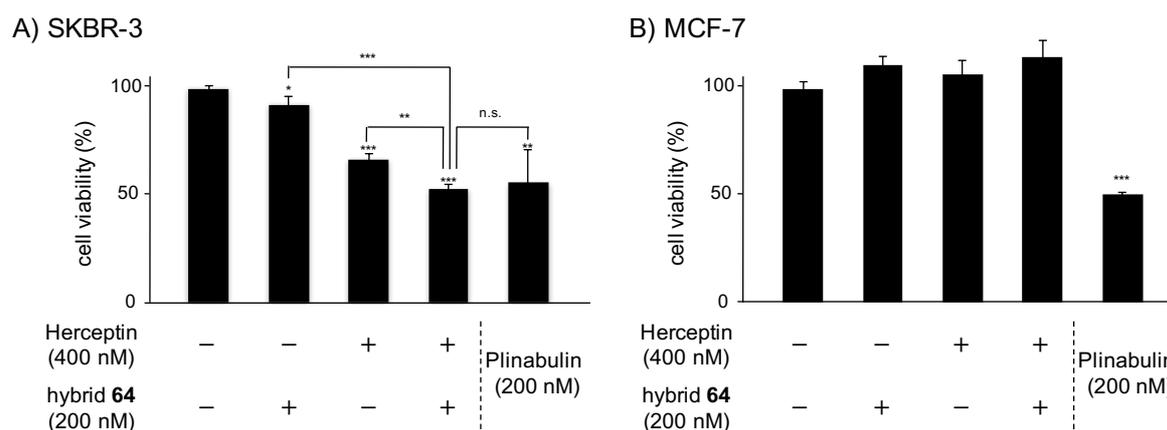


Figure 24. Cytotoxicity of Noncovalent-type ADC, complex of hybrid molecule **64** and Herceptin, against (A) SKBR-3 cells and (B) MCF-7 cells using the medium containing 10% of super low IgG FBS. n.s.: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Data ($n = 3$) are shown as means \pm SD.

細胞に対しては、一切の毒性を示さなかった (Figure 24B)。親化合物である Plinabulin はどちらの細胞に対しても非選択的な殺細胞活性を示していることから、架橋体 **64** は抗体依存的な殺細胞活性を示し、腫瘍指向性プロドラッグとして機能したことが示唆された。

Figure 24 において、架橋体 **64** の抗原選択的な細胞毒性は示されたものの、Herceptin 単独または架橋体単独においても SKBR-3 細胞に対して、殺細胞活性を示していることから、相加的な効果である可能性が拭いきれない。そこで、筆者は Nahta らの手法⁶¹⁾ に従い Herceptin に耐性を有する SKBR-3 細胞 (SKBR-3HR) を作製した。すなわち、SKBR-3 細胞を 8 µg/mL の Herceptin 含有培地で 3 ヶ月間継代することで、Herceptin に耐性を有する SKBR-3 細胞 (SKBR-3HR) を獲得した。耐性の機序については不明であるが、Flow cytometry (Figure 25) により細胞表面の HER2 抗原量を測定したところ、HER2 抗原のダウンレギュレーションが起きておらず、抗原発現量が維持されていることを確認した。

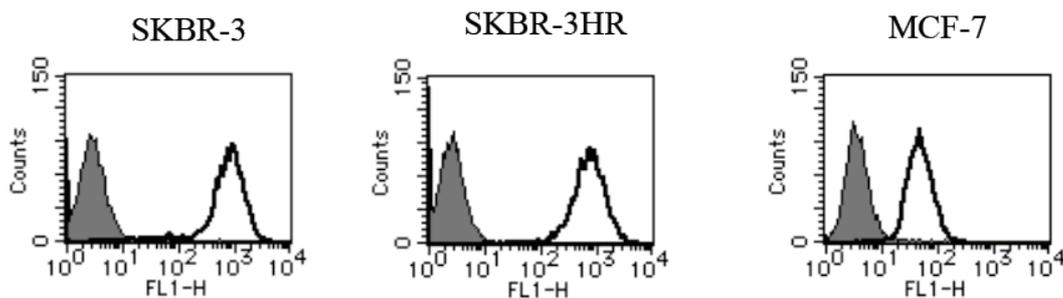


Figure 25. Flow cytometric analysis of HER2 antigen expression in SKBR-3, SKBR-3HR and MCF-7 cells. The expression of HER2 is shown as a solid line. The gray area indicates the negative control.

SKBR-3HR 細胞に対し、殺細胞活性評価を行なった (Figure 26)。本評価系においては通常の IgG 含有の FBS を用い、ネガティブコントロールとして合成した抗体への結合能を示さない Plinabulin-SS-Z33(retro) **65** についても同様に殺細胞活性評価を実施した。SKBR-3HR は SKBR-3 と比較して、Herceptin 単独での細胞生存率が期待通り向上した。一方で、Herceptin と架橋体 **64** を共存させた場合において、通常の SKBR-3 細胞に対しても観察されたように殺細胞活性の増強が確認できた ($p < 0.005$)。すなわち、相加的な活性ではなく、架橋体 **64** が抗体と複合体を形成することによって引き起こしている活性である。また、抗体結合能を持たない Plinabulin-SS-Z33(retro) **65** では、殺

細胞活性の向上がほとんど見られなかったことから、架橋体 **64** は抗体結合ペプチドの抗体親和性に依存して、殺細胞活性を示していることが示唆された。

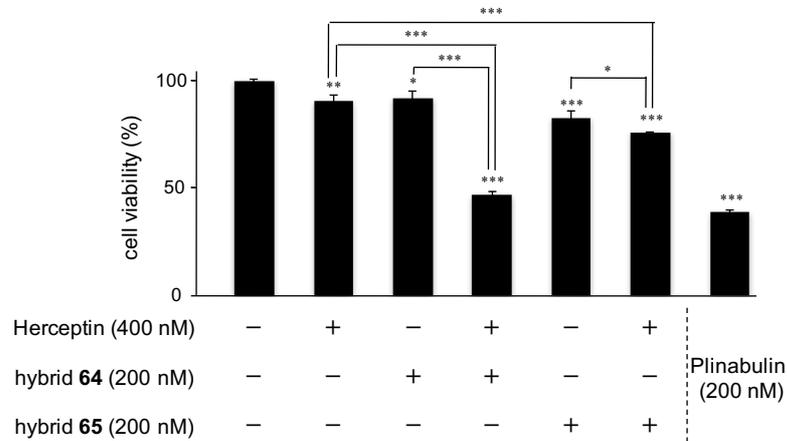


Figure 26. Cytotoxicity of Noncovalent-type ADC, complex of hybrid **64** or its retro-sequenced derivative **65**, against SKBR-3HR cells using the medium containing 10% of normal FBS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

第五節 他の抗体への応用

抗体の isotype の違いによる影響を評価すべく、anti-CD71 antibody (mouse IgG_{2a}) である 6E1 抗体⁶²⁾ を用い、前節と同様の評価を実施した (Table 6)。表面プラズモン共鳴法により、6E1 抗体への結合能を評価したところ、Plinabulin-SS-Z33 架橋体 **64** は $K_d = 4.5 \mu\text{M}$ と低い値を示した上、Z33 ペプチド自体も親和性は低いものであった ($K_d = 240 \text{ nM}$)。Protein A は mouse IgG に強く結合するとされているが^{47c)}、Z33 ペプチドの元となった B-domain は mouse IgG に対する結合力がすでに弱いことが知られており、⁶³⁾ その性質を Z33 ペプチドも有していることが明らかとなった。

human IgG₁ と mouse IgG_{2a} の Fc 部位の構造の違いを X 線結晶構造 (PDB: 1FC2⁵¹⁾, 3ZO0⁶⁴⁾) を基にした分子モデリングにより比較し、Z33 ペプチドの親和性の違いについて考察した。これらの抗体における Z33 ペプチド結合部位周辺の配列相同性は比較的高いものであった (配列相同性: 61%)。続いて、抗体表面の電荷を分子モデリングソフト (MOE, Molecular Operating Environment) により解析した結果を Figure 27 に示す。赤色が負の電荷であり、青色が正の電荷、緑色が疎水領域を示している。human IgG₁ では 315 番目のアミノ酸がアスパラギン酸であり、負電荷 (赤色) が抗体表面に存在しており、Z33 ペプチドの 24 残基目のアルギニンと静電的な相互作用を形成している (Figure 27 左)。一方、mouse IgG_{2a} において対応するアミノ酸残基は中性のセリンになっており、この電荷が消失している (Figure 27 右)。そのため、Z33 ペプチドとの相互作用が弱くなり、親和性の低下を招いたとが考察した。

Table 6. Binding kinetics for 6E1 (mouse IgG_{2a}) antibody.

	k_{on} (1/Ms $\times 10^6$)	k_{off} (1/s $\times 10^{-3}$)	K_d (nM)
Z33	0.67 ± 0.006	162 ± 0.75	240 ± 2.4
Cys-Gly-Z33	0.38 ± 0.004	50 ± 0.27	130 ± 1.6
Plinabulin-SS-Z33 (64)	N.D. ^a	N.D. ^a	4500 ± 560^b

^aN.D.: not determined, ^bcalculated by steady state analysis.

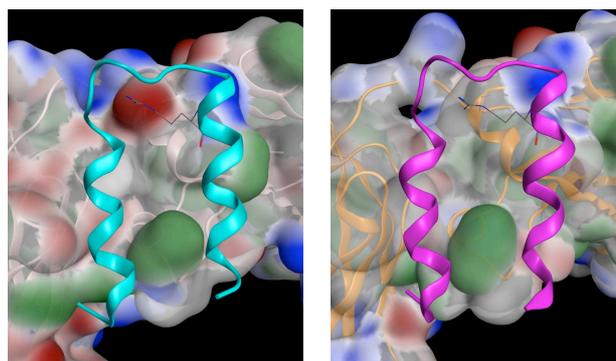


Figure 27. Structural models of the Z33 peptide binding to human IgG₁ (left) and mouse IgG_{2a} (right). Modeling study was performed on the basis of X-ray co-crystal data between human IgG₁ and B-domain of protein A (PDB: 1FC2)⁵¹⁾ and at the Z33 binding site of mouse IgG_{2a} (PDB: 3ZO0)⁶⁴⁾ using MOE software. Z33 peptide is shown as blue (left) and magenta (right) ribbons. Antibody surface is shown in red (negative charge), blue (positive charge) and green (hydrophobic core) colors.

架橋体 **64** は 6E1 抗体との親和性は弱いものの抗体-架橋体間の相互作用は確認できたことから、前節と同様に細胞実験を実施した (Figure 28)。細胞は CD71 抗原を発現しているヒトメラノーマの A375 細胞を用いた。本細胞は、SKBR-3 や MCF-7 細胞と比較して細胞の増殖が早いため、化合物で処理した後、24 h で WST-1 試薬による細胞生存率の評価を行なった。6E1 抗体は Herceptin と異なり抗体単独では殺細胞活性を示さないことが知られている。⁶²⁾ 架橋体 **64** による殺細胞活性が若干観察される濃度域において、評価を行なったところ、6E1 抗体の添加時において、その殺細胞活性の向上が観察された。すなわち、弱い抗体親和性であっても、架橋体 **64** は 6E1 抗体と非共有結合的な抗体薬物複合体を形成し、抗原選択的な殺細胞活性を示した。

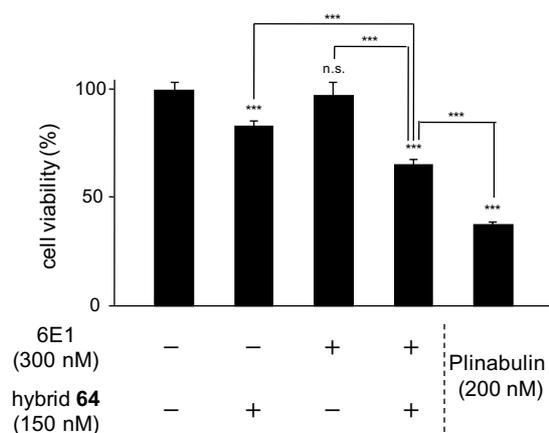


Figure 28. Cytotoxicity of NC-ADC, complex of hybrid **64** and 6E1 against A375 cell. n.s.: not significant, *** $p < 0.005$. Data ($n = 3$) are shown as means \pm SD.

第六節 小括

第二章では、Plinabulin (2) への腫瘍指向性の付与を目的として、抗体結合ペプチド (Z33) による抗体と非共有結合的な複合体形成を目指した。第一章と同様に CuAAC 反応により Plinabulin と抗体結合ペプチドの架橋体合成を試みたが、これらの化合物は物性が大きく異なるため、同時に溶解できる溶媒がなく、通常の液相法による架橋体合成は困難であった。そこで、Npys-Cl 樹脂 53 を用いた固相ジスルフィド架橋法 (SPDSL) を開発することで、Plinabulin-SS-Z33 架橋体 64 を獲得することに成功した。得られたジスルフィド架橋体 64 は抗体と複合体を形成し、非共有結合型の ADC を獲得することに成功した (human IgG₁: $K_d = 46.6$ nM, mouse IgG_{2a}: $K_d = 4.5$ μ M)。この ADC は *in vitro* の評価系において、抗体単独や架橋体 64 単独と比較して、より強い細胞毒性を発揮し、抗体依存的な殺細胞活性を示した。すなわち、抗体と架橋体を単に混合するだけという簡便な手法により、抗体薬物複合体を形成することに成功し、架橋体 64 は腫瘍指向性プロドラッグとして機能することが示唆された。

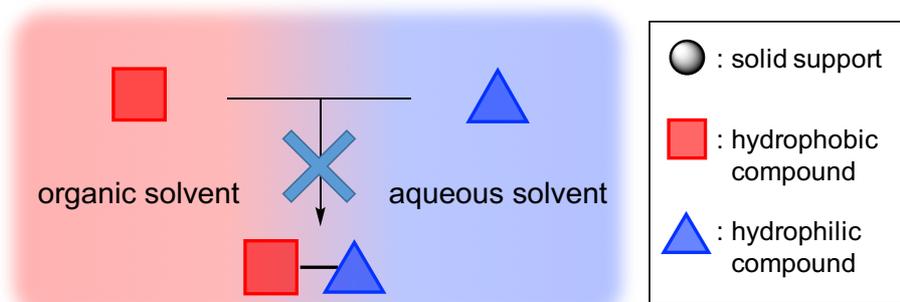
以上のように、抗体結合ペプチドを用いた Plinabulin の非共有結合型 ADC は、*in vitro* 系での評価において抗原選択的な殺細胞活性を示したが、生体内では抗体から解離する可能性があるため、その実用性に関しては未知である。しかし、抗体と共存させることで複合体を容易に形成するという特徴を有していることから、例えば、患者に投与する直前に架橋体 64 を抗体に混注することで、異なる標的に作用する複数の抗体と ADC を形成できたり、抗体と薬物を別々に投与することで、体内において ADC を形成したりといったことも可能になるかもしれない。また、一方で、抗体結合ペプチドの構造中に近接時のみに反応する官能基を導入することで、Fc 部位特異的に共有結合的に薬物を担持することも可能である。実際、いくつかの研究グループでこのような展開が実施されていることから⁶⁵⁾、今後も抗体結合ペプチドを用いた抗体薬物複合体の研究が幅広く展開されることを期待する。

第三章 固相ジスルフィド架橋法による難水溶性薬物-水溶性化合物の架橋体合成

序説

第二章での架橋体合成において経験したように、物理化学的な性質（特に反応溶媒への溶解性）が高度に異なる化合物同士の反応は困難な場合がある。⁶⁶⁾ 一般的な有機反応は適切な反応溶媒を用いる必要があり、溶媒の選択が間違っていたり、反応基質が溶媒に適していなかったりする場合に反応は進行しない。溶解性の異なる化合物同士を反応させる場合、二つの基質および試薬が溶解可能な混合溶媒を探索し使用することや、相間移動触媒などを利用し水層と有機層の二層系での反応が検討される (Figure 29A)。しかし、莫大な数の条件検討が必要になる場合や、結局のところ合成できない場合も考えられる。近年では、抗体薬物複合体 (Antibody-drug conjugate, ADC)¹⁵⁾ やペプチド薬物複合体 (Peptide-drug conjugate, PDC)¹⁶⁾ のみならずケミカルバイオロジー分野においても、水溶性の乏しい小分子とペプチドやタンパク質といった水溶性の高分子との架橋体合成が実施されており⁶⁷⁾、物性の大きく異なる物同士の反応の需要は高まっている。

A) conventional method



B) this method

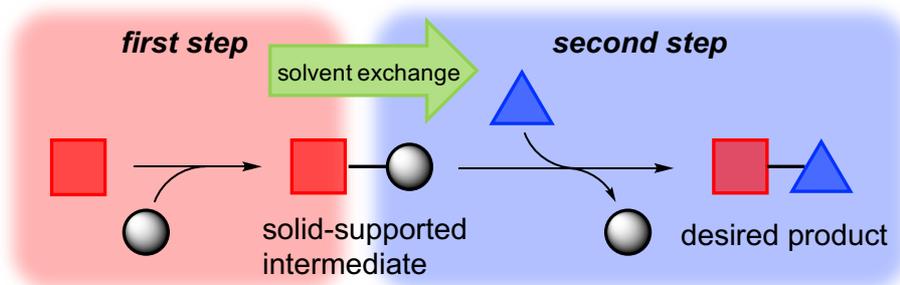
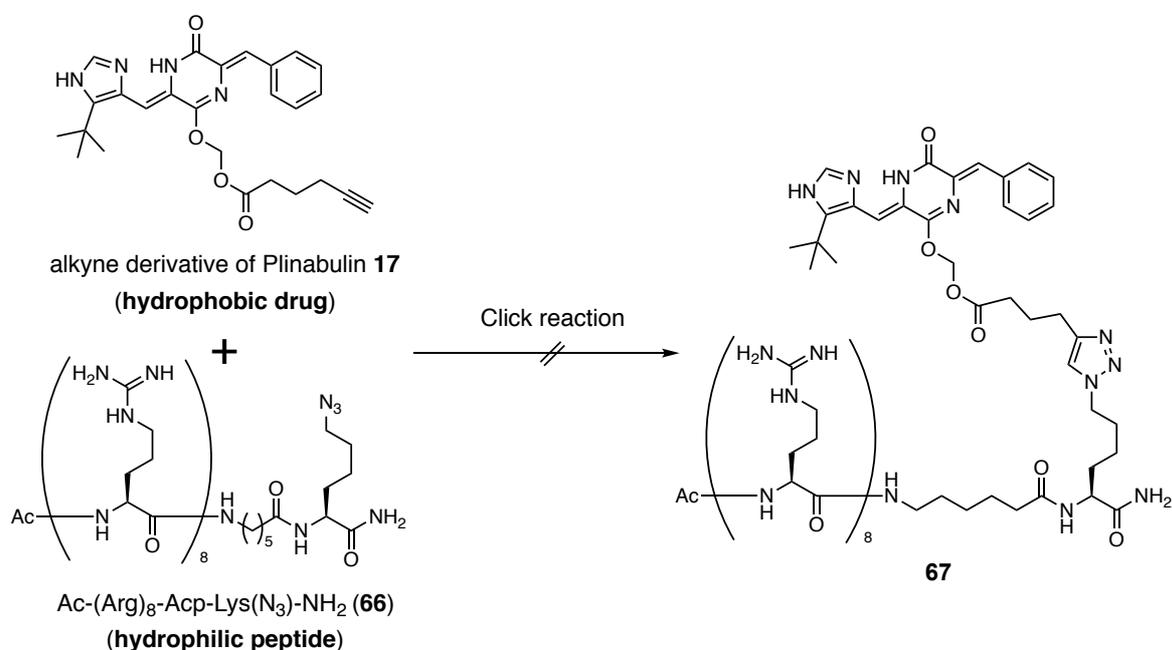


Figure 29. Conjugation reaction between hydrophobic and hydrophilic components: A) in solution-phase and B) *via* solid-phase.

第二章で考案した固相ジスルフィド架橋法（SPDSL）は両親媒性の固相担体 ChemMatrix[®] resin を介した one-pot 二段階反応である（Figure 29B）。本手法は、固相担体を介した新しい架橋体合成手法であり、反応を固相上で行うことで、基質に適した溶媒系を選択することができる。すなわち、このコンセプトに基づき反応を検討することで、これまでに合成困難であった架橋体も得られる可能性がある。本技術の確立は今後の医薬品開発を目指した架橋体合成における発展の一助となることが期待されるものの、汎用性および適応可能な反応条件に関する知見が少ない。そこで、本章では難水溶性薬物-水溶性ペプチド架橋体の合成を介して反応条件の最適化を実施することとした。

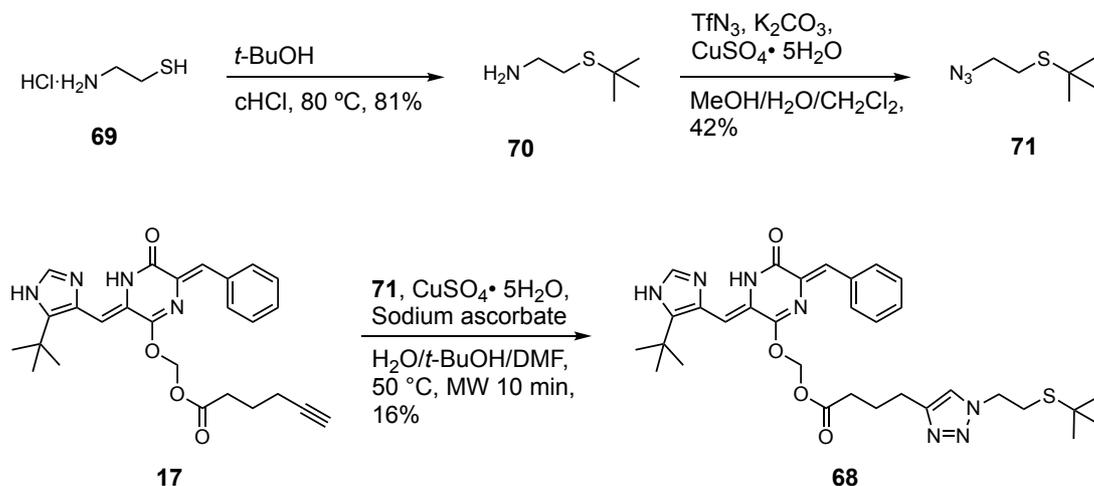
反応の条件検討に際して、反応基質として難水溶性薬物である Plinabulin と水溶性ペプチドであるオクタアルギニン（Arg₈）を選択した。オクタアルギニンは、8つのアルギニン残基から構成される細胞膜透過ペプチド（Cell penetrating peptide, CPP）であり、高度に水溶性であることが知られている。⁶⁸⁾ まず初めに、アジド基を有するオクタアルギニン **66** を合成後、液相系での一般的な架橋法である CuAAC 反応を行なった（Scheme 15）。しかし、この反応は進行せず目的である架橋体 **67** を得ることはできなかった。すなわち、Plinabulin とオクタアルギニンの架橋体は液相で合成困難な分子であり、SPDSL 法の有用性の証明に適したモデル化合物である。



Scheme 15. Failed synthetic strategy of plinabulin-octaarginine conjugate by CuAAC reaction.

SPDSL 法は、基質がスルフィド誘導体とチオール含有化合物でなければならないことから、それぞれの反応基質を合成した。第二章で用いた Plinabulin の *p*-methoxybenzyl sulfide 誘導体 **62** は HPLC における精製中においても分解が進行するほど安定性に乏しく、低温での保存においても徐々に分解することから、反応条件を検討する上で適していない。そこで、チオールの保護基をより嵩高い *t*-butyl へと変更した誘導体 **68** を合成することとした。

まず、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩 **69** のチオールを *t*Bu 基で保護し、化合物 **70** とした後に、アミンをアジドへと変換することでスルフィド構造を有するアジド誘導体 **71** を合成した (Scheme 16)。得られたスルフィド **71** とアルキン体 **17** をこれまでと同様の条件で CuAAC 反応を行い、HPLC にて精製を行なった。本反応において、出発物質であるアルキン体 **17** と生成物 **68** の逆相 HPLC における分離が十分ではないため、収率は低いものとなったが、Plinabulin のスルフィド誘導体 (**68**) を 16% の収率で合成した (Scheme 16)。本化合物は精製過程および $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ での保管において少なくとも 1ヶ月は安定であったことから、反応条件の検討に用いることとした。一方で、SPDSL 反応の二段階目に用いるチオール含有オクタアルギニンペプチド (Ac-Arg₈-Acp-Cys-NH₂, **72**) は Fmoc 固相ペプチド合成法により合成することで、30% の収率で得た。

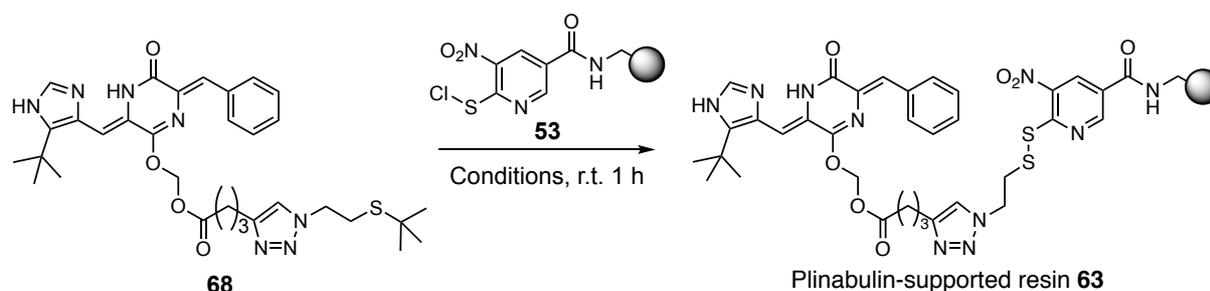


Scheme 16. Synthesis of sulfide derivative of Plinabulin **68**.

第一節 活性ジスルフィド体合成における条件検討 (First step)

SPDSL 反応の一段階目として、合成した Plinabulin スルフィド誘導体 **68** と Npys-Cl 樹脂 **53** との反応における至適溶媒を検討した (Table 7)。分析 HPLC を用いて反応 1 時間後におけるスルフィド **68** の消失率より反応効率を評価した。その結果、CH₃CN、CH₂Cl₂、CHCl₃ を溶媒として用いた際にスルフィド **68** は反応一時間後に溶液中から完全に消失した (Table 7, Entry 1-3)。すなわち、溶液中のスルフィド **68** が樹脂と反応し、Plinabulin 担持樹脂 **63** が得られた。一方で、DMF やメタノールのような溶媒を用いた場合の消失率は低いものであった (Entry 4, 6)。

Table 7. Reaction conditions for the first step of the SPDSL reaction.



Entry	Solvent	Resin (eq.) ^a	Disappearance level of 68 (%) ^b	DN (kcal/mol) ^c
1	CH ₂ Cl ₂	5	100	1
2	CHCl ₃	5	100	4
3	CH ₃ CN	5	100	14.1
4	CH ₃ OH	5	64	19
5	THF	5	74	20
6	DMF	5	42	26.6
7	DMSO	5	80	30.9
8	CH ₃ CN	2	98	14.1
9	CH ₃ CN	1.1	80	14.1

^aEq. of resin **57** against sulfide **68**, ^bThe disappearance level was calculated by the following formula; $(1 - [\text{peak area of } \mathbf{68} \text{ after } 1\text{h}]/[\text{peak area of } \mathbf{68} \text{ at } 0 \text{ h}]) \times 100$, ^cDonor number.⁶⁹⁾

Table 7 の結果に関して、代表的な溶媒パラメーターとしてドナー数 (Gutmann's donor number, DN)⁶⁹⁾、アクセプター数 (Gutmann's acceptor number, AN)^{69a)}、誘電率⁷⁰⁾ についての相関を調べた (Figure 30)。その結果、AN や誘電率では相関が得られなかったのに対して、DN において負の相関が得られることが明らかとなった (Figure 30A)。DN はルイス塩基性の指標でありカチオンの安定化に寄与する。推定される反応機構 (Scheme 17) では、スルフィド **68** の硫黄原子が樹脂上の Npys-Cl の硫黄原子を攻撃することで反応が始まる。その後、スルフリルカチオン中間体となり、*t*Bu カチオンが脱離することで、反応が進行する。通常、硫黄原子に結合する *t*Bu 基の脱離は起きにくく、親硫黄性の極めて高い水銀などを添加することで初めて脱離する保護基である。⁷¹⁾ そのため、用いる溶媒の DN が高いほど、スルフリルカチオン中間体が安定化され、*t*Bu 基の脱離が生じにくく、反応効率が低下する結果が得られたものと考察している。一方で、DMSO が近似直線から外れた性質を示すが、他の溶媒との大きな違いは DMSO の硫黄原子がソフトな求核性を有することである。実際にスルホキシドを添加することで *t*Bu の脱離が促進されるということがこれまでに報告されていることから、この性質が何かしらの影響を与えていることが考えられる。⁷²⁾

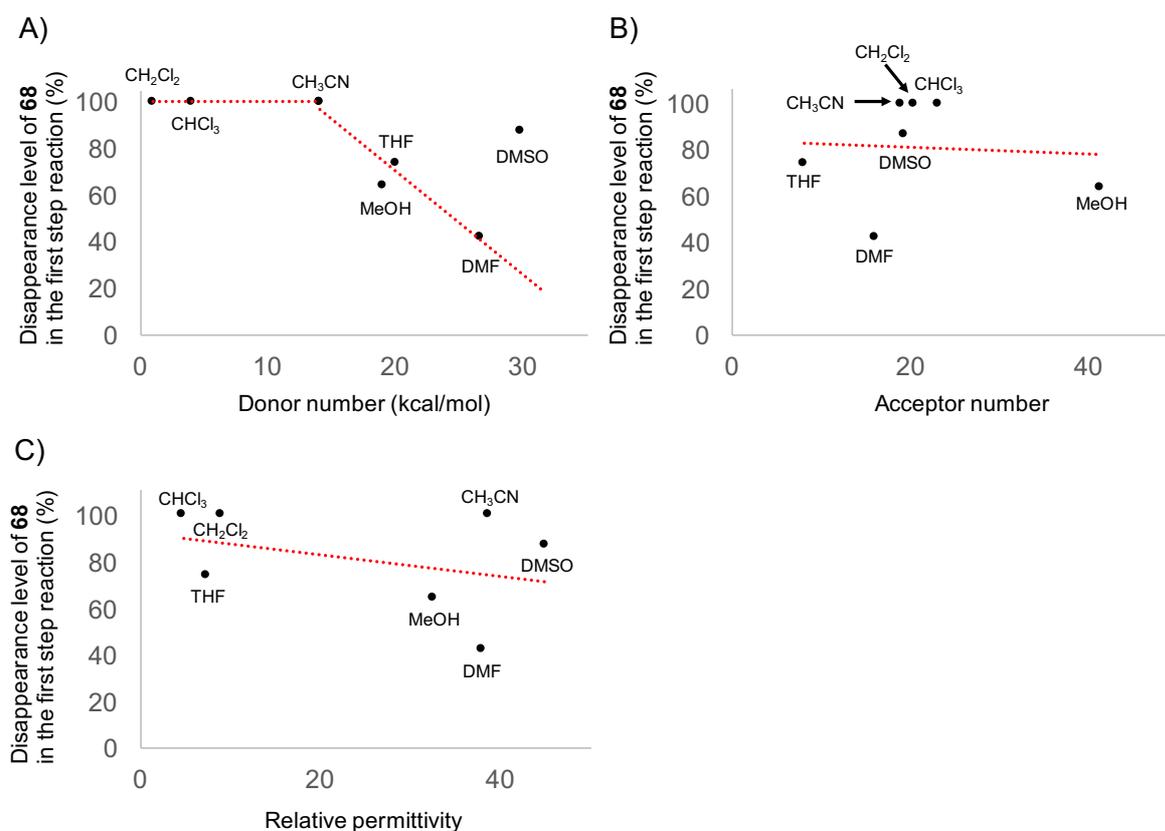
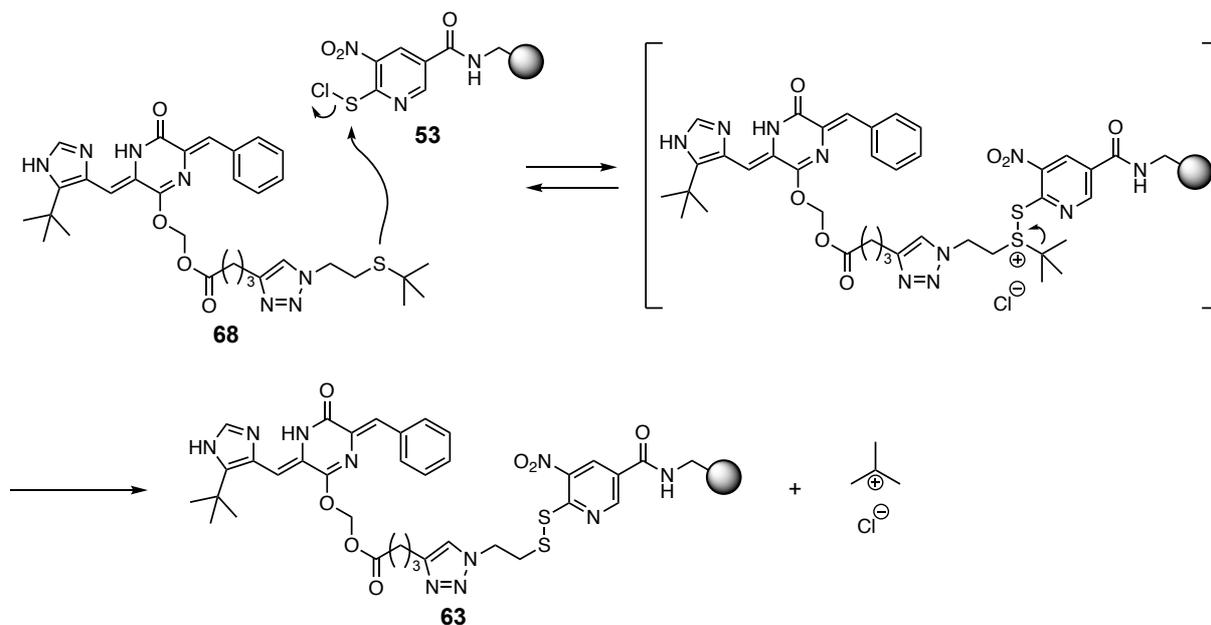


Figure 30. Relationship between disappearance level of **68** in the first step and (A) Gutmann's donor number⁶⁹⁾, (B) Gutmann's acceptor number^{69a)}, (C) relative permittivity⁷⁰⁾.



Scheme 17. Reaction mechanism of first step *via* a sulfuryl cation intermediate.

また、これまでに筆者の研究室が報告している 90%ギ酸水溶液中における Npys-Cl 樹脂 **53** を用いたペプチド間の架橋反応では 5 当量の樹脂 **57** が必要とされていた。⁵⁷⁾ しかし、アセトニトリル溶媒中では樹脂の使用量を 2 当量まで下げても反応が完結することが明らかとなった (Table 7, entry 8 and Figure 31)。含水条件では、系中に存在する水が樹脂上の Npys-Cl を徐々に水解させてしまっているため過剰量が必要となったと考察している。SPDSL 反応は one-pot 反応であるため、次節の Second step の条件検討においては、CH₃CN 溶媒によって得た樹脂 **63** (Table 7, Entry 3 or Entry 8) を用いることとした。

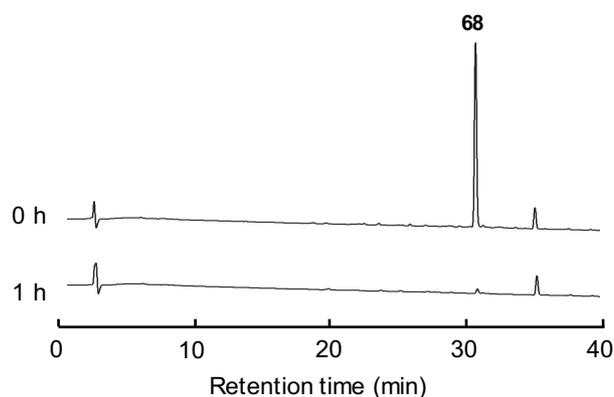
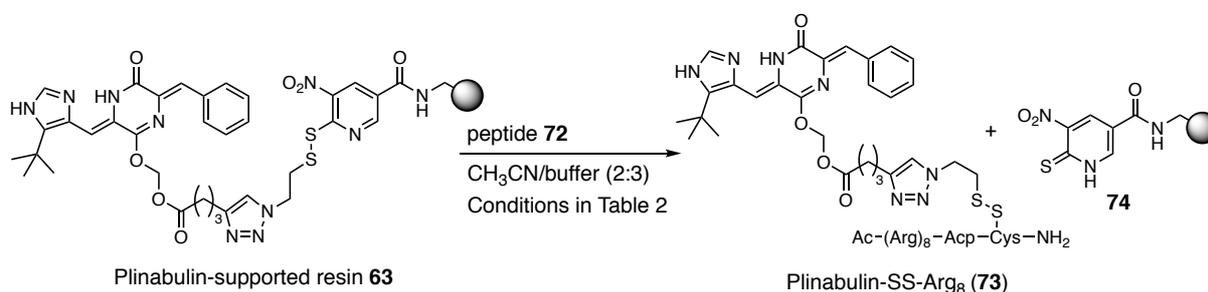


Figure 31. HPLC conditions are a linear gradient starting from 5% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA to 85% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA, over 40 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm.

第二節 ジスルフィド交換反応における条件検討 (Second step)

前節の検討で得られた Plinabulin 担持樹脂 **63** (第二節、Table 7, Entry 3 or Entry 8) をアセトニトリル、および水で洗浄後、第二段階である水系溶媒中でのジスルフィド交換反応の条件を検討した (Scheme 18)。チオール含有オクタアルギニンペプチド (Arg₈-SH, **72**) はスルフィド **68** に対して 0.9 当量使用した。反応溶媒には生成物を溶解するために、架橋体 **73** の逆相 HPLC における溶出濃度である 40%アセトニトリル水溶液を用いた。



Scheme 18. Second step reaction of the SPDSL reaction.

まず初めに、pH 非調整条件である 40% CH₃CN/H₂O 溶媒における反応を実施した。しかし、この反応の進行には時間がかかり、3 時間時点において HPLC 上で目的物が 7%生成しているが (Table 8, Entry 1)、5 日経過しても反応は完結しなかった。また、長時間の水溶液中での反応により、Plinabulin プロドラッグのエステル構造が加水分解され、親化合物の再生が観察された。プロドラッグは親化合物を再生する機構を有しており、不安定であるため、本反応の速度を速める必要がある。そこで、水系溶媒を緩衝液へと変更することで、pH を調節し、反応の加速を図った。

緩衝液 (50 mM sodium acetate (pH3.8, 4.5, 5.0 and 5.6) or 50 mM sodium phosphate (pH7.4)) : CH₃CN = 3 : 2 の各溶媒条件で反応を行い、分析 HPLC により反応 3 時間後における化合物 **73** の HPLC 収率から反応効率を評価した (Table 8)。その結果、pH5.0 acetate buffer では樹脂 2 当量、樹脂 5 当量どちらも反応 3 時間後に HPLC 上でペプチドのピークが消失し、高い反応効率により目的物が得られた (Figure 32A, Table 8, Entry 4 and 9)。樹脂 5 当量では pH 依存性を確認することができたが樹脂 2 当量ではその性質はほとんど消失した (Figure 33)。また、pH7.4 での反応では目的物の収率が芳しくないものの、チオールフリーのペプチド (Arg₈-SH) も消失する結果となった (Figure 32B, Table 8, Entry 6 and Entry 12)。このように本反応は反応系の pH に大きく

影響を受けることが明らかとなった。また、Entry 5 では緩衝液の塩濃度を上げ、1 M sodium acetate (pH 3.8) にしたところ 50 mM sodium acetate (pH 3.8) (Entry 2) と比較し HPLC 収率が上昇したことから、反応の促進に高い塩濃度が有効であることが明らかとなった。

Table 8. Reaction conditions for the second step of the SPDSL reaction.

Entry	From Table 7	Aqueous solvent	Yield (%)
1	Entry 8	Non-buffered water	7
2	Entry 8	50 mM sodium acetate (pH 3.8)	82
3	Entry 8	50 mM sodium acetate (pH 4.5)	81
4	Entry 8	50 mM sodium acetate (pH 5.0)	91
5	Entry 8	50 mM sodium acetate (pH 5.6)	75
6	Entry 8	50 mM sodium phosphate (pH 7.4)	7
7	Entry 3	50 mM sodium acetate (pH 3.8)	13
8	Entry 3	50 mM sodium acetate (pH 4.5)	50
9	Entry 3	50 mM sodium acetate (pH 5.0)	60
10	Entry 3	50 mM sodium acetate (pH 5.6)	27
11	Entry 3	1 M sodium acetate (pH 3.8)	43
12	Entry 3	50 mM sodium phosphate (pH 7.4)	15 ^b

^aHPLC yields are calculated from the area in analytical HPLC after 3 h on the basis of the amount of octaarginine peptide **72**, ^bHPLC yield after 1 h.

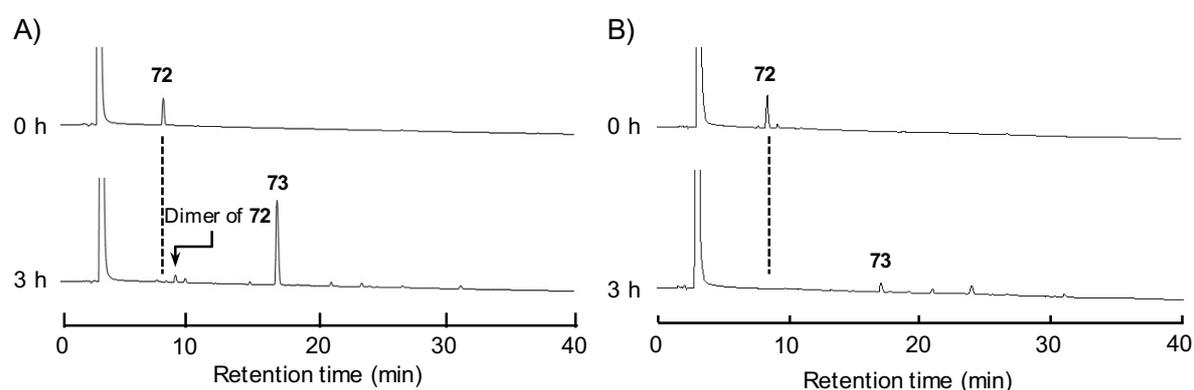


Figure 32. HPLC chromatograms of second step in the condition of (A) Table 8, Entry 4 and (B) Entry 6, HPLC conditions are a linear gradient starting from 5% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA to 85% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA, over 40 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm. *unidentified by-product.

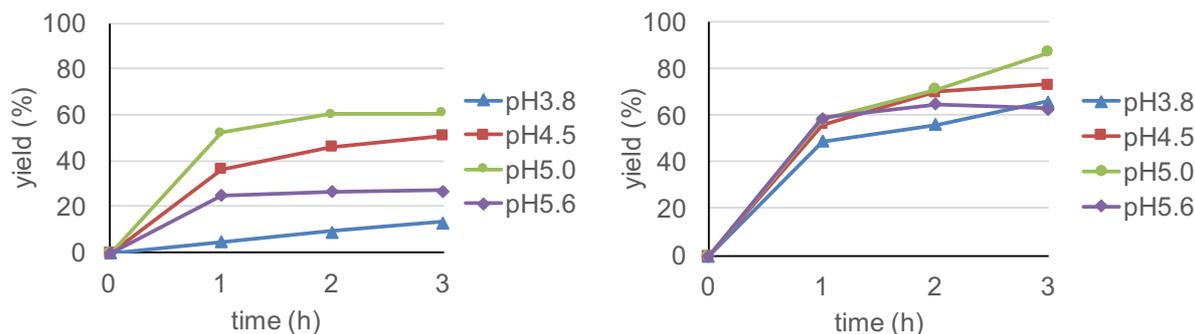
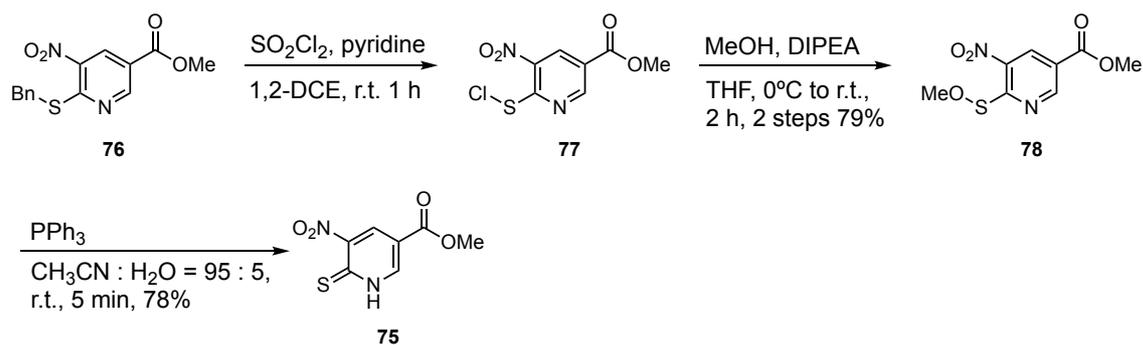


Figure 33. Time course of the yield of Plinabulin-SS-Arg₈ **73** in the second step reaction using (A) 5 equiv. of Npys resin and (B) 2 equiv. of Npys resin.

二段階目の反応において観察された pH 依存性は、一段階目において用いた樹脂が 5 当量の際に顕著であることから、反応後の樹脂上の副生成物 **74** が影響を与えている可能性が考えらる。

化合物 **74** は樹脂上の構造であるため、モデル化合物としてチオピリドン **75** を別途合成した (Scheme 19)。すなわち、Npys-Bn 樹脂の合成中間体であるベンジルスルフィド体 **76** を塩化スルフリルによりクロロスルフェニル化し、Npys-Cl **77** とした後に、diisopropylethylamine 存在下においてメタノールを反応させることでメチルスルファネート体 (**78**)⁷³⁾ を 79% の収率で合成した。その後、スルフェン酸エステル構造をトリフェニルホスフィンで還元することで、チオピリドン **75** を得た。⁷³⁾



Scheme 19. Synthesis of the model compound **75**.⁷³⁾

得られたチオピリドン **75** を酢酸エチルに溶解し、各 pH の緩衝液で分液操作を行った後、水層と有機層における **75** の存在率を HPLC で測定することで化合物 **75** の pKa を簡易的に算出した。その結果、Figure 34 に示すシグモイド曲線が得られた。これを

Kaleidagraph 4.5 で解析することで、およそ 7.3 の pKa を示すことが明らかとなった。すなわち、二段階目の反応において pH7.4 のリン酸緩衝液を用いると、反応後に生成する樹脂 **74** の約半分が電離し、アニオンとなる。そのため、高度にカチオン性の分子である Arg₈ が樹脂に非特異的に吸着してしまい、ペプチドと生成物の両方とも HPLC で確認できなかつたと考えられる。すなわち、SPDSL の二段階目においては、樹脂上の副生成物 **74** が電離しにくい pH5.0 以下での反応が適していることが示唆された。

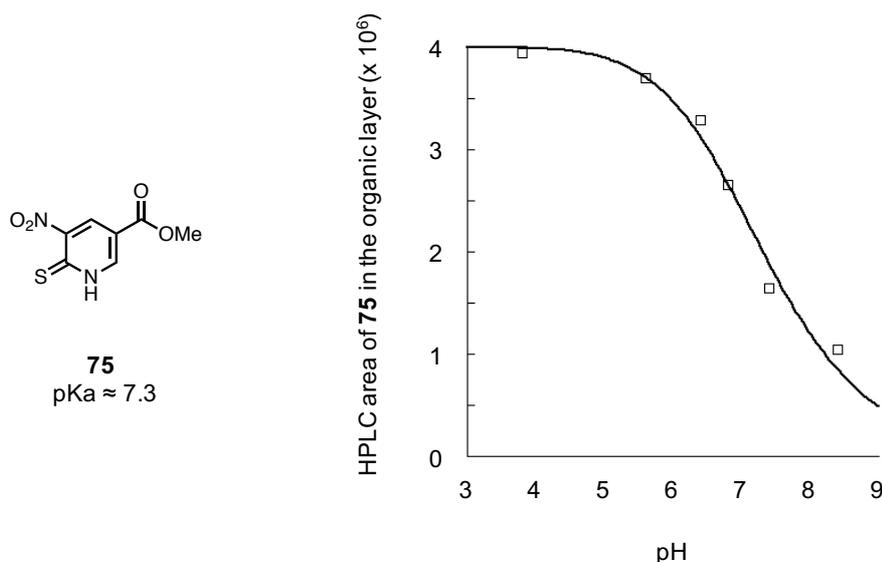


Figure 34. Evaluation of ionized property of thiopyridone **75**. The pKa value of **75** was determined as 7.3 on the basis of the sigmoidal curve, which was plotted by KaleidaGraph 4.5.

Plinabulin は 365 nm の紫外光を照射すると緑色の蛍光を発するため、SPDSL の二段階反応は肉眼でも反応の進行を確認することができる。一段階目の反応 0 h において、Plinabulin 構造が溶液中に存在しているため、紫外光を照射することで蛍光が観察できるが、この蛍光は反応 1 h 後に溶液中から消失する (Figure 35A)。すなわち、Plinabulin 構造が樹脂上に担持され、樹脂 **63** が得られたと考えられる。二段階目の 0 h においては溶液中にはペプチド **72** のみが存在するため、蛍光は観察できない。しかし、ジスルフィド交換反応が進行し、Plinabulin 構造が架橋体 **73** として溶液中に切り出されてきた 3 h 後においては、強い緑色の蛍光が観察される (Figure 35B)。このことから、期待通り SPDSL 反応が固相を介して進行していることがわかる。

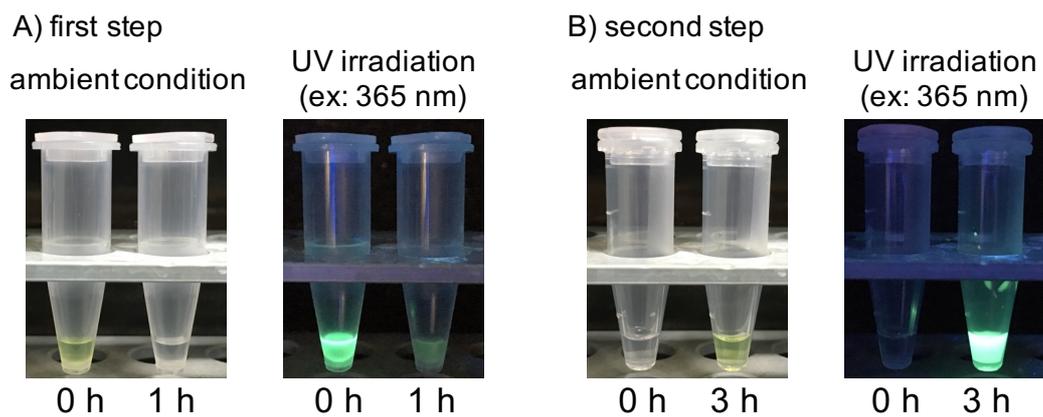
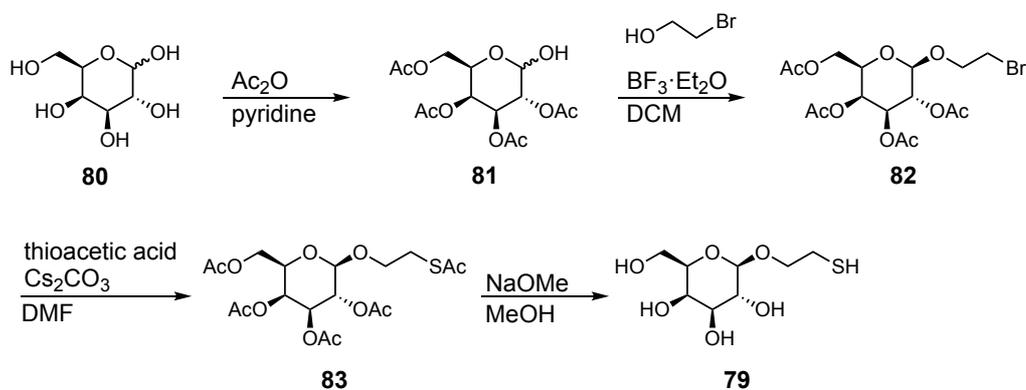


Figure 35. Photographs of the reaction solutions in the A) first and B) second steps (Table 1, Entry 8 and Table 2, Entry 4, respectively). Each solution was filtered to remove the Npys resin, and then a yellow color (ambient conditions) and a green fluorescence (UV irradiation at 365 nm) of plinabulin were observed.

第三節 Plinabulin とチオール含有水溶性化合物の架橋体合成

固相ジスルフィド架橋法 (SPDSL) の汎用性を示すため、第二節の Plinabulin-SS-Arg₈ (73) の合成における最適条件を基に他の機能性ペプチドや単糖のような水溶性分子との架橋反応を実施した。機能性ペプチドとして、1) 腫瘍集積性を有することが知られている D 体のオクタアルギニン (Ac-(D-Arg)₈-Acp-Cys-NH₂)^{16c)}、2) 非イオン化ペプチドとして Gly-Ser の 4 回繰り返し配列のペプチド (Ac-(Gly-Ser)₄-Acp-Cys-NH₂)^{68b)}、3) 第二章で抗体薬物複合体へと利用した抗体結合ペプチド (Cys-Gly-Z33) を用いた。さらに、4) 単糖であるガラクトース誘導体 (79) を別途合成し架橋反応を実施した。ガラクトース誘導体 79 は More らの報告⁷⁴⁾ を基に合成した (Scheme 20)。すなわち、ガラクトース 80 を無水酢酸で処理した後に、ルイス酸である三ふっ化ほう素ジエチルエーテル錯体の存在下、2-ブロモエタノールを反応させ、82 を得た。その後、チオ酢酸による求核置換反応でチオエステル構造を導入し、ナトリウムメトキシドによって加水分解することで、目的のガラクトース誘導体 79 を得た。



Scheme 20. Synthesis of the galactose derivative 79.⁷⁴⁾

SPDSL による Plinabulin と水溶性化合物の架橋体合成における単離収率を Table 9 に示す。結果として、どのペプチドに関しても同程度の単離収率で架橋体を得ることに成功した (entry 1-4, 32-45%)。本反応の主要な副生成物はチオール化合物のホモダイマーであり、特に、Entry 4 の Z33 ペプチドでは他のペプチドとの反応と比較し、ペプチドのダイマー形成が多かったため収率が比較的低いものであったと考えられる。また、第二章での Plinabulin-SS-Z33 64 の合成と比較すると、収率は同程度であるが、反応の完結まで 20 h を要した反応が 5 h まで短縮することに成功した。ペプチドにより

収率や反応条件は若干前後するものの、本手法は様々なペプチドとの架橋体合成にも応用可能であることを示した。さらに単糖との反応においても 29%の収率で目的のガラクトース架橋体が得られた (Table 9, Entry 5) ことから、ペプチドだけでなく他のチオールを有する化合物との架橋体合成も可能であることが明らかとなった。すなわち、本手法は化合物の溶解性によらず様々な分子を架橋することが可能な新規手法である。

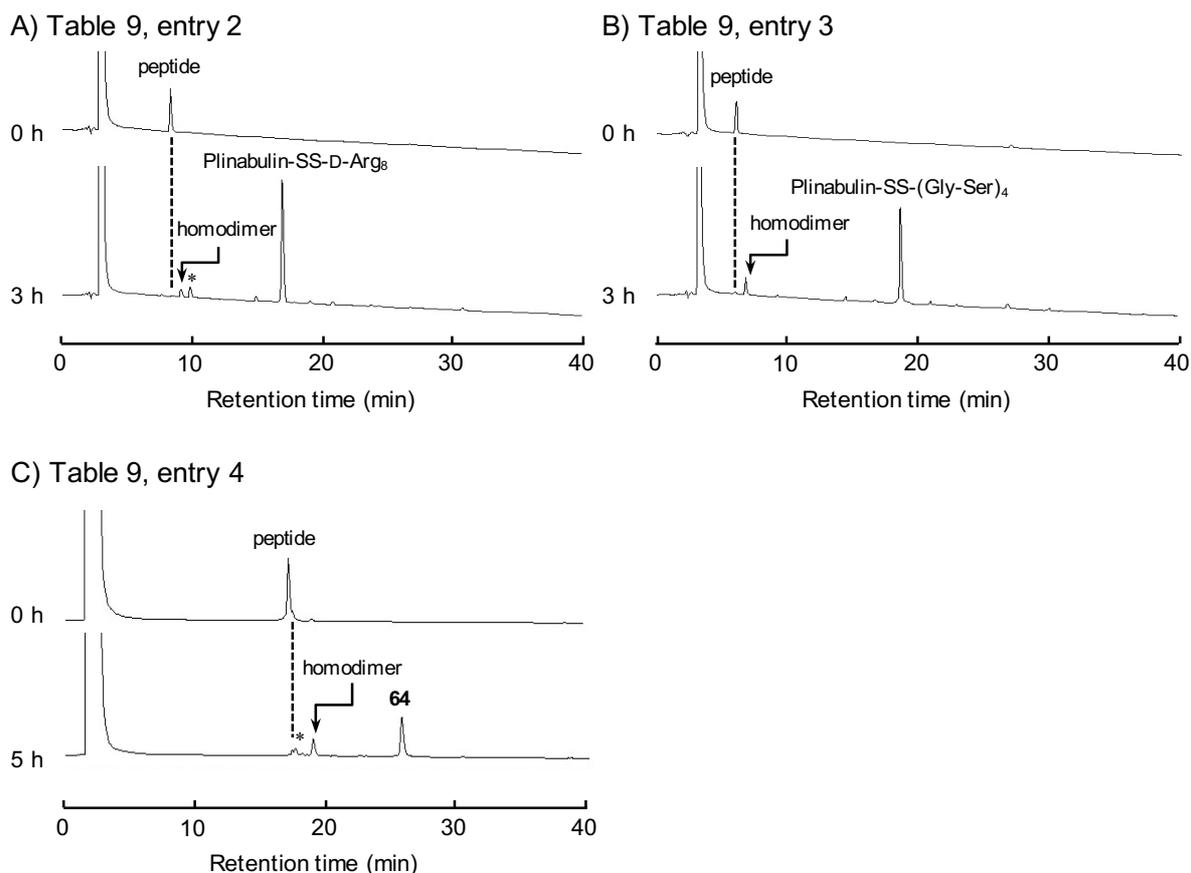


Figure 36. HPLC chromatograms for the synthesis of peptide-drug conjugate. HPLC conditions are a linear gradient starting from 5% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA to 85% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA or 10% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA to 50% CH₃CN in 0.1% aqueous TFA, over 40 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm. *unidentified by-product.

Table 9. Application of SPDSL reaction to the production of other conjugates.

Entry	Thiol containing hydrophilic components	Isolated yield (%)
1	Ac-(L-Arg) ₈ -Acp-Cys-NH ₂	44
2	Ac-(D-Arg) ₈ -Acp-Cys-NH ₂	37
3	Ac-(Gly-Ser) ₄ -Acp-Cys-NH ₂	45
4	H-Cys-Gly-Z33-NH ₂ (pH4.5)	32 ^a
5	Galactose-SH (79) (pH4.5)	29

^a0.75 eq. of peptide was used to directly compare with the previous condition.

第四節 小括

第三章では、Npys 樹脂 **53** を用いた固相ジスルフィド架橋法 (SPDSL) により、有機合成や医薬品開発においてしばしば問題とされる化合物の溶解性に起因する課題の解決を目指した。この SPDSL 法は、1) 難水溶性化合物を有機溶媒中で固相上へ担持する反応と、2) 水系溶媒中で樹脂上の難水溶性構造と架橋体を形成しながら水溶性化合物で切り出す反応の二段階からなる。そのため、この手法はそれぞれの反応段階において基質に適した反応溶媒を用いることができ、架橋反応における物質間の溶解性の問題を克服することができる。難水溶性の Plinabulin (**2**) と水溶性ペプチドであるオクタアルギニンをモデルとして架橋体合成を実施し、反応条件の探索を行った。

一段階目の検討により、溶媒としては CH_3CN 、 CH_2Cl_2 などの Gutmann's Donor Number (DN) の低い溶媒において、反応が効率的に進行し、Plinabulin 担持樹脂 **63** の獲得に成功した。二段階目では、若干の pH 依存性が観察され、反応後に樹脂上に生成するチオピリドン **70** ($\text{pK}_a = 7.3$) が影響していることが示唆された。反応系の pH を 5.0 以下でコントロールすることが望ましく、高い塩濃度により反応が促進されることを明らかにした。得られた至適条件を用いて様々な架橋体の合成を行ったところ、良好な単離収率 (25-45%) で液相系では合成不可能であった架橋体を獲得することに成功した。

このように、固相ジスルフィド架橋法を用いることで、難水溶性薬物 Plinabulin と水溶性化合物の架橋体合成に成功した。このような溶解性の問題はペプチドに限られるものではなく、天然物合成においても問題となる場合があり、本手法はそういった事例に対しても応用可能な概念であると考えられる。

総括

本論文は『チューブリン重合阻害剤 Plinabulin の水溶性および腫瘍指向性プロドラッグの創製研究』と題し、水溶性の極めて低いチューブリン重合阻害剤 Plinabulin ($IC_{50} = 15 \text{ nM}$, 溶解度 $< 0.1 \mu\text{g/mL}$) のプロドラッグ化研究を通し、創薬化学における化合物の溶解性に起因する問題を化学的な視点から三章にわたって述べたものである。

当研究室で創製されたチューブリン重合阻害剤 Plinabulin (**2**) は、現在第 III 相臨床試験が進行中であるが、水溶性が極めて低いことが問題とされている。そこで、第一章では、Plinabulin の水溶性プロドラッグ化研究を展開した。修飾点の限られた Plinabulin であるが、2,5-diketopiperazine (DKP) 環をモノラクチム構造へと変換することでリンカー構造を導入、その後 CuAAC 反応により無保護の水溶性補助基を直接的に導入することで、7 種類の水溶性プロドラッグ合成に成功した。得られたプロドラッグは親化合物と比較して大幅な水溶性の向上を示した ($0.0075\text{-}100 \text{ mg/mL}$)。in vitro におけるエステラーゼ加水分解反応においては、プロドラッグの構造によって幅広い半減期で親化合物を再生し ($t_{1/2} = 0.37\text{-}12 \text{ h}$)、水溶性補助基の構造により半減期をコントロールできることを明らかとした。

第二章では、Plinabulin の水溶性プロドラッグの水溶性補助基を抗体結合ペプチドへと変換し、非共有結合的に抗体と複合体を形成させることで、腫瘍選択的な薬物送達をめざした。初めに、抗体結合ペプチドとして Z33 ペプチドを選択し、Plinabulin と架橋体合成を検討したが、これらの化合物は反応溶媒に対する溶解度が極端に異なるため、目的とする化合物を得ることはできなかった。そこで、Npys-Cl 樹脂 **53** を用いる新規固相ジスルフィド架橋法 (SPDSL) を考案した。この手法は、1) 難水溶性化合物を有機溶媒中で固相上へ担持する反応と、2) 水系溶媒中で樹脂上の難水溶性構造を水溶性化合物で架橋体を形成しながら切り出す反応の one-pot 二段階反応である。Npys-Cl 樹脂 **53** には両親媒性の Chem Matrix[®] resin を用いているため、各反応段階において、反応基質に適した溶媒系を選択可能であり、溶解性の非常に異なる化合物同士の架橋反応に対して適用できる。本手法を用いることで、難水溶性薬物 Plinabulin と水溶性 Z33 ペプチドのジスルフィド架橋体 **63** を獲得することに成功した。架橋体 **63** は Herceptin (抗 HER2 抗体, ヒト IgG₁) に対して $K_d = 46.6 \text{ nM}$ の親和性で結合し、非共有結合的な抗体薬物複合体を形成し、抗原発現細胞に対して選択的な殺細胞活性を示した。本架橋体の医薬品としての開発を考えた場合、体内で解離する可能性が考えられ、今後検証すべき項目は多くあるが、抗体と架橋体を混合するのみで ADC を形成する点は特筆すべきであり、今後のさらなる発展を期待する。

第二章で示したように、物質間の溶解性の差が大きい場合、有機反応は進行しない

ことがあり、架橋体合成において数多くの条件検討を要求するか、結果として目的物を合成できないことがある。特に近年では、ADCを代表として、水溶性の乏しい小分子とペプチドやタンパク質といった水溶性の高分子との架橋体合成が実施されており、物性の大きく異なる物同士の反応の需要は高まっている。第二章で考案した SPDSL はこれらの需要に応えうる新たな概念である。そこで、第三章では、難水溶性薬物 Plinabulin と水溶性ペプチドのオクタアルギニンの架橋体をモデル化合物として、反応条件の最適化および汎用性の検討をした。固相上に難水溶性化合物を担持する一段階目では、溶媒として CH₃CN、CH₂Cl₂ などの Donor Number (DN) の低い溶媒が適していた。二段階目の検討では、各種緩衝液を用いて最適 pH (3.8-7.4) の検討を行ったところ、pH5.0 において最も効率よく反応が進行した。二段階目において観察された pH 依存性は、反応後の副生成物である樹脂上のチオピリドン (pKa = 7.3) が影響していることが示唆された。これらの知見を基に様々なペプチドと Plinabulin の架橋体合成を行ったところ、液相系では合成が難しい難水溶性薬物-水溶性化合物の架橋体を合成することに成功した (単離収率: 29-45%)。本反応は反応基質の溶媒への溶解性に依存せず、様々な架橋体を合成できるため、これまで合成することのできなかったハイブリッド分子を提供する新たな手法である。このような溶解性に起因する問題はペプチドに限られるものではなく、小分子の医薬品開発や天然物の全合成においても問題となり得る。本手法はそういった事例に対しても応用可能な概念であり、今後、この概念が有機合成化学および臨床薬学において幅広く応用されることを期待する。

ここまで述べてきた化合物の溶解性に関する研究は、メディシナルケミストリー分野において、プロドラッグの創製を行う上で極めて重要な知見であり、医薬品開発における一助となるものと考えている。加えて、溶解性の異なる分子間の架橋反応は多くの研究分野における課題であり、これまでに合成することのできなかった機能性分子と薬物のハイブリット分子創出にも応用できるものと期待する。本研究の成果を通じ、科学の発展や医薬品開発において貢献できれば幸いである。

2018 年 1 月

六車共平

実験の部

実験材料

合成試薬および溶媒は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、渡辺化学工業株式会社 (Hiroshima, Japan)、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)、関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。

Fmoc 固相ペプチド合成には、渡辺化学から購入した以下の保護アミノ酸を用いた。

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH

ヒト結腸癌細胞 HT-29、およびヒト乳がん細胞 SKBR-3 は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA) より購入した。ヒト乳がん細胞 MCF-7 (RCB1904) は RIKEN BRC (Ibaraki, Japan) より National Bio-Resource Project of the MEXT を介して購入した。6E1 抗体およびヒトメラノーマ A375 細胞は順天堂大学 福原武志 准教授に提供いただいた。Herceptin は鹿児島大学 伊東祐二 教授に提供いただいた。

McCoy's 5A 培地とウシ胎児血清 (FBS, fetal bovine serum) は Life Technologies (Carlsbad, CA) より購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) はナカライテスク (Kyoto, Japan) から購入した。Supper Low IgG FBS は GE Healthcare Life Sciences (Logan, UT) から購入した。エステラーゼ (from porcine liver) は、3.2 M (NH₄)₂SO₄ 溶液 (pH 8) の懸濁液として、Sigma-Aldrich から購入した。

カラムクロマトグラフィーによる分離精製には、関東化学株式会社から購入した Silica gel 60N (spherical, neutral, 40-50 μm) を用いた。薄相クロマトグラフィー (TLC) による分析には、MERCK Silica gel 60F254 を用いた。

測定には以下の機器を用いた。

¹HNMR スペクトル : Varian Mercury-300 (300 MHz), Bruker DPX-400 (400 MHz), AVANCE-III (400 MHz), Bruker DPX-500 (500 MHz), AV-600 (600 MHz)

内部標準物質としてテトラメチルシラン (0.00 ppm)、トリメチルシリルプロパン (0.00

ppm)、CH₃CN (1.94 ppm) を用いた。

NMR スペクトルの記載は、次の略号に従うものとする。

s : singlet, d : doublet, t : triplet, q : quartet, m : multiplet

¹³CNMR スペクトル : Bruker DPX-400 (100 MHz), AVANCE-III (100 MHz), Bruker DPX-500 (125 MHz), AV-600 (150 MHz)

内部標準物質として CH₃OH (49.00 ppm)、CHCl₃ (77.16 ppm)、CH₃CN (1.32 ppm)、トリメチルシリルプロパン酸 (0.00 ppm) を用いた。

IR スペクトル : JASCO FT/IR-4100

Mass スペクトル: Micromass LCT (HRMS), LCMS-2020 (LRMS)

旋光度 : JASCO DIP-730

逆相液体クロマトグラフィー : Waters 600E System controller, Waters 2489 Detector, HITACHI L-6200 Intelligent Pump, HITACHI L-6000 Pump, HITACHI L-4000 Detector, HITACHI D-2500 Chromato-Integrator, HITACHI Chromaster Organizer, HITACHI Chromaster Interface Box, HITACHI Chromaster 5410 UV Detector, HITACHI Chromaster 5110 Pump, Shimadzu SPD-20A, Shimadzu DGU-20A5R, Shimadzu LC-20AT, Shimadzu LC-20AD, Shimadzu CBM-20A, Shimadzu FCV-20AH₂, Waters SunFire 19 x 150 mm Column, YMC-pack ODS-AM 4.6 x 150 mm Column, COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 4.6 x 150 mm Column.

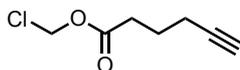
融点 : Yanaco MP-500D, 融点はすべて未補正である。

円二色性 (CD) : Jasco J-1500CD spectrometer

表面プラズモン共鳴 : Biacore T-200

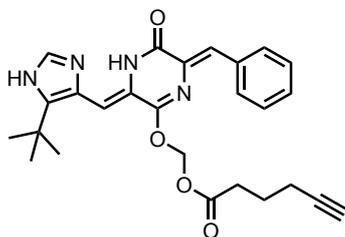
第一章

chloromethyl hex-5-ynoate (19)



Hex-5-ynoic acid **16** (300 mg, 2.68 mmol)、炭酸水素ナトリウム (1.00 g, 11.9 mmol)、テトラブチルアンモニウムヒドロゲンスルフェイト (100 mg, 0.27 mmol) を水/ジクロロメタン (3/2) (25 mL) に溶かし、室温で 10 分間激しく攪拌した。その後、クロロメチルクロロスルフェイト **18** (564 mg, 3.60 mmol) のジクロロメタン (5 mL) 溶液を加え、再び室温で 1 時間激しく攪拌した。反応溶液に水を加え、クロロホルムを用いて抽出した後、抽出液を飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した。この溶液をろ過後、溶媒を留去した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 10 : 1) で精製し、化合物 **19** を得た。Colorless oil, yield 81% (349 mg); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 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); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 171.12, 82.84, 69.47, 68.63, 32.56, 23.18, 17.69; IR (neat) cm^{-1} : 3301, 2946, 2118, 1762, 1417, 1373, 1340, 1309, 1260, 1225, 1129, 1029, 721; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_7\text{H}_9\text{ClO}_2\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 183.0189, found 183.0189.

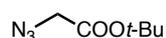
(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methyl hex-5-ynoate (17)



Plinabulin **2** (100 mg, 0.30 mmol) の DMF 溶液 (2.0 mL) に炭酸セシウム (220 mg, 0.66 mmol) を加えた後に、化合物 **19** (96 mg, 0.60 mmol) を加え、50 °C でマイクロ波照射下 15 分間攪拌した。その後、反応溶液を室温に戻し、溶媒を留去した後、酢酸エチルを用いて抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した。この溶液をろ過後、溶媒を留去した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロ

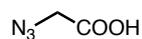
ロホルム：メタノール = 200 : 1) で精製し、化合物 **17** を得た。Yellow solid, yield 54% (74 mg), m.p. 181-184 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 12.30 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.40-7.29 (m, 4H), 6.65 (s, 1H), 6.14 (s, 2H), 2.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.26 (dt, J = 6.9 Hz, 2H), 1.94 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 1.88 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.12, 160.02, 152.75, 140.14, 135.28, 132.92, 131.98, 131.62, 128.80, 128.34, 128.08, 121.60, 102.79, 82.99, 81.89, 77.25, 69.37, 32.76, 31.99, 30.76, 23.39, 17.78; IR (KBr) cm^{-1} : 3280, 3161, 3062, 2974, 2951, 2922, 2118, 1749, 1649, 1610, 1584, 1492, 1446, 1197, 1159, 1140, 978, 886, 690; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 461.2189, found 461.2159.

***tert*-butyl 2-azidoacetate (26)**



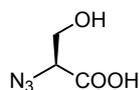
tert-butyl bromoacetate **24** (587 μL) の DMSO (4 mL) 溶液に対し、 NaN_3 (312 mg) を加え、終夜攪拌した。反応溶液を水で希釈し、 Et_2O で抽出した後、抽出液を飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した。この溶液をろ過後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 10 : 1）を用いて精製することで化合物 **26** を得た。Colorless oil, yield 85% (533.9 mg), ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.75 (s, 2H), 1.51 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 167.5, 83.2, 51.0, 28.1; IR (neat) cm^{-1} : 2982, 2934, 2108, 1741, 1370, 1356, 1227, 1156; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 180.0749, found 180.0742.

2-azidoacetic acid (20)



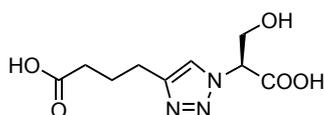
tert-butyl エステル **26** (533.9 mg) の水 (3.0 mL) 溶液に TFA (9.0 mL) を加えた後、室温で終夜攪拌した。反応後、溶媒を留去することで化合物 **20** とし、精製なしで次の反応に用いた。Colorless oil, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9.32 (s, 1H), 3.98 (s, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 174.1, 50.1; LRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_2\text{H}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 100.0, found 100.1.

(S)-2-azido-3-hydroxypropanoic acid (22)



アジ化ナトリウム (2.88 g) の水/ジクロロメタン (7.5 mL/15 mL) 溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (1.5 mL) を滴下した。室温で 2.5 時間攪拌した後、ジクロロメタンを用いて希釈・抽出した。抽出液を飽和炭酸カリウム水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。この溶液をろ過し、トリフルオロメタンスルホン酸アジドのジクロロメタン溶液を得た。そのトリフルオロメタンスルホン酸アジドのジクロロメタン溶液を L-セリンメチルエステル塩酸塩 **28** (689 mg)、炭酸カリウム (0.92 g)、硫酸銅五水和物 (11 mg) の水/メタノール (15 mL/23 mL) 溶液に加えた。室温で終夜攪拌した後、反応溶液の溶媒を留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 2:1) で精製することで、無色油状物質である L-セリンメチルエステルアジド **29** (440 mg, 69%) を得た。得られた化合物 **29** (336 mg) のメタノール/水 (3 mL/1.5 mL) 溶液に水酸化カリウム (169 mg) を加えた。室温で 1 時間攪拌した後、反応溶液を 1 M の塩酸を用いて pH 3 に調整し、酢酸エチルにて抽出した。その後、抽出液を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。この溶液をろ過した後、溶媒を留去することで化合物 **22** を得た。Yellow oil, yield 95% (287 mg); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD (OH was exchanged with CD_3OD .)): δ 4.02 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 3.90 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 172.03, 64.85, 63.53; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 154.0229, found 154.0224.

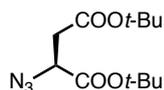
(S)-4-(1-(1-carboxy-2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butanoic acid (35)



tert-butyl hex-5-ynoate⁷⁵⁾ (50 mg, 0.30 mmol) の DMF (0.50 mL) /*t*-BuOH (0.50 mL) 溶液に **22** (78.7 mg, 0.60 mmol) の水溶液 (0.50 mL)、硫酸銅五水和物 (7.0 mg)、アスコルビン酸ナトリウム (16 mg) を加え、マイクロ波照射下、50 °C にて 20 分間攪拌した。その後、反応溶液を室温に戻し、溶媒を減圧留去した。この溶液を酢酸エチルにより抽出した後、抽出液を飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥した。その残留物を 5% の炭酸水素ナトリウム水溶液にて抽出した後、1 M の塩酸を用いて水層を酸性にした。そして、酸性の水層から酢酸エチルを用いて抽出した。その抽出液を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥した。この溶液をろ過し、溶媒を留去

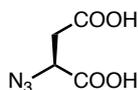
した。その残留物 (26 mg) を精製することなく、4 M HCl / 1,4-dioxane を加え、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を留去し、残留物を高速液体クロマトグラフィー (YMC-Pack ODS-AM 20 x 250 mm (5 μ m, 12 nm), gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 99 : 1 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 79 : 21 over 40 min, Flow rate: 6.00 mL/min, UV: 230 nm) を用いて精製し、化合物 **35** を得た。Colorless oil, yield 44% in 2 steps (11 mg); $[\alpha]_D^{25}$ -30.7° (c 0.295, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD (OH were exchanged with CD₃OD.)): δ 7.96 (s, 1H), 5.51 (dd, J = 6.2 and 3.6 Hz, 1H), 4.32 (dd, J = 12 and 6.2 Hz, 1H), 4.11 (dd, J = 12 and 3.6 Hz, 1H), 2.79 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.37 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.99 (quint, J = 7.4 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 176.97, 169.97, 147.90, 124.32, 66.35, 62.83, 34.08, 25.76, 25.59; IR (neat) cm⁻¹: 3151, 2946, 1731, 1556, 1230, 1072, 756; HRMS (ESI) m/z calcd for C₉H₁₄N₃O₅ [M+H]⁺ 244.0933, found 244.0960.

(S)-di-tert-butyl 2-azidosuccinate (42)



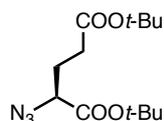
アジ化ナトリウム (1.1 g, 16.9 mmol) の水/ジクロロメタン (2.5/6.0 mL) 溶液に対して、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (1.5 mL) を滴下した。室温で 2 時間攪拌した後、ジクロロメタンを用いて希釈・抽出した。抽出液を飽和炭酸カリウム水で洗浄し、トリフルオロメタンスルホン酸アジドのジクロロメタン溶液を得た。その溶液を L-Asp(OtBu)-OtBu · HCl **39** (480 mg, 1.70 mmol)、炭酸カリウム (0.3 g)、硫酸銅五水和物 (5.5 mg) の水/メタノール (7 mL/11 mL) 溶液に加えた。室温で終夜攪拌した後、反応溶液の溶媒を留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキササン : 酢酸エチル = 4 : 1) で精製し、化合物 **28** を得た。Yellow oil, yield 93% (429 mg); $[\alpha]_D^{25}$ -65.41° (c 1.09, CH₃CN); 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; IR (neat) cm⁻¹: 2980, 2935, 2110, 1734, 1369, 1257, 1150; HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₂H₂₁N₃O₄Na [M+Na]⁺ 294.1430, found 294.1439.

(S)-2-azidosuccinic acid (45)



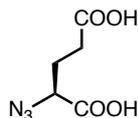
化合物 **42** (50 mg) の水 (2 mL) 溶液に対して、TFA (3.0 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。反応後、溶液をベンゼンと共沸させることにより濃縮し、化合物 **45** を得た。この化合物は精製せずに次の反応に用いた。Yellow oil, ^1H NMR (400 MHz, D_2O (OH was exchanged with D_2O .)): δ 4.58 (dd, $J = 5.3$ and 6.5 Hz, 1H), 3.01-2.88 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O): δ 177.0, 176.4, 61.5, 38.8; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 182.0178, found 182.0181.

(S)-di-tert-butyl-2-azidopentanediate (**43**)



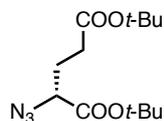
化合物 **42** と同様の手法により、化合物 **43** を得た。Colorless oil, yield 92% (445.2 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -49.91^\circ$ (c 1.13, CH_3CN); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.81 (dd, $J = 5.1$ and 8.8 Hz, 1H), 2.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.15-2.04 (m, 1H), 1.99-1.88 (m, 1H), 1.51 (s, 9H), 1.46 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 171.6, 169.2, 83.0, 80.8, 61.7, 31.4, 28.1, 28.0, 26.6; IR (neat) cm^{-1} : 2979, 2935, 2109, 1733, 1369, 1256, 1153; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 308.1586, found 308.1578.

(S)-2-azidopentanedioic acid (**46**)



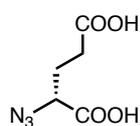
化合物 **45** と同様の手法により、化合物 **46** を得た。Yellow oil, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 10.42 (s, 2H), 4.12 (dd, $J = 5.6$ and 7.8 Hz, 1H), 2.61-2.58 (m, 2H), 2.31-2.19 (m, 1H), 2.16-2.05 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 178.8, 176.0, 60.5, 29.6, 26.1; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 196.0334, found 196.0343.

(R)-di-tert-butyl-2-azidopentanediate (**44**)



化合物 **42** と同様の手法により、化合物 **44** を得た。Colorless oil, yield 96% (232.6 mg); $[\alpha]_D^{25} +51.99^\circ$ (c 1.22, CH₃CN); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.81 (dd, $J = 5.2$ and 8.9 Hz, 1H), 2.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.15-2.05 (m, 1H), 1.99-1.89 (m, 1H), 1.51 (s, 9H), 1.46 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.6, 169.1, 83.0, 80.7, 61.7, 31.4, 28.1, 28.0, 26.6; IR (neat) cm⁻¹: 2980, 2934, 2109, 1733, 1369, 1256, 1153; HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₃H₂₃N₃O₄Na [M+Na]⁺ 308.1586, found 308.1581.

(*R*)-2-azidopentanedioic acid (**47**)

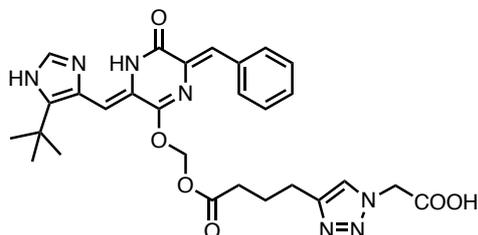


化合物 **45** と同様の手法により、化合物 **47** を得た。Yellow oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.07 (s, 2H), 4.12 (dd, $J = 6.1$ and 7.2 Hz, 1H), 2.67-2.53 (m, 2H), 2.28-2.19 (m, 1H), 2.18-2.07 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.8, 176.0, 60.6, 29.6, 26.1; HRMS (ESI) m/z calcd for C₅H₇N₃O₄Na [M+Na]⁺ 196.0334, found 196.0326.

*Typical procedure of the CuAAC reaction and ion exchange to the sodium salt (Synthesis of Ser-type prodrug **32**).*

アルキン体 **17** (50 mg, 0.11 mmol) の DMF (0.40 mL) /*t*-BuOH (0.40 mL) 溶液に対してアジド体 **22** (28.8 mg, 0.22 mmol) および硫酸銅五水和物 (2.7 mg) とアスコルビン酸ナトリウム (6.5 mg) の水溶液を加え、マイクロ波照射下、50 °C にて 10 分間攪拌した。その後、反応溶液を室温に戻し、溶媒を減圧留去した。この溶液を酢酸エチルにより抽出した後、抽出液を飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、得られた溶液を濃縮し、残渣を HPLC (SunFire PrepC₁₈ OBD 19 x 150 mm (5 μ m, 12 nm), gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 35 : 65 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 over 40 min, Flow rate: 9.00 mL/min, UV: 365 nm and 230 nm) にて精製することで、トリアゾール体 (42.8 mg) を得た。得られたトリアゾール体 (30.0 mg) を、H₂O/CH₃CN (1/1) 溶媒中、イオン交換樹脂を通すことによりカルボン酸をナトリウム塩へと変換した。反応系中の樹脂をろ過により除き、減圧濃縮した後、凍結乾燥することで、プロドラッグ **32** を得た (30.0 mg)。

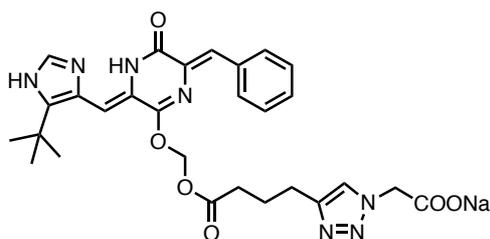
2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid



CuAAC 反応により合成した。Yellow solid, yield 66% (16.1 mg); m.p. 113.1-113.7 °C; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD (NH and OH were exchanged with CD₃OD.)): δ 8.40 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.41-7.37 (m, 2H), 7.36-7.32 (m, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.14 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 2.73 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.99 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 173.4, 169.7, 161.5, 153.1, 147.9, 141.7, 135.9, 134.7, 132.8, 132.3, 130.6, 130.4, 129.4, 126.8, 125.4, 124.8, 100.7, 83.2, 51.4, 33.8, 32.9, 30.3, 25.4, 25.2; IR (KBr) cm⁻¹: 3444, 3142, 2971, 1749, 1670, 1588, 1205, 1185, 1136; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₈H₃₂N₇O₆ [M+H]⁺ 562.2414, found 562.2412.

sodium

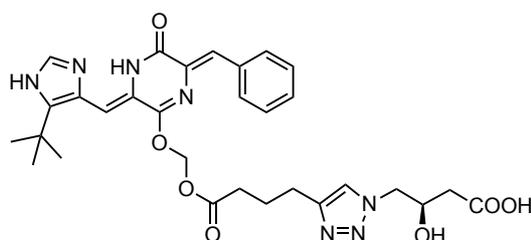
2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetate (30)



Orange solid; m.p. 153.9-155.5 °C; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD (NH was exchanged with CD₃OD.)): δ 8.07 (d, *J* = 7.4Hz, 2H), 7.63 (s, 1H) 7.56 (s, 1H), 7.39-7.35 (m, 2H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.14 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 2.72 (t, *J* = 7.6Hz, 2H), 2.50 (t, *J* = 7.3Hz, 2H), 2.00 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 173.8, 172.9, 161.4, 154.2, 147.7, 142.4, 136.4, 135.1, 133.1, 132.7, 130.0, 129.4, 128.7, 124.7, 121.8, 105.1, 83.2, 54.4, 34.1, 33.2, 31.2, 25.6, 25.5; IR (KBr) cm⁻¹: 3420, 3197, 2971, 1684, 1649, 1583, 1210, 1134, 1185, 1134; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₈H₃₁N₇O₆Na [M+H]⁺

584.2234, found 584.2243.

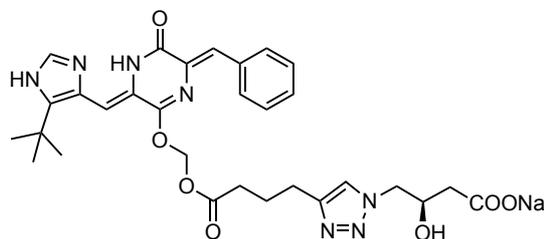
(R)-4-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3-hydroxybutanoic acid



CuAAC 反応により合成した。Yellow solid, yield 79% (10 mg); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.08 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.39-7.30 (m, 3H), 7.23 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 4.45-4.30 (m, 3H), 2.71 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.51-2.47 (m, 3H), 2.39 (dd, $J = 16, 7.3$ Hz, 1H), 1.99 (quint, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.42 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 174.26, 173.69, 161.47, 154.03, 147.82, 142.28, 136.36, 135.05, 132.98, 132.77, 131.22, 130.15, 129.46, 129.19, 124.46, 122.93, 104.18, 83.25, 68.06, 56.29, 40.11, 34.07, 33.14, 31.00, 25.57, 25.40; IR (KBr) cm^{-1} : 3180, 3050, 2972, 2925, 1663, 1205, 1134; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 606.2676, Found 606.2704.

sodium

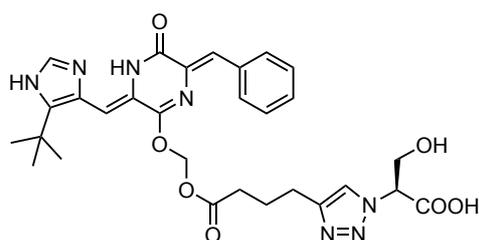
(R)-4-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3-hydroxybutanoate (31)



Orange solid; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.07 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.39-7.30 (m, 3H), 7.21 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.14 (s, 2H), 4.44 (dd, $J = 15, 2.8$ Hz, 1H), 4.31-4.22 (m, 2H), 2.71 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.48 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.36 (dd, $J = 15, 5.0$ Hz, 1H), 2.27 (dd, $J = 15, 7.2$ Hz, 1H), 1.99 (quint, $J = 4.5$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); ^{13}C NMR (125

MHz, CD₃OD) δ : 178.83, 173.72, 161.41, 154.24, 147.77, 142.38, 136.45, 135.09, 133.12, 132.70, 130.03, 129.42, 128.75, 124.28, 121.83, 105.07, 83.24, 69.22, 56.56, 42.47, 34.10, 33.15, 31.15, 25.63, 25.46; IR (KBr) cm⁻¹: 3141, 3075, 2954, 1647, 1579, 1440, 1396, 1219, 1126; HRMS (ESI) m/z Calcd for C₃₀H₃₅N₇O₇Na [M+H]⁺ 628.2496, Found 628.2479.

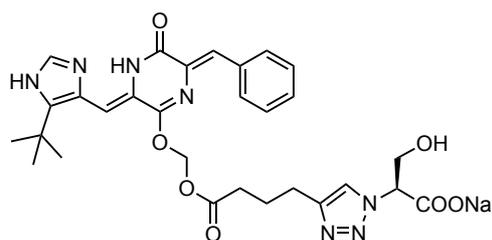
(S)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-3-hydroxypropanoic acid



CuAAC 反応により合成した。Yellow solid, yield 67% (42.8 mg); m.p. 127-128 °C; $[\alpha]_D^{25} +6.98^\circ$ (c 0.13, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD (NH and OH were exchanged with CD₃OD.)): δ 8.41 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.41-7.33 (m, 3H), 7.28 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 5.47 (dd, *J* = 6.4 and 3.5 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 12 and 6.4 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J* = 12 and 3.5 Hz, 1H), 2.74 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.50 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.01 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 220.27, 173.65, 169.98, 161.67, 153.21, 147.67, 141.90, 136.03, 134.86, 132.94, 132.45, 130.87, 130.56, 129.55, 124.14, 100.74, 83.36, 66.25, 62.84, 34.05, 33.08, 30.43, 25.53, 25.48; IR (neat) cm⁻¹: 3409, 3203, 2973, 1734, 1647, 1636, 1585, 1455, 1182, 1132; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₉H₃₄N₇O₇ [M+H]⁺ 592.2520, found 592.2560.

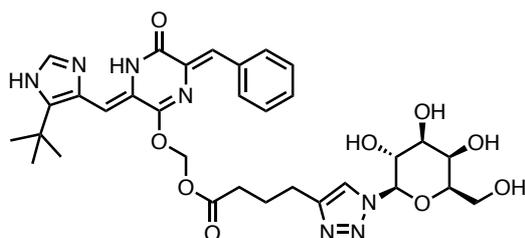
sodium

(S)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-3-hydroxypropanoate (32)



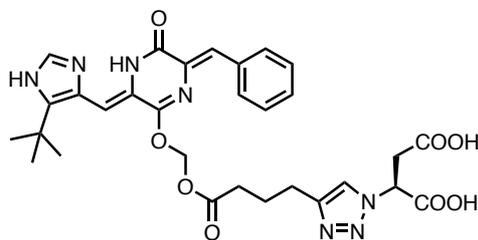
Orange solid; m.p. 154-155 °C; $[\alpha]_D^{25} +1.96^\circ$ (c 0.31, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD (NH and OH were exchanged with CD_3OD .)): δ 8.07 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.39-7.30 (m, 3H), 7.21 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.14 (s, 2H), 5.15 (dd, $J = 7.6$ and 4.2 Hz, 1H), 4.16 (dd, $J = 12$ and 7.6 Hz, 1H), 4.10 (dd, $J = 12$ and 4.2 Hz, 1H), 2.74 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.01 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.42 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 173.81, 173.07, 161.43, 154.23, 147.26, 142.36, 136.45, 135.06, 133.11, 132.69, 130.03, 129.42, 128.75, 123.58, 121.82, 105.06, 83.27, 69.35, 63.95, 34.13, 33.15, 31.15, 25.65, 25.58; IR (KBr) cm^{-1} : 3421, 3177, 2970, 1684, 1648, 1584, 1447, 1208, 1183, 1134; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 614.2339, found 614.2339.

(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methyl 4-(1-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butanoate (33)



CuAAC 反応により合成した。Yellow solid, yield 79% (11.4 mg); ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.27 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.40-7.37 (m, 3H), 7.27 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.16 (s, 2H), 5.48 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 3.81-3.65 (m, 4H), 2.73 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.01-1.96 (m, 2H), 1.41 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 173.62, 161.65, 153.26, 148.18, 141.94, 136.04, 134.91, 132.95, 132.48, 130.74, 130.56, 129.56, 122.15, 101.07, 90.17, 83.36, 79.92, 75.33, 71.41, 70.39, 62.47, 34.04, 33.09, 30.50, 25.46; IR (KBr) cm^{-1} : 3131, 1749, 1659, 1623, 1586, 1353, 1204, 1135; HRMS (ESI) m/z Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 666.2888, Found 666.2886.

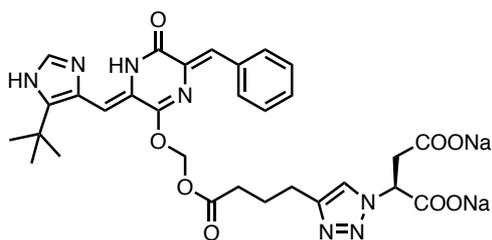
(S)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)succinic acid



CuAAC 反応により合成した。Yellow solid, yield 62% (25.0 mg); m.p. 140.4-141.3 °C; $[\alpha]_D^{25} -11.86^\circ$ (c 0.14, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD (NH and OH were exchanged with CD_3OD .)): δ 8.29 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.42-7.32 (m, 3H), 7.27 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 5.66 (dd, $J = 6.0$ and 7.8 Hz, 1H), 3.32-3.29 (overlapped with MeOH, 2H), 2.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.48 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.99 (quint, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ 173.6, 172.7, 170.6, 161.6, 153.4, 147.8, 142.0, 136.1, 134.9, 132.9, 132.5, 130.6, 130.5, 129.5, 126.5, 126.3, 124.3, 101.4, 83.4, 60.4, 36.9, 34.0, 33.1, 30.5, 25.5, 25.4; IR (KBr) cm^{-1} : 3410, 3154, 2968, 1737, 1667, 1206, 1184, 1142; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 620.2469, found 620.2463.

sodium

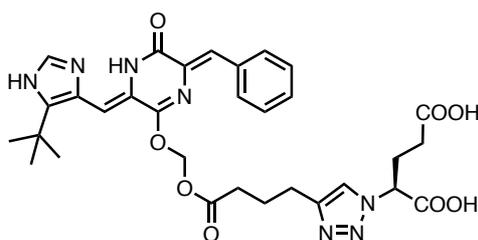
(S)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)succinate (32)



Orange solid; m.p. 222.2-224.5 °C; $[\alpha]_D^{25} +12.34^\circ$ (c 0.09, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD (NH was exchanged with CD_3OD .)): δ 8.07 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.68 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.41-7.37 (m, 2H), 7.34-7.31 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 5.50 (dd, $J = 4.2$ and 10.7 Hz, 1H), 3.15 (dd, $J = 4.1$ and 16.0 Hz, 1H), 3.04 (dd, $J = 10.7$ and 16.2 Hz, 1H), 2.71 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.99 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.42 (s,

9H); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 177.8, 175.6, 173.8, 161.5, 154.2, 146.9, 142.4, 136.4, 135.1, 133.1, 132.7, 130.1, 129.4, 128.8, 123.2, 121.8, 105.1, 83.3, 65.6, 41.8, 34.1, 33.2, 31.2, 25.7, 25.6; IR (KBr) cm^{-1} : 3404, 3185, 2971, 1684, 1649, 1612, 1584, 1209, 1180, 1135; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_7\text{O}_8\text{Na}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 664.2108, found 664.2108.

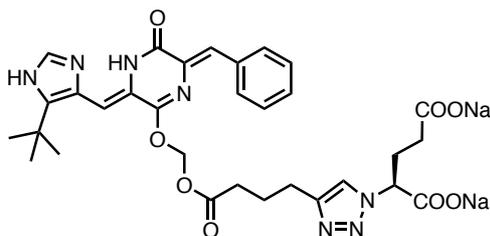
(S)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentanedioic acid



CuAAC 反応により合成した。Yellow solid, Yield 77% (31.7 mg); m.p. 136.6-137.0 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +3.46^\circ$ (c 0.04, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD (NH and OH were exchanged with CD_3OD .)): δ 8.36 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.42-7.31 (m, 3H), 7.27 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.14 (s, 2H), 5.41 (dd, $J = 5.3$ and 10.1 Hz, 1H), 2.73 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.62-2.53 (m, 1H), 2.49 (t, $J = 7.2$, 2H), 2.42-2.31 (m, 1H), 2.24-2.18 (m, 2H), 2.00 (quint, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 175.5, 173.6, 171.3, 161.6, 153.3, 148.2, 141.9, 136.0, 134.9, 133.0, 132.5, 130.7, 130.6, 129.6, 126.8, 125.9, 123.5, 101.0, 83.4, 63.2, 34.0, 33.1, 30.7, 30.5, 28.2, 25.5, 25.4; IR (KBr) cm^{-1} : 3136, 2972, 2877, 1749, 1654, 1627, 1191, 1131; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 634.2625, found 634.2625.

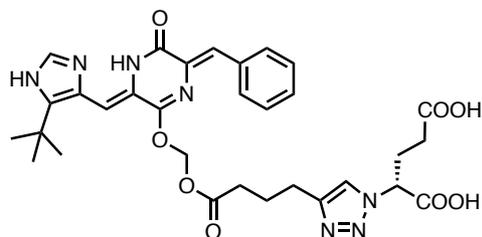
sodium

(S)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(*tert*-butyl)-1*H*-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentanedioate (37)



Orange solid; m.p. 243.1-245.6 °C; $[\alpha]_D^{25} +13.59^\circ$ (c 0.25, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD (NH was exchanged with CD_3OD .)): δ 8.07 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.41-7.29 (m, 3H), 7.22 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 5.07 (dd, $J = 5.2$ and 10.0 Hz, 1H), 2.73 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.59-2.48 (m, 3H), 2.36-2.25 (m, 1H), 2.18-2.09 (m, 1H), 2.06-1.96 (m, 3H), 1.42 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 180.0, 175.2, 173.8, 161.4, 154.3, 147.6, 142.4, 136.4, 135.1, 133.1, 132.7, 130.1, 129.4, 128.8, 122.8, 121.8, 105.1, 83.3, 67.6, 34.8, 34.2, 33.2, 31.2, 31.0, 25.7, 25.6; IR (KBr) cm^{-1} : 3403, 3172, 2974, 1686, 1650, 1583, 1446, 1402, 1210, 1183, 1134; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_8\text{Na}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 678.2264, found 678.2284.

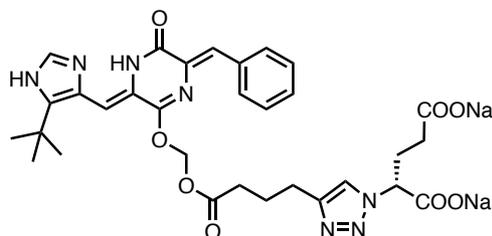
(R)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentanedioic acid



CuAAC 反応により合成した。Yellow solid, yield 74% (30.6 mg); m.p. 128.8-130.6 °C; $[\alpha]_D^{25} -5.53^\circ$ (c 0.12, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD (NH and OH were exchanged with CD_3OD .)): δ 8.34 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.41-7.31 (m, 3H), 7.27 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 5.41 (dd, $J = 5.3$ and 10.2 Hz, 1H), 2.73 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.62-2.52 (m, 1H), 2.49 (t, $J = 7.2$, 2H), 2.42-2.31 (m, 1H), 2.24-2.18 (m, 2H), 2.00 (quint, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 175.5, 173.6, 171.3, 161.6, 153.3, 148.2, 141.9, 136.1, 134.9, 132.9, 132.5, 130.7, 130.5, 129.6, 126.7, 126.1, 123.5, 101.1, 83.4, 63.2, 34.0, 33.1, 30.7, 30.5, 28.2, 25.5, 25.4; IR (KBr) cm^{-1} : 3143, 2975, 2878, 1741, 1661, 1589, 1187, 1138; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 634.2625, found 634.2627.

sodium

(R)-2-(4-(4-(((3Z,6Z)-6-benzylidene-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methoxy)-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentanedioate (38)



Orange solid; m.p. 248.8-245.0 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -19.01° (c 0.25, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD (NH was exchanged with CD_3OD)): δ 8.07 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.77 (s, 1H) 7.63 (s, 1H), 7.41-7.29 (m, 3H), 7.22 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 5.07 (dd, $J = 5.1$ and 10.2 Hz, 1H), 2.73 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.60-2.46 (m, 3H), 2.37-2.26 (m, 1H), 2.17-2.07 (m, 1H), 2.05-1.92 (m, 3H), 1.42 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): d 180.9, 175.3, 173.8, 161.5, 154.3, 147.5, 142.4, 136.4, 135.1, 133.1, 132.7, 130.1, 129.4, 128.8, 122.8, 121.8, 105.1, 83.3, 67.8, 35.7, 34.2, 33.2, 31.4, 31.2, 25.7, 25.6; IR (KBr) cm^{-1} : 3427, 3191, 2974, 1675, 1649, 1586, 1212, 1136; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_8\text{Na}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 678.2264, found 678.2264.

水溶性の評価

室温において各サンプルの飽和水溶液を調整し、メンブランフィルターでろ過し、ろ液を逆相 HPLC にて分析を行った。一方、既知濃度のサンプルの DMSO 溶液を同様に HPLC にて分析を行い、検量線を引き、飽和溶液濃度を算出した。

エステラーゼによる加水分解反応の評価

10 mM PBS (pH 7.4) に水溶性プロドラッグ体を 1.64 mM となるように溶解し、エッペンドルフチューブに 50 μL , 50 μL , 400 μL に分注した。その内の 50 μL の 2 つを陰性対照群としてエステラーゼ処理を行わなかった。残りの 400 μL にブタ肝エステラーゼ (carboxylic-ester hydrolase; EC 3. 1. 1. 1; E-2884) を 8 μL 加え、攪拌し、50 μL ずつ分注した。そして、それぞれ 37 °C 恒温槽でインキュベーションした。反応停止は、DMSO を 150 μL 加え、エステラーゼを失活させることによって行い、その後、メンブランフィルターでろ過した。加水分解反応の評価は、1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h と経時的に HPLC を用いて親化合物への変換を観察することによって行った。また、陰性対照として、エステラーゼ未処理群を 0, 48 h にて HPLC により分析を行った。

殺細胞活性評価

HT-29 細胞の培地には、10% ウシ胎児血清 (FBS, Nichirei, #171012, lot: 8G0297)、100 units/mL penicillin (Invitrogen)、100 units/mL streptomycin (Invitrogen) を含む McCoy's 5A medium (Invitrogen) を用い、細胞は 37 °C、5% CO₂ の湿潤雰囲気下にて培養した。細胞毒性試験 (XTT/PMS assay) において、HT-29 細胞を 96 well plate に 5000 cells/well で播種し、24 h 培養した。連続的に希釈した測定化合物溶液を、化合物の最終濃度が 2 pM から 20 μM の範囲で添加した。Vehicle control には 0.25% (v/v) DMSO を含む培地で培養した細胞を使用した。72 h 培養後、0.1 mg/mL XTT/25 μM PMS /PBS 溶液を 50 μL/well 加え、37 °C で 40 min インキュベートした。生細胞数の指標として XTT の代謝物であるフォルマザン色素の 492 nm における吸光度をプレートリーダー (TECAN SAFIRE) で測定した。対照として 690 nm での吸光度も測定し、数値を補正した。

第二章

Fmoc 固相ペプチド合成⁵⁴⁾

Fmoc-NH-SAL resin (官能基置換率 0.47-0.56 mmol/g) に対し DMF を加え、1 時間、振盪攪拌することで樹脂を膨潤した。溶媒を濾去したのち、20%ピペリジン/DMF を加え、20 分間振盪することで Fmoc を脱保護した。溶媒を濾去し、DMF で樹脂を洗浄 (10 回) した後、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・一水和物 (HOBt·H₂O, 3 eq.)、*N,N'*-ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCI, 3 eq.) により α -アミノ基が Fmoc 保護されたアミノ酸 (3 eq.) を縮合した。Kaiser 試験が陰性であることを確認し、溶媒を濾去、DMF で樹脂の洗浄 (10 回) を行った。これら Fmoc 基の脱保護、アミノ酸の縮合のサイクルを任意のペプチド鎖長まで繰り返した。N 末端アミノ基のアセチル化が必要なペプチドは Ac₂O (3 eq.)、DIEA (3 eq.) で樹脂を 15 分間処理した。ペプチドの伸長が完了後、メタノールおよびジエチルエーテルで樹脂を洗浄、乾燥した。乾燥樹脂を *m*-cresol (375 μ L)、thioanisole (375 μ L)、TFA (15 mL) により処理することで、樹脂からの切り出しおよび各アミノ酸側鎖の脱保護を行った。反応後に窒素圧により、濾過し樹脂を除去した後、窒素を吹き付けることにより、ペプチド溶液を濃縮した。その後、得られた残渣に対し、ジエチルエーテル (50 mL) を加え、粗ペプチドを析出させ、遠心沈殿させることで回収した。上澄み液を捨て、粗ペプチドをジエチルエーテルで洗浄後、風乾することで白色の乾燥粗ペプチドを得た。乾燥粗ペプチドを、高速液体クロマトグラフィー (SunFire PrepC₁₈ OBD 19 x 150 mm (5 μ m, 12 nm), Flow rate: 6.00 mL/min, UV: 230 nm and 254 nm) を用いて精製し、目的のペプチドを獲得した。ペプチドの純度は分析 HPLC (COSMOSIL 5C₁₈ AR-II, UV: 230 nm) により評価した。

Z33: H-FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD-NH₂

White powder, Yield of 37%; HRMS (ESI) *m/z* 4103.0420 (calcd. for C₁₇₅H₂₇₇N₅₈O₅₅S [M+H]⁺ 4103.0382); HPLC purity of 98%

K(N₃)-Z33: H-K(N₃)FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD-NH₂

White powder, Yield of 34%; HRMS (ESI) *m/z* 4257.1353 (calcd. for C₁₈₁H₂₈₇N₆₂O₅₆S [M+H]⁺ 4257.1237); HPLC purity of 96%

Z33-K(N₃): H-FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDK(N₃)-NH₂

White powder, Yield of 22%; HRMS (ESI) *m/z* 4257.1201 (calcd. for C₁₈₁H₂₈₇N₆₂O₅₆S [M+H]⁺ 4257.1237); HPLC purity of 99%

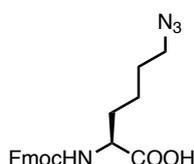
Cys-Gly-Z33: H-CGFNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD-NH₂

White powder, Yield of 38%; HRMS (ESI) m/z 4263.0664 (calcd. for C₁₈₀H₂₈₅N₆₀O₅₇S₂ [M+H]⁺ 4263.0689); HPLC purity of 99%

Cys-Gly-Z33(retro): H-CGDDRISKIKANRQEENLNPDLAEYFRRQQQMNF-NH₂

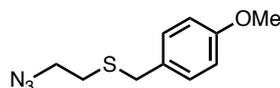
White powder, Yield of 13%; HRMS (ESI) m/z 4263.0537 (calcd. for C₁₈₀H₂₈₅N₆₀O₅₇S₂ [M+H]⁺ 4263.0689); HPLC purity of 98%

N²-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-N⁶-diazo-L-lysine



Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.0g, 6.17mmol) にトリフルオロ酢酸 (20 mL) 水 (6 mL) を加え、2 時間攪拌した。反応後、ベンゼンを加え、水と共沸させることにより、溶媒を留去し Fmoc-Lys-OH を得た。これを水/メタノール (45.4 mL/60.5 mL) に溶解し、炭酸カリウム (2.78 g)、硫酸銅五水和物 (33.25 mg) を加えた。その後、別途調製したトリフルオロメタンスルホン酸アジドのジクロロメタン溶液を滴下した。終夜攪拌した後、反応溶液の溶媒を留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール : 酢酸 = 100 : 1 : 0.1) で精製した。残留する酢酸を除去するために、水を過剰量加え、凍結乾燥することで Fmoc-Lys(N₃)-OH を得た。White solid, yield 97% (2.20g), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.1 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.58-7.45 (m, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.4, 2H), 7.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.51-4.47 (m, 1H), 4.38 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 6.7, 1H), 3.20-3.10 (m, 2H), 1.92-1.80 (m, 1H), 1.72-1.60 (m, 1H), 1.58-1.48 (2H, m), 1.47-1.34 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.32, 158.08, 143.78, 143.65, 141.35, 127.78, 127.09, 125.03, 120.34, 67.14, 53.50, 51.06, 47.15, 31.84, 28.35, 22.46; IR (neat) cm⁻¹: 3066, 2947, 2867, 2097, 1716, 1522, 1450, 1339, 1248, 1081, 760, 740; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₁H₂₃N₄O₄ [M+H]⁺ 395.1719, found 395.1716.

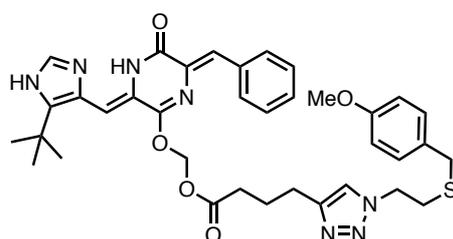
(2-azidoethyl)(4-methoxybenzyl)sulfane (61)



化合物 **42** と同様の手法により、化合物 **61** を得た。colorless oil, yield 94% (212 mg), ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.22–7.17 (m, 2H), 6.85–6.80 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 3.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.54 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 158.47, 129.65, 129.43, 113.67, 54.87, 50.57, 35.44, 29.94; IR cm^{-1} : 2915, 2101, 1609, 1511, 1249; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 246.0677, found 246.0679.

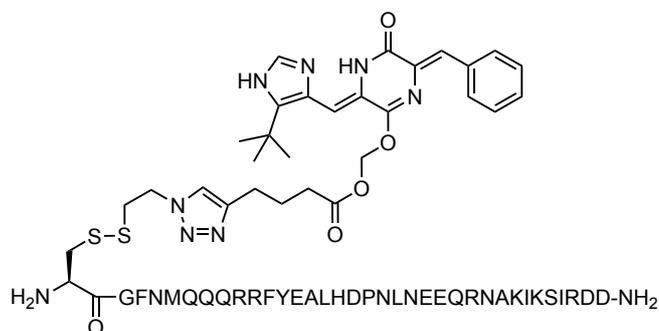
(((Z)-6-((Z)-benzylidene)-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methyl

4-(1-(2-((4-methoxybenzyl)thio)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butanoate (62)



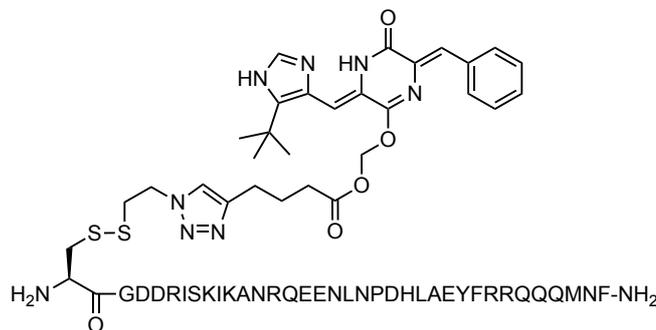
CuAAC 反応により合成した (実験の部 第一章)。yellow solid, yield 76% (27.5 mg), ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 12.19 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 8.10-8.07 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.40-7.27 (m, 4H), 7.20-7.16 (m, 2H), 7.14 (s, 1H), 6.83 (d, $J = 8.68$ Hz, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 4.29 (t, $J = 6.84$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.55 (s, 2H), 2.79 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.47 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.03 (quint, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.43 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.27, 159.68, 158.84, 152.65, 146.71, 135.28, 132.30, 131.89, 131.61, 129.99, 129.48, 128.77, 128.35, 127.91, 121.92, 121.52, 114.06, 102.13, 81.73, 55.29, 49.69, 35.75, 33.31, 31.79, 31.05, 30.65, 29.71, 24.63, 24.42; IR cm^{-1} : 3142, 2961, 2371, 1750, 1671, 1510, 1456, 1179, 1130; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 684.2968, found 684.2961.

Plinabulin-SS-Z33 (64)



固相ジスルフィド架橋試薬のベンジル体 **57** (12.4 mg, 7.3 μmol) に対し、塩化スルフルル (20 μL)、1,2-ジクロロメタン (1 mL)、ピリジン (3.9 μL) の混合溶液を加え、氷浴上で 20 分攪拌し、溶媒を除去した。この操作を三回繰り返すことにより、Npys-Cl 樹脂 **53** へと導いた。その後、ジクロロメタンにて洗浄を行い、Plinabulin のスルフィド誘導体 **62** (1.0 mg) のアセトニトリル (162 μL) 溶液を加え、1 時間振盪攪拌を行うことで、Plinabulin 担持樹脂 **63** を得た。反応は分析 HPLC で追跡した。その後、アセトニトリルおよび H_2O で樹脂を洗浄した。DMF/ H_2O (1:1) (367 μL) に溶解した Cys-Gly-Z33) (5.6 mg) を反応させることで、二段階目のジスルフィド交換反応を行った。濾過により樹脂を除去した後、得られた反応液を HPLC (SunFire PrepC₁₈ OBD 19 x 150 mm (5 μm , 12 nm), gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 85 : 15 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 60 : 40 over 25 min, Flow rate: 6.00 mL/min, UV: 365 nm and 230 nm) を用いて精製し、化合物 **64** を得た。Yellow solid, yield 29% (3 mg), HRMS (ESI) m/z 4824.2832 (calcd. for $\text{C}_{208}\text{H}_{316}\text{N}_{67}\text{O}_{61}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 4824.2847); HPLC purity of 97%.

Plinabulin-SS-Z33 (retro) (**65**)



Plinabulin-SS-Z33 **64** と同様に固相ジスルフィド架橋法により合成した。yellow solid, yield 29%; HRMS (ESI) m/z 4824.2832 (calcd. for $\text{C}_{208}\text{H}_{316}\text{N}_{67}\text{O}_{61}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 4824.2847); HPLC purity of 97%.

表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance; SPR)

ペプチドの抗体結合能は Biacore T-200 を用いて評価した。*N*-hydroxysuccinimide と 1-(3-(dimethylamino)propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) により CM5 センサーチップ上のカルボン酸を活性エステルとし、酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解したリガンド (Herceptin, 6E1, Fc fragment) を反応させることで、それぞれ FC1, FC2, FC3 に固定化した。FC4 は固定化せずにコントロールとして用いた。アナライト (Z33 誘導体) は running buffer (HBS-EP; 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%

Tween 20, pH 7.4) に溶解し連続希釈をすることで、各濃度のサンプル溶液を調整し、以下の条件のもと測定した (association time: 180 s, dissociation time: 600 s, flow rate: 50 μ L/min)。Cys-Gly-Z33 と Plinabulin-SS-Z33 **64** のみ、設定した解離時間内での解離が不十分であったため、センサーチップを測定ごとに Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) で 5 秒間 2 回洗浄した。結合測定論定数 (k_{on} , k_{off} , K_d) は、得られたセンサーグラムを Biacore T-200 Evaluation software v 1.0 により、1 : 1 binding model によるカーブフィットまたは平衡値解析を行うことで決定した。

殺細胞活性評価

SKBR-3 細胞は McCoy's 5A (10% normal FBS+)、MCF-7 細胞と A375 細胞は DMEM (10% normal FBS+) でそれぞれ培養した。SKBR-3HR 細胞は Herceptin を 8 μ g/mL 添加した培地で培養した。

殺細胞活性評価では、0.05% Trypsin-EDTA 処理により剥がした細胞 (SKBR-3, MCF-7, SKBR-3HR, A375) を Plinabulin-SS-Z33 **64**、抗体 (Herceptin or 6E1) もしくはその両方を含む培地 (10% super low IgG FBS) に懸濁し、5000 cells/well となるように 96-well plate に播種した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 72 時間培養した後、細胞生存率を WST-1 試薬により決定した。生細胞数の指標として WST-1 の代謝物であるフォルマザン色素の 450 nm における吸光度をプレートリーダーで測定した。対照として 620 nm での吸光度も測定し、数値を補正した。A375 細胞における殺細胞活性評価では、細胞増殖が他の細胞と比べて早いため、化合物での処理時間を 24 時間として評価した。

Flow Cytometry

SKBR-3, SKBR-3HR, MCF-7 細胞を dissociation buffer で 10 分間処理することで、細胞懸濁液を得た。得られた細胞を 1 mM EDTA/PBS で洗浄後、氷浴上、一次抗体 (Herceptin) で一時間処理した。0.1% BSA/1 mM EDTA/PBS で再度細胞を洗浄した後、氷浴上、二次抗体 (Alexa488-labeled anti-human IgG) で一時間処理した。その後、細胞懸濁液中の Alexa-488 の蛍光を FACS calibur flow cytometer により分析することで、HER2 発現量を評価した。

CD スペクトル

Z33 ペプチド誘導体の円二色性は Jasco J-1500CD spectrometer を用いて測定した。測定には以下の条件を用いた (25 $^{\circ}$ C, 石英セル (0.5 cm path length), 190-250 nm, scan speed: 100 nm/min, response time: 1 s, bandwidth: 1 nm)。測定するペプチドは 2.5 μ M となるよう 10 mM phosphate buffer (pH7.4) に溶解した。 α -helicity は Reed の式⁶⁰⁾に基づきカーブフィットすることにより算出した。

第三章

ペプチド合成

各ペプチドは Fmoc 固相合成法により合成した（実験の部 第二章参照）。ペプチドの樹脂からの切り出しおよびアミノ酸側鎖の脱保護には、TFA : triisopropylsilane : H₂O : ethanedithiol（60 : 5 : 1 : 2）を用いた。

Ac-(Arg)₈-AcpLys(N₃)-NH₂

White powder, Yield: 30%, Purity: 96% HRMS (ESI): m/z calcd for C₆₂H₁₂₃N₃₈O₁₁ [M+H]⁺ 1576.0234, found 1576.0164.

Ac-(Arg)₈-Acp-Cys-NH₂

White powder, yield 30%, purity 96% HRMS (ESI): m/z calcd for C₅₉H₁₁₈N₃₅O₁₁S [M+H]⁺ 1524.9471, found 1524.9464.

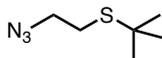
Ac-(D-Arg)₈-Acp-Cys-NH₂

White powder, yield 37%, purity 98%, HRMS (ESI): m/z calcd for C₅₉H₁₁₈N₃₅O₁₁S [M+H]⁺ 1524.9471, found 1524.9503.

Ac-(Gly-Ser)₄-Acp-Cys-NH₂

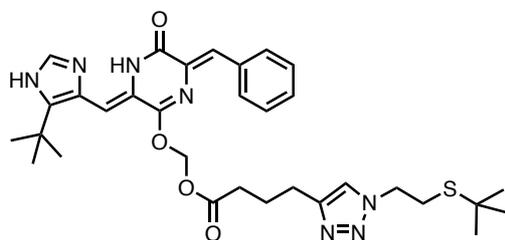
White powder, yield 31%, purity 99%, HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₁H₅₄N₁₁O₁₅S [M+H]⁺ 852.3522, found 852.3536.

(2-azidoethyl)(*tert*-butyl)sulfane (71)



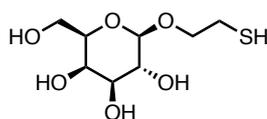
化合物 **42** と同様の反応により、化合物 **71** を得た。colorless oil, yield 42% (395 mg), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.44 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.34 (s, 9H), ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 51.49, 42.72, 31.00, 27.78; IR (KBr) cm⁻¹: 2100.

(((Z)-6-((Z)-benzylidene)-3-((5-(tert-butyl)-1H-imidazol-4-yl)methylene)-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrazin-2-yl)oxy)methyl 4-(1-(2-tert-butylthio)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butanoate (68)



CuAAC 反応により合成した (実験の部 第一章)。Yellow solid, yield 16% (27.2 mg); m.p. 90.5-91.1 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 12.24 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.41-7.36 (m, 2H), 7.35-7.28 (m, 2H), 7.23 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 4.40 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.74 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.47 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.03 (quint., $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.27, 159.84, 152.77, 146.62, 140.19, 135.30, 132.89, 132.06, 131.69, 131.62, 128.80, 128.39, 127.80, 121.67, 121.59, 102.80, 81.77, 50.44, 43.04, 33.35, 31.98, 30.89, 30.77, 28.71, 24.68, 24.44; IR (KBr) cm^{-1} : 3439, 2964, 2369, 1750, 1654, 1586, 1456; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 620.3019, found 620.3022.

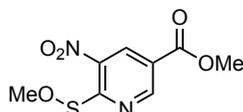
(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(hydroxymethyl)-6-(2-mercaptoethoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol: Gal-SH (79)



More らの合成法を基に合成した。⁷⁴⁾ すなわち、2-(acetoxymethyl)-6-(2-(acetylthio)ethoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate **83** (2 g, 4.44 mmol) の MeOH (45 mL) 溶液に対し、NaOMe (480 mg, 8.88 mmol) を加え、1 時間攪拌した。イオン交換樹脂により反応溶液の pH を 2-3 にした後、濾過にて樹脂を除き、反応溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 : MeOH = 10 : 1) で精製することで化合物 **79** を得た。white solid, yield 10% (111 mg); ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 4.92-4.82 (m, 1H), 4.76-4.67 (m, 1H), 4.63-4.53 (m, 1H), 4.39-4.34 (m, 1H), 4.11 (dd, $J = 7.3$ and 10.5 Hz, 1H), 3.97-3.89 (m, 1H), 3.83-3.68 (m, 1H), 3.65-3.59 (m, 1H), 3.58-3.43 (m, 3H), 3.29-3.22 (m, 2H), 2.94 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), ^{13}C NMR (400 MHz, MeOD): 105.09, 76.77, 74.99, 72.82, 72.57, 70.34, 62.54, 24.94; HRMS (ESI) m/z calcd for

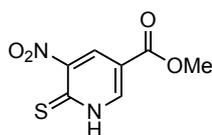
$C_8H_{16}O_6S [M+Na]^+$ 263.0565, found 263.0558.

Methyl 6-(methoxythio)-5-nitronicotinate (78) ⁷³⁾



Methyl 6-(benzylthio)-5-nitronicotinate **76** (300 mg, 0.99 mmol) の 1,2-DCE (2.5 mL) 溶液に対して、 SO_2Cl_2 (176 μ L, 2.18 mmol) とピリジン (40.3 μ L, 0.50 mmol) を加え、室温で一時間攪拌した。反応液を減圧濃縮することで、スルフェニルクロライド **77** とし、精製せずに次の反応に用いた。化合物 **77** を THF に溶解し、MeOH (40.2 μ L, 0.99 mmol) と *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA, 2.85 mL, 19.8 mmol) を氷冷下加えた後、室温で 2 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を $CHCl_3$ に溶解した。有機相を 5% クエン酸水溶液、飽和食塩水で洗浄後、 Na_2SO_4 により乾燥した。濾過後、濃縮したのちに残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製することで、化合物 **78** を得た。Yellow solid, yield 79% in 2 steps (190 mg); m.p. 92.3-93.9 °C; IR (KBr) 1731, 1547, 1361, 986, 728 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.43 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 9.03 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.98 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 169.6, 163.8, 154.8, 137.1, 134.1, 122.4, 65.6, 53.0; HRMS (ES+) calcd for $C_8H_8N_2O_5NaS [M+Na]^+$ 267.0052, found 267.0042.

Methyl 5-nitro-6-thioxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxylate (75) ⁷³⁾



スルフェン酸エステル **78** (10.0 mg, 40.9 μ mol) の CH_3CN/H_2O (95:5, 820 μ L) 溶液に対して、 PPh_3 (21.5 mg, 81.9 μ mol) を加えて、室温で 5 分攪拌した。溶媒を減圧留去したのち、 $CHCl_3$ に溶解し、1 M $NaHCO_3$ aq. で抽出した。水相を 5% citric acid aq. により pH 4-5 程度にすることで、再度 $CHCl_3$ で抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 を加え乾燥、濾過、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することでチオピリドン **75** を得た。yellow solid, yield 78% (6.8 mg); m.p 169.7 °C (decomp.); IR (KBr) 3211, 3020, 1703, 1541, 1243, 1157, 762, 744 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ 8.24 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 3.86 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN) δ 173.67,

163.8, 153.3, 144.0, 131.8, 115.4, 53.4; HRMS (FAB+) calcd for C₇H₇N₂O₄S [M+H]⁺ 215.0127, found 215.0122.

チオピリドン誘導体 (75) の pKa 評価

反応後の副生成物である樹脂 **74** のモデル化合物として合成したチオピリドン **75** を 5 mM の濃度になるように AcOEt に溶解した。その後、各種緩衝液 (100 mM sodium acetate (pH3.8, 5.6) , 100 mM sodium phosphate (pH6.4, 6.8, 7.4, 8.4)) を加え転倒混和した。遠心分離機 (3000 rpm, 1 min) により遠心分離した後、終夜静置し、平衡化した。各溶液の上層 (AcOEt 層) および下層 (水層) をサンプリングし、メンブランフィルターを通した後に、逆相 HPLC (COSMOSIL 5C₁₈ AR-II) により分析した。その後、各種 pH の緩衝液における面積値を KaleidaGraph 4.5 を用いてプロットし、シグモイド曲線から pKa 値を算出した。

樹脂 57 の活性化

樹脂 **57** (10 mg, 5.3 μmol) に対して、氷冷下、塩化スルフルル (20 μL)、1,2-DCE (1 mL) 及びピリジン (3.9 μL) の混合溶液を加え、20 分間攪拌した後、溶液を除去した。同じ操作を 2 回繰り返した後、氷冷したジクロロメタンにより樹脂を洗浄し、Npys-Cl 樹脂 **53** を得た。

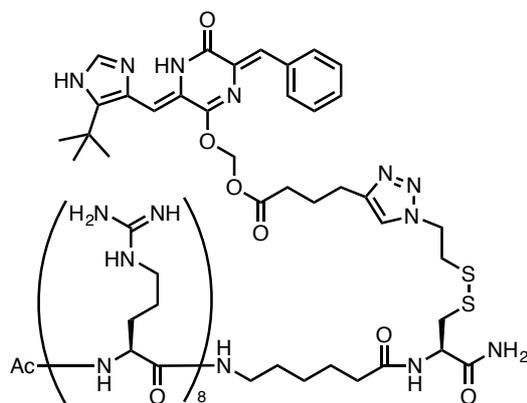
Plinabulin 担持樹脂 63 の合成 (First step)

前項で得た樹脂 **53** に対して各有機溶媒 (294 μL) で溶解した Plinabulin スルフィド誘導体 **68** を加え、室温で 1 時間攪拌した。**68** の消失率は分析 HPLC にて溶液中の濃度を測定し以下の式で算出した [1 時間における **68** の面積値 / 0 時間における **68** の面積値] (Table 7)。反応後は、アセトニトリル (2 mL) で洗浄した後に、水 (6 mL) で洗浄することで、樹脂上に Plinabulin を担持させた活性ジスルフィド体である樹脂 **63** を得た。

ジスルフィド交換反応 (Second step of SPDSL)

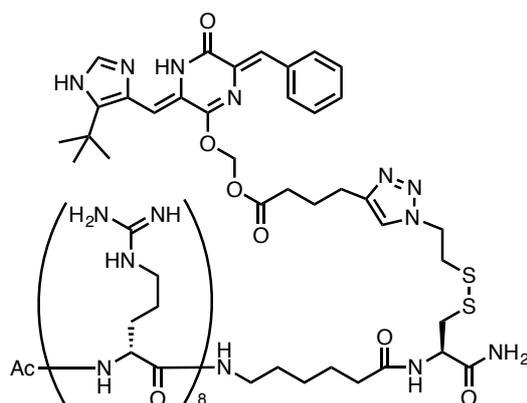
First step で得られた樹脂 **63** に各種溶媒 (50 mM sodium acetate (pH3.8, 4.5, 5.0 and 5.6) or 50 mM sodium phosphate (pH7.4) : CH₃CN = 3 : 2; 269 μL) に溶解したチオールを有する水溶性化合物を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応溶液をサンプリングし、逆相 HPLC (COSMOSIL 5C₁₈ AR-II) により分析することで、ペプチドおよびの消費と、架橋体の生成を確認した。反応の完結後、樹脂をろ過により除き、HPLC (SunFire PrepC₁₈ OBD 19 x 150 mm (5 μm, 12 nm)) により精製し、Plinabulin 架橋体を得た (Table 9)。Plinabulin-SS-Gal (Table 9, Entry 5) の反応は TLC により追跡した。

Plinabulin-SS-Arg₈ (73)



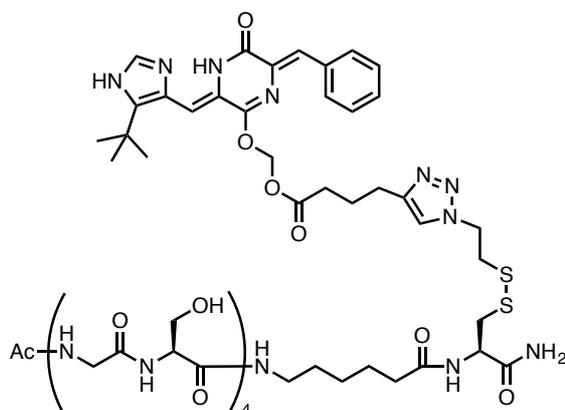
Yellow solid, HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{87}H_{149}N_{42}O_{15}S_2$ $[M+H]^+$ 2086.1629, found 2086.1633.

Plinabulin-SS-D-Arg₈



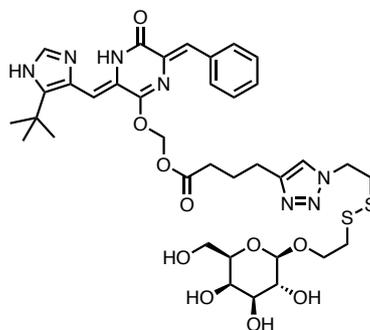
Yellow solid, HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{87}H_{149}N_{42}O_{15}S_2$ $[M+H]^+$ 2086.1629, found 2086.1633.

Plinabulin-SS-(GS)₄



Yellow solid, HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{59}H_{85}N_{18}O_{19}S_2$ $[M+H]^+$ 1413.5680, found 1413.5663.

Plinabulin-SS-Gal



Yellow solid, HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{36}H_{47}N_7O_{10}S_2$ $[M+H]^+$ 802.2904, found 802.2904.

引用文献

1. Savjani K. T., Gajjar A. K., Savjani J. K., *ISRN Pharm.*, **2012**, 2012, 195727–195736.
2. (a) Kalepu S., Nekkanti V., *Acta Pharm. Sin. B*, **2015**, 5, 442–453; (b) Khadka P., Ro J., Kim H., Kim I., Kim J. T., Kim H., Cho J. M., Yun G., Lee J., *Asian J. Pharm. Sci.*, **2014**, 9, 304–316; (c) Kawabata Y., Wada K., Nakatani M., Yamada S., Onoue S., *Int. J. Pharm.*, **2011**, 420, 1–10.
3. (a) Lee H. J., Soliman M. R., *Science*, **1982**, 215, 989–991; (b) Khan M. O., Park K. K., Lee H. J., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 2227–2239; (c) Lee H. J., Cooperwood J. S., You Z., Ko D. H., *Arch. Pharm. Res.*, **2002**, 25, 111–136.
4. Procopiou P. A., Biggadike K., English A. F., Farrell R. M., Hagger G. N., Hancock A. P., Haase M. V., Irving W. R., Sareen M., Snowden M. A., Solanke Y. E., Tralau-Stewart C. J., Walton S. E., Wood J. A., *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 602–612.
5. Druzgala P., Hochhaus G., Bodor N., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1991**, 38, 149–154.
6. Albert A., *Nature*, **1958**, 182, 421–422.
7. Iida S., *Biochem. Pharmacol.*, **1966**, 15, 1139–1145.
8. Beauchamp L. M., Orr G. F., de Miranda P., Burnette T., Krenitsky T. A., *Antivir. Chem. Chemother.*, **1992**, 3, 157–164.
9. Ambrose P. J., *Clin. Pharmacokinet.*, **1984**, 9, 222–238.
10. (a) Brownfield R. B., Shultz W., *Steroids*, **1963**, 2, 597–603; (b) Samtani M. N., Jusko W. J., *Int. J. Pharm.*, **2005**, 301, 262–266.
11. Shimma N., Umeda I., Arasaki M., Murasaki C., Masubuchi K., Kohchi Y., Miwa M., Ura M., Sawada N., Tahara H., Kuruma I., Horii I., Ishitsuka H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 8, 1697–1706.
12. Sawada S., Okajima S., Aiyama R., Nokata K., Furuta T., Yokokura T., Sugino E., Yamaguchi K., Miyasaka T., *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 1446–1454.
13. da Silva Santos S., Igne Ferreira E., Giarolla J., *Molecules*, **2016**, 21, 686–707.
14. (a) Chari R. V., Miller M. L., Widdison W. C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 3796–3827; (b) Sliwkowski M. X., Mellman I., *Science*, **2013**, 341, 1192–1198; (c) de Goeij B. E., Lambert J. M., *Curr. Opin. Immunol.*, **2016**, 40, 14–23.
15. (a) Böhme D., Beck-Sickinger A. G., *J. Pept. Sci.*, **2015**, 21, 186–200; (b) Choi H., Jeena M. T., Palanikumar L., Jeong Y., Park S., Lee E., Ryu J. H., *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 5637–5640; (c) Nakase I., Konishi Y., Ueda M., Saji H., Futaki S., *J. Control. Release*, **2012**, 159, 181–188.

16. 今井輝子, *Drug Delivery System*, **2015**, 30–35.
17. (a) Kanoh K., Kohno S., Asari T., Harada T., Katada J., Muramatsu M., Kawashima H., Sekiya H., Uno I., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 2847–2852; (b) Kanoh K., Kohno S., Katada J., Takahashi J., Uno I., *J. Antibiotics*, **1999**, *52*, 134–141; (c) Kanoh K., Kohno S., Katada J., Hayashi Y., Muramatsu M., Uno I., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1999**, *63*, 1130–1133; (d) Hayashi Y., Orikasa S., Tanaka K., Kanoh K., Kiso Y., *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 8402–8405.
18. (a) Nicholson B., Lloyd G. K., Miller B. R., Palladino M. A., Kiso Y., Hayashi Y., Neuteboom S. T., *Anticancer Drugs*, **2006**, *17*, 25–31; (b) Kanoh K., Kohno S., Katada J., Takahashi J., Uno I., Hayashi Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 1451–1457; (c) Hayashi Y., Yamazaki-Nakamura Y., Yakushiji F., *Chem. Pharm. Bull.*, **2013**, *61*, 889–901.
19. Zhou J., Giannakakou P., *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2005**, *5*, 65–71.
20. (a) Pettit G. R., Temple C., Narayanan V. L., Varma R., Simpson M. J., Boyd M. R., Rener G. A., Bansal N., *Anticancer Drug Des.*, **1995**, *10*, 299–309. (b) Nielsen T., Bentzen L., Pedersen M., Tramm T., Rijken P. F., Bussink J., Horsman M. R., Østergaard L., *Clin. Cancer Res.*, **2012**, *18*, 6469–6477.
21. (a) Siemann D. W., Bibby M. C., Dark G. G., Dicker A. P., Eskens F. A., Horsman M. R., Marme D., LoRusso P. M., *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*, 416–420; (b) Gaya A. M., Rustin G. J. S., *Clin. Oncol.*, **2005**, *17*, 277–290; (c) Lee R. M., Gewirtz D. A., *Drug Dev. Res.*, **2008**, *69*, 352–358; (d) Pilat M. J., LoRusso M. J., *J. Cell Biochem.*, **2006**, *99*, 1021–1039; (e) Singh A. V., Bandi M., Raje N., Richardson P., Palladino M. A., Chauhan D., Anderson K., *Blood*, **2011**, *117*, 5692–5700.
22. (a) <http://www.beyondspringpharma.com/plinabulin/> (accessed in Jan. 2018); (b) 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., Cropp G., Ashton E., LoRusso P. M., *Clin. Cancer Res.*, **2010**, *16*, 5892–5899.
23. (a) Dye D., Watkins J., *Br. Med. J.*, **1980**, *280*, 1353; (b) Kloover J. S., den Bakker M. A., Gelderblom H., van Meerbeeck J. P., *Br. J. Cancer*, **2004**, *90*, 304–305.
24. (a) Stella V. J., Nti-Addae K. W., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2007**, *59*, 677–694; (b) Huttunen K. M., Raunio H., Rautio J., *Pharmacol. Rev.*, **2011**, *63*, 750–771; (c) Chassaing C., Berger M., Heckerroth A., Ilg T., Jaeger M., Kern C., Schmid K., Uphoff M., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 1111–1114.
25. Mantyla A., Vepsalainen J., Jarvinen T., Nevalainen T., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 3793–3794.
26. (a) Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004–

- 2021; (b) Kolb H. C., Sharpless K. B., *Drug Discov. Today*, **2003**, *8*, 1128–1137; (c) Patterson D. M., Nazarova L. A., Prescher J. A., *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, 592–605.
27. Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596–2599.
28. (a) Link A. J., Vink M. K. S., Tirrell D. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 10598–10602; (b) VanBrunt M. P., Shanebeck K., Caldwell Z., Johnson J., Thompson P., Martin T., Dong H., Li G., Xu H., D'Hooge F., Masterson L., Bariola P., Tiberghien A., Ezeadi E., Williams D. G., Hartley J. A., Howard P. W., Grabstein K. H., Bowen M. A., Marelli M., *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 2249–2260; (c) Hong V., Steinmetz N. F., Manchester M., Finn M. G., *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 1912–1916.
29. (a) Heck H. D., Casanova-Schmitz M., Dodd P. B., Schachter E. N., Witek T. J., Tosun T., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **1985**, *46*, 1–3; (b) Casanova M., Heck H. D., Everitt J. I., Harrington W. W. Jr., Popp J. A., *Food Chem. Toxicol.*, **1988**, *26*, 715–716.
30. (a) Totsuka K., Shimizu K., Konishi M., Yamamoto S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, *36*, 757–761; (b) Nakashima M., Uematsu T., Oguma T., Yoshida T., Mizojiri K., Matsuno S., Yamamoto S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, *36*, 762–768; (c) Wellington K., Curran M. P., *Drugs*, **2004**, *64*, 2597–2618. (d) Bryson H. M., Brogden R. N., *Drugs*, **1993**, *45*, 589–621.
31. Power N. P., Bethell D., Proctor L., Latham E., Dawson P., *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 1554–1562.
32. Nishiguchi S., Sydnés M. O., Taguchi A., Regnier T., Kajimoto T., Node M., Yamazaki Y., Yakushiji F., Kiso Y., Hayashi Y., *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 314–320.
33. (a) Alper P. B., Hung S.-C., Wong C.-H., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 6029–6032; (b) Lundquist J. T. 4th, Pelletier J. C., *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 781–783.
34. Hasenpusch D., Bornscheuer U. T., Langel W., *J. Mol. Model.*, **2011**, *17*, 1493–1506.
35. Bencharit S., Morton C. L., Hyatt J. L., Kuhn P., Danks M. K., Potter P. M., Redinbo M. R., *Chem. Biol.*, **2003**, *10*, 341–349.
- 36 (a) Hayashi Y., Takeno H., Chinen T., Muguruma K., Okuyama K., Taguchi A., Takayama K., Yakushiji F., Miura M., Usui T., Hayashi Y., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2014**, *5*, 1094–1098; (b) 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.*, **2012**, *20*, 4279–4289. (c) 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.*, **2012**, *55*, 1056–1071.

37. Peddi P. F., Hurvitz S. A., *Future Oncol.*, **2013**, *9*, 319–326.
38. Senter P. D., Sievers E. L., *Nat. Biotechnol.*, **2012**, *30*, 631–637.
39. (a) Bross P. F., Beitz J., Chen G., Chen X. H., Duffy E., Kieffer L., Roy S., Sridhara R., Rahman A., Williams G., Pazdur R., *Clin. Cancer Res.*, **2001**, *7*, 1490–1496; (b) Hamann P. R., Hinman L. M., Hollander I., Beyer C. F., Lindh D., Holcomb R., Hallett W., Tsou H. R., Upešlacis J., Shochat D., Mountain A., Flowers D. A., Bernstein I., *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 47–58.
40. Schaefer N. G., Huang P., Buchanan J. W., Wahl R. L., *J. Nucl. Med.*, **2011**, *52*, 830–838.
41. Kaminski M. S., Zelenetz A. D., Press O. W., Saleh M., Leonard J., Fehrenbacher L., Lister T. A., Stagg R. J., Tidmarsh G. F., Kroll S., Wahl R. L., Knox S. J., Vose J. M., *J. Clin. Oncol.*, **2001**, *19*, 3918–3928.
42. Agarwal P., Bertozzi C. R., *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 176–192.
43. Lewis Phillips G. D., Li G., Dugger D. L., Crocker L. M., Parsons K. L., Mai E., Blättler W. A., Lambert J. M., Chari R. V., Lutz R. J., Wong W. L., Jacobson F. S., Koeppen H., Schwall R. H., Kenkare-Mitra S. R., Spencer S. D., Sliwkowski M. X., *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 9280–9290.
44. (a) Sun M. M., Beam K. S., Cerveny C. G., Hamblett K. J., Blackmore R. S., Torgov M. Y., Handley F. G., Ihle N. C., Senter P. D., Alley S. C., *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 1282–1290; (b) Zuberbühler K., Casi G., Bernardes G. J., Neri D., *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 7100–7102.
45. (a) Junutula J. R., Raab H., Clark S., Bhakta S., Leipold D. D., Weir S., Chen Y., Simpson M., Tsai S. P., Dennis M. S., Lu Y., Meng Y. G., Ng C., Yang J., Lee C. C., Duenas E., Gorrell J., Katta V., Kim A., McDorman K., Flagella K., Venook R., Ross S., Spencer S. D., Lee Wong W., Lowman H. B., Vandlen R., Sliwkowski M. X., Scheller R. H., Polakis P., Mallet W., *Nat. Biotechnol.*, **2008**, *26*, 925–932; (b) Axup J. Y., Bajjuri K. M., Ritland M., Hutchins B. M., Kim C. H., Kazane S. A., Halder R., Forsyth J. S., Santidrian A. F., Stafin K., Lu Y., Tran H., Seller A. J., Biroc S. L., Szydlak A., Pinkstaff J. K., Tian F., Sinha S. C., Felding-Habermann B., Smider V. V., Schultz P. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2012**, *109*, 16101–16106; (c) Xiao H., Chatterjee A., Choi S. H., Bajjuri K. M., Sinha S. C., Schultz P. G., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2013**, *52*, 14080–14083.
46. (a) Jeger S., Zimmermann K., Blanc A., Grünberg J., Honer M., Hunziker P., Struthers H., Schibli R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 9995–9997; (b) Siegmund V., Schmelz S., Dickgiesser S., Beck J., Ebenig A., Fittler H., Frauendorf H., Piater B., Betz U. A., Avrutina O., Scrima A., Fuchsbaier H. L., Kolmar H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*,

- 13420–13424; (c) Dorywalska M., Strop P., Melton-Witt J. A., Hasa-Moreno A., Farias S. E., Galindo Casas M., Delaria K., Lui V., Poulsen K., Loo C., Krimm S., Bolton G., Moine L., Dushin R., Tran T. T., Liu S. H., Rickert M., Foletti D., Shelton D. L., Pons J., Rajpal A., *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 650–659.
47. (a) Uhlén M., Guss B., Nilsson B., Gatenbeck S., Philipson L., Lindberg M., *J Biol Chem.*, **1984**, *259*, 1695–1702; (b) Hober S., Nord K., Linhult M., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2007**, *848*, 40–47; (c) Lund L. N., Christensen T., Toone E., Houen G., Staby A., St Hilaire P. M., *J. Mol. Recognit.*, **2011**, *24*, 945–952.
48. (a) Jansson B., Palmcrantz C., Uhlen M., Nilsson B., *Protein Eng.*, **1990**, *2*, 555–561; (b) Mazzucchelli S., Colombo M., De Palma C., Salvade A., Verderio P., Coghi M. D., Clementi E., Tortora P., Corsi F., Prosperi D., *ACS Nano* **2010**, *4*, 5693–5702; (c) Qtaishat N. M., Gussin H. A., Pepperberg D. R., *Anal. Biochem.*, **2013**, *432*, 49–57.
- 49 Nilsson B., Moks T., Jansson B., Abrahmsen L., Elmlblad A., Holmgren E., Henrichson C., Jones T. A., Uhlen M., *Protein Eng.* **1987**, *1*, 107–113.
50. Braisted A. C., Wells J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1996**, *93*, 5688–5692.
51. Deisenhofer J., *Biochemistry*, **1981**, *20*, 2361–2370.
52. Kratzin H. D., Palm W., Stangel M., Schmidt W. E., Friedrich J., Hilschmann N., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1989**, *370*, 263–272.
53. (a) Katayama H., Hojo H., Ohira T., Nakahara Y., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 5492–5494. (b) Byrne C., McEwan P. A., Emsley J., Fischer P. M., Chan W. C., *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 2589–2591.
54. Chang C. D., Meienhofer J., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1978**, *11*, 246–249.
55. Townend R., Kumosinski T. F., Timasheff S. N., Fasman G. D., Davidson B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1966**, *23*, 163–169.
56. (a) Matsueda R., Walter R. J., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1980**, *16*, 392–401; (b) Matsueda R., Higashida S., Ridge R. J., Matsueda G. R., *Chem. Lett.*, **1982**, *11*, 921–924; (c) Bernatowicz M. S., Matsueda R., Matsueda G. R., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1986**, *28*, 107–112; (d) Rentier C., Fukumoto K., Taguchi A., Hayashi Y., *J. Pept. Sci.*, **2017**, *23*, 496–504.
57. Taguchi A., Fukumoto K., Asahina Y., Kajiyama A., Shimura S., Hamada K., Takayama K., Yakushiji F., Hojo H., Hayashi Y., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 3186–3189.
58. (a) Fukumoto K., Adachi K., Kajiyama A., Yamazaki Y., Yakushiji F., Hayashi Y., *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 535–538; (b) Fukumoto K., Kajiyama A., Shimura S., Taketa K., Kimura S., Taguchi A., Takayama K., Yakushiji F., Hayashi Y., *Aisan J. Org. Chem.*, **2015**, *4*, 1030–1033.
59. (a) García-Martín F., Quintanar-Audelo M., García-Ramos Y., Cruz L. J., Gravel C.,

- Furic R., Côté S., Tulla-Puche J., Albericio F., *ACS Comb. Sci.*, **2006**, 8, 213–220; (b) Ramesh S., Cherkupally P., Govender T., Kruger H. G., Albericio F., de la Torre B. G., *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 2334–2337.
60. Reed J., Reed T. A., *Anal. Biochem.*, **1997**, 254, 36–40.
 61. Nahta R., Esteva F. J., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2004**, 53, 186–190.
 62. Yamaguchi M., Nishii Y., Nakamura K., Aoki H., Hirai S., Uchida H., Sakuma Y., Hamada H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, 454, 600–603.
 63. Unverdorben F., Färber-Schwarz A., Richter F., Hutt M., Kontermann R. E., *Protein Eng. Des. Sel.*, **2012**, 25, 81–88.
 64. Keeble A. H., Khan Z., Forster A., James L. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**, 105, 6045–6050.
 65. (a) Hui J. Z., Tamsen S., Song Y., Tsourkas A., *Bioconjugate Chem.*, **2015**, 26, 1456–1460; (b) Perols A, Karlström A. E., *Bioconjugate Chem.*, **2014**, 25 481–488; (c) Ito Y., WO patent 2016186206 A1, Nov., 24, 2016.
 66. (a) Kent S. B., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 338–351; (b) Hojo H., *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14, 6368–6374; (c) Delgado A., Clardy J., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2862–2866.
 67. Hayashi T., Yasueda Y., Tamura T., Takaoka Y., Hamachi I., *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 5372–5380.
 68. (a) Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y., *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 5836–5840; (b) Fretz M. M., Penning N. A., Al-Taei S., Futaki S., Takeuchi T., Nakase I., Storm G., Jones A. T., *Biochem. J.*, **2007**, 403, 335–342.
 69. (a) Gutmann V., *Coordin. Chem. Rev.*, **1976**, 18, 225–255; (b) Cataldo F., *Eur. Chem. Bull.*, **2015**, 4, 92–97.
 70. Laurence C., Nicolet P., Dalati M. T., Abboud J.-L. M., Notario R., *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 5807–5816.
 71. Nishimura O., Kitada C., Fujino M., *Chem. Pharm. Bull.*, **1978**, 26, 1576–1585.
 72. Koide T., Otaka A., Suzuki H., Fujii N., *Synlett.*, **1991**, 5, 345–346.
 73. Taguchi A., Kobayashi K., Kotani A., Muguruma K., Kobayashi M., Fukumoto K., Takayama K., Hakamata H., Hayashi Y., *Chem. Eur. J.*, **2017**, 23, 8262–8267.
 74. More S. V., Chang T. T., Chiao Y. P., Jao S. C., Lu C. K., Li W. S., *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 64, 169–178.
 75. McGinley C. M., Jacquot C., van der Donk W. A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 4049–4052.

掲載論文

本論文の内容は以下の論文に発表した。

- 1) Fumika Yakushiji, **Kyohei Muguruma**, Yoshiki Hayashi, Takuya Shirasaka, Ryosuke Kawamata, Hironari Tanaka, Yushi Yoshiwaka, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi, Click strategy with disodium salts of amino acids improved water solubility of plinabulin and KPU-300, *Bioorg. Med. Chem.*, 25, 3623–3630 (2017). [第一章]
- 2) **Kyohei Muguruma**, Fumika Yakushiji, Ryosuke Kawamata, Daichi Akiyama, Risako Arima, Takuya Shirasaka, Yamato Kikkawa, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Takeshi Fukuhara, Tetsuro Watabe, Yuji Ito, Yoshio Hayashi, Novel hybrid of a plinabulin prodrug with an IgG binding peptide and its application to a tumor selective noncovalent-type antibody-drug conjugate, *Bioconjugate Chem.*, 27, 1606-1613 (2016). [第二章]
- 3) **Kyohei Muguruma**, Takuya Shirasaka, Daichi Akiyama, Kentarou Fukumoto, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, An efficient conjugation method between hydrophilic and hydrophobic components using a solid-phase assisted disulfide ligation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 2170-2173. (2018). [第三章]

参考論文

- 1) Akihiro Taguchi, Kiyotaka Kobayashi, Akira Kotani, **Kyohei Muguruma**, Misaki Kobayashi, Kentarou Fukumoto, Kentaro Takayama, Hideki Hakamata, Yoshio Hayashi, 3-Nitro-2-pyridinesulfenates as efficient solution and solid-phase disulfide bond forming agents, *Chem. Eur. J.*, 23, 8262–8267 (2017).
- 2) Kentaro Takayama, Cedric Rentier, Tomo Asari, Akari Nakamura, Yusuke Saga, Takahiro Shimada, Kei Nirasawa, Eri Sasaki, **Kyohei Muguruma**, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi, Development of potent myostatin inhibitory peptides through hydrophobic residue-directed structural modification, *ACS Med. Chem. Lett.*, 8, 751–756 (2017).
- 3) Yoshiki Hayashi, Haruka Takeno, Takumi Chinen, **Kyohei Muguruma**, Kohei Okuyama, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, Masahiko Miura, Takeo Usui, Yoshio Hayashi, Development of a New Benzophenone–Diketopiperazine-Type Potent Antimicrotubule Agent Possessing a 2-Pyridine Structure, *ACS Med. Chem. Lett.*, 5, 1094–1098 (2014).
- 4) Fumika Yakushiji, Hironari Tanaka, **Kyohei Muguruma**, Takahiro Iwahashi, Yuri Yamazaki, Yoshio Hayashi, Prodrug Study of Plinabulin using a Click Strategy Focused on the Effects of a Replaceable Water-solubilizing Moiety, *Chem. Pharm. Bull.*, 60, 877–881 (2012).
- 5) Fumika Yakushiji, Hironari Tanaka, **Kyohei Muguruma**, Takahiro Iwahashi, Yuri Yamazaki, Yoshio Hayashi, Water-Soluble Prodrug of Antimicrotubule Agent Plinabulin: Effective Strategy with Click Chemistry, *Chem. Eur. J.*, 17, 12587–12590 (2011).

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬品化学教室 林良雄教授に心より深謝申し上げます。

本論文をまとめるにあたり懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部 野水基義教授、松本隆司教授に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 薬師寺文華講師に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、種々有益なる御指導、ご協力下さいました東京薬科大学薬品化学教室 谷口敦彦講師、高山健太郎講師、田口晃弘助教、山崎有理博士、福元謙太郎博士に心より感謝申し上げます。

抗体を用いた実験において御指導、御助言をいただきました鹿児島大学 伊東祐二教授、岸本聡修士に感謝申し上げます。

細胞実験の基礎や評価系の構築において御指導、御助言をいただきました東京薬科大学薬学部病態生化学教室 吉川大和准教授、東京医科歯科大学 渡部徹郎教授、順天堂大学医学部 福原武志准教授に感謝申し上げます。

グローバルな視点での研究をご御教示いただきました Cedric Rentier 博士、Pillaiyar Thanigaimalai 博士に心より感謝申し上げます。

本研究の礎を築いてくださいました東京薬科大学薬品化学教室 岩橋孝祐修士、田中達也学士に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、実験にご協力くださいました義若祐士学士、川俣亮介学士、久保島緑学士、秋山大地学士、有間理沙子学士、中島萌学士、白坂拓也氏、坂本宗一郎氏、藤田好珠氏、伊藤真由氏に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、多方面からサポートして下さいました東京薬科大学薬品化学教室の諸氏に感謝申し上げます。

特別研究員（DC1）に採用していただき、特別研究員奨励費（15J09551）および研究奨励金により、公私に渡り支援していただきました日本学術振興会に感謝申し上げます。

本研究に際し、多数の化合物の X 線結晶構造解析、核磁気共鳴スペクトル、質量分析、元素分析を行なっていただきました東京薬科大学中央分析センターの諸氏に感謝申し上げます。

最後に、これまでの学生生活において、常に支えて下さいました両親ならびに家族に深く感謝申し上げます。