

## テルペノイド-アミノ酸結合体のプロドラッグ合成 Synthesis of terpenoid-amino acid conjugate prodrug

○住吉大輔<sup>1</sup>, 浮谷基彦<sup>2</sup>, 仁科淳良<sup>2</sup>\*Daisuke Sumiyoshi<sup>1</sup>, Motohiko Ukiya<sup>2</sup>, Atsuyoshi Nishina<sup>2</sup>

Abstract: Two oleanane-type triterpenoid-amino acid conjugates (**3** and **4**) were synthesized and evaluated their cytotoxicity against three human cancer cell lines (HL60, A549, and MKN45) and normal cell (WI-38). These compounds showed potent cytotoxicities against A549 and WI-38. In addition, for preparation of prodrug which generate cytotoxic compound after activation with  $\beta$ -glucuronidase, methyl[4-(hydroxymethyl)-2-nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside] uronate (**10**) was synthesized as intermediate.

### 1. 目的

がん(悪性新生物)は、現在の日本人の死因で第1位となっているため、がん細胞に対して活性のある新規抗がん薬の開発が求められている。その開発において天然化合物は、構造の多様性が高く多様な生理活性を示すため、リード化合物として利用されている。中でも、トリテルペノイドは薬用植物の成分として多く含まれ、豊富な薬理活性を示すことで知られていることから、多くの誘導体合成に関する報告がある<sup>1)</sup>。これまでに本研究室では、オレアナン型トリテルペノイドの一種、エリスロジオールにL-アラニンを経エステル結合(Fig. 1)することで腫瘍細胞傷害活性が向上することを報告した<sup>2)</sup>。しかし、本化合物は正常細胞にも傷害活性を示すことが分かっており、オレアナン型トリテルペノイドアミノ酸結合体の問題点と考えられた。

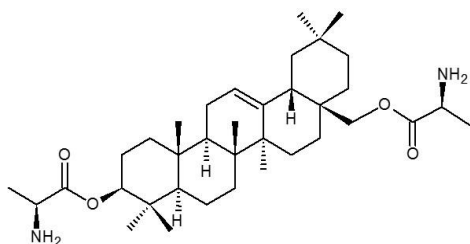


Fig. 1 エリスロジオール-L-アラニン結合体

そこで、本研究では、がん細胞に多く発現するとされる酵素であるグルクロニダーゼを利用したプロドラッグの合成戦略に注目した<sup>3)</sup>。プロドラッグとは体内で代謝されて効果を示す薬剤を言う。ここでは、アミノ基のプロドラッグ化に関する報告<sup>4)</sup>(Fig. 2)を基に、以下の3分子を結合した化合物を合成する計画を立てた；グルクロン酸(Trigger部)、4-ヒドロキシ-3-ニトロベンズアルデヒド(Linker部)、 $\beta$ -アミリン-アラニン結合

体(Drug部)。 $\beta$ -アミリンはオレアナン型トリテルペノイドの一種であり、水酸基が1か所にのみ存在することから、モデル分子として適切であると考え選択した。

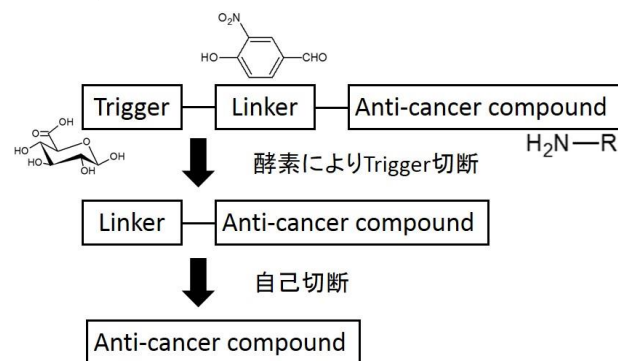


Fig. 2 酵素による自己切断型プロドラッグの概略

### 2. 方法

#### 2.1 $\beta$ -アミリン-アラニン結合体(L-, D-体)の合成

$\beta$ -アミリンアセテート(**1**)を5% KOH/メタノールに溶解し、加熱還流して $\beta$ -アミリン(**2**)を得た。 $\beta$ -アミリン(**2**)は、チオ炭酸 *O,O'*-ジ-2-ピリジル(DPTC)を縮合剤とし、4-ジメチルアミノピリジン(4-DMAP)存在下、*tert*-ブトキシカルボニル(Boc)-L-アラニンとトルエン中で反応して得た粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、 $\beta$ -アミリン-Boc-L-アラニン(**3'**)とした。 $\beta$ -アミリン-Boc-L-アラニン(**3'**)のBoc基を除くため、3M HCl/1,4-ジオキサン、ヘキサンを加え、遠心分離を行い $\beta$ -アミリン-L-アラニン結合体(**3**)を得た。同様に、Boc-D-アラニンを用いて反応を行い、 $\beta$ -アミリン-D-アラニン結合体(**4**)を得た(Fig. 3)。

各化合物の構造は、<sup>1</sup>H-NMR, HRMS, IR スペクトルデータを用いて確認をした。

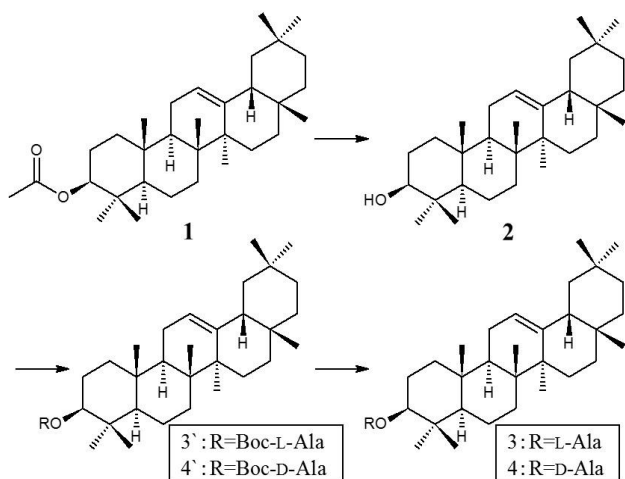


Fig. 3  $\beta$ -アミリン-アラニン結合体 (L-, D-体)の合成

### 2.2 プロドラッグ体の部分構造の合成

まず, Trigger 部 (Fig. 2)の合成を行った. D-グルクロノ-6,3-ラクトン (5)を無水酢酸, 酢酸ナトリウム存在下で反応し, 1,2,3,4-テトラ-O- $\beta$ -D-グルクロン酸メチルエステル (6)を合成した. 化合物(6)はジクロロメタン, 臭化水素 (33% 酢酸溶液)を用いて臭素化し,目的の構造を持った 1-ブロモ-2,3,4-トリ-O-アセチル- $\alpha$ -D-グルクロン酸メチルエステル (7)を得た (Fig. 4).

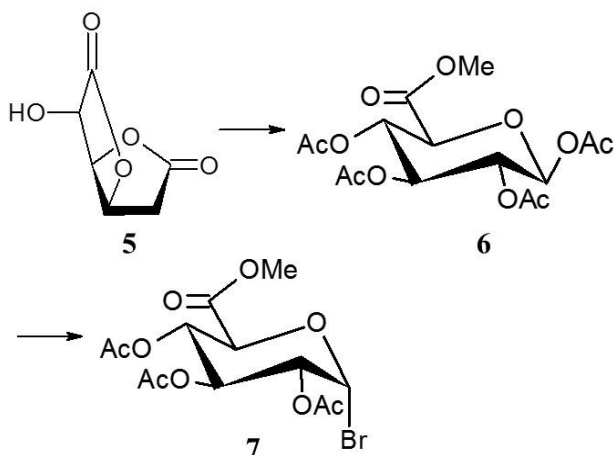


Fig. 4 プロドラッグ部分構造の合成① (Trigger 部)

次に, Trigger 部と Linker 部 (Fig. 2)の結合を行った. Trigger 部である化合物 7 を, 酸化銀存在下, 4-ヒドロキシ-3-ニトロベンズアルデヒド (8)と脱水アセトニトリル中で室温攪拌し, 4-ヒドロキシ-3-ニトロベンズアルデヒドのアセチルグルクロン酸メチルエステル配糖体(9)を得た. 化合物 9 は, イソプロパノール, クロロホルム中で水素化ホウ素ナトリウムにより還元し, 合成中間体(10)の合成までを行った (Fig. 5). 各化合物の構造は,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , HRMS, IR スペクトルデータを用いて確認した.

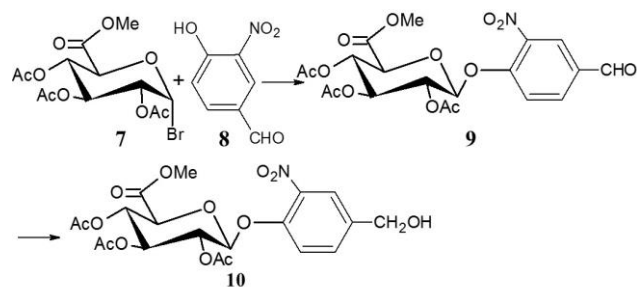


Fig. 5 プロドラッグ部分構造の合成② (Trigger-Linker 部の結合)

### 2.3 細胞傷害活性試験

96 well plate に 3 種のヒト由来腫瘍細胞株[HL60 細胞 (前骨髄球性白血病細胞), A549細胞 (肺がん細胞), MKN45 細胞 (胃がん細胞)] および 1 種のヒト由来正常細胞株[WI-38 細胞(肺線維芽細胞)] をそれぞれ  $3 \times 10^3$  cell/well で播種し, 24 時間培養した. 化合物を添加し 48 時間作用させた後, 0.5 % MTT 溶液を加え, 3 時間インキュベート後に 570 nm 及び 630 nm における吸光度を測定し, 50 % 生存阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}; \mu\text{M}$ ) を算出した.

### 3. 結果

2 種のオレアナン型トリテルペノイド-アミノ酸結合体を合成した (3, 4; Fig. 3). また, プロドラッグ合成に関わる部分構造を合成した (Fig. 4, 5). 合成した 2 種の化合物 3, 4 に関して細胞傷害活性評価を行った結果を Table 1 に示す.  $\beta$ -アミリン-アラニン結合体は, 既報<sup>2)</sup>で報告された化合物よりもアミノ酸結合部分が 1 つ少ない化合物であったが, A549 (肺がん細胞)に対しては元の分子よりも強い傷害活性を示し, かつ, WI-38 (肺正常細胞)にも強い傷害活性を示した. 従って, 予想通り選択性が低い化合物であることが分かった.

Table 1  $\beta$ -アミリン-アミノ酸結合体の細胞傷害活性

Compounds	Cytotoxicity( $\text{IC}_{50}; \mu\text{M}$ )			
	HL60	A549	MKN45	WI-38
$\beta$ -amyrin (2)	>100	>100	>100	>100
$\beta$ -amyrin-L-Ala (3)	>100	10.13	>100	7.56
$\beta$ -amyrin-D-Ala (4)	41.48	9.43	26.16	3.95
Cisplatin	4.2	18.4	3.92	20.1

### 4. 参考文献

- [1] D. J. Newman, *J. Med. Chem.* **51**, 2589-2559 (2008).
- [2] 石井卒論, 日本大学理工学部卒業論文 (2017).
- [3] F. Kratz, et al., *Chem. Med. Chem.* **3**, 20-53 (2008).
- [4] T. Legigan, et al., *J. Med. Chem.* **55**, 4516-4520 (2012).