

Title	スルホン酸エステルを母核とした刺激応答性リンカーの開発とプロドラッグへの応用
Sub Title	Development of sulfonylester-based self-immolative linkers with higher degradation rates
Author	花屋, 賢悟(Hanaya, Kengo)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>標的部位の微小環境に由来する化学的な刺激に応答し、薬物を放出するプロドラッグの開発は、薬の有効性の向上、および副作用の低減、の両面で重要である。化学的刺激への応答速度が速ければ、狙った場所でのみプロドラッグを活性化することができる。本研究課題では、刺激応答性アミノスルホン酸エステルリンカーを開発し、その化学構造と薬物の放出速度の関係を明らかにした。そしてその結果をふまえ新たな化学構造を持つプロドラッグの開発を試みた。</p> <p>Prodrugs are drug precursors which are designed to be activated through enzymatic or chemical transformation in vivo microenvironment. Fast reaction kinetics of activation reactions are required to exert maximum biological activity with fewer side effects. We have proposed the sulfonate-based prodrug strategy: prodrugs with sulfonylester-based self-immolative linkers release active drugs through enzymatic cleavage of trigger moieties and successive intramolecular nucleophilic attack of terminal amino group to sulfonylester. In this strategy, intramolecular cyclization had been revealed to be a rate limiting step. In this study, various substituents were introduced on terminal amino group and/or alkyl chain of sulfonylester-based linker and reaction kinetics of intramolecular cyclization were evaluated. With the results in hand, photo- and oxidation-sensitive prodrugs were designed and their properties were examined.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K21362 研究分野：生物有機化学</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K21362seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K21362seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 元 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21362

研究課題名(和文)スルホン酸エステルを母核とした刺激応答性リンカーの開発とプロドラッグへの応用

研究課題名(英文)Development of sulfonylester-based self-immolative linkers with higher degradation rates

研究代表者

花屋 賢悟(HANAYA, Kengo)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：50637262

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): 標的部位の微小環境に由来する化学的な刺激に応答し、薬物を放出するプロドラッグの開発は、薬の有効性の向上、および副作用の低減、の両面で重要である。化学的刺激への応答速度が速ければ、狙った場所でのみプロドラッグを活性化することができる。本研究課題では、刺激応答性アミノスルホン酸エステルリンカーを開発し、その化学構造と薬物の放出速度の関係を明らかにした。そしてその結果をふまえた新たな化学構造を持つプロドラッグの開発を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新薬の創出が難しくなっている昨今、既存の薬の有効性を最大限向上させ、かつ副作用を低減させるプロドラッグの開発は創薬において重要である。近年急速に開発が進んでいる抗体-薬物複合体(ADC)もプロドラッグの一種である。特定の化学的刺激に応答し、薬物分子を迅速に放出する刺激応答性リンカーはプロドラッグの開発に欠かせない。本研究では、刺激応答性アミノスルホン酸エステルリンカーの化学構造と薬物放出速度を明らかにし、実用的なプロドラッグの創製に寄与する知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文): Prodrugs are drug precursors which are designed to be activated through enzymatic or chemical transformation in vivo microenvironment. Fast reaction kinetics of activation reactions are required to exert maximum biological activity with fewer side effects. We have proposed the sulfonate-based prodrug strategy: prodrugs with sulfonylester-based self-immolative linkers release active drugs through enzymatic cleavage of trigger moieties and successive intramolecular nucleophilic attack of terminal amino group to sulfonylester. In this strategy, intramolecular cyclization had been revealed to be a rate limiting step. In this study, various substituents were introduced on terminal amino group and/or alkyl chain of sulfonylester-based linker and reaction kinetics of intramolecular cyclization were evaluated. With the results in hand, photo- and oxidation-sensitive prodrugs were designed and their properties were examined.

研究分野：生物有機化学

キーワード：プロドラッグ スルホン酸エステル 分子内環化 -スルタム 自己分解 刺激応答性リンカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

標的部位の微小環境による化学的な刺激に応答し、薬物を放出するプロドラッグの開発は、薬の有効性の向上、および副作用の低減、の両面で重要である。薬物分子をプロドラッグ化するには、その分子がもともと有する官能基（例えば、ヒドロキシ基やアミノ基）に、特定の化学的刺激に応答する種々の部分構造（刺激応答性部位）を連結することが望ましい。しかし、刺激応答性部位は多様な化学構造を有しており、必ずしも薬物分子に直接連結できるとは限らない。薬物分子と種々の刺激応答性部位を自己分解性のリンカー分子を介して連結したプロドラッグならばこの問題を回避することができる。このプロドラッグは、刺激応答性部位が化学刺激を受けて構造変化すると、リンカー分子が直ちに自己分解し、薬物分子を放出する。2003年に Shabat らは、薬物分子のヒドロキシ基と自己分解性リンカーをカルバメートまたは炭酸エステルで連結したプロドラッグを報告した。しかし、カルバメートや炭酸エステルは体内で標的の部位に到達する前に、生体内に広く存在するエステラーゼなどにより酵素的に加水分解、または非酵素的に分解されてしまう恐れがあった。

## 2. 研究の目的

本研究課題代表者は、薬物分子とリンカー分子を連結する化学構造としてスルホン酸エステルに注目した。スルホン酸エステルは、構造が類似しているカルボン酸エステルと比較して、非酵素的な加水分解に対する安定性が高く、さらに特異的な加水分解酵素が知られていない。すでに、本研究代表者は、刺激応答性アミノスルホン酸エステルリンカーを開発し、ペプチダーゼによる加水分解を起点とする薬物分子放出に成功している。本リンカーは、スルホン酸エステルとアミノ基が炭素鎖 3 のリンカーで連結されており、アミノ基にロイシンがアミド結合で連結している。ロイシンが加水分解されると、アミノ基がスルホン酸エステルに対し分子内求核攻撃し、薬物分子が遊離する。この際、リンカー分子の自己分解反応が、薬物分子放出の律速段階であった。本研究では、薬物分子放出速度を制御することを目的として刺激応答性アミノスルホン酸エステルリンカーの構造を種々変換し、開発したリンカーを用いたプロドラッグの創製を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) アミノプロピルスルホン酸エステルを母核とする刺激応答性リンカーの構造を種々変更し、分子内環化反応速度定数  $k$  を測定し、分子構造が分子内環化反応に及ぼす影響について考察した。リンカー部位の構造変換は以下に示す二つのアプローチ、アミノ基への置換基導入とアルキル鎖の構造修飾、で行った。  
(2) ベンジルアンモニウムを刺激応答性部位とする刺激応答性リンカーを創製し、酵素を用いた酸化的代謝、または光分解反応による薬物分子の放出を試みた。

## 4. 研究成果

(1) アミノ基にメチル基を一つまたは二つ導入した化合物は、メチル基の電子供与性誘起効果により求核性が上昇し、分子内環化反応速度定数  $k$  が約 10 倍に上昇した。窒素原子上に電子供与性置換基を導入すると環化速度は上昇する傾向が見られた。しかし、本分子内環化反応においてアミノ基は求核部位として機能するため、 $k$  はアミノ基のかさ高さに対しても非常に敏感であった。メチル基よりも大きな置換基、例えばベンジル基等、を導入すると、 $k$  は 1.5 倍程度しか上昇しなかった。

一方、求核部位と求電子部位をつなぐアルキル鎖上に置換基を導入すると、分子内環化速度が飛躍的に上昇する現象は Thorpe-Ingold 効果として知られている。Thorpe-Ingold 効果による分子内環化速度の上昇を期待して、リンカー中のプロピル基に置換基を導入した化合物を合成した。アミノ基の隣の炭素原子上 (3 位) に置換基を導入すると  $k$  は最大 4 倍程度しか上昇しなかった。末端アミノ基に隣接する炭素上の置換基は環化を加速するものの、環化の際の立体反発も大きく、結果的に加速効果が小さくなったと考えた。一方、真ん中の炭素原子上 (2 位) に置換基の位置を変更すると、 $k$  は 20 倍に上昇した。

上述の結果をもとに設計した、末端アミノ基およびアルキル鎖にメチル基をひとつずつ導入した化合物の  $k$  は元の化合物の 200 倍に達した。

(2) 上記の結果を踏まえて刺激応答性リンカーのアミノ基をベンジルアンモニウムとしたプロドラッグを 2 種類合成し、その分解実験を試みた。末端アミノ基を第四級アンモニウム塩とすることにより、プロドラッグの水溶液中での安定性、溶解性、さらに外部刺激によるトリガー部位の分解促進を期待した。生体内酸化酵素 (CYP) による芳香環またはベンジル位の水酸化を開始としてドラッグを放出するプロドラッグと、光照射により *o*-ニトロベンジル基が分解するとドラッグを放出するプロドラッグを合成した。前者のプロドラッグについては、ラット肝ミクロソーム分画中インキュベートし、反応液の HPLC 分析により代謝活性化を検討した。プロドラッグのピークは消失したが、遊離すると期待していた化合物のピークは確認できず、代わりに生成した化合物の同定は困難であった。一方、*o*-ニトロベンジル部位を光応答性部位として導入したプロドラッグについては、 $^1\text{H}$  NMR によりその分解反応を追跡したが、薬物分子の遊離は確認できなかった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Kengo Hanaya, Jun Ohata, Mary K. Miller, Alicia E. Mangubat-Medina, Michael J. Swierczynski, David C. Yang, Reece M. Rosenthal, Brian V. Popp, Zachary T. Ball. "Rapid Nickel(II)-Promoted Cysteine S-Arylation with Arylboronic Acids." *Chem. Commun.* **2019**, 55, 2841-2844. (査読有)  
DOI:10.1039/C9CC00159J
2. Kengo Hanaya, Mary K. Miller, Zachary T. Ball. "Nickel(II)-Promoted Amide N-H Arylation of Pyroglutamate-Histidine with Arylboronic Acid Reagents." *Org. Lett.* **2019**, 21, 2445-2448. (査読有)  
DOI:10.1021/acs.orglett.9b00759
3. Ryuji Tsunekawa, Kazuhiro Katayama, Kengo Hanaya, Shuhei Higashibayashi, Yoshikazu Sugimoto, Takeshi Sugai. "Synthesis of 5-Hydroxy-3,4,7-Trimethoxyflavone and Related Compounds and Elucidation of Their Reversal Effects on BCRP/ABCG2-Mediated Anticancer Drug Resistance." *ChemBioChem* **2019**, 20, 210-220. (査読有)  
DOI:10.1002/cbic.201800431.
4. Alicia E. Mangubat-Medina, Samuel C. Martin, Kengo Hanaya, Zachary T. Ball. "A Vinylogous Photocleavage Strategy Allows Direct Photocaging of Backbone Amide Structure." *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 8401-8404. (査読有)  
DOI:10.1021/jacs.8b04893.

### 〔学会発表〕(計 8 件)

1. 花屋 賢悟, 大畠 潤, Mary K. MILLER, Alicia E. MANGUBAT-MEDINA, Zachary T. BALL、ニッケル触媒を用いたス테인選択的アリール化、日本薬学会 第 139 年会、2019 年、千葉。
2. 花屋 賢悟, 大畠 潤, Mary K. Miller, Alicia E. Mangubat-Medina, Zachary T. Ball、Selective chemical protein modification with nickel(II) and arylboronic acid、日本化学会 第 99 春季年会、2019 年、兵庫。
3. 安井 将満, 大津 博義, 河野 正規, 花屋 賢悟, 須貝 威, 東林 修平、環状カルバゾール化合物の新規酸化的転位、第 53 回天然物化学談話会、2018 年、大阪。
4. 藤田 理愛, Mandal Susanta, 花屋 賢悟, 東林 修平, 須貝 威、配糖体から出発するメチル化フラボノイドの位置選択的合成、第 53 回天然物化学談話会、2018 年、大阪。
5. Kengo Hanaya, Jun Ohata, Mary K. Miller, Alicia E. Mangubat-Medina, Zachary T. Ball, "Selective chemical protein modification via Nickel(II)-catalyzed arylation with arylboronic acid", 第 20 回生体触媒化学シンポジウム、2018 年、神奈川。
6. 蜂須賀 ナナ, 佐々木 昭郎, 庄司 満, 須貝 威, 花屋 賢悟、刺激応答性リンカーを有するチオール応答性蛍光プローブの創製、日本薬学会 第 137 年会、2017 年、宮城。
7. Kengo Hanaya, Akio Sasaki, Mitsuru Shoji, Takeshi Sugai, "Development of self-immolative aminosulfonate linker for prodrug", 17th Tetrahedron Symposium、2016 年、Spain。
8. Kengo Hanaya, Akio Sasaki, Nana Hachisuka, Shin Aoki, Mitsuru Shoji, Takeshi Sugai, "Development of Aminosulfonate Ester-based Self-immolative linker for Application in Prodrug", International Symposium on Pure & Applied Chemistry 2016、2016 年、Malaysia。

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。