

氏名（本籍）	むぐるま きょうへい 六車 共平（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 287 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査） 教授 林 良雄 教授 野水 基義 教授 松本 隆司

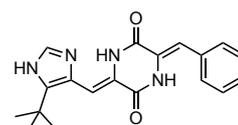
論文内容の要旨

プロドラッグは生体内で構造を変換することで活性を示す医薬品であり、所望の生物活性をもつ化合物をプロドラッグ化することで経口吸収性や溶解性を改善することができる。また、抗がん剤の場合は、正常細胞への毒性を軽減させることも可能である。そのため、近年の創薬研究においてプロドラッグ化は重要な戦略であり、すでに多くのプロドラッグが臨床で利用されている。

申請者の所属する研究室で創製された Plinabulin (**1**, Figure 1) は 2,5-diketopiperazine (DKP) 環を有する抗がん剤候補化合物であり、注射剤としての第 III 相臨床試験が進行中である。この化合物はチューブリン重合阻害作用に基づく強力な殺細胞活性 ($IC_{50} = 15 \text{ nM}$, HT-29 cell) に加え、腫瘍部位へ誘導・新生される未熟な血管内皮細胞を障害する作用をもつが、水溶性が極めて低い ($< 0.1 \mu\text{g/mL}$) ことが問題とされている。本化合物のプロドラッグ化研究は、近年の医薬候補化合物群に多く見られる難水溶性という課題を解決するため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。

1. Plinabulin の水溶性プロドラッグの創製

まず、Plinabulin の水溶性プロドラッグ化を検討した。Plinabulin は小分子化合物であるため修飾点が限られているが、DKP 環をモノラクチム構造へと変換するこ

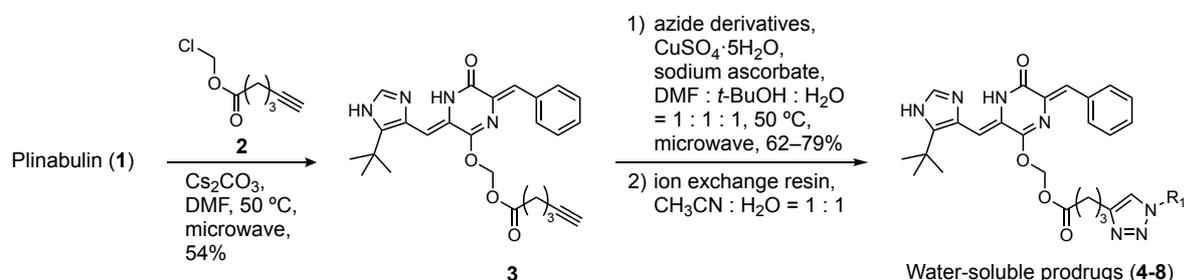


Plinabulin (**1**, Phase III)
 $IC_{50} = 15 \text{ nM}$ (HT-29 cell)
 Solubility $< 0.1 \mu\text{g/mL}$

Figure 1.

Plinabulin.

とでリンカー構造を付加することに成功した (Scheme 1)。その後、クリックケミストリーの一つであり、無保護の水溶性補助基 (R_1) を直接導入することのできる CuAAC (Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition) 反応を利用して、アミノ酸や単糖のような水溶性構造を有するプロドラッグ **4–8** を合成した (Scheme 1)。



Scheme 1. Synthesis of Plinabulin prodrugs by the CuAAC reaction.

得られたプロドラッグの水溶性は親化合物 (**1**) と比較して大幅に向上した (Table 1)。特に、ジカルボン酸のナトリウム塩構造を有する誘導体 **6–8** で高い水溶性を示した (> 100 mg/mL)。臨床試験で用いられている Plinabulin の濃度は 4 mg/mL であるが、これらプロドラッグはより高い濃度の溶液を調製可能であり、実用に耐えると考えられる。また、本プロドラッグはエステル部位で分解することで、親化合物 (**1**) を再生することを想定しているため、これらプロドラッグのエステラーゼによる *in vitro* 加水分解反応を実施した。その結果、水溶性官能基 (R_1) の違いにより、幅広い半減期で親化合物を再生することが明らかとなった ($t_{1/2}$ = 0.37–12 h)。すなわち、本プロドラッグ合成法は2段階と短工程であるが、導入する官能基に依存して多彩な性質のプロドラッグを与えることが可能であり、水溶性や半減期をコントロールできることが明らかとなった。

Table 1. Solubility and half-life of prodrugs.

entry	R	solubility	half life (h)
1: Plinabulin (1)	-	< 0.1 µg/mL	-
2: L-Ser (4)		6.4 mg/mL	1
3: Gal (5)		7.5 µg/mL	n.d.
4: L-Asp (6)		> 100 mg/mL	12.0 ± 1.9
5: L-Glu (7)		> 100 mg/mL	5.4 ± 0.2
6: D-Glu (8)		> 100 mg/mL	9.0 ± 0.7

n.d.: not determined

2. 抗体結合ペプチドを用いた抗体薬物複合体 (Antibody-drug conjugate; ADC)

Plinabulin のプロドラッグは導入する官能基 (R_1) の構造を変更することで、容易にその性質を変える。そこで、 R_1 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 (Z33, FNMQQRRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD, K_d = 8.2 nM,

human IgG₁)を導入することで、抗体薬物複合体(ADC)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。まず、Scheme 1と同様にCuAAC

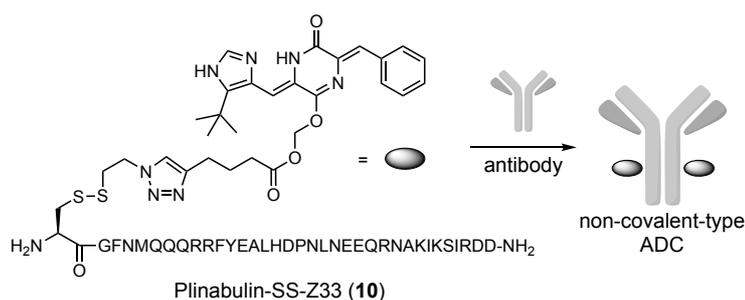
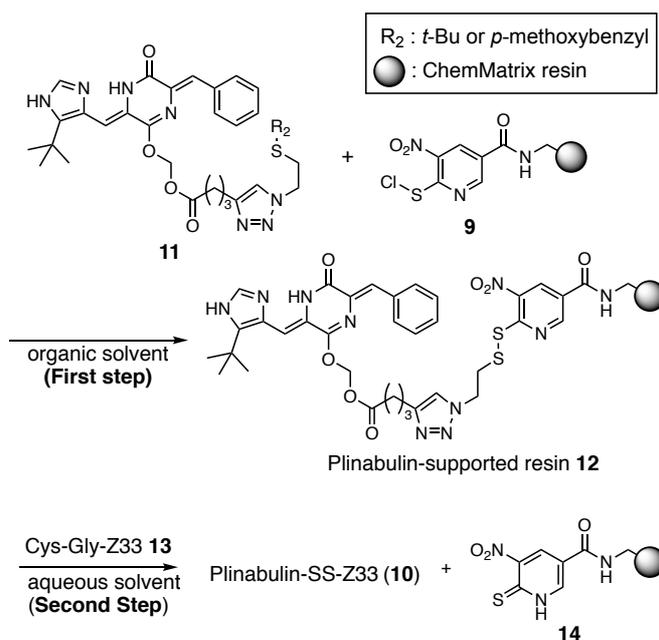


Figure 2. Noncovalent-type antibody-drug conjugate (ADC).

Z33 ペプチドの架橋体合

成を試みた。しかし、Z33 ペプチド(水溶性)と Plinabulin(難水溶性)は物性が大きく異なるため、同一系での反応が困難であり、目的とする架橋体を得ることはできなかった。そこで、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)基を固相に担持したジスルフィド化試薬 **9** を用いる新規合成法(Solid-Phase assisted DiSulfide Ligation, SPDSL)を応用し、ジスルフィド架橋体 **10** を合成することとした(Scheme 2)。SPDSLは、一段階目において難水溶性の Plinabulin スルフィド誘導体 **11** を有機溶媒中で樹脂上へ担持し、樹脂 **12** とした後、水系溶媒中にてチオール含有 Z33 ペプチド **13** とジスルフィド交換反応を行う二段階反応である。試薬 **9** は固相担体として両親媒性の ChemMatrix[®] resin を用いているため、有機系と水系のどちらの溶媒に対しても適応できる。そのため、各反応段階でそれぞれの基質に適した溶媒を使用することが可能になる。本手法により、液相系では合成困難であった Plinabulin と Z33 の架橋体を 29%の単離収率で合成することに成功した。



Scheme 2. Synthesis of Plinabulin-SS-Z33 (**10**) by the SPDSL reaction.

続く表面プラズモン共鳴法による解析の結果、架橋体 **10** は良好な抗体結合能($K_d = 46.6$ nM, human IgG₁)を示し、抗体との共存下で、非共有結合的にADCを形成することが示された(Figure 2)。HER2を過剰発現しているSKBR-3細胞を用いた*in vitro*殺細胞活性評価においては、抗HER2抗体(Herceptin)の共存下で、有意な活性を示した(Figure 3A)。一方で、HER2発現量の少ないMCF-7細胞には殺細胞活性を示さなかった(Figure 3B)。親化合物であるPlinabulin(**1**)は非選択

的な殺細胞活性を示すのに対して、架橋体 **10** は非共有結合的であるにもかかわらず、抗体依存的な腫瘍指向性を有するプロドラッグであることが明らかとなった。

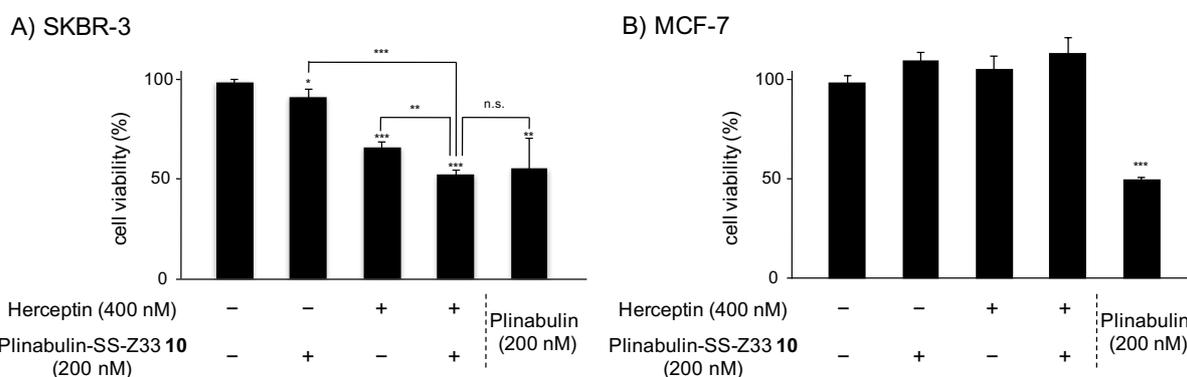
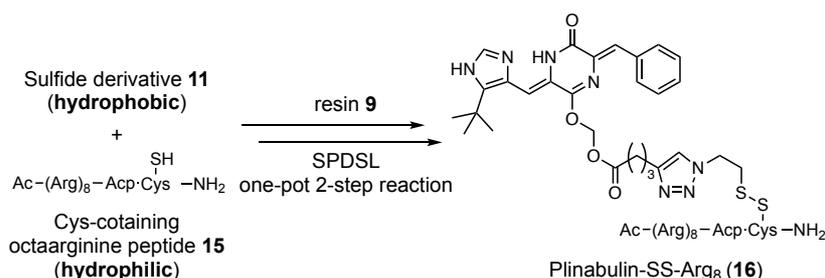


Figure 3. Cytotoxicity of noncovalent-type ADC, against (A) SKBR-3 cells and (B) MCF-7 cells, n.s.: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Data ($n = 3$) are shown as means \pm SD.

3. 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

Plinabulin と Z33 ペプチド間の架橋反応において観察されたように、一般に溶解性の差の大きな分子間での結合形成は困難である。しかし近年では、抗体薬物複合体をはじめとして、水溶性

の乏しい小分子とペプチドやタンパク質などの水溶性の高分子との架橋体を形成させる試みは数多く実施されており、物性の大きく異なる化合物同士の反応の需要は高まっている。SPDSL (Scheme 2) はこれらの需要に応える新たな合成手法である。そこで、本反応の一般性を高めるため、通常液相反応での合成が困難な Plinabulin (難水溶性) とオクタアルギニン (水溶性) の架橋体 (Plinabulin-SS-Arg₈, **16**) をモデルとして、反応条件を検討した (Scheme 3)。その結果、一段階目は CH₃CN や CH₂Cl₂ などの溶媒が適しており、DMF や MeOH では反応効率の低下が確認された。この



Scheme 3. Conjugation of hydrophobic and hydrophilic compounds by the SPDSL reaction.

Table 2. Isolated yields of SPDSL reaction.

entry	thiol containing compounds	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	32
5	Gal-SH	29

Acp: 6-aminocaproic acid
Z33: FNMQQRRFYALHDPNLNNEEQRNAKIKSIRDD
Gal-SH: 2-mercaptoethyl β -D-galactopyranoside

結果は Lewis 塩基性の指標である Gutmann's Donor Number (DN) との相関が得られ、DN の低い溶媒ほど一段階目に適しているという傾向が得られた。二段階目の反応は、pH 未調整の条件において、反応後 5 日間経過しても完結しなかった。そこで、各種緩衝液 (pH 3.8–7.4) を用い、反応系中の pH を変化させることで反応の促進を図った。酢酸緩衝液 (50 mM, pH 5.0) : CH₃CN (3 : 2) を溶媒として使用した際に、3 h で反応が完結し、91% の HPLC 収率で架橋体 **16** を得ることに成功した。また、本手法は他のペプチドや単糖との架橋体合成に応用できたことから (Table 2, isolated yields: 29–45%)、汎用性の高い反応であることが示唆された。

SPDSL 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。ここまで記述してきた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。SPDSL 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。

【研究結果の掲載誌】

1. K. Muguruma, F. Yakushiji, R. Kawamata, D. Akiyama, R. Arima, T. Shirasaka, Y. Kikkawa, A. Taguchi, K. Takayama, T. Fukuhara, T. Watabe, Y. Ito, Y. Hayashi, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1606–1613.
2. F. Yakushiji, K. Muguruma, Y. Hayashi, T. Shirasaka, R. Kawamata, H. Tanaka, Y. Yoshiwaka, A. Taguchi, K. Takayama, Y. Hayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3623–3630.
3. K. Muguruma, T. Shirasaka, D. Akiyama, K. Fukumoto, A. Taguchi, K. Takayama, A. Taniguchi, Y. Hayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2170–2173.

論文審査の結果の要旨

六車共平 氏の博士学位申請論文は、チューブリン重合阻害作用を有する難水溶性薬物 **Plinabulin** を対象として、プロドラッグ化研究を実施したものである。2018年現在、**Plinabulin** は注射剤として第 III 相臨床試験が進められているが、低い水溶性 ($<0.1 \mu\text{g/mL}$) が問題とされている薬剤である。氏は **Plinabulin** の「水溶性プロドラッグ」の創製研究を皮切りとし、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」を創製した。また、その研究の過程で、物性の大きく異なる化合物間の架橋反応を効率的に行える「固相ジスルフィド架橋法」という新たな反応形態の提案に至った。氏の博士学位申請論文は、これらの研究成果を 3 章に亘ってまとめたものである。

第一章では、**Plinabulin** の水溶性改善を目的としたプロドラッグ化研究について述べている。難水溶性薬物の研究開発において水溶性の改善は極めて重要な課題であることから、**Huisgen** 反応を利用した 2 工程の反応により全 7 種類の **Plinabulin** の水溶性プロドラッグを合成した。合成したプロドラッグの水溶性およびエステラーゼにより分解される時間の半減期を評価した。その結果、 100 mg/mL 以上の水溶性を示すプロドラッグや幅広い半減期で親化合物を再生(半減期: $0.37\text{-}12 \text{ h}$) するプロドラッグの獲得に成功した。得られたプロドラッグは臨床試験で用いられる濃度よりも高濃度の溶液を調製することができ、臨床での使用に耐える化合物であると期待される。

第二章では、一章で確立した **Plinabulin** の化学修飾法に立脚して、腫瘍指向性プロドラッグの創製について述べている。すなわち、抗体結合ペプチド (**Z33**) を利用し、非共有結合的に抗体と **Plinabulin** の複合体を形成する新しい抗体薬物複合体の創製研究である。**Z33** ペプチドと **Plinabulin** の架橋体合成は、これら化合物の反応溶媒に対する溶解度が極端に異なるため、液相系の反応での合成が困難であった。そこで、氏は **Npys-Cl** 樹脂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 **one-pot** の二段階反応であり、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、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からなる。そのため、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。本手法により、**Plinabulin** と **Z33** ペプチドのジスルフィド架橋体を獲得することに成功した。この架橋体は **Herceptin** と非共有結合的な抗体薬物複合体 ($K_d = 46.6 \text{ nM}$) 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。抗体と架橋体を混合するのみで抗体薬物複合体を形成する点は特筆すべきであり、今後のさらなる発展が期待される。

第三章では、第二章で考案した固相ジスルフィド架橋法の反応条件を検討することで、有機化学における本架橋法の一般性を検討している。液相系での合成が困難なモデル化合物として **Plinabulin** と水溶性ペプチドのオクタアルギニンの架橋体を設定し、固相ジスルフィド架橋法の各反応段階の条件の最適化および汎用性を検討した。その結果、固相上に難水溶性化合物を担持する一段階目では、ルイス塩基性の低い溶媒が適していた。二段階目では、**pH5.0** の緩衝液を用いた際に最も効率よく反応が進行することを明らかとした。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（5種、単離収率：29-45%）。本結果は、物性の大きく異なる化合物間の架橋体合成における新規概念の提案に至っている。

以上、六車氏の博士学位申請論文研究は、チューブリン重合阻害剤 **Plinabulin** のプロドラッグ化研究を基盤に、物性（溶解性）の異なる化合物同士の効率的な架橋法の創成という、極めて有機化学における普遍性を有する成果へ繋がった研究である。本研究で得られた知見は、創薬化学分野、特に水溶性プロドラッグの創製を行う上で極めて重要であり、難水溶性薬物の医薬展開における一助となるものと考えられる。加えて、溶解性の異なる分子間の架橋反応は、多様な研究分野における課題であるが、本研究は当該課題解決に向けた独創的な新手法を提供するもので、科学的にも卓越した成果である。すなわち、臨床薬学の基盤形成に有意義な成果と貢献をもたらす研究と言える。したがって、本論文は博士（薬学）学位申請論文として相応しい内容を有すると判断する。