

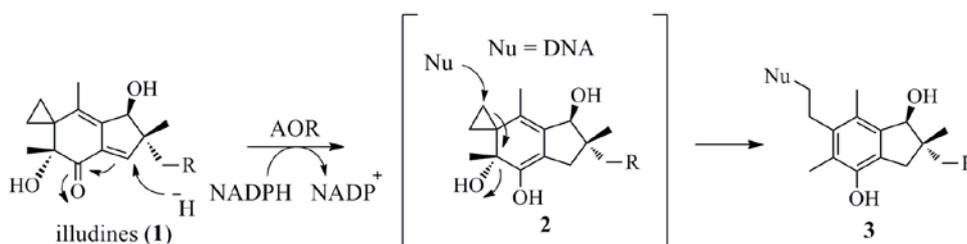
## 小員環の特性を活用する刺激応答プロドラッグの創製

京都大学大学院 薬学研究科 薬品合成化学分野  
高須 清誠

### 1. はじめに

DNA アルキル化剤はがん治療で有効性を示す薬剤であるが、腫瘍細胞と正常細胞との選択性の低さによる重篤な副作用がしばしば問題となる。抗腫瘍活性テルペンであるイルジン類 (**1**) は代謝活性化されたのちにアルキル化剤として働く、いわゆるプロドラッグ様の作用を示す (Scheme 1)。その合成誘導体のイロフルベン は固形癌に対する第二相臨床試験まで進んでいる。しかし、 $\alpha,\beta$ 不飽和ケトン部の求核剤に対する反応性が高いため、還元型グルタチオンなど生体内のチオール化合物により、非酵素的な代謝活性化が進行して無差別なアルキル化が進行し、しばしば重篤な副作用につながるという危惧がある。細胞選択性のさらなる向上には、腫瘍細胞に特徴的な局所環境を精密に認識して活性化される低分子の設計が重要であると考えた。

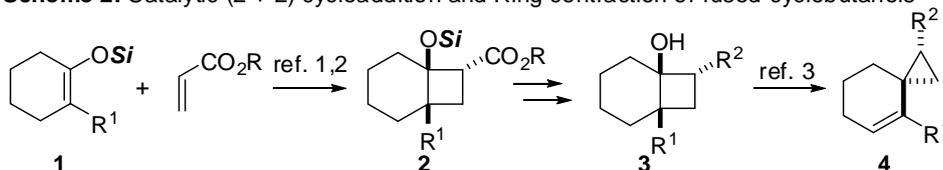
Scheme 1. Enzymatic DNA alkylation mechanism of illudines.



### 2. 方法

我々は研究開始にあたりイルジンの生合成経路に着目した。イルジンの特徴的なスピロシクロプロパン構造は、カチオン転位により四員環が三員環に環縮小して構築されることが提唱されている。

Scheme 2. Catalytic (2 + 2) cycloaddition and Ring contraction of fused-cyclobutanols

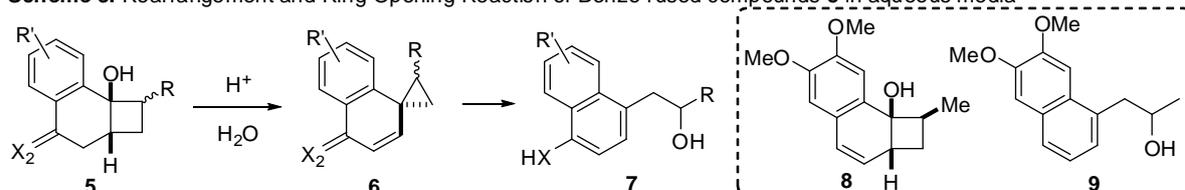


この反応を実験科学的に再現し、細胞選択性の高いアルキル化剤の創製を目指すこととした。我々は、これまでに多置換シクロブタノール誘導体 **1** を立体選択的に与える触媒的(2+2)環化付加反応を開発している<sup>1,2</sup>。それにより合成される縮環シクロブタノール **2** の水酸基をスルホニル化して脱離基として活性化することにより期待どおり脱離に続く環縮小転位が進行し、スピロシクロプロパン **3** を与えることを見出した。また、この転位は基質の立体化学が生成物に反映する立体特異的反応であることも明確にした<sup>3</sup>。合成した **3** は、適切な反応条件において求核剤により三員環が位置選択的に開裂することも明らかにしている (Scheme 2)<sup>4</sup>。これらの一連の化学反応を連続的に生体条件下で行うことができれば、シクロブタノール **3** がアルキル化剤として機能しうると考えた。課題となるのは水酸基の活性化をいかに水性条件下で行うかということになる。ところで、腫瘍細胞の細胞質環境は正常細胞に比べて低 pH である (特に DNA の存在領域であるミトコンドリア内はそのような環境にある)。もし、プロトン酸により **3** の水酸基が活性化され **4** への環縮小転位が進行すれば、低 pH 条件下でのみアルキル化剤として働きうることが期待できると考えた。

### 3. 結果、考察

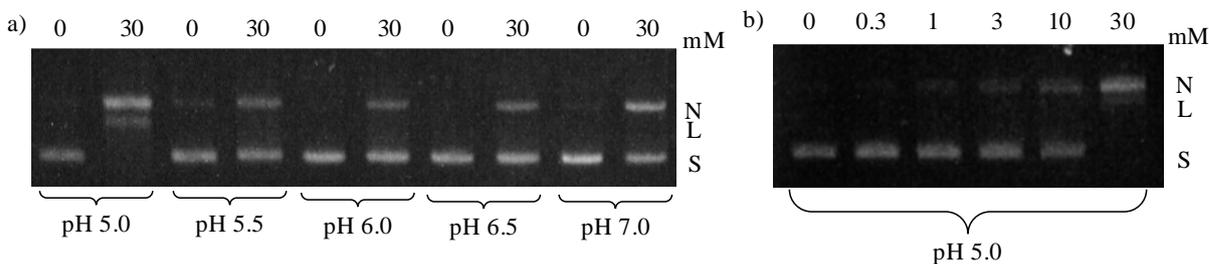
双環性シクロブタノール **1** に対して強酸性条件で転位反応を検討したが、ほとんど反応が進行しなかった。これは水酸基が脱離するには基質の反応性が充分で高くなかったことが原因と考えた。そこで、脱離後のカルボカチオンが安定化するよう隣接位に芳香環が縮環した三環性シクロブタノール **5** を設計・合成した。その結果、予想通り **1** と比べ格段に反応性が向上した。しかしこの場合の生成物は、スピロシクロプロパン **6** でなく、共存する水で三員環が開環したナフタレン化合物 **7** であった (Scheme 3)。なお、アルキル化剤創製を前提とする場合、生じた **6** が速やかに DNA 等の生体高分子と付加体を形成することは細胞選択性を高めるには好都合と考えられる。種々の誘導体に対して、有機合成的に酸性条件における転位反応の速度を評価した結果、現在のところ化合物 **8** を最も有望な化合物として選択した。化合物 **8** は pH6.5 の緩衝液中で転位・開環が進行しナフタレン **9** に変化するが、中性および塩基性条件ではほとんど原料回収であった。

Scheme 3. Rearrangement and Ring Opening Reaction of Benzo-fused compounds **5** in aqueous media



最後に **8** を用いて DNA 切断活性の評価を行った。種々の酸性 pH の緩衝液中、プラスミド DNA と 37 °C で 24 時間培養すると、pH の低下に伴い DNA の切断活性が向上した (Figure 1a)。また pH 5 の緩衝液中、種々の濃度の **8** を用いて 37 °C、24 時間培養したところ、最小 1 mM で DNA の切断が見られ濃度依存的に DNA 切断活性が向上することも確認できた (Figure 1b) <sup>5</sup>。

Figure 1. a) pH and b) concentration dependence of DNA cleavage by **8**. (S: supercoiled, N: nicked, L: linear).



### 4. まとめ

以上まとめると、我々が期待した通り、水中においても縮環シクロブタノール骨格をもつ化合物は酸性環境下で、スピロシクロプロパンに転位することが明らかとなった。また、この化合物は酸性環境で特異的に DNA 鎖を切断することも明らかにした。本結果は、縮環シクロブタノールは酸をトリガーとして活性化されうるプロドラッグ構造として利用できることが示唆された。現在、計画通り合成シクロブタノールがスピロ三員環を経由してアルキル化剤として働いているかについて、DNA-低分子コンジュゲートの生成を確認する検討を行っている。また、さらに活性の高い化合物の創製を目指している。

1. K. Inanaga, K. Takasu, M. Ihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3668-3669.
2. K. Takasu, *Synlett* **2009**, 1905-1914.
3. K. Takasu, Y. Nagamoto, Y. Takemoto, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8427-843.
4. Y. Nagamoto, Y. Takemoto, K. Takasu, *Synlett* **2013**, *24*, 120-124.
5. Y. Nagamoto, A. Hattori, H. Kakeya, Y. Takemoto, K. Takasu, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2622-2624.